

**Interferents endocrins,
una amenaça a l'ordre del dia**

Abans de començar m'agradaria fer referència a un seguit de persones que es mereixen aparèixer en aquesta plana i que sense ells res d'això hagués estat possible. Primerament, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Jordi Sunyer i al seu equip (CREAL), que des d'un principi va posar a la meva disposició un ventall de possibilitats per poder elaborar un projecte com aquest.

Vull agrair a la Mercè Bigorra la seva eficàcia alhora d'accelerar els tràmits per poder realitzar la meva estada.

També agraeixo als meus pares i persones properes el recolzament i la força que m'han donat durant aquest temps.

Agraeixo especialment la predisposició, l'ajuda donada, les ganes de seguir treballant que m'ha transmès i la paciència a la meva tutora de projecte al CREAL i al CRG, la Mariona Bustamante; que m'ha ensenyat tant en l'àmbit professional com personal.

Vull agrair finalment, i no com a menys important que els anteriors, a la meva tutora del treball de recerca, la Laura López, per tot el temps que m'ha dedicat, la constància, els consells i tota l'ajuda que m'ha aportat durant més de mig any.

“Per a què viatjar lluny, si no es pren un la molèstia d'intentar comprendre allò estrany”

Jorge Riechmann

Índex de continguts

Introducció.....	6
1 Hipòtesi de treball.....	8
2 Sistema endocrí.....	9
3 Interferents endocrins.....	11
3.1 Terme.....	11
3.2 Presagis.....	12
4 Exposició en humans.....	15
4.1 Experiment massiu.....	17
4.2 Mecanismes d'interferència.....	18
4.3 Evidències científiques de l'associació entre efectes en la salut i factors ambientals.....	19
4.4 Exposició infantil a interferents endocrins.....	20
5 Compostos com a interferents endocrins.....	21
5.1 Compostos organoclorats persistents com interferents endocrins.....	22
5.2 P,p'-DDT i els seus metabòlits	24
6 INMA.....	29
6.1 Cohorts INMA.....	30
7 DDT, DDE i pes al néixer.....	31
7.1 Antecedents científics i justificació del projecte.....	31
7.2 Plantejament del projecte.....	32
8 GSTs i CNVs	33
9 Material i mètodes	35
9.1 Cohort INMA.....	35
9.2 Genotips GST.....	35
9.2.1 Seqüència amplificada.....	35
9.2.2 Protocol PCR i gel d'agarosa.....	38
9.2.3 Observacions al gel d'agarosa	39
9.3 Metodologia de dades: Anàlisi estadística.....	40
10 Resultats.....	43
10.1 Resultats pràctics.....	43
10.1.1 Descriptius de la cohort.....	43
10.1.2 Determinants del pes al néixer.....	46
10.1.3 Determinants dels nivells de DDE.....	48

10.1.4 Anàlisi de l'efecte del DDE sobre el pes al néixer.....	49
10.1.5 Anàlisi de l'efecte del DDE sobre el pes al néixer segons els CNVs GSTT1 i GSTM1.....	51
10.2 Resultats de la investigació.....	53
Conclusions.....	56
Valoració personal.....	58
11 Bibliografia.....	60
Annex 1: Protocol PCR i gel d'electroforesi.....	65
Annex 2: Gràfics i diagrames.....	71
Anàlisi de variables.....	71

Introducció

La ciència per a mi ha estat sempre aquest desig de saber-ne més. Així doncs, volia enfocar el meu treball a aquest àmbit; però com tots sabreu, aquest no és precisament poc extens. Biologia general, genètica, medicina, química, totes les ciències em cridaven l'atenció. Cada setmana em plantejava temes nous, i tots em semblaven interessants, però potser massa repetitius o impossibles d'executar; no trobava un terme mig, allò que fos "inèdit" i que alhora em motivés per a realitzar-ne una recerca exhaustiva.

Finalment, vaig trobar el tema adient, els interferents endocrins; era un tema que englobava les meves expectatives temàtiques, tot i que em semblava un tema bastant allunyat del meu nivell, vaig decidir imposar-me el repte. Tractar un tema d'aquestes característiques, es faria feixuc, bàsicament perquè la majoria de gent no n'havia sentit a parlar mai. En part, és per aquest aspecte que em semblava un tema interessant sobre el qual realitzar una recerca, sobre el qual poder establir hipòtesis, investigar-ne i conèixer-lo a fons; o almenys, intentar-ho.

Interferents endocrins: substàncies que afecten el sistema hormonal; aquest era l'únic coneixement que tenia sobre el tema que havia de fer la recerca. Només n'havia llegit uns quants articles; així doncs vaig començar a recopilar informació i vaig adonar-me de que realment era un tema greu i preocupant en qüestions biològiques i químiques, i que hi havia els suficients casos estudiats per tal de poder elaborar un bon treball.

Pel que fa a la part pràctica del treball, volia que en tingués una estreta relació, que estudiés casos reals o una metodologia determinada que encaixés en el tema. Tant material com conceptualment, no tenia les eines per assolir una experiència empírica d'aquest tipus, així que vaig decidir que havia d'intentar per els mitjans que em fossin possibles, contactar amb alguna persona relacionada amb aquest estudi, per tal que

m'aconsellés sobre què podia fer. Al CREAL (Centre de Recerca en Epidemiologia Ambiental) i al CRG (Centre de Regulació Genòmica) em van rebre amb les portes obertes i van posar totes les seves eines i esforços a la meva disposició. Durant el mes de juliol vaig realitzar una estada al PRBB (Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona) on vaig tenir la sort de treballar en ambient científic sobre el tema que m'interessava; vaig viure l'esperit investigador en la meua pell. Vaig assistir a seminaris relacionats amb temes diversos, vaig treballar al laboratori i conèixer el funcionament d'aquest (aparells, extracció de dades i investigadors), vaig llegir molts articles i vaig iniciar-me en l'estadística. Es pot dir, doncs, que havia experimentat la ciència des de diferents punts de vista, i aquest fet em seria molt útil de cara al meu futur professional i alhora de redactar el treball. Tenia el tema, la informació teòrica i empírica, calia així, donar-li forma a tot plegat.

1 Hipòtesi de treball

La hipòtesi d'aquest treball és si determinades substàncies que es troben en el medi ambient per determinades circumstàncies (sintetitzades o derivades de processos industrials), afecten negativament la salut de la població.

Com que es tracta d'un camp molt ampli, m'he fixat en una substància concreta, el p,p'-DDE (diclorodifenildicloroetilè), un derivat del DDT (diclorodifeniltricloroetà), i en la seva afectació en el pes al néixer dels nadons d'un determinat grup poblacional exposat a aquesta substància; tenint en compte la codificació genètica dels individus.

2 Sistema endocrí

El sistema endocrí és el conjunt d'òrgans especialitzats que s'encarrega de regular una gran quantitat de funcions del nostre cos, com el creixement, la funció dels teixits o el metabolisme; mitjançant la síntesi i la secreció a la sang d'unes substàncies específiques anomenades hormones. Globalment, aquestes substàncies arriben, gràcies al torrent sanguini, als anomenats òrgans diana, sobre els quals desencadenaran una determinada acció. Així, el sistema està format per glàndules i cadascuna d'elles elabora unes hormones determinades que provoquen accions específiques sobre el teixit receptor. Actua com una xarxa de comunicació cel·lular que respon als estímuls alliberant hormones.

El sistema endocrí és l'encarregat de la coordinació del metabolisme en els mamífers. Les cèl·lules individuals d'un teixit detecten un canvi en l'entorn de l'organisme i responen segregant un missatger químic que passa a una altra cèl·lula, on s'uneix a una molècula receptora i desencadena un canvi en la següent cèl·lula.

Les transduccions de senyals són extraordinàriament específiques i sensibles. Cada tipus de cèl·lula té el seu propi ventall de receptors hormonals, que defineixen la gama de la seva resposta hormonal. L'especificitat de l'acció hormonal és conseqüència de la complementaritat estructural entre l'hormona i el seu receptor; aquesta interacció és molt selectiva, tant que hormones estructuralment similars tenen efectes diferents. L'elevada afinitat d'aquesta interacció fa possible que les cèl·lules responguin a concentracions molt baixes d'hormones, la qual cosa comporta que la interferència pugui causar-se per concentracions igual de baixes.

Cal destacar per la rellevància en aquest treball que les hormones, a més de dirigir i regular el nostre cos, tenen una gran importància en el creixement de l'embrió.

Els problemes que poden sorgir a partir d'un error en el sistema pot comportar greus repercussions en l'organisme, desenvolupant-se així malalties com el gegantisme, la diabetis, l'hipertiroïdisme, o determinats càncers, que poden causar la mort de l'individu.

3 Interferents endocrins

Alguns efectes adversos sobre la salut humana observats recentment podrien trobar una explicació en l'exposició a substàncies químiques amb capacitat d'alterar l'equilibri hormonal i, en conseqüència, contribuir a l'increment de determinats tipus de tumors, malformacions i disfuncions de l'aparell reproductor, així com el fracàs en la resposta immune o algunes formes de neurotoxicitat. L'evidència d'aquesta relació, documentada per exemple en algunes espècies salvatges, ha donat peu a la hipòtesi de la interferència endocrina.

3.1 Terme

Un interferent endocrí (*Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs*) és una substància química exògena capaç d'alterar l'equilibri hormonal, podent així provocar efectes adversos sobre la salut d'una de les persones exposades, animals o en els seus descendents. Aquestes substàncies poden ser la causa de perjudicis per a la salut com el càncer, alteracions del comportament i anomalies reproductives.

No va ser fins al 1991, en una conferència organitzada per la Dra. Theo Colborn, que es va proposar el terme *interferents endocrins* per anomenar aquest tipus de substàncies.

Aquest és un problema de salut mediambiental que qüestiona els paradigmes en què es fonamenta el control i la regulació de la utilització dels compostos químics, basats en l'estudi toxicològic per similitud química i efectes perjudicials, i que suggereix que alguns dels contaminants ambientals, introduïts mitjançant l'activitat humana, es comportin com hormones (o l'efecte contrari), alterin l'homeòstasi hormonal i originin un desequilibri en el balanç de determinades hormones (producció, alliberament, transport, metabolisme, unió, acció biològica, etc.).

Els interferents endocrins engloben un grup de substàncies químiques d'origen, estructura i utilitat molt diversa. En algunes ocasions, es tracta de compostos als que els assajos habituals de toxicitat no havien atribuït cap efecte important. A més, molts d'ells presenten gran estabilitat i inèrcia per a reaccionar químicament, és per això que reuneixen les característiques òptimes per a haver estat, i ser, empleats en grans quantitats i amb gran llibertat sense protecció mediambiental especial. En altres ocasions, es tracta de compostos coneguts per la seva bioacumulació i la seva persistència en les cadenes tròfiques, com és el cas dels POPs (*Persistent Organic Pollutants*) o contaminants orgànics persistents, sobre els quals s'han anat establint mesures de control adequades.

L'atribució d'una anomalia del sistema endocrí a una substància d'aquestes característiques és extremadament difícil; ja que en el funcionament d'aquest hi intervenen molts factors, no només les substàncies que en puguin alterar el seu funcionament.

Posteriorment, el Comitè d'Experts per a Toxicologia i Ecotoxicologia i Mediambient de la Unió Europea afirmava que la interferència endocrina no és un efecte toxicològic en si, com pugui ser el càncer o l'al·lèrgia, sinó una alteració de l'equilibri hormonal que pot, o no, conduir a una alteració patològica.

3.2 Presagis

Des de mitjans del segle passat, biòlegs i naturistes han anat documentant estranys i desconcertants problemes que patien animals de zones del món totalment diferents, aparentment sense cap tipus de connexió els uns amb els altres. Aquests problemes incloïen la pèrdua de la capacitat reproductora, mortalitats massives, deformacions en òrgans reproductors, aparició de tumors, comportaments sexuals anòmals i la disminució del sistema immunològic, entre d'altres. Alguns d'aquests problemes apareixien també en humans.

Al 1952, es va documentar la pèrdua de l'instint natural d'aparellament i de cria en el pigarg americà, l'única espècie d'àguila exclusiva d'Amèrica del Nord, de Florida (EUA), determinant que un 80% de les àguiles eren estèrils. A finals del 1950 les llúdries pràcticament van desaparèixer dels llacs d'Anglaterra.

A mitjans dels anys seixanta, les femelles de visó de les granges properes al Llac Michigan (EUA), no parien o perdien les seves cries al poc temps. El problema es va relacionar amb la presència de bifenils policlorats (PCBs) en els peixos amb què eren alimentades.

L'any 1970, es va observar que el 80% dels pollets de gavines platejades, *Larus argentatus*, del Llac Ontari (EUA), moria abans de sortir de l'ou i alguns presentaven deformitats molt similars a les observades en pollets tractats amb dioxines en experiments de laboratori. A principis dels 70, es va documentar que femelles de gavina occidental del sud de Califòrnia (EUA) formaven parella amb altres femelles.

A finals dels anys vuitanta, es va observar que només el 18% de caimans del Llac Apopka de Florida (EUA) eren viables i, a més, la meitat de les cries morien abans de que complissin els 10 dies de vida. El 60% dels mascles presentaven penis anormalment petits, és a dir, caràcters feminitzats. Les femelles adolescents presentaven deformacions als ovaris i el seu nivell d'estrògens en sang era el doble del normal. El cas és aquest, 10 anys abans s'havia produït un abocament incontrolat d'insecticides formats per dicofol i diclorofeniltricloroetà (DDT) des d'una fàbrica i havia arribat al llac.

A principi dels 90 els dofins del mar Mediterrani van patir una mortalitat massiva causada per una infecció vírica. Es va observar que els animals morts presentaven concentracions de PCBs entre dos i tres vegades superiors a les dels animals sans. Als 90, a Anglaterra, s'observa la feminització de peixos que vivien pròxims a un abocament provinent de les depuradores d'aigües municipals. Aquests peixos presentaven anomalies que no es trobaven en peixos que vivien en altres trams del riu.

És per això que es va sospitar que la causa podia estar relacionada amb la presència d'unes substàncies químiques provinents de la degradació de detergents i plàstics, els alquilfenols. Es va observar un cas similar en la no reproducció dels musclos gallecs.

La consciència de que determinats productes químics ocasionaven danys hi era, s'identificaven les substàncies que causaven el problema i, fins i tot es feien hipòtesis i prediccions, però calia encara lligar molts fils. Científiques com Rachel L. Carson i, posteriorment, Theo Colburn, van exercir un paper molt important alhora de resoldre aquest trencaclosques tan complex; el qual encara avui en dia s'està lluitant per acabar de resoldre. Tot i això, es va fer un gran pas alhora de trobar un punt comú entre la multitud de problemes patits per espècies tan diferents, afectades per compostos químics, que no tenien res en comú i localitzades en llocs tan distants del planeta.

De tot aquell batibull d'informació aparentment inconnexa, la Dra. Colburn, després de la seva llarga i exhaustiva investigació sobre el tema a tractar, va treure'n l'aigua clara. Tots eren problemes relacionats amb funcions controlades per hormones. Totes aquestes espècies animals patien alteracions en el funcionament del seu sistema hormonal o endocrí, ocasionat per la exposició prenatal a determinades substàncies químiques sintètiques.

Va ser, doncs, amb la publicació de *Silent Spring* (1962) quan es va prendre consciència de la importància que havia assolit la utilització i l'alliberament de determinades substàncies al nostre planeta; i no només això, sinó que ja es coneixien alguns efectes devastadors que es relacionaven amb aquests compostos.

4 Exposició en humans

En humans, l'exposició a interferents endocrins, és un fet ben demostrat, sobretot en els compostos químics mimetitzadors hormonals, que han captivat l'atenció dels investigadors per les seves característiques de lipofilitat i bioacumulació, però les evidències d'associació entre exposició i malaltia han estat més reservades. S'han anunciat algunes de les raons que dificulten l'establiment d'una relació de causalitat entre ambdós:

- La baixa potència hormonal dels compostos químics considerats interferents, sobretot quan es compara amb la potència de les hormones naturals
- El desconeixement absolut de l'efecte combinat d'aquestes substàncies químiques (si ja n'és difícil la detecció i l'establiment d'una relació causa-efecte amb una sola substància; amb la combinació d'aquestes substàncies apareixen combinacions infinites i això fa que es multipliqui el treball i els possibles efectes combinats que solen ser més potents que la suma dels dos efectes)
- El desconeixement dels mecanismes d'acció dels interferents sobre els diferents òrgans diana (al que cal sumar el desconeixement en el funcionament del sistema endocrí en si)
- L'intent, freqüentment associat al fracàs, d'associar exposicions a interferents amb malalties de causa multifactorial, de presentació transgeneracional, manifestades, en molts casos, en forma d'error funcional d'alguna activitat orgànica i de presentació tardana

Degut a que els nivells d'hormones circulants varien en funció de l'edat, sexe o temporalitat (moment precís en què es dona la mesura), qualsevol intent d'estimació realista de les conseqüències d'exposició als interferents cal que tingui present el patró hormonal de cada individu (tenint en compte una infinitat de paràmetres) i com petites variacions de la normalitat d'aquest, poden afectar a la funcionalitat del sistema en la seva totalitat.

És per aquesta raó que cal evidenciar la distinció entre interferents endocrins i interferents endocrins potencials, utilitzant aquesta segona accepció a aquells compostos químics dels quals en manca informació sobre els efectes *in vivo*, tot i que la seva activitat hormonal en assajos *in vitro* així ho indiqui. D'aquesta manera, un interferent endocrí no és nomenat d'aquesta manera fins que no s'ha evidenciat en l'animal intacte, que tingui una activitat com a tal.

Els interferents endocrins són un problema emergent de salut mediambiental que ha qüestionat alguns dels paradigmes en què es fonamenten el control i la regulació en l'ús dels compostos químics. S'ha suggerit que els interferents hormonals presenten característiques particulars que els fan diferents a altre tòxics mediambientals i que condicionen qualsevol aproximació a la relació de causalitat buscada entre exposició i malaltia. Aquesta forma especial de toxicitat podria relacionar-se amb les següents característiques:

- El moment de l'exposició és decisiu per a determinar el caràcter, la gravetat i la evolució posterior del efecte. Els efectes són diferents sobre l'embrió, el fetus, l'organisme perinatal o l'adult. Si actuen durant un període crític caracteritzat per una diferenciació cel·lular o per organogènesi, les lesions poden ser irreversibles.
- Els efectes poden no aparèixer en el moment de l'exposició. Les conseqüències es manifesten amb major freqüència en la generació següent que en el progenitor exposat. L'exposició embrionària pot tenir conseqüències que no s'evidencien fins a la maduresa de l'individu. El desenvolupament anormal no s'expressa necessàriament al naixement; els seus efectes poden romandre latents durant anys, o fer-se patents en la descendència en lloc dels individus exposats.
- No existeix un nivell de concentració precís per al desenvolupament de l'efecte toxicològic, o almenys, aquest nivell de concentració és molt inferior al reconegut com a límit de seguretat per a altres aspectes toxicològics diferents de la interferència endocrina.
- És possible l'acció combinada d'interferents endocrins que poden adquirir, en actuar conjuntament, un efecte paradoxal; ja sigui sinèrgic, antagònic o simplement additiu.

Així, globalment, alguns dels efectes documentats derivats de l'exposició a interferents són, entre d'altres, els següents: en dones exposades, càncer de mama, endometriosi, mort embrionària i fetal, malformacions en la descendència; en homes exposats, càncer de testicular, càncer de pròstata, reducció del recompte espermàtic; en filles de persones exposades, pubertat precoç, càncer vaginal, major incidència de càncers, deformacions en òrgans reproductors, problemes en el desenvolupament del sistema nerviós central, baix pes al néixer, hiperactivitat, disminució del coeficient intel·lectual; en fills de persones exposades, criptorquidia, hipospadies, reducció del recompte espermàtic, disminució del nivell de testosterona, baix pes al néixer, hiperactivitat, problemes d'aprenentatge, disminució del coeficient intel·lectual, danys neurològics.

4.1 Experiment massiu

Cal destacar un dels tràgics episodis de la història mèdica, que demostren que els éssers humans són vulnerables als compostos sintètics que trastornen l'acció hormonal, i confirmen que estudis realitzats amb animals, in vitro, han de servir d'advertència contra els perills que amenacen als humans.

Els anys trenta ja s'havia demostrat que l'alteració dels nivells hormonals durant l'embaràs era molt perillosa, sobre tot per al fetus que desenvolupava un ràpid creixement en l'úter.

Al 1938 va sintetitzar-se un compost que actuava sobre l'organisme de la mateixa manera que l'estrogen natural. Aquest compost, el dietilestilbestrol o DES, era descrit com un medicament meravellós amb multitud d'aplicacions possibles. Quasi immediatament, els investigadors començaren a administrar DES a dones que patien problemes durant l'embaràs, convençuts de que un nivell insuficient d'estrogen provocaria avortaments i parts prematurs. Es va dur a terme un experiment massiu amb éssers humans que va arribar a afectar a uns cinc milions de dones embarassades en Estats Units, Amèrica Llatina i altres parts del món.

Durant les dècades següents, els metges no només receptaven DES per a evitar avortaments, sinó que el van començar a recomanar-lo en embarassos sense problemes, per a suprimir la producció de llet després del part, per a alleujar símptomes de la menopausa, per a tractar l'acne, el càncer de pròstata, la gonorrea

infantil, com a anticonceptiu “del dia després” i fins i tot per a aturar el creixement de les adolescents que creixien més que el que dictava la moda.

El període de postguerra va ser una època d'optimisme prometedora, en la que tothom, des dels metges fins als agricultors, adoptava amb entusiasme noves tecnologies “miraculoses”.

Els experiments amb rates que ja avançaven possibles desastres, van ser vistos com a anomalies que només succeïrien en rosegadors.

Els efectes del DES no eren visibles en les mares tractades, sinó que s'evidenciaven en la segona generació. Aquest compost causava càncer vaginal, anomalies en el teixit de la vagina, greus deformacions en el conducte reproductor, possibilitat de patir embarassos ectòpics i avortaments prematurs, en dones i, per exemple, testicles no descendits, la conservació de parts del sistema reproductor femení, espermatozous anormals, trastorns en el sistema immunitari, quists a l'epidídim, en homes.

El moment de la exposició a la substància sembla ser més important que la dosi. Altres estudis confirmen que el compost no només actua en el tracte reproductor, sinó que també sobre altres parts de l'embrió en desenvolupament, com el cervell, la glàndula pituïtària, les glàndules mamàries i el sistema, provocant canvis permanents en totes elles.

Els efectes del DES en el desenvolupament, van deixar clar que el cos humà pot confondre una substància artificial amb una hormona.

Medicaments i altres substàncies que gairebé no tenen efecte sobre els adults, poden provocar greus danys permanents a un nadó durant el seu ràpid procés de desenvolupament prenatal.

4.2 Mecanismes d'interferència

Encara avui és un misteri la raó per la qual una hormona i una altra substància; sent estructuralment diferents, poden, per exemple, exercir la mateixa acció sobre una cèl·lula.

Aquests compostos químics tenen mecanismes d'interferència diferents:

- Poden mimetitzar l'activitat biològica d'una hormona endògena, unint-se a un receptor cel·lular (efecte agonista).
- Poden unir-se a un receptor sense activar-lo, prevenint o impedit que ho facin les hormones naturals (efecte antagonista).
- Poden alterar els nivells d'hormones presents en el flux sanguini, interferint amb les proteïnes de transport.
- Poden interferir en els processos metabòlics de l'organisme, afectant la síntesi o la lisi de les hormones.
- Poden modificar l'activitat transcripcional dels gens relacionats amb hormones i receptors.

4.3 Evidències científiques de l'associació entre efectes en la salut i factors ambientals

En éssers humans, la interferència endocrina s'associa a alguns canvis aparents de caràcter perjudicial, que s'han produït en els patrons de salut humana, a escala mundial, en les últimes dècades. Aquests efectes inclouen el descens en els nivells d'espermatozous, increment en les malformacions congènites en nens (hipospadies i criptorquídies), càncer relacionat amb disfuncions hormonals (de mama i d'ovari en dones, i testicular i de pròstata en homes). També s'ha detectat un avanç en la pubertat d'adolescents que viuen en àrees contaminades i trastorns en el desenvolupament neurològic i conductiu.

Aquests efectes s'han observat sense que s'hagi pogut establir de forma clara una relació causal entre l'exposició a EDCs i les patologies descrites. Una de les majors dificultats és la correcta avaluació de l'exposició, ja que cal tenir en compte la intervenció de diversos factors externs. Tot i això, cal també considerar que en la detecció de l'activitat interferent en compostos químics només s'han desenvolupat assajos per a comprovar activitat hormonal androgènica i estrogènica, però no hi ha assajos harmonitzats per a la identificació d'altres efectes interferents. També cal exercir importància en el fet que, els estudis dels efectes adversos sobre la salut o el medi ambient generats per exposició a compostos químics, en general, es realitzen sobre compostos específics, ja que hi ha una manca en el desenvolupament de tests

que tinguin en compte la multiexposició a baixes dosis de diferents compostos químics de forma simultània.

4.4 Exposició infantil a interferents endocrins

Gairebé tots els nounats en qualsevol lloc del món presenten nivells detectables de compostos orgànics persistents. L'ús local d'aquests químics té efectes globals que poden arribar a ser més intensos en zones allunyades que no pas on s'han fet servir. Els nens són més vulnerables a l'entorn que els adults, ja que la majoria dels seus sistemes estan en formació.

Els factors d'origen de moltes malalties cròniques s'acumulen en l'organisme des de les primeres etapes de la vida, i tot el que ens passa en les etapes embrionària i fetal és d'importància vital. Així, hi ha un bon nombre de malalties en la infància associades amb un entorn contaminat. La contaminació ambiental contribueix a afectar el desenvolupament, en diferents àmbits, dels infants.

L'exposició infantil a compostos hormonalment actius troba en l'etapa intrauterina una de les seves fases més crítiques. Està ben documentada la mobilització de greix corporal matern que té lloc durant l'embaràs. Això suposa un important alliberament a la sang de compostos que la mare ha acumulat en el seu teixit adipós, fonamentalment degut a la solubilitat i a la persistència d'aquests, anys d'exposició a través de diverses fonts: alimentària, ambiental, laboral, etc. A través de la placenta el fetus s'impregna de l'exposició històrica de la mare a aquests compostos, que passen així a acumular-se en el seu propi teixit adipós. És per això que s'estan centrant investigacions i estudis en aquest camp.

L'exposició intrauterina, perinatal i post-natal s'ha denunciat freqüentment, sobretot per a aquelles substàncies que passen lliurement per la barrera placentària o que són segregades en la secreció làctia. Tot i que les conseqüències a llarg plaç d'aquesta exposició primerenca no són ben conegudes, el cert és que les observacions experimentals i les dades provinents del món animal creen el clima apropiat per a pensar que l'assumpte és, almenys, digne de ser estudiat en profunditat.

5 Compostos com a interferents endocrins

Cada any es sintetitzen unes 50 substàncies noves, consegüentment, aquest fet fa augmentar la llarga llista de compostos que actuen, o podrien actuar, com interferents endocrins. Cal tenir en compte que, no només s'han de fer anàlisis toxicològiques, sinó que, com que són substàncies que es troben en “quarantena” de ser interferents, cal que s'efectuïn diverses proves que determinin si la substància afecta o no el sistema endocrí. Les substàncies entre elles són químicament diferents, factor que, en comptes d'acotar la regió de recerca, crea sospites en totes les substàncies noves.

S'ha documentat la presència d'interferents endocrins en productes de neteja (desinfectants, abrillantadors), de construcció (coles, plàstics), d'ús agrícola (pesticides, biocides) i com a conseqüència del seu ús es troben en éssers vius; entrant en l'organisme mitjançant la inhalació, la ingestió i el contacte.

Fins al moment s'han descrit més de deu grups de substàncies sintètiques pertanyents a diferents famílies químiques, que es comporten en models animals com a interferents endocrins i que potencialment s'acumulen en l'organisme humà. Principalment, es tracta de:

1. Compostos organoclorats, com per exemple el DDT i els seus metabòlits, dieldrí, clordecona, toxafè, endosulfà i metoxiclor. Els quatre primers són plaguicides ja prohibits en la major part dels països desenvolupats; l'endosulfà és un pesticida encara en ús al Brasil, Índia i Austràlia.
2. Alguns bifenils policlorats (PCB), utilitzats fins fa poc en transformadors elèctrics, com a olis refrigerants, i en altres aplicacions.
3. Bifenils polibromats (PBB) i èters de bifenils policlorats (PBDE), empleats com a retardadors de la flama en múltiples objectes de consum.
4. Bisfenol A i compostos clorats i bromats relacionats, empleats en la fabricació de plàstic policarbonat (envasos alimentaris i biberons), en resines epoxi (en

l'interior de llaunes de conserva), en fixadors dentals i en la composició de coles d'ús habitual, entre d'altres.

La majoria d'interferents es troben en la llista de contaminants orgànics persistents (POPs). Podem destacar també, els alquilfenols, els ftalats i els parabens, entre d'altres.

5.1 Compostos organoclorats persistents com interferents endocrins

L'acció hormonal no està limitada a les hormones naturals ni als compostos farmacèutics. Com ja s'ha comentat anteriorment, alguns contaminants químics mediambientals d'origen i estructura química molt diferent, poden actuar sobre l'homeòstasi hormonal. Així, un grup que destaca per la seva presència en aquest àmbit són els organoclorats.

Un compost organoclorat és un compost químic orgànic en el qual alguns àtoms d'hidrogen han estat substituïts per àtoms de clor units per enllaços covalents al carboni. La immensa majoria dels individus de les poblacions occidentals emmagatzemem en el nostre organisme quantitats apreciables d'aquests contaminants orgànics persistents. Aquesta contaminació, que engloba a tots els sectors de la població, és un fet amb una rellevància important des de la perspectiva de la salut. És habitual trobar un 80-90% d'individus amb nivells detectables d'un o més d'aquests compostos, fins i tot en nens i nenes acabats de néixer, doncs l'acumulació d'aquests agents químics en el teixit adipós durant la vida de la mare, suposa una font d'exposició per al nen, tant durant la gestació com a través de la lactància.

S'ha demostrat que molts d'aquests contaminants orgànics persistents es caracteritzen per la seva gran inèrcia química (baixa reactivitat en el medi, efectes biocides durant molt de temps, i bioacumulació), per la seva dispersió el que ha provocat que hagin contaminat àmplies zones del planeta, i per la seva dificultat d'excretar-se per el cos humà, en què tenen llarga vida mitjana, acumulant-se en els teixits adiposos.

Compostos organoclorats persistents com interferents endocrins

Els interferents endocrins bioacumulables arriben al nostre organisme a través d'una exposició ambiental gairebé inevitable i, possiblement, en dosis molt baixes. La via d'entrada és fonamentalment a través de la dieta, no només pel consum de productes vegetals, sinó per la ingesta de productes d'origen animal, concretament de les parts més greixoses d'aquests aliments; i fins i tot per l'aigua que consumim.

La manca a nivell nacional d'estudis representatius de zones geogràfiques àmplies i ben definides, que valorin l'exposició humana a agents químics ambientals en població sana, on s'integren dades d'anàlisis químiques d'aquests compostos, juntament a les dades clíniques, epidemiològiques i ambientals, ha portat a determinats grups d'investigació a desenvolupar una línia d'estudi respecte a aquest (com el CREAL).

Amb la diversitat de fonts d'exposició i la gran varietat de compostos químics sembla difícil assolir una acció global, no obstant, hem assolit diversos moments històrics, en el que destaca el Conveni d'Estocolm. Aquest conveni perseguia acabar amb la utilització de varis d'aquests compostos i reduir el d'altres. Entre els seus propòsits destacarem per la rellevància en aquest treball, la restricció de la producció i la utilització del DDT. El conveni estableix, a més, les condicions en les quals aquests compostos persistents actualment existents han de ser eliminats, prevé la incorporació en el futur d'altres compostos a la llista de substàncies que haurien d'eliminar-se i senyala els plans d'aplicació en cada país, que es revisaran de forma periòdica, constituint així un programa eficient d'eliminació i control dels compostos orgànics persistents. (Cal tenir en compte la actual utilització de compostos d'aquest tipus per a la eradicació de la malària).

Els principals compostos organoclorats que es classifiquen dins del grup d'interferents endocrins són els diclorodifeniletans (DDT, DDD, DDE, dicofol, metoxiclor), els ciclodiens, l'hexaclorobenzè i carboximides.

Degut a la seva diversitat estructural, els pesticides amb freqüència es classifiquen atenent a algunes de les seves propietats derivades del seu comportament davant els organismes vius, de la seva vida mitjana o del patró de degradació mediambiental (els plaguicides organoclorats s'inclouen dins dels compostos persistents).

Així, els pesticides classificats en funció de la seva persistència en el medi ambient, estan definits segons el temps necessari per a que un 75-100% del compost desaparegui del medi. L'escala de persistència distingeix entre: pesticides no persistents (d'1 a 12 setmanes); pesticides moderadament persistents (d'1 a 18 mesos); pesticides persistents (de 2 a 5 anys).

Tot i que inicialment la persistència d'aquests productes es considerà com una qualitat desitjable per a la seva utilització, ja que el seu efecte biocida durava més temps, passat el temps s'han posat de manifest els inconvenients d'aquest comportament ja que la seva alta lipofilitat juntament amb l'estabilitat química magnifica els efectes biològics indesitjables.

La majoria de països industrialitzats han prohibit la seva utilització després d'haver-se revelat els seus efectes adversos sobre la salut, no obstant això, degut a la seva persistència en els medis naturals i la seva lipofilitat, poden trobar-se encara avui en dia, fins i tot en individus no exposats de forma directa.

Respecte a aquest, el DDT no és més que un exemple d'aquesta gran família de pesticides organoclorats que comparteixen com a característica comú: la seva capacitat per a mimetitzar a les hormones naturals alterant l'homeòstasi hormonal del sistema endocrí, o el que és el mateix, produint un desequilibri en el balanç d'estrògens, andrògens, progestàgens i hormones tiroides, a través de mecanismes d'acció diversa.

5.2 *P,p'*-DDT i els seus metabòlits

El DDT (diclorodifeniltricloroetà; 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-età) va ser sintetitzat per Zeidler l'any 1874, tot i que va ser Müller (Premi Nobel de Medicina 1948) qui descobrí la seva acció insecticida. Aquest descobriment inicià una revolució en el camp dels plaguicides desencadenant la incorporació de productes derivats de la síntesi orgànica a la lluita contra plagues i malalties.

Va ser utilitzat en EUA per primera vegada l'any 1943 com a pesticida en campanyes contra la malària durant la II Guerra Mundial i estenent el seu ús en la vida civil a partir de 1945. El primer informe de presència de DDT en la llet animal va ser publicat el

1945, i el primer informe que parlava sobre DDT en greix humà i llet materna va aparèixer en 1948 i 1951. La restricció en la utilització de DDT no va arribar fins l'any 1969, set anys després de la publicació de "Silent Spring" de Rachel Carson. L'any 1972 el Govern d'EUA prohibí l'ús domèstic del DDT. No obstant això, es segueix utilitzant en algunes regions del món. Al ser el DDT un derivat clorat, s'obrí, al seu torn, un camí de recerca de matèries actives que contenen un o més àtoms de clor en la seva estructura, desenvolupant-se així un conjunt de productes, dels quals la llista encara no està acabada, i que ocupen un lloc d'importància en el total de plaguicides utilitzats.

El DDT és una molècula rígida i liposoluble amb una vida mitjana d'aproximadament 100 anys. S'acumula i es concentra; és per això que avui en dia es pot trobar al llarg de tota la cadena alimentària. Té una tensió de vapor molt baixa ($1,5 \cdot 10^{-7}$ mmHg) i una volatilitat molt escassa, la qual cosa, unida a la seva poca sensibilitat a la llum ultraviolada, explicaria la seva notable persistència al medi ambient. Degut a la ubiqüitat del DDT, tota persona nascuda a partir del 1940 ha patit una exposició al llarg de tota la seva vida al DDT i l'ha emmagatzemat en els seus teixits adiposos.

El DDT empleat en les formulacions no correspon a un producte pur, es tracta d'una barreja d'isòmers entre els quals el més abundant és p,p'- DDT, que contribueix en un 80% aproximadament; el segueix o,p'-DDT en un 20%, tot i que es poden trobar quantitats mínimes d'altres isòmers. Els *orto-para* isòmers són menys estables que les configuracions *para-para* pel què es troben en la natura en concentracions molt baixes. Respecte a el seu metabolisme, trobem diferències depenent de l'organisme en què aquest es doni. Així, en vertebrats, és comú la presència del producte d'oxidació DDA en orina i excrements, no obstant per a l'home, el DDT s'emmagatzema sota la forma de DDE (diclorodifenildicloroetilè; 1,1-bis (4-clorofenil)-2,2-dicloroetà), un derivat etilènic del DDT. El DDT és un compost bastant inestable que, per a adquirir un grau d'estabilitat major, sol transformar-se en DDE. Una tercera via de degradació del DDT, és la formació del derivat di-clor o DDD.

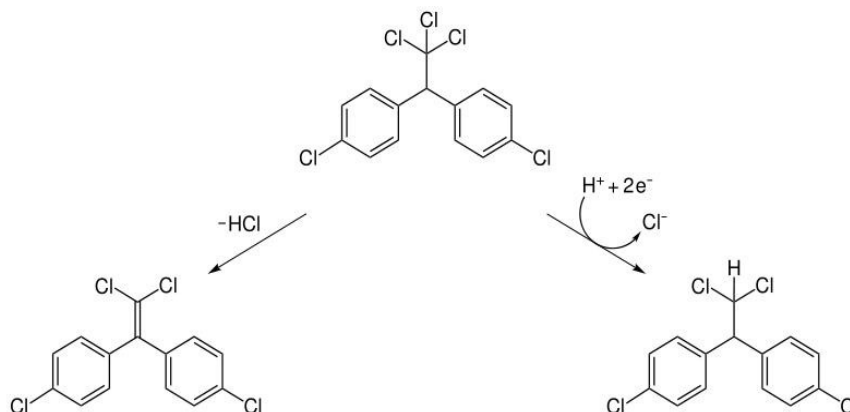


Figura 1: Esquema de la via de degradació del DDT per a formar DDE (per eliminació d'HCl, esquerra) i DDD (per declorinació reductiva, dreta)¹

Al p,p'-DDE, se li ha atribuït activitat estrogènica, així com, nivells menors d'activitats corresponent a diverses hormones, tenint així activitat antiandrogènica.

El DDE és el metabòlit del DDT més abundant i persistent en el medi ambient. Tant la potència estrogènica del DDT com la dels seus metabòlits s'ha avaluat mitjançant proves *in vivo* i *in vitro*.

Alguns animals i peixos metabolitzen ràpidament el DDT a p,p'-DDE i els éssers humans poden consumir el p,p'-DDE preformat en la dieta i acumular-se en el teixit adipós. No obstant, estudis realitzats en homes en el passat, mostren poca capacitat de metabolitzar DDT a DDE. La major part de p,p'-DDE acumulat en el teixit adipós humà prové de la ingesta de p,p'-DDE prèvia, més que de la transformació de DDT a p,p'-DDE. És per això que s'ha estudiat la relació entre la quantitat d'aquest metabòlit en individus que tenien uns nivells baixos de consum de peix, i els que en tenien un consum considerable. D'aquesta manera, s'han trobat nivells de DDE més elevats en persones que habiten en zones remotes de la terra (com els esquimals, grans

¹ Imatge extreta de *Wikipedia*: http://en.wikipedia.org/wiki/File:DDT_to_DDE_and_DDD.svg

consumidors de peix), que per aparença i lògica general, ens portarien a pensar que estan menys exposades a aquest tipus de contaminació. Aquest fet és degut a que alguns contaminant i nutrients tenen la mateixa ruta d'ingestió; el peix, la principal font d'omega 3, també porta organoclorats i metil mercuri. L'alimentació per lactància materna, que és l'única forma de nutrició durant el primer mes de vida, aporta tant nutrients com contaminants.

Tot i que els mecanismes de toxicitat d'aquests compostos no es coneixen, es pensa que els mecanismes metabòlics i hormonals, implicats en la neurotoxicitat d'aquests contaminants, es troben en el mateix camí que la deficiència d'alguns àcids grassos essencials.

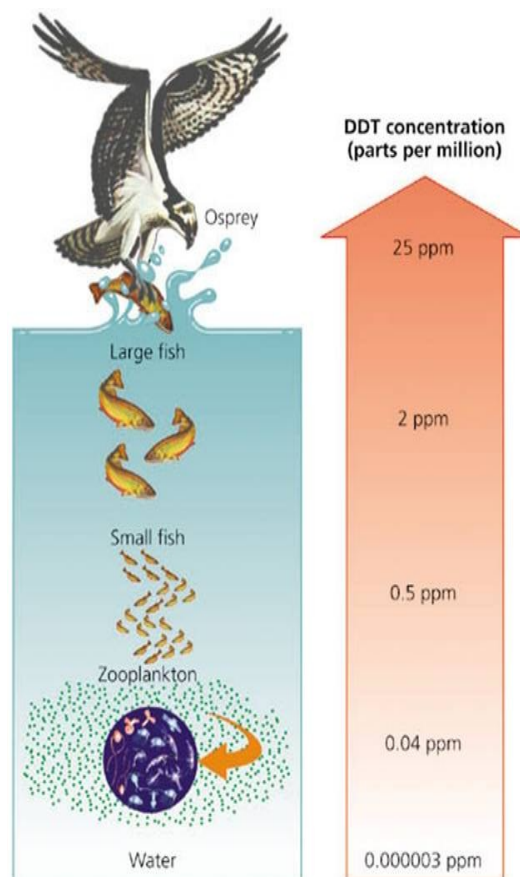


Figura 2: Esquema sobre l'acumulació de DDE en la cadena alimentària²

² Imatge extreta de: <http://nothingwillbealright.com/2011/05/26/biomagnification-applies-to-sadness-too/>

Estudis realitzats en dones embarassades mostren com la presència de DDT i DDE en sèrum matern és un factor que incrementa el risc de tenir fills anteriors a la setmana 37-38 de gestació; la placenta, no actua com a barrera entre mare i nadó, així, el percentatge d'organoclorat que tingui la mare estarà relacionat amb la quantitat d'aquest present en el nou individu.

Dins d'aquest grup cal anomenar també el metoxiclor. El seu espectre d'acció és similar al del DDT, que presenta acció més suau i menor toxicitat per als mamífers. Aquest compost es metabolitza més ràpidament i és més biodegradable que els anteriors. El metoxilclor presenta activitat proestrogènica, *in vivo* produeix efectes adversos sobre la fertilitat i sobre la activitat uterina en femelles; en mascles, s'ha vist una alteració del comportament sexual, quan han estat exposats en l'úter.

6 INMA

INMA (Infància i Medi Ambient) és una xarxa d'investigació de grups espanyols que van crear un projecte amb l'objectiu d'estudiar els principals contaminants que es troben en l'aire, l'aigua i la dieta durant l'embaràs i l'inici de la vida, i també els seus efectes en el creixement i el desenvolupament infantil. Així s'estudien les exposicions prenatales i al començament de la vida, incloent-hi la dieta, que s'associen amb la salut infantil i el desenvolupament humà, i predisposa efectes posteriors en adults.

L'afectació dels contaminants als nens és diferent a la que pateixen els adults, ells estan en procés de creixement; per tant, el seu sistema immunològic i els seus mecanismes de desintoxicació no estan completament desenvolupats. Aquest fet comporta que els nens siguin més vulnerables que els adults en les exposicions ambientals. L'exposició a contaminants ambientals per aire, aigua i alimentació és universal, fins i tot en llocs remots s'han trobat nivells considerables de contaminants. S'han relacionat els contaminants persistents, com ara els compostos organoclorats (OC), amb el retard en el creixement intrauterí, la prematuritat, el retard en el creixement postnatal i amb alteracions del neurodesenvolupament i de la conducta.

El projecte INMA té 3 objectius generals:

- Descriure el grau d'exposicions prenatales individuals a contaminants ambientals i també les dosis internes d'aquests contaminants durant la gestació i durant la infància a tot l'Estat Espanyol.
- Avaluar l'impacte de l'exposició, pre i post-natal, a diversos contaminants ambientals en el creixement, la salut i el desenvolupament dels infants durant un període que comprèn des de les etapes fetals fins a l'adolescència.

- Avaluar com alguns factors genètics i nutricionals poden alterar els efectes dels contaminants ambientals en el creixement infantil.

6.1 Cohorts INMA

El Projecte INMA està format per diferents cohorts (conjunt d'individus d'una població que comparteixen un determinat aspecte; en aquest cas, famílies embarassades sobre les quals s'ha elaborat un seguiment) a través de les quals s'assoleix l'experiència en casos reals per a poder formular diversos estudis a través dels quals poder extreure'n resultats i conclusions. Cadascun d'aquests grups va estudiar-se, i es continua estudiant, amb diferents objectius; la cohort de Ribera d'Ebre (n=102) és una àrea amb nivells elevats d'organoclorats i de mercuri, en què es va avaluar la relació entre l'exposició a aquests compostos i el desenvolupament neurològic dels infants; la cohort de Menorca (n=482), que va estudiar la relació entre la exposició primerenca a irritants de l'aire i al·lèrgens amb els desenvolupament d'al·lèrgia i asma; i la cohort de Granada (n=668), que va estudiar la incidència de trastorns reproductius en nens de gènere masculí en relació amb l'exposició a interferents endocrins. Posteriorment, i basat en l'experiència d'aquestes cohorts inicials, es van dissenyar noves cohorts, consegüentment nous estudis, per avaluar l'impacte de les exposicions ambientals en la salut infantil: València (n=855), Sabadell (n=787), Astúries (n=489) i Guipúscoa (n=637).

La població d'estudi són dones embarassades de la població general que viuen en cada àrea d'estudi i els seus fills.

S'han realitzat avaluacions extenses a les dones embarassades i als nens. La informació s'ha recollit a partir de qüestionaris, dades clíniques (exploració física; ecografies; mostres biològiques de sang, placenta, orina, saliva, llet materna, cabell i ungles; determinants de la dieta) i mesures ambientals.

Així, aquest estudi; el fet d'analitzar aquests compostos en les primeres etapes de la vida, obre un nou camí: la possibilitat d'aplicar mesures de prevenció per a exercir un canvi en el problema.

7 DDT, DDE i pes al néixer

7.1 Antecedents científics i justificació del projecte

Els nens necessiten d'un ambient que els permeti el seu desenvolupament físic, mental i social complert, al llarg de tota la seva vida (des de la concepció fins a l'adolescència). En l'actualitat es relacionen un nombre creixent de malalties, trastorns i anomalies en nens amb la exposició ambiental a contaminants. Existeixen coneixements científics, evidències, de que aquests tipus d'irregularitats s'inicien o promouen per l'exposició a compostos tòxics persistents, tals com els compostos orgànics persistents, en el període periconcepcional i prenatal. Les dones i els nens són especialment vulnerables a les exposicions a compostos químics del medi ambient; les dones, per la seva fisiologia i constitució, amb major contingut en greix corporal, i períodes més vulnerables, com la maternitat i la menopausa; els nens, tant per la immaduresa dels seus mecanismes immunològics i de detoxificació, com perquè els seus òrgans estan en formació. A més, durant l'embaràs es produeix una mobilització de compostos químics acumulats en els teixits adiposos, per la qual cosa les concentracions trobades en sang de cordó poden ser elevades. D'altra banda, en la llet materna s'acumulen els compostos orgànics persistents (COP), observant-se un augment dels compostos químics d'introducció més recent, com els retardants de flama i els compostos utilitzats en cosmètica.

Gran part dels coneixements científics existents sobre els efectes adversos de l'exposició prenatal a COP prové de l'experimentació animal amb compostos químics. Altra bona part del coneixements s'han obtingut per episodis d'enverinament massiu deguts a accidents. En canvi, un dels aspectes que pitjor es coneixen és l'efecte sinèrgic de l'exposició crònica a dosis baixes a múltiples COP.

7.2 Plantejament del projecte

Determinats estudis mostren que hi ha una relació entre la exposició *in utero* a contaminants orgànics persistents (POPs); tals com BB-153 i p,p'-DDE, i la disminució del pes al néixer del nadó i del període gestacional^{3 4}.

En aquest treball s'ha analitzat la relació entre el pes al néixer i la quantitat de p,p'-DDE (que té la capacitat de traspasar la barrera placentària) determinat en sang de cordó en la cohort de INMA-Menorca. En aquest anàlisi s'han tingut en compte covariables d'interès.

A més s'ha estudiat l'efecte en l'associació anterior segons la presència o la manca d'un determinat polimorfisme genètic, rellevant per la detoxificació cel·lular.

3 Morales E, Sunyer J, Castro-Giner F, Estivill X, Julvez J, Ribas-Fitó N, Torrent M, Grimalt JO, de Cid R. "Influence of Glutathione S-Transferase Polimorphisms on Cognitive Functioning Effects Induced by p,p'-DDT among Preschoolers". *Environmental Health Perspective*, Nov 2008

4 Wojtjtyniak BJ, Rabczenko D, Jönsson BA, Zvezday V, Pedersen HS, Rylander L, Toft G, Ludwicki JK, Góralczyk K, Lesovaya A, Hagmar L, Blonse JP; INUENDO research group. "Association of maternal serum concentrations of 2,2', 4,4'5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethylene (p,p'-DDE) levels with birth weight, gestational age and preterm births in Inuit and European populations". *Environmental Health Perspective* 2010

8 GSTs i CNVs

Els GSTs (*glutathione S-transferase*) són una família de gens que codifiquen per proteïnes involucrades en la detoxificació, de compostos exògens, mitjançant la unió d'un grup glutatió que fa els compostos més hidrofílics i més fàcilment excretables. Els gens GSTT1 i GSTM1, membres d'aquesta família, es troben en regions de número de copia variable (CNV).

Els CNVs (*Copy-number variations/variants*) són polimorfismes genètics, és a dir, variacions en la seqüència d'un lloc determinat del DNA. En concret són alteracions en el nombre de còpies d'una regió concreta del DNA. Els CNVs corresponen a regions relativament llargues del genoma (pot afectar des d'una kilobase fins a varies megabases) que poden haver estat eliminades (deleció), insertades, o bé, duplicades.

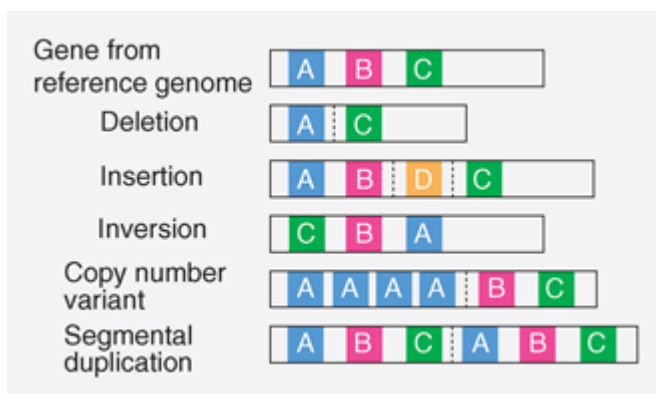


Figura 3: Representació dels Copy Number Variants⁵

Tot i que hi ha alguns CNVs rars que comporten malalties greus, els més comuns, és a dir, els que es troben més freqüentment en la població general, són simplement factors de susceptibilitat a la malaltia, però no determinants d'aquesta. (Aquesta anomalia no és considerada una mutació, ja que afecta a una quantitat de la població suficientment gran; sent, en determinades ocasions, més comú una deleció que no la presència.)

⁵ Imatge extreta de: *Annotation for CNV, Wang et al. 2007*

D'aquesta manera en la població general trobem individus amb 0, 1 o 2 còpies del gen *GSTT1*. Els individus amb 0 còpies no tenen la possibilitat de detoxificar determinats compostos, ja que en la zona en la qual tenen una deleció s'hi troba a la vegada la zona encarregada de codificar per a una proteïna que intervé en el procés de detoxificació cel·lular.

9 Material i mètodes

9.1 Cohort INMA

La cohort de Menorca va formar-se l'any 1997. Consta de 482 individus. Les dades que s'han analitzat pertanyen a la mare, al pare i al nadó, respectivament. En l'anàlisi s'han inclòs diferents variables confusores, ja que l'elaboració d'un estudi ajustat requereix la presència d'un nombre de variables determinat, per tal d'arribar a uns resultats més pròxims a la realitat. Així trobem les següents variables:

- Variable exposició: la mesura de DDE i DDT en sang de cordó
- Variables resposta: el pes al néixer
- Variables confusores (covariables): el pes maternal, l'alçada maternal, l'aspecte fumador en la mare, el pes i l'alçada paterna, l'edat gestacional, el sexe del nadó i la presència dels gens *GSTT1* i *GSTM1*.

9.2 Genotips GST

Per a determinar la presència o la deleció de GSTs cal tenir coneixement sobre la regió a la qual correspon de DNA. El procediment utilitzat per a identificar la manca o presència de la zona que inclou els gens *GSTT1* i *GSTM1* s'anomena PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Utilitzarem 3 regions del DNA per a la realització d'aquest procediment: el *GSTM1*, el *GSTT1* i la BGlobin. La BGlobin ens servirà com a control positiu.

9.2.1 Seqüència amplificada

Per a dissenyar una PCR que permeti amplificar les regions d'interès, cal conèixer de la seqüència nucleotídica d'aquestes. El coneixement de la seqüència completa del genoma humà va finalitzar-se l'any 2003. En l'anàlisi realitzada s'ha tingut com a patró

la seqüència corresponent a febrer de 2009, ja que no hi ha un únic model de genoma que sigui universal.

En la PCR no amplificarem la totalitat de la seqüència nucleotídica dels gens que codifiquen per *GSTM1* i *GSTT1*, sinó un petit fragment. Això ens serà suficient per a valorar la presència o absència d'aquests. El GST *GSTM1* es troba localitzat en el cromosoma 1, i amplificarem la regió entre 110034443 i 110034661 que té una extensió de 219 parells de bases. (Veure figura 4)

```

5' - GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGCtctactcagagtttctggggaagcggcc -3'
5' - GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
      |||
3' - cttgagggacttttcgatttcgagatgagtctcaaagacccttcgccgg -5'

5' - atggtttgccaggaacaaggtaaaggaggagtgatatggggaatgagatc -3'
3' - taccaaacgctcctttgttccatttcctcctcactataccccttactctag -5'

5' - tgttttgcttcacgtggttatggaggttccagcccacatattcttggcctt -3'
3' - acaaaacgaagtgcacaatacctccaaggtcgggtgtataagaaccggaa -5'

5' - ctgcagatcacttttgtagattttctcgtctatgatgtccttgacctCCA -3'
                                     |||
                                     3' -GGT

3' - gacgtctagtgaaaacatctaaaagagcagattctacaggaactggtggt -5'

5' - CCGTATATTTGAGCCCAAC -3'
      |||
      GGCATATAAACTCGGGTTG-5'

3' - ggcatataaaactcgggttg -5'

```

Figura 4: Representació de la seqüència de *GSTM1*

La cadena de color gris correspon al filament patró; les lletres majúscules corresponen als *primers* utilitzats en la PCR; i les lletres minúscules de color negre corresponen a la regió que s'ha d'ampliar durant el procés.

El *GSTT1* es troba localitzat en el cromosoma 22, en la zona 22706423-22706881, amb una extensió de 459 parells de bases. (Veure figura 5)

```

5' - TTCCTTACTGGTCCTCACATCTCcttagctgacctcgtagccatcacgga -3'
5' - TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
      |||
3' - aaggaatgaccaggagtgtagaggaatcgactggagcatcggtagtgcct -5'

5' - gctgatgcatgtgagtgtgtggcaggtgaaccactaggcagggggcc -3'
3' - cgactacgtacactcacgacacccgtccacttgggtgatccgtccccgg -5'

5' - ctggctagtgtgctgaagtcctgcttatgctgccacacccggctatggcac -3'
3' - gaccgatcaacgacttcaggacgaatacgcacgggtgtggcccgataccgtg -5'

5' - tgtgcttaagtgtgtgtgcaaacacctcctggagatctgtgggtcccaaa -3'
3' - acacgaattcacacacacgcttctgtggaggacctctagacaccaggggtt -5'

5' - tcagatgctgccatccctgccctcacaaccatccatccccagctctgtac -3'
3' - agtctacgacgggtagggtcgggtgtgttggttaggtagggtcagacatg -5'

5' - cctttccccacagcccggtgggtgctggctgccaagtcttgaaggccga -3'
3' - ggaaaaggggtgtcgggcacccacgaccgacggxrccagaagcttccggct -5'

5' - cccaagctggccacatggcggcagcgcgtggaggcagcagtgggggagga -3'
3' - gggttcgaaccggcacacccgcgctcgcgcacctccgctcaccctcct -5'

5' - cctctccaggaggcccatgaggtcattctgaaggccaaggacttcccac -3'
3' - ggagaaggctcctccgggtactccagtcgcgacttccgggtcctgaagggtg -5'

                                     3' - ACGACCGGTAC
                                     |||
5' - ctgcagaccccaccataaagcagaagctgatgccctgggTGCTGGCCATG -3'
3' - gacgtctgggggtggtatcttctcgcactacgggacccacgaccggtac -5'

      TAGGCCACT -5'
      |||
5' - ATCCGGTGA -3'
3' - taggccaact -5'

```

Figura 5: Representació de la seqüència de *GSTT1*

La BGlobin es troba en el cromosoma 11, en la regió 5204755+5205022. La seva extensió és de 268 parells de bases. (Figura 6)

```

5' - CAACTTCATCCACGTTACCCttgccccacagggcagtaacggcagacttc -3'
5' - CAACTTCATCCACGTTACCC -3'
      |||
3' - gttgaagtaggtgcaagtggaacgggggtgtcccgctcattgcccgtctgaag -5'

5' - tcctcaggagtcagatgcaccatgggtgtctgtttgaggttgctagtgaac -3'
3' - aggagtcctcagtcctacgtggtaccacagacaaaactccaacgatcactta -5'

5' - acagttgtgtcagaagcaaatgtaagcaatagatggctctgccctgactt -3'
3' - tgtcaacacagtccttcggttacattcgttatctaccgagacgggactgaa -5'

5' - ttatgccagccctggctcctgccctccctgctcctgggagtagattggc -3'
3' - aatacgggtcgggaccgaggacgggagggacgaggaccctcatctaaccg -5'

                                     3' -CA
                                     ||
5' - caaccctaggggtgtggctccacagggtgaggtctaagtgatgacagccGT -3'
3' - gttgggatccacacaccgaggtgtcccactccagattcactactgtcgga -5'

TGGACAGGAACCGAGAAG -5'
      |||
5' - ACCTGTCCTTGGCTCTTC -3'
3' - tggacaggaaccgagaag -5'

```

Figura 6: Representació de la seqüència BGlobin

9.2.2 Protocol PCR i gel d'agarosa

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un mètode que té com a objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un determinat fragment de DNA, en el nostre cas, per tal de poder identificar si l'individu presenta o no la regió GST. La tècnica es fonamenta en la propietat natural de les DNA-polimerases per a replicar DNA, utilitzant cicles d'altres i baixes temperatures alternades per a separar els filaments de DNA (hèlix) acabats de formar després de cada fase de replicació; tot seguit, es deixa que es tornin a unir a polimerases per a que tornin a duplicar-les. Va ser desenvolupada l'any 1986 per Kary Mullis. El protocol utilitzat en aquest projecte concret ens permet diferenciar si l'individu presenta o no presenta la regió, però no podem distingir si aquest presenta 1 o 2 còpies de la regió. **(Veure annex 1: Protocol PCR i gel d'agarosa)**

Així doncs, durant el procés s'han ampliat les regions que corresponien a fragments dels diferents gens d'interès (*GSTM1*, *GSTT1* i B-Globin (control positiu)). Hem obtingut moltes còpies de les regions d'interès i, depenent si l'individu presenta o no la regió; és a dir, si l'individu no presenta el gen *GSTT1*, no s'haurà ampliat ni copiat durant la PCR i, per tant, no podrem observar-ho. La finalitat del procés és poder separar els individus segons la presència dels gens, per a després estudiar els casos classificats i poder donar els resultats segons genotip. I, també, verificar o no la hipòtesi de la detoxificació per part dels GST, en el nostre cas.

Un cop obtenim el resultat de la PCR; el DNA ampliat i copiat moltes vegades, seguint un determinat protocol, cal córrer els resultats en gel (**Annex 1**). Per a verificar la correcte amplificació dels fragments d'interès mitjançant la PCR cal córrer un gel d'agarosa. El patró de bandes obtingut en el gel, ahora ens indicarà els genotips de cada un dels individus analitzats.

9.2.3 Observacions al gel d'agarosa

Per a conèixer els resultats obtinguts és necessari elaborar una fotografia del gel en qüestió. L'últim pou del gel contenia el marcador, el qual ens indica el nombre de bases que representa cada franja; és com un regle en què les unitats són la quantitat de bases. Com que coneixem el nombre de bases que ha de tenir cada fragment i els fragments que han de presentar les mostres analitzades (ja que coneixíem prèviament el genotip dels individus), podem quin genotip té cadascun dels individus estudiats.

Observacions:

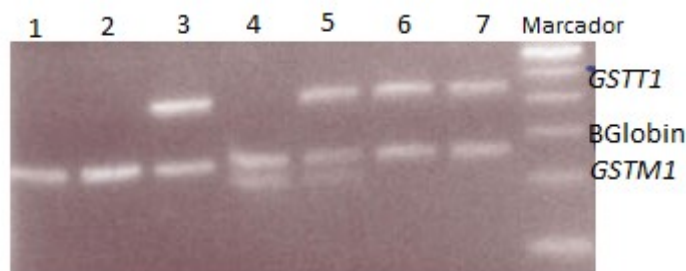


Figura 7: Fotografia del resultat del corrent de les mostres en gel d'agarosa

Taula 0. Presència de seqüències en mostres

Mostres	Presència BGlobin	Presència <i>GSTT1</i>	Presència <i>GSTM1</i>
1	Sí	No	No
2	Sí	No	No
3	Sí	Sí	No
4	Sí	No	Sí
5	Sí	Sí	Sí
6	Sí	Sí	No
7	Sí	Sí	No

9.3 Metodologia de dades: Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística és l'anàlisi de dades quantitatives o qualitatives que sorgeixen de l'estudi d'una mostra poblacional. Les dades s'obtenen mitjançant mètodes molt diversos (enquestes, entrevistes, mesures, etc.). Així, l'anàlisi estadística consisteix en descriure, analitzar i interpretar certes característiques d'un conjunt d'individus anomenat població. L'estadística és un sistema o mètode empleat en la recollida, organització, anàlisi i interpretació de les dades. Es divideix en dues fases; l'estadística descriptiva i l'estadística d'interferència.

1. Estadística descriptiva

La finalitat de l'estadística descriptiva és agrupar i representar la informació de forma ordenada, de tal manera que ens permeti identificar ràpidament aspectes característics del comportament de les dades.

Realitzant una anàlisi descriptiva podem conèixer millor les dades amb les quals haurem de treballar; s'encarrega d'analitzar i representar les dades. Aquest procediment ens permet analitzar de forma descriptiva les variables categòriques i contínues, mitjançant la generació de taules de freqüència, gràfics, entre d'altres.

Per a les variables categòriques, en el nostre cas, utilitzarem només la N (el nombre d'individus) i la freqüència de la variable en qüestió.

Per a les variables contínues, en canvi, podríem analitzar-ne diferents mesures estadístiques; com les mesures de tendència central (mitjana, mediana, moda i suma), mesures de posició no central (quartils, punts de tall i percentils), mesures de dispersió (desviació estàndard, rang, mínim, màxim, etc.) i mesures de distribució.

Per a la representació de les dades s'utilitzen diferents tipus de gràfics, en què cadascun d'ells presenta unes propietats específiques que s'utilitzen depenent de les variables que vulguem analitzar.

a. Histograma

Mitjançant un histograma obtenim un gràfic d'una variable en forma de barres, on l'altura de cada barra és proporcional a la freqüència dels valors que es representen. L'histograma s'utilitza per a mostrar les variacions quan es proporcionen dades contínues (temps, pes, temperatura, freqüència, etc.). Aquest tipus de gràfic de barres permet reconèixer i analitzar patrons de comportament en la informació que no són aparents a primera vista al calcular un percentatge o la mitjana. Un cop generat l'histograma cal analitzar-lo per tal de conèixer la distribució de les nostres dades. En general, les dades presenten una distribució normal; la majoria dels individus presenten valors corresponents als intervals intermedis, el que indica que la variació respecte a la mitjana és normal (es troba sota control i és manejable).

b. Diagrama de caixa o box-plot

Un diagrama de caixes és un gràfic basat en quartils mitjançant el qual es visualitzen un conjunt de dades. Aquest gràfic mostra informació sobre els valors mínim i màxim, els quartils Q1, Q2 (mediana) i Q3, i sobre l'existència d'*outliers* o valors atípics i la simetria de la distribució.

c. Diagrama de punts

En aquest tipus de gràfic, cada dada es representa amb un punt sobre la corresponent localització en una escala horitzontal de mesura. Permet, per exemple, analitzar la dispersió i detectar dades atípiques. Utilitzem el diagrama de punts per a determinar gràficament si dues variables tenen o no relació entre elles (per a la determinació numèrica realitzem una anàlisi de correlació de Pearson, per exemple).

2. Estadística d'inferència

L'estadística d'inferència busca donar explicacions al comportament o trobar conclusions d'un ampli grup d'individus a través de l'anàlisi d'una petita fracció dels seus components. Entre els diferents tests d'estadística d'inferència destaca la regressió lineal.

La regressió lineal és un model matemàtic utilitzat quan es requereix analitzar la relació entre dues variables (quantitatives). Els dos objectes fonamentals d'aquesta anàlisi són per una banda, determinar si aquestes variables estan associades, i en quin sentit es dona aquesta associació; per altra banda, estudiar si els valors d'una variable poden ser utilitzats per a predir i determinar l'efecte en el valor de l'altra.

En la regressió lineal trobem 2 tipus de variables: la variable dependent, situada a l'eix Y; i la/les variables independents situades a l'eix X.

Els models de regressió lineal poden ser simples (tenint una variable independent) o múltiples (tenint més d'una variable independent).

Aquests models ens aporten dos tipus d'informació. Per una banda podem estimar l'efecte de l'associació, és a dir, si per exemple analitzem l'associació entre el tabac i el càncer de pulmó, ens indica quantes vegades augmenta el risc de tenir càncer en els fumadors. D'altra banda també permet identificar si els nostres resultats són estadísticament significatius, és a dir, creïbles i per tant allunyats de l'atzar, per tal que puguem arribar a conclusions fiables. En el nostre cas, per a que un resultat sigui significatiu el p-valor (*p-value*) ha de ser inferior a 0,05.

10 Resultats

La diferències en termes de característiques i resultats entre l'estudi teòric i l'estudi pràctic, condueixen a analitzar-los per separat.

10.1 Resultats pràctics

10.1.1 Descriptius de la cohort

La cohort de INMA-Menorca consta de 248 nens i 234 nenes (Taula 1). En la variable que fa referència al sexe tenim un 48,5% i un 51,5%, sent el valor més elevat el corresponent als nens.

El 44,4% de les mares de la cohort són no fumadores i el 17,85 són ex-fumadores, mentre que el 21,2% van fumar durant l'embaràs. Observem també que un 44% no pateix exposició al tabac en el seu lloc de treball i un 11,2%, molta.

Respecte als gens, observem que el *GSTM1* es troba absent en un 57,2% dels casos i el gen *GSTT1* té una presència del 81%.

Taula 1: Variables categòriques

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>Freqüència (%)</i>
<i>Fumadora durant període gestacional</i>	482	
- <i>No fumadora</i>		241 (44,4)
- <i>Ex-fumadora</i>		86 (17,8)
- <i>Fumadora inicialment</i>		80 (16,6)
- <i>Fumadora durant embaràs</i>		102 (21,2)
<i>Sexe</i>	482	
- <i>Nena</i>		234 (48,5)
- <i>Nen</i>		248 (51,5)
<i>Fumadora passiva durant període gestacional (2a mà, a la feina)</i>	482	
- <i>No</i>		212 (44)
- <i>Esporàdic</i>		60 (12,4)
- <i>Una mica</i>		43 (8,9)
- <i>Molt</i>		54 (11,2)
- <i>No treballa</i>		113 (23,4)
<i>GSTM1</i>	411	
- <i>Deleció</i>		235 (57,2)
- <i>Presència</i>		176 (42,8)
<i>GSTT1</i>	411	
- <i>Deleció</i>		78 (19)
- <i>Presència</i>		333 (81)

La mitjana de pes matern pregestacional correspon a 59,23 kg i l'alçada a 161,1 cm aproximadament (Taula 2). Pel què fa el pare, el pes té la seva mitjana als 78 kg i l'alçada, als 175 cm. El p,p'-DDE s'ha mesurat en 405 individus, amb una mitjana d'aquest de 1,65 ng/mL. En el p,p'-DDT s'ha mesurat una quantitat mitjana de 0,19 ng/mL. En el pes al néixer dels nadons s'ha observat una mitjana de 3186,56 g; amb un mínim de 780 grams i un màxim de 4880 grams. La mitjana del període gestacional es troba en 39,28 setmanes.

Taula 2: Descriptius de les variables contínues de la cohort

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>Mitjana</i>	<i>Mediana</i> <i>(rang</i> <i>interquartílic)</i>	<i>Min- Màx</i>	<i>Desviació</i> <i>estàndard</i>
<i>Pes matern pregestacional (kg)</i>	475	59,23	58 (52,60-63,50)	38-132	9,99
<i>Alçada materna (cm)</i>	464	161,1	161 (157-165)	146-185	5,94
<i>Pes patern (kg) *</i>	407	77,9	76 (70-85)	53-120	11,37
<i>Alçada paterna (cm) *</i>	410	174,62	174 (170-180)	156-205	7,32
<i>P,p'-DDE (ng/mL)</i>	405	1,65	1,028 (0,57-1,9)	0,40-19,55	2,06
<i>P,p'-DDT (ng/mL)</i>	372	0,19	0,088 (0,04-0,22)	0,01-2,28	0,27
<i>Pes al néixer (g)</i>	482	3186,56	3200 (2900-3520)	780-4880	501,09
<i>Període gestacional (setmanes)</i>	481	39,28	40 (38-40)	27-42	1,76

* Mesurat 4 anys després del naixement del nen/nena

10.1.2 Determinants del pes al néixer

S'han analitzat diferents dades per a observar si aquestes influeixen en el pes al néixer del nadó.

- Sexe:

El sexe influencia en el pes del nadó; ja que els nens pesen 200 g més que les nenes (p-valor<0,001 , error estàndard 44,80; mitjançant anàlisi cru). (Veure figura 8)

Com podem observar en la *Figura 8*, el sexe del nadó influeix en el seu pes. D'aquesta manera, els nens presenten una mediana (percentil 50%) superior a la de les nenes; tenint aquestes últimes també un percentil del 75% i un percentil 25% amb valors inferiors als masculins. Els punts i els asteriscs representen els valors atípics; la franja superior, el màxim (el nombre que apareix és l'individu, el nombre que li correspon a la base de dades); la línia a continuació, el percentil 75%; en negreta tenim la mediana; tot seguit i tancant el rectangle, tenim el percentil 25%; i la línia inferior correspon al mínim.

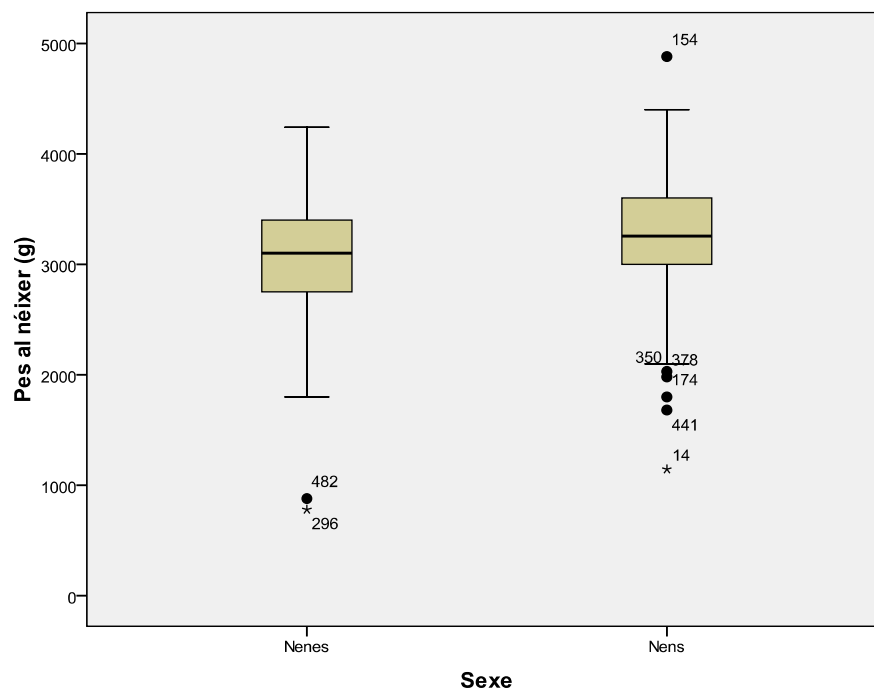


Figura 8: Diagrama de caixes. Pes al néixer-sexo

- Edat gestacional:

L'edat gestacional també és una variable que influeix en el pes del nadó. A mida que augmenten les setmanes de gestació, augmenta també el pes del nadó. **(Veure annex 2: Gràfics i diagrames)**

- Tabac:

Hem analitzat també dades respecte a l'exposició al tabac de les mares. Les mares no fumadores donen a llum uns nadons que pesen al voltant de 3200 grams; en canvi, les mares fumadores tenen fills que pesen al voltant de 150 grams menys (error estàndard 59,76; p-valor 0,012 mitjançant anàlisi cru). Les mares fumadores habituals, per cada cigarreta al dia que fumen, el nadó pesa 16 grams menys (p-valor 0,023, error estàndard 7,056 mitjançant anàlisi cru). En l'exposició passiva al tabac no s'ha observat que la variació de pes al respecte en sigui significativa. (Veure annex 2)

- Mesures antropomètriques del pare i la mare:

Hem analitzat també la influència del pes de la mare en el pes del nadó. Aproximadament, per cada kg que pesa la mare, el nen pesa 6 grams més (p-valor 0,012, error estàndard 2,29 mitjançant anàlisi cru). Ja que hem analitzat el pes de la mare, podem també fer-ho amb el del pare; però hem observat que és una associació no significativa. En canvi la talla del pare sí que influeix en el pes del nadó. Per cada cm d'alçada del pare, el nadó pesa 8 grams més (p-valor 0,011, error estàndard 3,4; mitjançant anàlisi cru). (Veure annex 2)

10.1.3 Determinants dels nivells de DDE

Com ja sabem, el DDE és un metabòlit del DDT; per tant esperem una clara relació entre ambdós. La regressió lineal ens mostra que estan correlacionats, donant-nos un p-valor $> 0,001$ (Figura 9).

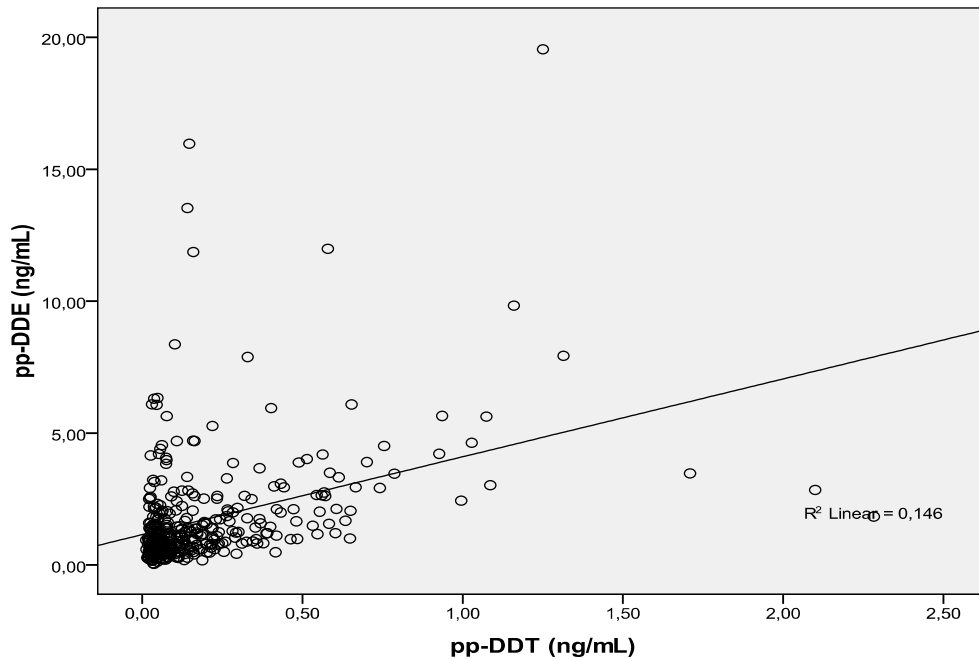


Figura 9: Gràfic de punts. DDE-DDT

El DDE és liposoluble i per tant s'acumula en teixit adipós; per això vam explorar si existia alguna relació entre el pes de la mare i els nivells de DDE en sang de cordó. Vam veure que per cada quilogram de la mare, es detectaven 0,7 ng/mL de p,p'-DDE en cordó (p-valor 0,002; error estàndard 0,220; mitjançant anàlisi cru). Així que a mida que augmenta el pes de la mare, ho fa també la quantitat de DDE. (Figura 10)

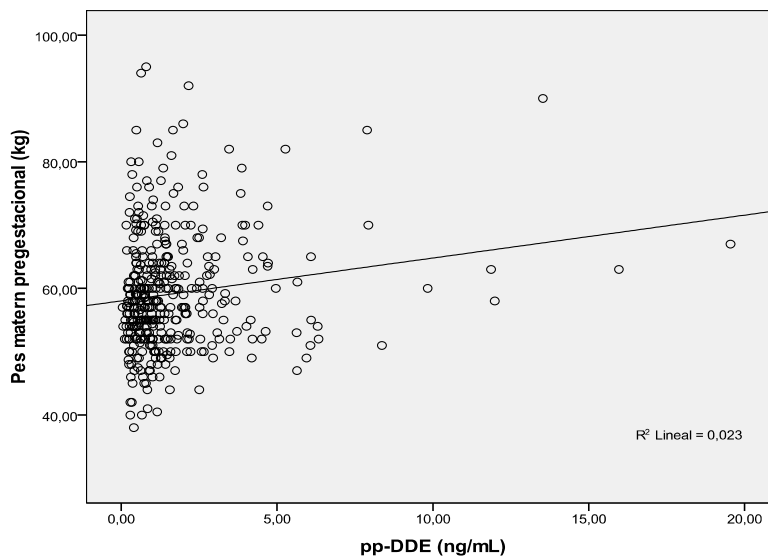


Figura 10: Diagrama de dispersió. Pes matern pregestacional-p,p'-DDE

10.1.4 Anàlisi de l'efecte del DDE sobre el pes al néixer

La nostra hipòtesi principal és que el DDE afecta al pes al néixer. En analitzar gràficament la relació entre DDE i pes al néixer, no observem cap relació notable (Figura 11).

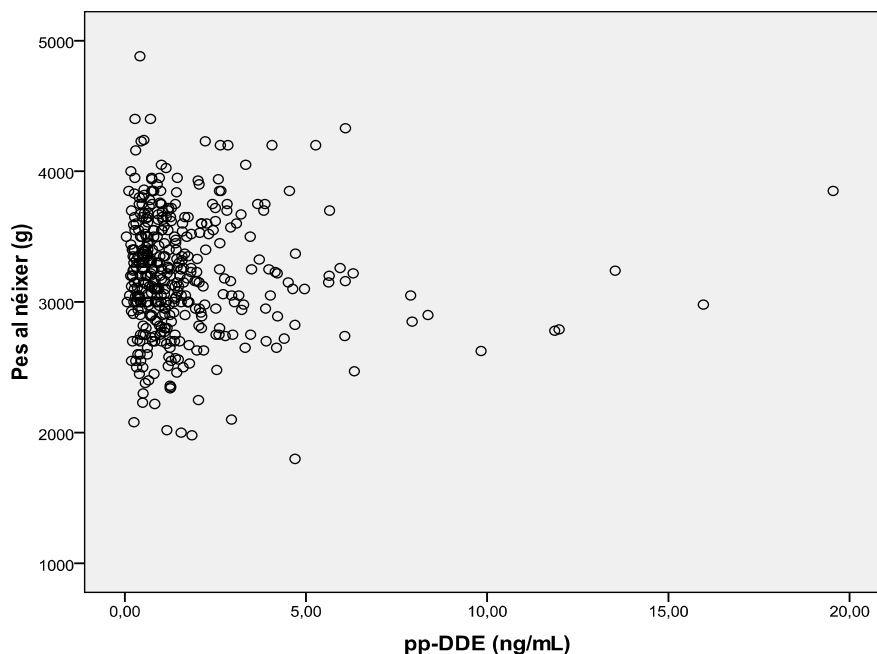


Figura 11: Gràfic de punts. Pes al néixer-DDE

En l'anàlisi en cru del pes al néixer respecte el p,p'-DDE observem que aquest disminueix el pes del nadó 7,63 grams per cada unitat d'aquesta substància mesurada en sang de cordó. No obstant, les dades no són significatives. (Taula 3).

Taula 3. Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer

Variable	Beta	Error estàndard	P valor
(Constant)	3223,355	29,113	0
P,p'-DDE (ng/mL)	-7,636	11,038	0,489

Com ja hem vist, hem detectat diversos factors que modifiquen el pes del nadó al néixer, ja sigui augmentant o disminuint-lo. Així establím un model ajustat que contindrà totes les variables que hem observat que afecten el pes al néixer amb un p-valor<0.05 i que podrien actuar com a confusores en l'associació entre el DDE i el pes al néixer. (Taula 4). Així doncs, incloem el pes matern pregestacional, l'alçada paterna, el període gestacional, el sexe i l'aspecte fumador matern; sent significatives. Com en l'anàlisi cru, el p,p'-DDE disminueix el pes al néixer, però els resultats segueixen sense ser significatius.

Al realitzar l'anàlisi ajustat, l'alçada de la mare ha esdevingut una variable no significativa, per tant no s'ha reincorporat al conjunt de variables en la nova regressió.

Taula 4. Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer tenint en compte covariables

Variable	Beta	Error estàndard	P-valor
(Constant)	-2134,035	768,559	0,006
Pes matern pregestacional (kg)	4,897	2,444	0,046
Alçada paterna (cm)	7,604	3,08	0,014
Període gestacional (setmanes)	93,692	14,56	0
Sexe	201,209	44,56	0
P,p'-DDE (ng/mL)	-14,206	12,979	0,275
Nombre de cigarrets/dia	-25,34	7,007	0

10.1.5 Anàlisi de l'efecte del DDE sobre el pes al néixer segons els CNVs GSTT1 i GSTM1

Anteriorment ja hem indicat la hipòtesi de la intervenció dels gens *GSTT1* i *GSTM1* en la detoxificació cel·lular. Per això hem mirat l'associació del DDE amb el pes al néixer per a cada grup d'individus amb un genotip concret (anàlisi estratificat).

Cap dels anàlisis estratificats per genotip va resultar significatiu tot i que tots ells presentaven a mostrar nivells inferior de pes al néixer en els individus més exposats a DDE. Els individus que no tenen el gen *GSTM1* pesen 8,2 g menys per cada unitat de DDE detectada en sang de cordó (Taula 5). Els individus que sí el presenten pesen 10 grams menys per cada unitat de DDE (Taula 6). Els individus que no presenten en el seu genotip el *GSTT1* pesen 5 grams més per cada unitat de DDE mesurada (Taula 7). Els individus que el tenen, pesen 11,65 grams menys per cada unitat d'aquest metabòlit del DDT (Taula 8).

Taula 5: Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer tenint en compte covariables. Anàlisi estratificat: 0 còpies de GSTM1

Variable	Beta	Error estàndard	P valor
(Constant)	-3269,731	1106,72	0,004
Pes matern pregestacional (kg)	5,495	3,689	0,138
Alçada paterna (cm)	7,012	4,519	0,123
Període gestacional (setmanes)	123,405	20,382	0
Sexe	236,348	64,285	0
P,p'-DDE (ng/mL)	-8,159	23,191	0,725
Nombre de cigarrets/dia	-17,383	10,399	0,096

Taula 6: Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer tenint en compte covariables. Anàlisi estratificat: 1 o 2 còpies de GSTM1

Variable	Beta	Error estàndard	P valor
(Constant)	-178,141	1256,519	0,887
Pes matern pregestacional (kg)	5,596	3,898	0,154
Alçada paterna (cm)	6,993	4,769	0,145
Període gestacional (setmanes)	47,28	24,253	0,054
Sexe	126,758	70,368	0,074
P,p'-DDE (ng/mL)	-10,286	16,699	0,539
Nombre de cigarrets/dia	-40,347	10,44	0

Taula 7: Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer tenint en compte covariables. Anàlisi estratificat: 0 còpies de GSTT1

Variable	Beta	Error estàndard	P valor
(Constant)	-3007,605	2053,03	0,149
Pes matern pregestacional (kg)	4,585	5,99	0,447
Alçada paterna (cm)	10,201	8,763	0,25
Període gestacional (setmanes)	106,263	41,476	0,013
Sexe	127,422	124,621	0,311
P,p'-DDE (ng/mL)	5,872	42,179	0,89
Nombre de cigarrets/dia	-37,365	25,484	0,148

Taula 8: Anàlisi de l'efecte del DDE en el pes al néixer tenint en compte covariables. Anàlisi estratificat: 1 o 2 còpies de GSTT1

Variable	Beta	Error estàndard	P valor
(Constant)	-2092,2	902,09	0,021
Pes matern pregestacional (kg)	5,354	3,031	0,079
Alçada paterna (cm)	7,077	3,579	0,049
Període gestacional (setmanes)	94,117	16,953	0
Sexe	200,037	52,968	0
P,p'-DDE (ng/mL)	-11,652	14,466	0,421
Nombre de cigarrets/dia	-25,724	7,738	0,001

Ja que en l'anterior anàlisi no he trobat relacions amb la hipòtesi de la detoxificació cel·lular, he continuat explorant les dades (considerant el p,p'-DDT); però els resultats han estat estadísticament no significatius.

Concretament, he analitzat el p,p'-DDT envers el pes al néixer tenint en compte les covariables i he observat que un, el *GSTM1*, sembla modificar l'efecte del DDT sobre el pes al néixer. Els nens amb la deleció de *GSTM1* pesen 50,3 grams menys per cada unitat de DDT mesurada. En canvi en l'anàlisi els nens amb el gen *GSTM1* pesen 5 grams més per cada unitat de p,p'-DDT mesurada. Tot i l'evident diferència entre les dades, que indiquen que la presència o la deleció del *GSTM1* influeixen en la concentració del p,p'-DDT, aquestes no són significatives.

En l'estratificació per *GSTT1* tampoc s'han trobat resultats significants.

Resumint podem dir que ni el DDE ni el DDT semblen influenciar el pes al néixer en la cohort de INMA-Menorca en conjunt, ni quan s'analitza tenint en compte possibles genotips de gens detoxificadors (*GSTT1* i *GSTM1*).

10.2 Resultats de la investigació

L'afectació de determinades substàncies al sistema endocrí és un fet investigat i documentat. Els estudis relacionats amb aquest camp han tingut una importància rellevant alhora de poder seguir cercant les causes de diferents anomalies que ens poden arribar a afectar en la nostra vida quotidiana. La contínua generació i desenvolupament en l'àmbit científic comporta el consegüent estudi empíric i analític, el qual indiqui els caràcters, en potència, d'actuació com a interferent. El fet de que ho faci d'aquesta manera, comporta l'estudi dels paràmetres que poden afectar al sistema endocrí, ja que aquest regula una infinitat de processos en l'organisme.

La complexitat en aquesta àrea d'estudi, causada pels trets que caracteritzen els interferents, provoca que les combinacions de variants i paràmetres sigui molt gran; la qual cosa alenteix l'aparició de resultats concrets. Tot i la gran importància d'aquest fet, en la investigació hi ha lloc per a la fallida en els resultats, ja que l'assaig i error fa que

la ciència sigui tal i com la coneixem. Així doncs, en l'estudi empíric realitzat en aquest projecte, no s'ha obtingut la intensitat en els resultats que qualsevol investigador desitja alhora de realitzar la preparació d'un estudi. Tot i aquest fet, s'ha pogut demostrar mitjançant la fiabilitat d'estudis, que, efectivament, determinades substàncies alteren l'homeòstasi del nostre sistema endocrí, tot provocant alteracions (ja siguin lleus o severes) en el desenvolupament del nostre organisme que està en un canvi continu, tot podent afectar-nos en potència o en acte; la qual cosa alteraria la nostra vida quotidiana de forma permanent. D'aquesta manera, trobem els resultats següents:

- L'exposició prenatal i postnatal a contaminants ambientals tenen efectes tant en el naixement (retard del creixement intrauterí, prematuritat, alteracions del desenvolupament neurològic) com sobre la salut en etapes posteriors de la vida, incloent la morbiditat en l'edat adulta per càncer, asma i al·lèrgies, malalties cardiovasculars, alteracions cognitives, etc. De la mateixa manera ho fan la dieta i la nutrició durant l'etapa fetal i primera infància (origen fetal de les malalties). (Barker DJ. The long-term outcome of retarded fetal growth. *Schweiz Med Wochenschr* 1999; Kogevinas *et al.* *International Journal of Epidemiology*, 2004) **(Veure bibliografia)**

- Els compostos orgànics persistents (COPs), incloent els compostos organoclorats i alguns metalls (plom i metil-mercuri), s'ingereixen principalment mitjançant el consum d'aliments greixosos com el peix i la carn. Els COPs s'han relacionat amb el retard del creixement intrauterí, prematuritat, amb el ritme de creixement postnatal i amb alteracions menors del desenvolupament neuroconductiu. (Ribas-Fitó *et al.* *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2001) (Torres-Arreola *et al.* *Annals of Epidemiology*, 2003) (Patandin *et al.* *Pediatr Res* 1998)

- El desequilibri hormonal provocat pels EDCs podria contribuir a l'etiopatogènia de trastorns funcionals i orgànics identificats com a factors de risc per a malalties d'aparició tardana. L'associació entre alteracions de la maduració genital masculina amb alteracions de la funció testicular i càncer de testicle o de menarquia precoç amb càncer de mama són un bon exemple de la hipòtesi d'exposició primerenca amb conseqüències posteriors. (Ibarluzea JJ *et al.* *Cancer Causes Control*, 2004) (García-

Rodríguez *et al.* Environmental Health Perspectives, 1996)

- La contaminació atmosfèrica (partícules i gasos) s'ha associat amb un increment de la mortalitat infantil i amb problemes de salut com asma i al·lèrgia. (Rumchev *et al.* Thorax 2004) Sobre la seva associació amb trastorns reproductius existeix menor evidència científica. (Lacasaña *et al.* European Journal of Epidemiology 2005)

- Els productes de desinfecció per a la potabilització de l'aigua, trihalometans, també s'han relacionat amb malformacions congènites i retards en el creixement intrauterí. (Wright *et al.* Environmental Health Perspective 2004)

- La llargada del nadó, el pes i el diàmetre del cap al néixer es veuen afectats pels nivells de PCBs, PBDEs als que es troben exposats a l'úter matern. (Tan *et al.* Chemosphere 2009)

- Els nivells en sèrum matern de concentracions en p,p'-DDE i bifenils afecten al pes al néixer i l'edat gestacional. (Wojtojtyniak *et al.* Environmental Health 2010)

- L'exposició intrauterina a p,p'-DDT influeix en el neurodesenvolupament del nadó. (Morales *et al.* Environmental Health perspective, 2008)

Com hem vist, els interferents endocrins afecten a la persona exposada, i als seus descendents. Les dades de diferents estudis ens mostren nivells de compostos orgànics persistents com a interferents endocrins en tot el planeta. És, en aquest sentit, un fet gairebé impossible evitar la contaminació d'un individu. Tothom té, en menor o major quantitat, una concentració d'aquests compostos en el seu cos. Com a mostra, en tenim l'estudi que s'ha realitzat en aquest projecte, en què els nadons acabats de néixer ja mostren concentracions d'aquestes substàncies.

Conclusions

En el nostre estudi experimental no s'han trobat evidències que mostrin que el p,p'-DDE o el p,p'-DDT afecten el pes al néixer del nadó, en la totalitat de les mostres analitzades (ni tenint en compte la variabilitat genètica dels individus; estratificant per genotip (*GSTT1* i *GSTM1*)). La literatura mostra que els EDCs afecten la salut, tot i que no està clar quins són els mecanismes a través dels quals ho fan; això requereix més investigació. Els resultats d'aquest estudi, i tenint en compte altres evidències científiques, ens portarien a la generació d'un de nou en què es consideressin variables com la dieta de la mare o s'analitzessin mostres extretes de teixit adipós (o alguna substància amb alt contingut en lípids, com la llet materna).

De la metodologia de treball utilitzada es pot concloure que és una tasca que requereix una alta rigurositat, racionalitat i constància. Alhora del disseny de l'experiment cal acotar les variables per tal d'obtenir resultats suficientment precisos per poder verificar, o no, la hipòtesi inicial; fet que comporta el coneixement d'estudis del camp en què es vol investigar. Darrere dels resultats de qualsevol estudi s'hi troba un gran esforç per part de tot un equip; l'obtenció de mostres, el seu tractament i l'anàlisi d'aquestes, ens mostren la interdependència a que el treball científic està sotmès: la investigació de laboratori no serviria per a res si ningú no analitzés les dades obtingudes; un estadista matemàtic no seria tal sense el disseny d'estudi realitzat per un investigador. El fet d'haver treballat en un ambient com aquest, permet copsar la complexitat d'una feina sistemàtica i exhaustiva; la interconnexió i coordinació de tasques que hi ha darrere del que a simple vista sembla un mer percentatge.

Tot i que en l'estudi realitzat no s'han trobat evidències d'associació entre interferent i efecte; altres estudis han indicat que les substàncies que actuen com a interferents endocrins tenen el poder de causar efectes en nosaltres i en el nostre entorn, permanents, durant un llarg període o, fins i tot, en els nostres descendents. Així doncs,

estudiant els casos d'afectació, podem verificar i justificar aquest fet. Els efectes són molt variats i depenen de moltes circumstàncies; per exemple, de les diferents substàncies que hi intervenen, que poden actuar de forma combinada (no estem exposats únicament a un sol compost), i de l'estat de l'individu estudiat (genètica, desenvolupament, comportament, hàbits, zona geogràfica, dieta, etc.). Així doncs, existeix en aquest fet una gran pluralitat i complexitat que comporta grans dificultats alhora de detectar i relacionar un efecte amb una substància determinada.

La síntesi de nous compostos xenobiòtics es dona a una velocitat massa elevada per a que es puguin dur a terme els tests adients per tal d'assegurar la fiabilitat en la utilització d'aquests compostos. A més, als interferents endocrins, que poden ser estructuralment diferents, cal efectuar-los-hi altres proves per corroborar o rebutjar l'efecte com a tal. Els mètodes que s'utilitzen es testen sobre animals, ja que de moment no hi ha una altra opció per a poder documentar els efectes *in vivo*. Arribats a aquest punt, se'ns planteja un dels dilemes ètics per excel·lència.

Valoració personal

Es tracta d'un tema que afecta a cadascun de nosaltres, però no en som conscients, i molts, ni en coneixíem el concepte. És per aquest fet que considero que cal seguir els nous camins que es van traçant, només així potser podríem avançar. Des del meu punt de vista personal, trobo absolutament necessari el recolzament de les institucions per poder obrir pas a la ciència, i sí, el que cal és recolzament econòmic. I sí, també sóc conscient que estem patint una crisi econòmica. No obstant, en temps de bonança i inici de la crisi, els projectes estatals creats per govern central respecte estudis sobre substàncies tòxiques no arribaven a donar-se o deixaven molt que desitjar. Es podria haver mobilitzat treball per a molta gent i generat coneixement socialment rellevant.

La ciència evoluciona, i aquest fet ens fa plantejar-nos la nostra vida, i l'estructura de la nostra societat. Es tracta d'un punt d'inici per pensar en els poders i llibertats; els interferents endocrins i les substàncies tòxiques persistents en general, plantegen un conjunt de qüestions d'autèntica rellevància social, cultural i econòmica. Els contaminants ens porten a pensar en altres grans temes (alimentació, ramaderia, medi ambient, transport, educació, consum, justícia, impostos, economia, condicions de treball, transparència, col·laboració entre sector privat i públic, poder i responsabilitats de les organitzacions ciutadanes, etc.). No sóc qui per a dir què, una mera estudiant de segon de batxillerat que expressa el seu punt de vista sobre un tema. Considero que cal, doncs, pensar amb total llibertat sobre les característiques i el futur de les nostres societats; sobre mètodes d'assolir més justícia, cultura, educació, coherència moral.

El desenvolupament de conflictes i plantejament de qüestions de diferents àmbits té el seu origen en situacions com aquesta, conflictes que s'han de pensar amb matisos, perquè no hi ha conclusions simples. Anàlogament, es planteja aquesta situació en el treball realitzat, (a una escala molt menor, es clar) quan comparem les concentracions de p,p'-DDE en la població espanyola; una persona pot tenir una quantitat 7600

vegades superior a la d'una altra persona. (Concentració més alta: 7838,21ng/g i més baixa: 1,02).

A part dels resultats, les conclusions i les diferents visions que aquest tema pot arribar a desenvolupar; personalment m'emporto la satisfacció d'haver treballat en vertader ambient científic; poder haver copsat el treball en equip; après a utilitzar uns mètodes, materials i maquinari, la gran paciència i metodologia amb què ha de bregar un científic, jo, en menor grau, quan la PCR no sortia correctament (i resultava que la temperatura de la màquina es descalibra amb un subtil canvi de la temperatura exterior); haver tractat amb situacions que no hauria trobat fins a la carrera universitària i haver après un munt d'aquesta fantàstica experiència, tant des del punt de vista conceptual i científic, com personal.

11 Bibliografia

- LLOVERAS i VALLÈS, Gonçal: *Enciclopèdia de medicina i salut*, HOYO i CALDUCH, J., Enciclopèdia Catalana, Barcelona, 1989-1991.
- DEVLIN, Thomas M.: *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones Clínicas*, Editorial Reverté, Barcelona, Segona edició, 2004.
- PERETÓ, Juli; SENDRA, Ramon; PAMBLANCO, Mercè; BAÑÓ, Carme: *Fonaments de Bioquímica*, Universitat de València, Barcelona, Cinquena edició, 2005.
- PORTA, Miquel; PUIGDOMÈNECH, Elisa; BALLESTER, Ferran: *Nuestra contaminación interna*, Editorial Catarata Madrid, 2009.
- CARSON, Rachel L.: *Primavera silenciosa*, Barcelona, 2001.
- COLBURN, Theo; DUMANOSKI, Dianne; PETERSON-MYERS, John: *Nuestro futuro robado*, Ecoespaña Editorial, Madrid, 1998.
- NELSON, David L.; COX, Michael M.; : *Lehninger. Principios de bioquímica*, Madrid, Ediciones Omega, Cinquena edició, 2009.
- PHILLIPS, Karen P.; FOSTER, Warren G.: "Key Developments in endocrine disrupter research and human health ", març de 2008.
- BUCHARD, Anders; SANCHEZ, Juan J.; DALHOFF, Kim; MORLING, Niels: "Multiplex PCR Detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Gene Variants", novembre de 2007.
- MORALES, Eva; SUNYER, Jordi; CASTRO-GINER, Francesc; ESTIVILL, Xavier; JULVEZ, Jordi; RIBAS-FITÓ, Nurua; TORRENT, Maties; GRIMALT, Joan O.; CID, Rafael de: "Influence of Glutathione S-Transferase Polymorphisms on Cognitive Functioning Effects Induced by p,p'-DDT among Preschoolers", novembre de 2008.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia; BOURGUIGNON, Jean-Pierre; GUIDICE, Linda C; HAUSER, Russ; PRINS, Gail S.; SOTO, Ana M.; ZOELLER,

- Thomas R.; GORE, Andrea C.: "*Endocrine-Disrupting Chemicals*", juny de 2009.
- FARHANG, Lili; WEINTRAUB, June M.; PETREAS, Myrto; ESKENAZI, Brenda, BHATIA, Rajiv: "*Association of DDT and DDE with Birth Weight and Length of Gestation in the Child Health and Development Studies, 1959–1967*", agost de 2005.
- WOJTYNIAK, Bogdan J.; RABCZENKO, Daniel; Jönsson, Bo AG; ZVEZDAY, Valentyna; PEDERSEN, Henning S.; RYLANDER, Lard; TOFT, Gunnar; Ludwicki, JAN; GÓRALCZYK, Katarzyna; LESOVAYA, Anna; HAGMAR, Lars; BONDE, Jens P.: "*Association of maternal serum concentrations of 2,2', 4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethylene (p,p'-DDE) levels with birth weight, gestational age and preterm births in Inuit and European populations*", 2010.
- BUCHARD, Anders; SANCHEZ, Juan J.; DALHOFF, Kim; MORLING, Niels: "*Simultaneously Detecting GSTM1 and GSTT1 Gene Copy Number and the Allelic Status of the GSTP1 Ile105Val Genetic Variant*", novembre de 2007.
- KOGEVINAS, Manolis; ANDERSEN, Anne-Marie N; OLSEN, Jorn: "*Collaboration is needed to co-ordinate European birth cohort studies*"; International Journal of Epidemiology, Agost 2004.
- RIBAS-FITÓ, N; SALA, M; KOGEVINAS, M; SUNYER, J: "*Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review*", Journal of Epidemiology and Community Health, 2001.
- TORRES-ARREOLA, Laura, BERKOWITZ, Gertrud, TORRES-SÁNCHEZ, Luisa; LÓPEZ-CERVANTES, Malaquías; CEBRÍAN E, Mariano; URIBE, Marisela; LÓPEZ-CARRILLO, Lizbeth: "*Preterm Birth in Relation to Maternal Organochlorine Serum Levels*", Annals of Epidemiology, 2003.
- PATANDIN, S; KOOPMAN-ESSEBOOM, C; DE RIDDER, MA; WEISGLAS-KUPEUS, N; SAUER, PJ: "*Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children*",

- Pediatr Res 1998.
- IBARLUZEA, JJ; FERNÁNDEZ, MF; SANTA-MARINA, L; OLEA-SERRANO, MF; RIVAS, AM; AURREKOETXEA, JJ: *Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. Cancer Causes Control 2004.*
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J; GARCÍA-MARTÍN, M; NOGUERAS-OCAÑA, Mm DE DIOS LUNA-DEL-CASTILLO, J; GARCÍA, M, OLEA, N: *Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. Environmental Health Perspective, 1996.*
- RUMCHEV, K; SPIKETT, J; BULSARA, M; PHILLIPS, M, STICK, S: *Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. Thorax 2004.*
- LACASAÑA, M; ESPLUGUES, A; BALLESTER, F: *Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. Eur J Epidemiol 2005*
- WRIGHT, JM; SCHWARTZ, J; DOCKERY, DW: *The effect of disinfection by-products and mutagenic activity on birth weight and gestational duration. Environmental Health Perspective 2004.*
- TAN, J; LOGANATH, A; CHONG, YS; OBBARD, JP: *Exposure to persistent organic pollutants in utero and related maternal characteristics on birth outcomes: a multivariate data analysis approach. Chemosphere 2009.*
- WOJTOJTYNIAK, BJ; RABCZENKO, D; JÖNSSON, BA; ZVEZDAY, V; PEDERSEN, HS; RYLANDER, L; TOFT, G; LUDWICKI, JK; GÓRALCZYK, K; LESOVAYA, A; HAGMAR, L; BLONSE, JP, INUENDO research group: *Association of maternal serum concentrations of 2,2', 4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethylene (p,p'-DDE) levels with birth weight, gestational age and preterm births in Inuit and European populations. Environmental Health 2010.*
- TAN, Jing; LOGANATH, Annamalai; SENG CHONG, Yap; OBBARD, Jeffrey P.: *"Exposure to persistent organic pollutants in utero and related maternal characteristics on birth outcomes: A multivariate data analysis approach"*, juny de 2008.

- OLEA, N; FERNÁNDEZ, M.F.; ARENQUE, P.; OLEA SERRANO, F.: "*Perspectivas en disrupción endocrina*", 2002.
- ESTRUCPLAN: <http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=302>, (consulta: 7-7-2011).
- GENOME BROWSER: <http://genome.ucsc.edu/> (consulta:13-7-2011).
- INICIATIVA SOCIALISTA: <http://www.inisoc.org/disrup.htm> (consulta:15-7-2011).
- SLIDE SHARE: *Disruptores endocrinos*
<http://www.slideshare.net/jesusarriagac/disruptores-endocrinos-desarrollo-sustentable-factores-ambientales-determinantes-de-la-salud> (consulta: 8-8-2011).
- SCIELO: *Gaceta Sanitaria* http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000300010 (consulta: 5-8-2011).
- BIBLIOTECA UNIVERSIA: *Disrupción endocrina*
http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/disrupcion-endocrina-perspectivas-ambientales-salud-publica/id/37807788.html (consulta: 17-8-2011).
- PROYECTO INMA: *Resultados*
http://proyectoinma.org/presentacion-inma/resultats_ca/index.php?thematic=100 (consulta: 19-7-2011).
- CREAL: *Projectes* <http://www.creal.cat/programes-recerca/projectes-creal/61/mcc-spain-estudio-multi-caso-control-poblacional-incluyendo-tumores-de-alta-incidencia-en-espana?prog=0> (consulta: 7-7-2011).
- SOSTENIBLE: *Un enverinament consentit. Efectes en la salut de la contaminació ambiental*
http://www.sostenible.cat/sostenible/web/noticies/sos_noticies_web.php?cod_idioma=1&seccio=3&num_noticia=438929 (consulta: 20-6-2011).
- Cancer y disruptores endocrinos* <http://www.youtube.com/watch?v=3bcxbxhATB8> (5,14 min).
- SCIELO:http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-91112002000300002&script=sci_arttext&lng=e (consulta: 8-9-2011).

WATERRF: *Contamination* <http://www.waterrf.org/Pages/WaterRFHome.aspx> (consulta: 29-12-2011).

COMRÀDIO: *Entrevista a Jordi Sunyer*

<http://comradioblocs.com/eureka/2011/05/15/jordi-sunyer-cada-dos-dies-mor-una-persona-per-contaminacio-a-barcelona/> (consulta: 16-6-2011).

MONOGRAFIAS: *Hormonas*

<http://www.monografias.com/trabajos26/hormonas/hormonas.shtml>
(consulta: 11-6-2011).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: *Endocrine Disruptor*

<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/EndocrineDisruptorKnowledgebase/default.htm> (consulta: 12-10-2011).

RESEARCH AND INNOVATION: *Endocrine Disrupter Research*

http://ec.europa.eu/research/endocrine/activities_links_en.html
(consulta: 20-7-2011).

TOXICOLOGY: *Alligators and endocrine disruptors at lake apopka*

<http://web.bryant.edu/~d1m1/sc372/readings/toxicology/toxicology.htm>
(consulta: 6-9-2011).

Llista de substàncies incloses en la Comunicació de la Comissió al Consell i al Parlament Europeu COM (2001) 262 final

Fotografia de la portada: Biomagnificació i bioacumulació <http://www.salman-khan.net/bioconcentration-vs-biomagnification&page=4>

Annex 1: Protocol PCR i gel d'electroforesi

La realització de la PCR comporta els següents passos:

- 1- Desnaturalització primària de la cadena: augment de la temperatura per tal de separar la doble hèlix de DNA (94-96°C, 5 minuts)
- 2- Desnaturalització secundària (94-96°C, 1 minut)
- 3- Anellament: s'uneixen els "primers" o encebadors (60-65°C, 1 minut)
- 4- Extensió: elaboració de la còpia per part de la polimerasa (72°C, 1 minut)
- 5- Repetició del cicle (passos 2, 3 i 4): unes 30-40 vegades per obtenir molta quantitat de molècules. (S'obtenen milions de còpies en pocs cicles, en comparació, ja que el procés es comporta de manera exponencial)
- 6- Extensió final: manteniment de la temperatura per tal de finalitzar la síntesi de les còpies (72°C, 5 minuts)
- 7- Emmagatzemament del producte (4-10°C)

Passos a seguir per a la preparació del gel d'electroforesi:

- 1- Preparar una dissolució d'agarosa en pols (2 grams d'agarosa en dissolució tampó TBE buffer 0,5X) 30 ml. Afegir 1 microlitre de SYBR Safe DNA gel stain (aportarà fluorescència)
- 2- Abocar la dissolució en un recipient d'electroforesi i col·locar-hi la pinta (que farà els pous per a poder introduir les mostres)
- 3- Deixar que el gel polimeritzi (es torna semi sòlid). Cal tapar-lo de la llum per aconseguir major eficàcia alhora de la realització de la fotografia.
- 4- S'omplen els pous amb les mostres (el resultat de la PCR amb tampó LB, a una concentració determinada, depenent de la concentració de DNA en les mostres inicials)
- 5- Es col·loca el recipient d'electroforesi en la màquina d'electroforesi (cobert amb dissolució tampó)

6- En l'últim pou aboquem el marcador, que serà com un regle de bases, per a saber la quantitat de parells de bases de cada mostra, i així determinar si l'individu presenta o no la regió de DNA

7- Es tanca la màquina d'electroforesi i es fa passar el corrent elèctric

Condicions de la PCR

Pre-PCR: S'ha de realitzar en una zona diferent a la de la part posterior de la PCR, ja que així es redueix el risc de contaminació de mostres. No cal oblidar que s'ha de tenir una rigorosa precisió i netedat (utilització de guants i bata, material esterilitzat, etc.)

- Reactius

Per a realitzar aquest protocol s'ha utilitzat: 82,24 microlitres d'H₂O; 12 microlitres de buffer 1,5mM Mg²⁺; 14,4 microlitres de dNTPs 1,25mM; 0,48 microlitres de cada primer (*GSTM1* F 0,48 microlitres 20pmol/microlitre, *GSTM1* R 0,48 microlitres 20 pmol/microlitre, *GSTT1* F 0,48 microlitres 20 pmol/microlitre, *GSTT1* R 0,48 microlitres 20 pmol/microlitre, b-Globin F 0,48 microlitres 20 pmol/microlitre, b-Globin R 0,48 microlitres 20 pmol/microlitre); 0,48 microlitres de Taq 5U/microlitre; 1 microlitre de cada mostra de DNA 100 ng/microlitre; 1 microlitre d'H₂O; tubs de PCR, gradeta, pipetes, puntes de pipetes, màquina de PCR GeneAmp PCRSystem, 7 microlitres de LB 6x.

- Procediment

Preparem la *mix* per a 8 mostres (n'utilitzarem per a 7): afegim a un *ependorf* 82,24 microlitres d'H₂O; 12 microlitres de buffer; 14,4 microlitres de dNTPs; 0,48 microlitres de cada primer i 0,48 microlitres de Taq (cal mantenir-la en fred).

Prenem uns tubs de PCR (una tira de 8) i afegim 14 microlitres de la mix a cada tub menys al vuitè. Posteriorment, havent numerat els tubs i els diferents DNAs, afegim 1 microlitre de cada DNA al tub corresponent. Al tub 7, no afegim 1 microlitre de DNA (uns 50 nanograms) sinó que afegim 1 microlitre d'H₂O que ens servirà de control negatiu. Tapem els tubs amb els taps corresponents i els portem a la màquina de PCR.

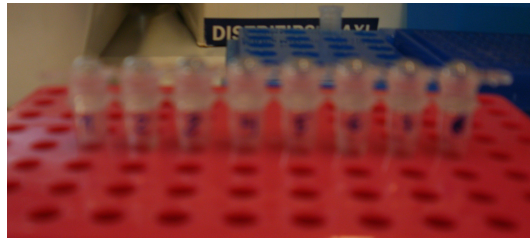


Figura 1': tubs de PCR numerats

El procés de PCR que hem utilitzat consisteix en una sèrie de 35 canvis repetits de temperatura, anomenats cicles; i cada cicle consisteix en 3 passos a diferents temperatures. Els cicles estan precedits per un xoc tèrmic, a alta temperatura (96°C en el nostre cas), i seguit per un *hold* al final del procés per a la extensió de producte final o per a un breu emmagatzematge. *Les temperatures emprades i el temps aplicat a cada cicle depenen de molts paràmetres (tipus d'enzims utilitzats, la concentració de dNTPs, la temperatura d'unió dels encebadors *primers*,...)

Els cicles de la PCR són els següents: primera fase on es dóna la desnaturalització primària a 96°C durant 5 minuts; cicle 3 fases on es dóna la desnaturalització (96°C durant 1 minut), l'anellament (64°C durant 1 minut) i l'extensió (72°C durant 1 minut) amb 35 vegades de repetició; i una tercera fase on es dóna l'extensió final a 72°C durant 5 minuts; posteriorment pot donar-se un termini de breu emmagatzemament a 4°C.



Figura 2': Màquina de PCR utilitzada

De la màquina de PCR obtenim el producte de PCR; s'han realitzat moltes còpies de la zona que s'havia acotat. Així, en la zona del laboratori de PCR, prenem una tira de tubs nova i la numerem. Afegim a cada tub buit, 5 microlitres de resultat de la PCR mantenint la numeració. A cada tub, ja amb els 5 microlitres del resultat de la PCR, li afegim 1 microlitre de tampó de càrrega, que aporta densitat a les mostres que faciliten el corrent en gel de les mostres, i color blau, que fa visible dues franges blaves que indiquen aproximadament per on es troba la mostra.

Per al corrent de les mostres ens cal preparar un gel d'agarosa. Preparam una dissolució d'agarosa al 2% (2g/100mL dissolució). Prenem 30 mL de la dissolució i hi afegim 1 microlitre de *SYBR Safe DNA gel stain* 10000x. En una placa per a preparar gels, hi posem la pinta de 8 cavitats i, amb els extrems coberts, afegim la dissolució. Deixem que el gel polimeritzi, tot evitant el contacte amb la llum, ja que el *SYBR Safe* és el component que s'intercala entre les cadenes de DNA per tal d'aportar la fluorescència a la mostra.

Un cop el gel ha polimeritzat, retirem la pinta i afegim, a cada cavitat, el contingut dels tubs nous; tot respectant la numeració inicial. En l'última cavitat, la vuitena, que està

buida, hi posem 2 microlitres de *100 bp Marker*, que ens servirà de patró per a saber el nombre de bases de les mostres.

Tenint les cavitats del gel plenes, retirem els plàstics dels extrems i introduïm el gel a la màquina de corriment de gel (per tal que es produeixi l'electroforesi). El DNA és ara negatiu i, quan l'exposem a un camp magnètic, aquest migra al pol positiu. Correm el gel a 100v, evitant el contacte amb la llum. Quan observem que l'última franja està a punt de desaparèixer, aturem el procés.

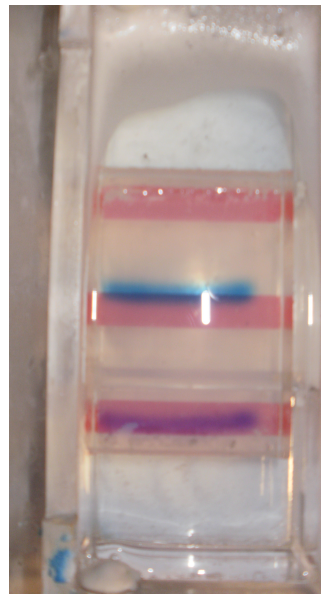


Figura 3' i 4': *Corriment de les mostres en gel d'agarosa*

Retirem el gel de la màquina on s'ha produït el corriment i retirem la plaqueta inferior, per tal de fer la fotografia al gel, exposant-lo a llum blanca i a raigs UV.



Figura 5': Màquina emissora de raigs UV per a la realització de fotografies de mostres fluorescents

Annex 2: Gràfics i diagrames

- *Anàlisi de variables*

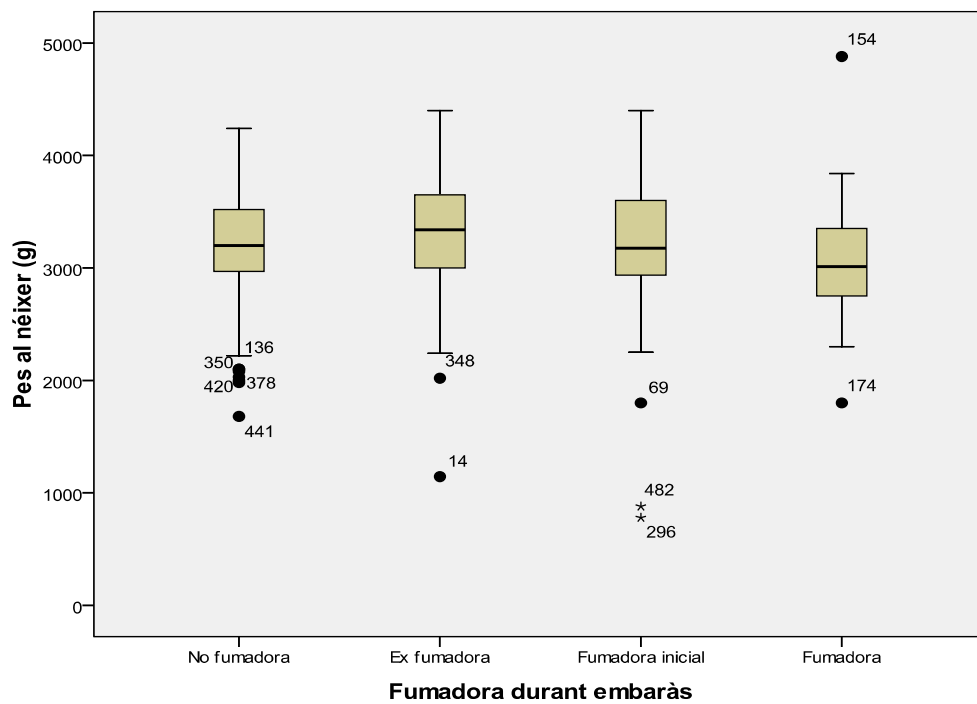


Figura 1'': Diagrama de caixes. Pes al néixer-mare fumadora

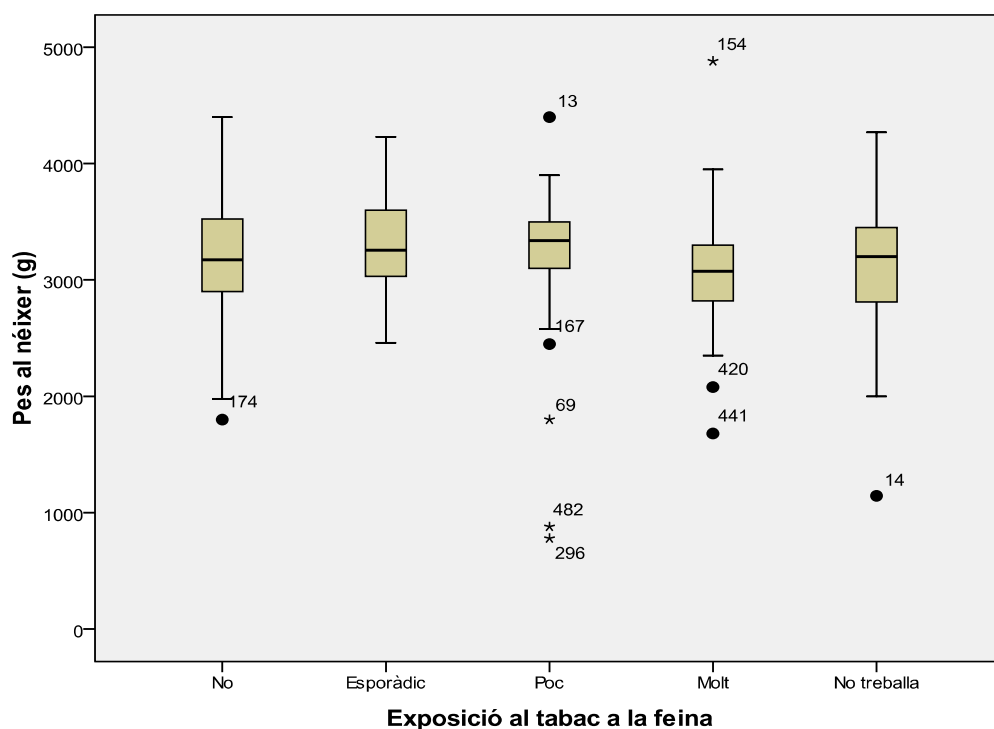


Figura 2'': Diagrama de caixes. Pes al néixer-exposició al tabac a la feina

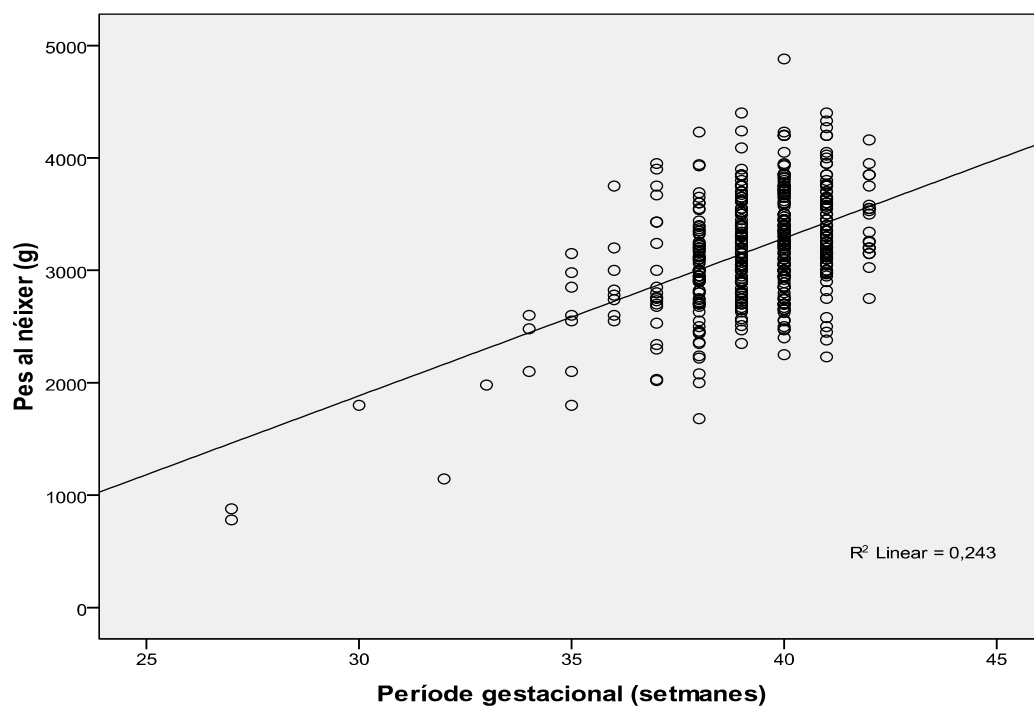


Figura 3'': Gràfic de punts. Pes al néixer-període gestacional.

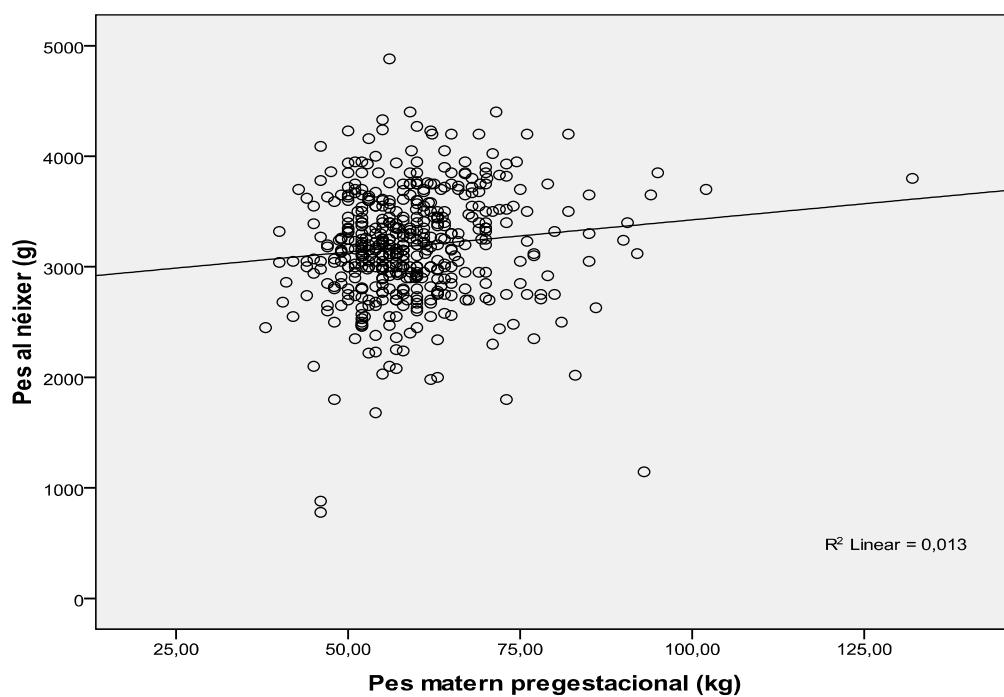


Figura 4^{''}: Gràfic de punts. Pes al néixer-pes matern pregestacional

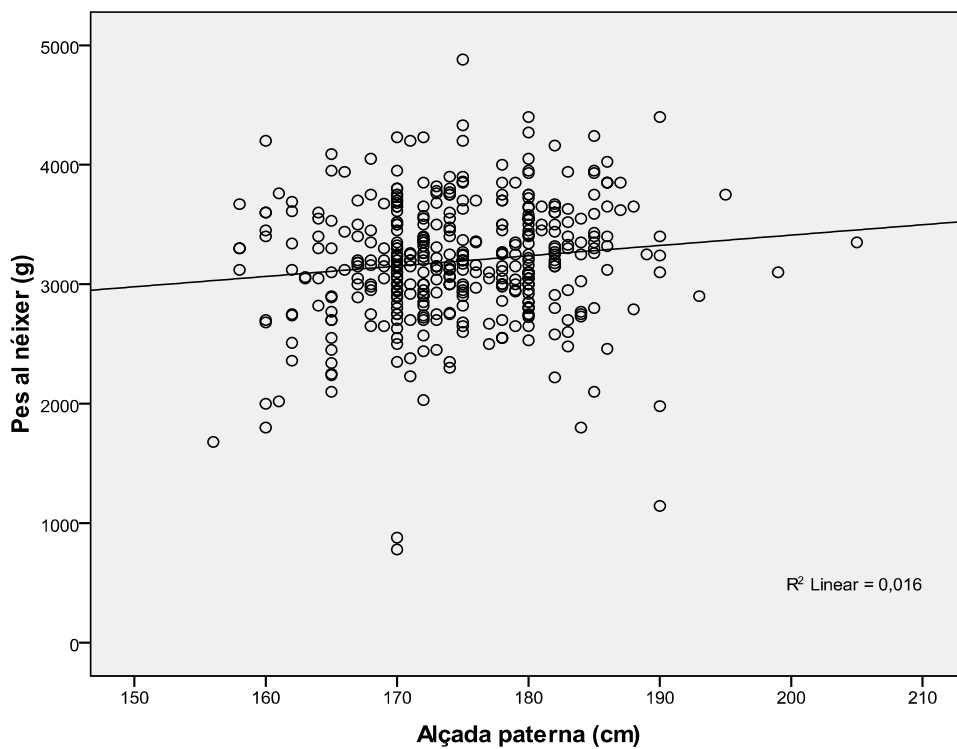


Figura 5^{''}: Gràfic de punts. Pes al néixer-alçada paterna