

ORIGINAL

Relación entre la exposición a disruptores endocrinos durante el período fetal y perinatal y la tasa de oligospermia

Marisa López Teijón^{a,b}, Damià Barceló^{c,d}, Marinella Farré^c, Elena Martínez^c, Helvia Temprano^e y Juan G. Álvarez^{a,b}

^aServicio de Reproducción Asistida, Instituto Marqués, Barcelona, España

^bFundación Leonardo Marqués, Barcelona, España

^cDepartamento de Química Ambiental, Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, España

^dInstitut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA), Gerona, España

^eServicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Teresa Herrera, La Coruña, España

Recibido el 19 de marzo de 2011; aceptado el 8 de abril de 2011

PALABRAS CLAVE

Disruptores endocrinos;
Leche materna;
Oligospermia.
Hispospadias;
Criptorquidia;
Bifenilos policlorados;
Pesticidas organoclorados;
Éteres bifenilos policlorados

Resumen La posible relación entre la exposición residencial a disruptores endocrinos (EDC) durante el período fetal y perinatal, y el aumento en la tasa de oligospermia todavía no ha sido bien caracterizada. En este estudio se investiga la posible asociación entre los niveles de EDC en la leche materna de mujeres lactantes y la tasa de oligospermia previamente reportada en diferentes comunidades autónomas de España con marcadas diferencias en el desarrollo industrial. Se evaluaron un total de 38 EDC en 69 muestras de leche materna de mujeres lactantes de las comunidades de Cataluña ($n = 34$) y Galicia ($n = 35$). Los análisis se realizaron mediante *gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry (GC-EI-MS)* y *liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap tandem (LC-QqLIT MS)*. Los valores medios de las concentraciones de la suma de bifenilos policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (OCP) y éteres bifenilos polibromados (PBDE) en las muestras de Cataluña fueron respectivamente 13,5 y 0,3 ng/g de grasa, mientras que en las de Galicia estos valores fueron significativamente más bajos, 3,2,5 y < 0,1 ng/g de grasa. Los resultados de este estudio indican que la concentración de EDC en la leche materna se correlaciona con la tasa de oligospermia en estas regiones y proporciona soporte adicional a la hipótesis de que la exposición a EDC durante el período fetal y perinatal podría ser causa de esterilidad masculina idiopática.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Endocrine disruptor compounds; Breast milk; Oligospermia; Hypospadias; Cryptorchidism; Polychlorinated biphenyls; Organo chlorinated pesticides; Polybrominated diphenyl ethers

Relationship between exposure to endocrine disruptors during the fetal and perinatal period and the rate of oligospermia

Abstract The relationship between residential exposure to endocrine disruptor compounds (EDCs) during fetal and perinatal life and the increase in the rate of oligospermia has not been well characterized yet. This study investigates this potential association by comparing the levels of EDCs in breast milk of lactating women with the rate of oligospermia previously reported in two regions of Spain with marked differences in industrial development. Thirty-eight EDCs were evaluated in 69 breast milk samples from women from Catalonia ($n = 34$) and Galicia ($n = 35$). The analyses were performed by gas chromatography electron ionization - mass spectrometry (GC-EI-MS), and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-tandem (LC-QqLIT MS). The average concentrations of polychlorinated biphenyls, organo chlorinated pesticides, and polybrominated diphenyl ethers in breast milk samples from Catalonia and Galicia were respectively 13, 5 and 0,3 ng/g, and 3, 2,5 and < 0,1 ng/g of fat. In conclusion, the concentration of endocrine disruptor compounds in breast milk correlated with the rate of oligospermia in these regions and provides additional support to the hypothesis that exposure to EDCs during fetal and perinatal life could lead to male infertility.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Durante el siglo XX, la producción y uso de compuestos químicos ha aumentado de forma rápida como resultado de los procesos modernos de manufactura, dando lugar a la introducción de miles de disruptores endocrinos (EDC) en el medio ambiente. Durante las pasadas décadas, la atención prestada a los posibles riesgos que para la salud se pueden derivar de los tóxicos medioambientales se ha centrado en la posible inducción del cáncer. Actualmente, los riesgos para la esterilidad masculina, tanto real como potencial, son también centro de atención. Sin embargo, es difícil de establecer la relación entre los niveles de EDC presentes en el medio ambiente y sus efectos en la salud reproductiva humana. La evidencia que existe sobre los efectos de compuestos tóxicos medioambientales como factores clave en la génesis de la esterilidad masculina y el cáncer de testículo no es concluyente. No obstante, se considera un problema de salud pública muy importante que requiere una mayor atención.

Estudios de biomonitorización de los niveles de EDC en tejidos humanos y fluidos biológicos proporcionan una medida directa de las dosis interna de estos compuestos. La estabilidad físico-química de los bifenilos policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (OCP) y éteres bifenilos polibromados (PBDE) determina en gran parte su presencia prolongada en humanos, mientras que su alta lipofilia determina su bioacumulación en la fracción lipídica de los tejidos. El contenido lipídico relativamente alto de la leche materna la hace una matriz ideal para la bioacumulación y el análisis de EDC. Además, los niveles de EDC en la leche materna no solo reflejan su bioacumulación en la madre sino también en el feto y el recién nacido, que son estados de desarrollo muy sensibles a los efectos de estos compues-

tos. Otro grupo de EDC son los compuestos perfluorados (PFC) que pueden bioacumularse uniéndose a la fracción proteica. Numerosas publicaciones han reportado estudios de bioacumulación de EDC clorados¹⁻⁷ y perfluorados en la leche materna^{8,9}.

En la última década se han publicado numerosos estudios científicos en los que se describen los posibles efectos de la polución medioambiental en la salud perinatal¹⁰. Sin embargo, otras rutas relevantes de exposición, tales como el agua y la comida, también deberían ser investigadas. En este sentido, la determinación de EDC en la leche materna es de gran importancia a la hora de valorar de forma adecuada el riesgo que supone la exposición y bioacumulación de EDC en leche materna y que, por otra parte, representa una muy valiosa fuente de información sobre una posible exposición fetal y perinatal a los EDC.

Estudios previos han reportado una disminución de la calidad seminal y un aumento en la tasa de esterilidad en áreas industrializadas, y se ha postulado una posible relación con la contaminación por EDC. Algunos de estos estudios han demostrado que, por ejemplo, los daneses tienen una concentración espermática más baja que los finlandeses¹¹. Estudios posteriores demostraron que los daneses tienen una mayor prevalencia de criptorquidia e hipospadias¹²⁻¹⁴. Durante las últimas dos décadas, varios grupos han investigado el impacto de los EDC en la salud reproductiva. Numerosos estudios han sido diseñados para intentar demostrar el efecto disruptor de los ftalatos, PCB y OCP¹⁵. La asociación entre la exposición a EDC y la disminución de la calidad seminal ha sido confirmada en múltiples estudios realizados en diferentes países. El estudio de los mecanismos a través de los cuales los EDC aumentan la incidencia del síndrome de disgenesia testicular en hombres (es decir, criptorquidia e hispoadias en recién nacidos y cáncer de

testículo y oligospermia en adultos) se ha realizado *in vivo* en modelos experimentales animales¹⁶. Sin embargo, el mecanismo de acción del efecto de mezclas de EDC todavía no ha sido elucidado. La relación entre la exposición a EDC en humanos y el síndrome de disgenesia testicular es difícil de establecer ya que, además de la propia exposición a estos compuestos tóxicos, otros factores tales como los estadios de desarrollo durante los cuales esta exposición tiene lugar; el papel de los procesos de detoxificación y la bioactividad de las mezclas de EDC deberían tenerse en cuenta. Estos factores deberían incluirse en los estudios epidemiológicos del síndrome de disgenesia testicular para poder diseñar así modelos experimentales animales más adecuados.

Nuestro grupo ha reportado recientemente la presencia de diferencias geográficas significativas en la tasa de oligospermia en diferentes regiones de España¹⁷. La tasa de oligospermia, definida como el porcentaje de hombres en una población con una concentración espermática por debajo de 20 millones/ml, fue significativamente más alta en regiones industrializadas como Cataluña que en regiones con una incorporación más reciente al desarrollo industrial, como es el caso de Galicia. En este estudio postulamos la hipótesis de que si la tasa de oligospermia idiopática en jóvenes sanos viniese determinada por la exposición a EDC (que se acumulan en el tejido adiposo de la madre a lo largo de su vida) durante el período fetal y perinatal, los niveles de EDC deberían ser más altos en la leche materna de las mujeres de regiones con una mayor tasa de oligospermia.

En este contexto, los objetivos principales de este estudio fueron a) evaluar los niveles de un grupo selecto de EDC en la leche materna de mujeres lactantes de las comunidades autónomas de Cataluña y Galicia; y b) correlacionar la bioacumulación de EDC con la tasa de oligospermia en ambas regiones. Todos los compuestos analizados en este estudio fueron seleccionados de acuerdo a su potencia como EDC y su condición de marcadores fiables de polución industrial. Que a nosotros nos conste, este es el primer estudio en el que se presentan datos que correlacionan la bioacumulación de EDC en humanos y la tasa de oligospermia en hombres jóvenes sanos.

Material y métodos

Reactivos

Las soluciones estándar PCB-Mix19, y la de pesticidas Mix164 se obtuvieron del Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). La solución estándar PCB-Mix 19 está compuesta por tres tri-PCB (PCB 18, 28 y 31), dos tetra-PCB (PCB 44, 52), dos penta-PCB (PCB 101, 118), tres hexa-PCB (PCB 138, 149, 153), dos hepta-PCB (PCB 170, 180), un octa-PCB (PCB 194), y un deca-PCB (PCB 209), y la solución estándar de pesticidas Mix 164 se compone de o,p-DDD, p,p DDD, o,p DDE, p,p DDE, o,p DDT y p,p DDT. Nonilfenol y octilfenol fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania).

La mezcla de isómeros α, β, γ de hexaclorohexano y clordano se obtuvo de Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania). Los estándares utilizados fueron una mezcla de hexaclorobenzeno-13C, 4-n-nonilfenol-D8, γ-hexaclorohexano-D6, p,p-DDE-D8 se obtuvieron del Dr. Ehrenstorfer. La solución

analítica estándar de PBDE, EO 4980 se obtuvo de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EE.UU.). El sulfonato de perfluoroctano (PFOS), y el ácido perfluorooctanoico (PFOA) se obtuvieron de Wellington Laboratories Inc., Canadá. El 13C₄-PFOS y el 13C₄-PFOA también se obtuvieron de Wellington Laboratories Inc. Los cartuchos de 5 g utilizados para la extracción en fase sólida (SPE) se obtuvieron de International Sorbent Technology (IST), Reino Unido. Hidromatrix se obtuvo de Varian (EE.UU.). El nitrógeno utilizado para la evaporación de solventes fue de una pureza del 99,995% y se obtuvo de Air Liquide (España) y el ácido sulfúrico se obtuvo de Merck. La columna de LC utilizada para el análisis de PFC fue una columna analítica LiChro-CART® Purosphere Star-18e (125 mm × 4 mm i.d., 5 µm) de Merck. La columna de GC fue de fused-silica (HP-5MS; 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 µm).

Recogida de muestras y método de extracción

Tras la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC), un total de 69 mujeres fueron incluidas en el estudio. Un total de 35 muestras de leche materna fueron obtenidas de mujeres residentes en la comunidad autónoma de Galicia y 34 muestras se obtuvieron de mujeres residentes en la comunidad autónoma de Cataluña.

El protocolo experimental fue aprobado por el CEIC local de acuerdo con la legislación vigente en España, y se obtuvo consentimiento informado de todas las mujeres que participaron en el estudio. Despues de firmar dicho consentimiento informado, se les realizó un cuestionario exhaustivo para recabar información sobre el lugar de residencia, edad, número de hijos a los que previamente se les proporcionó lactancia natural, peso del recién nacido, hábitos de la mujer, tipo de profesión y dieta. Alícuotas de 25-30 ml de leche materna fueron recogidas en el hospital correspondiente dentro de los 40 días postparto, ya fuese utilizando un sacaleches o de forma manual, despues la muestra se pasó a un recipiente de vidrio previamente lavado, almacenado a -20 °C y posteriormente transportado al laboratorio del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Barcelona donde se hicieron los análisis. Antes de la extracción, las muestras fueron liofilizadas, homogenizadas y almacenadas a -36 °C.

Extracción de bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados y éteres bifenilos polibromados

La extracción de las muestras se llevó a cabo mediante el método de extracción líquida presurizada (PLE) utilizando un sistema totalmente automatizado ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.). El protocolo de extracción fue como se indica a continuación: todas las muestras liofilizadas se colocaron en celdas de extracción de acero inoxidable con filtros de celulosa. El volumen muerto se rellenó con anhídrido de sulfato sódico para análisis de residuos de Panreac Química S.A. (Montcada i Reixac, Barcelona, España) previamente activado a 150 °C durante 4 horas. El extracto se calentó a 100 °C y se rellenó con una mezcla de CH₂Cl₂:hexano (2:1, v/v) hasta que la presión alcanzó los 2.000 psi. Se realizaron dos extracciones estáticas de 5 minutos a presión y temperatura constante. Tras este período estático se

añadió solvente fresco para purgar las líneas y las celdas, y el extracto final se recogió en un vial. El volumen utilizado representó el 100% de la celda de extracción. La extracción se recicgó dos veces. El volumen del extracto osciló entre 15 y 20 ml. Tras la extracción, los extractos fueron concentrados a 3 ml y después sometidos a un paso de purificación utilizando ataque con ácido sulfúrico concentrado (3×2 ml). Las muestras fueron finalmente concentradas y redispersadas en 100 μ l de hexano.

Extracción por par-iónico de compuestos perfluorados

Se añadieron 5 ml de agua destilada a 0,5 g del residuo seco de las muestras de leche materna. Después de la homogenización en un homogenizador Ultra Turrax, se añadió 1 ml de TBA (0,5 M, pH 10) y 2 ml de una solución de carbonato sódico (0,25 M). La solución de la muestra se agitó en un *vortex mixer* durante 20 segundos y se añadieron 5 ml de metil ter-butil éter (MTBE). Después de agitar en un *orbital shaker* durante 20 minutos, la solución de la muestra se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos (a 25 °C). Las capas orgánica y acuosa fueron separadas y se retiró el mismo volumen de MTBE (4,0 ml) de la solución. La fase acuosa se extrajo de nuevo dos veces con dos volúmenes de la solución de MTBE (4 ml); todos los lavados fueron combinados en un segundo tubo de polipropileno. El solvente se evaporó

bajo nitrógeno utilizando un Zymark TurboVap antes de ser reconstituido en 0,5 ml metanol agua con 20 mM de sulfato amónico (10/90, v/v).

Análisis de las muestras de leche materna

El análisis de PCB y OCP se llevó a cabo por *gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry* (GC-EI-MS) en un cromatógrafo TRACE GC2000 conectado a un espectrómetro TRACE MS Thermo Finnigan (Manchester, Reino Unido). Se utilizó una columna capilar HP- 5 ms (30 md 0,25 mm i.d., 0,25 μ m de grosor) con un contenido de 5% fenil metil siloxano (Ref 19091S-433, Agilent) con helio (99,999% Air Liquide) como gas portador a 1,2 ml/min. La temperatura del programa osciló de 60 a 175 °C (se mantiene durante 1 min) a 3 °C/min, de 175 a 240 °C (se mantiene durante 5 min) a 10 °C/min y de 240 a 320 °C (se mantiene durante 2 min) a una tasa de 0,5 °C/min. La inyección se realizó en el modo *splitless*. El inyector, la línea de transfer y una fuente de temperatura iónica programada a 250, 270 y 200 °C, respectivamente y una energía de ionización programada a 70 eV. La adquisición se llevó a cabo mediante la modalidad de monitorización iónica programada (SIM) en tiempos previamente seleccionados para aumentar la sensibilidad y la selectividad. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del estándar interno. La identificación y cuantificación se llevaron a cabo automáticamente utilizando un soft-

Tabla 1 Iones seleccionados para los experimentos de *gas chromatography -electron ionization - mass spectrometry - selective ionization monitoring* (GC-EI-MS-SIM)

| Compuestos organoclorados | m/z 1 | m/z 2 | m/z 3 |
|---|-------|-------|---------|
| 18,2,2',5'-Trichlorobifenilo | 186 | 256 | 258 |
| 28,2,4,4'-Trichlorobifenilo | 258 | 256 | 186 |
| 52,2,2',5,5'-Tetrachlorobifenilo | 220 | 292 | 110 |
| 101,2,2',4,5,5'-Pentachlorobifenilo | 326 | 254 | 328/184 |
| 118,2,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo | 326 | 254 | 328/184 |
| 138,2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobifenilo | 360 | 290 | 145 |
| 149,2,2',3,4',5',6-Hexabromobifenilo | 360 | 290 | 145 |
| 153,2,2',4,4'5,5'-Hexachlorobifenilo | 360 | 290 | 145 |
| 170,2,2',3,3',4,4',5-Heptachlorobifenilo | 394 | 324 | 162 |
| 180,2,2',3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobifenilo | 394 | 324 | 162 |
| 194,2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobifenilo | 430 | 179 | 358 |
| 2,4-DDD | 235 | 237 | 165 |
| 4,4-DDD | 235 | 237 | 165 |
| 2,4-DDE | 246 | 248 | 176 |
| 4,4-DDE | 246 | 248 | 176 |
| 2,4-DDT | 235 | 237 | 165 |
| 4,4-DDT | 235 | 237 | 165 |
| Alpha HCH | 181 | 119 | |
| Beta HCH | 181 | 119 | |
| Gamma HCH | 181 | 119 | |
| Epsilon HCH | 181 | 119 | |
| p,p' DDE C13 | 254 | | |
| Hexachlorbenzeno 13C | 292 | | |
| GammaHCH d6 | 222 | | |
| p,p' DDT D8 | 247 | 248 | |

ware Xcalibur. Los iones diagnósticos utilizados para el análisis de GC-SIM-MS (EI) se muestran en la tabla 1.

El análisis de los diferentes PBDE que contenían de 1 a 7 átomos de bromo se llevó a cabo mediante un método de GC/NCI-MS de acuerdo al protocolo previamente publicado por nuestro grupo¹⁸. Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases, Agilent 6890, conectado a un espectrómetro de masas, Agilent 5973 Network. Se utilizó una columna capilar HP-5 ms (30 md 0,25 mm d.i., 0,25 µm de grosor) con un 5% de fenil metil siloxano (Model HP 19091S-433) utilizando helio como el gas portador a 1,2 ml/min. La temperatura del programa fue de 110 °C (mantenida durante 1 min) a 180 °C (mantenida durante 1 min) a 8 °C/min, y después de 180 a 240 °C (mantenida durante 5 min) a 2 °C/min, y finalmente de 240 a 280 °C (mantenida durante 6 min) a 2 °C/min, utilizando el modo de inyección *splitless* durante 1 min. Brevemente, las condiciones del GC/NCI-MS fueron las siguientes: las temperaturas del cuadrupolo y líneas de transfer fueron programadas a 150 °C y 300 °C. Sistema de presión a $1,9 \times 10^{-4}$ Torr, fuente de temperatura a 250 °C y el reactivo NCI (NH_3). La identificación y cuantificación mediante el modo SIM se llevó a cabo automáticamente utilizando software Chemstation. La cuantificación se llevó a cabo mediante el modo SIM para aumentar la sensibilidad del análisis.

Finalmente, dos de los compuestos perflorurados (PFC) más abundantes: el ácido perfluoroctanoico (PFOA) y el sulfonato de perfluoroctano (PFOS) fueron analizados por *liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry* (LC-QqLIT MS) utilizando un protocolo basado en el método recientemente desarrollado y validado por nuestro grupo¹⁹. Los PFC fueron analizados en un sistema 4000 Q TRAP™ MS/MS de Applied Biosystems/MDS Sciex (Concord, Ontario, Canadá) acoplado a un sistema Symbiosis™ Pico (Spark Holland, Emmen, Holanda). Este último integra un sistema LC y Online SPE pero únicamente se utilizó el sistema de HPLC que básicamente consiste en un *autosampler Alias™* que maneja volúmenes de muestras de 10 µl a 10 ml y que puede añadir, mezclar y diluir las muestras de manera previa a su análisis, con dos bombas de gradiente LC de alta presión, con un selector de solventes de 4 canales por cada bomba. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna analítica LiChroCART- LiChrospher 100 RP-18 de 250 × 4 mm y 5 µm de diámetro de partícula de Merck a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en 20 mM acetato de amonio en agua (solvente A) y 20 mM acetato de amonio en metanol (solvente B) a un flujo de 0,5 ml min⁻¹. El programa de elución de gradiente lineal fue el siguiente: 10-80% B por 5 min, 80-90% B sobre 5 min seguido de una parada isocrática en 90% B por otros 8 min. A los 18 min, el solvente B se volvió de nuevo al 10% por 2 min. El tiempo total de cada separación por inyección fue de 20 min y el volumen de inyección de 20 µl. El espectrómetro de masas fue operado en el modo iónico negativo utilizando un *turbo ion spray*. Los otros parámetros de ionización fueron los siguientes: gas cortina (CUR), 30 (unidades arbitrarias); fuente iónica gas 1 (GS1), 25 (unidades arbitrarias); fuente iónica gas 2 (GS2), 0 (unidades arbitrarias); fuente de temperatura (TEM), 350 °C; *ion spray* (IS), -4.500 V; potencial de entrada (EP), -10 V, potencial de colisión de salida (CXP) -10 V y potencial de ruptura (DP) -25 V.

El tiempo de espera de cada transición MRM fue de 150 ms. El espectrómetro de masas fue controlado con software Analyst 1.4.2 de Applied Biosystems/MDS Sciex y Symbiosis de Symbiosis Pico para Analyst Software.

Resultados

Las características de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla 2. Para minimizar el posible impacto de factores exógenos en la variabilidad de las muestras, todas las muestras fueron recogidas en el hospital durante la misma época del año utilizando exactamente el mismo protocolo de recogida dentro de los 40 días postparto. No se encontraron diferencias en edad gestacional o paridad entre las mujeres lactantes de las comunidades autónomas de Cataluña y Galicia. De acuerdo al *unpaired t test*, la edad de las madres en ambas poblaciones no difirió de forma significativa (IC del 95%). En ambos casos, la edad materna siguió una distribución gáuistica de acuerdo a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

En las figuras 1a, 1b y 1c se detallan las concentraciones de EDC en las muestras de leche materna analizadas. Las concentraciones medias de la suma de PCB, OCP y PBDE en las muestras de Cataluña fueron respectivamente 13, 5 y 0,3 ng/g de grasa, mientras que en las de Galicia estos valores fueron significativamente más bajos, 3, 2,5 y < 0,1 ng/g de grasa. Los compuestos encontrados en concentraciones más altas fueron PCB 194, PCB 28, PCB 52, p,p'-DDE, γ-HCB y PFOS. Los compuestos más frecuentemente encontrados fueron PCB 153, PCB 170, PCB 180 p,p'-DDE, p,p'-DDD, PBDE 47 y PFOS.

La figura 2 muestra el dendograma que ilustra el análisis de clúster jerárquico. Los participantes en el estudio fueron agrupados de acuerdo a los resultados de los 40 EDC bioacumulados, la edad de la madre, el tipo de profesión y el lugar de residencia (urbana, rural, o industrial). La disimilitud entre los diferentes grupos de muestras fue calculada utilizando el método de distancias euclídeas. La aglomeración fue llevada a cabo de acuerdo al método de *linkage analysis*, y se definieron 3 grupos: un grupo mayormente compuesto por los participantes de Galicia; otro grupo formado principalmente por participantes de Cataluña; y un grupo de muestras individuales que mostraron niveles altos atípicos de algunos EDC y que no pudieron ser agrupados en los otros dos.

Discusión

El hallazgo principal que emerge de este estudio son las diferencias altamente significativas en los niveles de EDC en la leche materna de mujeres lactantes de las comunidades de Cataluña y Galicia. Como se puede apreciar en la figura 2, la clasificación utilizada, siguiendo la disimilitud entre la bioacumulación de EDC, distinguió dos grupos principales, de acuerdo a su origen geográfico y a las tasas de oligospermia. Las muestras de leche materna de mujeres lactantes de Galicia mostraron niveles muy bajos de EDC mientras que las muestras de Cataluña mostraron niveles muy altos. Esta remarcable diferencia en los niveles

Tabla 2 Resumen de las características principales de los participantes

| Región | Código | Edad de la madre | N.º de lactancias | Tipo de residencia | Sexo del recién nacido |
|----------|--------|------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------|
| Galicia | G1 | 32 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Hembra |
| Galicia | G2 | 33 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G3 | 40 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G4 | 40 | 1 | Área rural | Varón |
| Galicia | G5 | 29 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G6 | 29 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G7 | 33 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G8 | 34 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G9 | 34 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G10 | 37 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G11 | 32 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Hembra |
| Galicia | G12 | 33 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Hembra |
| Galicia | G13 | 33 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G14 | 35 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G15 | 35 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G16 | 36 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G17 | 36 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G18 | 35 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G19 | 40 | 3 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G20 | 37 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Hembra |
| Galicia | G21 | 29 | 2 | Ciudad > 1600000 habitantes | Varón |
| Galicia | G22 | 29 | 2 | Área rural | Varón |
| Galicia | G23 | 25 | 1 | Área rural | Varón |
| Galicia | G24 | 33 | 1 | Área rural | Varón |
| Galicia | G25 | 28 | 2 | Área rural | Varón |
| Galicia | G26 | 31 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G27 | 32 | 1 | Área rural | Varón |
| Galicia | G28 | 33 | 1 | Área rural | Hembra |
| Galicia | G29 | 32 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G30 | 31 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G31 | 32 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G32 | 35 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G33 | 34 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G34 | 31 | 2 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Galicia | G35 | 30 | 1 | Ciudad < 400.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C1 | 38 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C2 | 35 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C3 | 34 | 3 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C4 | 35 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C5 | 38 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Female |
| Cataluña | C6 | 29 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C7 | 36 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C8 | 34 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C9 | 37 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C10 | 40 | 2 | Área rural | Hembra |
| Cataluña | C11 | 34 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C12 | 31 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C13 | 40 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C14 | 35 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C15 | 38 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C16 | 39 | 1 | Área rural | Hembra |
| Cataluña | C17 | 29 | 1 | Área rural | Hembra |
| Cataluña | C18 | 29 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C19 | 37 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C20 | 41 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C21 | 34 | 2 | Área industrial | Varón |
| Cataluña | C22 | 35 | 1 | Área industrial | Varón |
| Cataluña | C23 | 35 | 2 | Área rural | Hembra |
| Cataluña | C24 | 47 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C25 | 27 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C26 | 35 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C27 | 33 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |
| Cataluña | C28 | 36 | 2 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C29 | 38 | 2 | Área rural | Hembra |
| Cataluña | C30 | 28 | 1 | Área industrial | Hembra |
| Cataluña | C31 | 30 | 1 | Área industrial | Hembra |
| Cataluña | C32 | 28 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Varón |
| Cataluña | C33 | 35 | 3 | Área rural | Varón |
| Cataluña | C34 | 32 | 1 | Ciudad > 1.600.000 habitantes | Hembra |

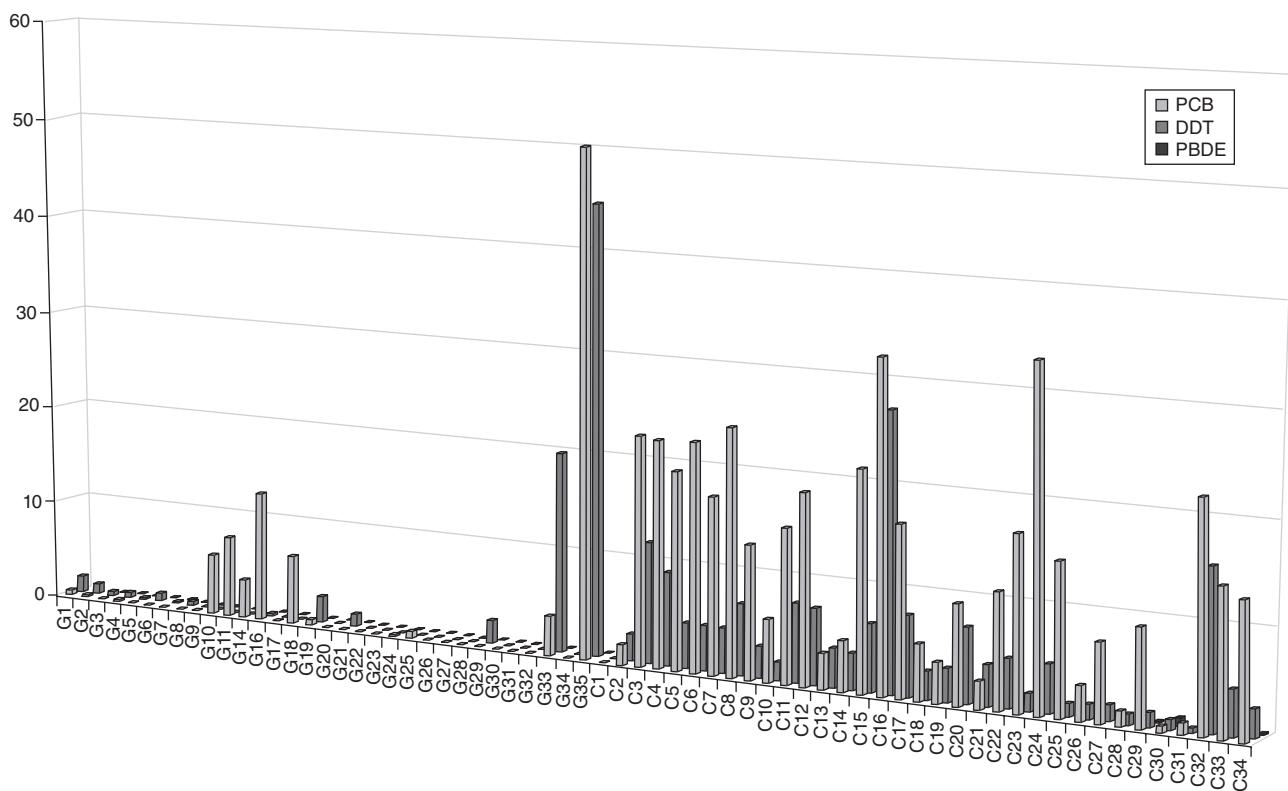


Figura 1a Concentraciones de disruptores endocrinos en las muestras de leche materna analizadas. OCP: pesticidas organoclorados; PBDE: éteres bifenilos policlorados; PCB: bifenilos policlorados.

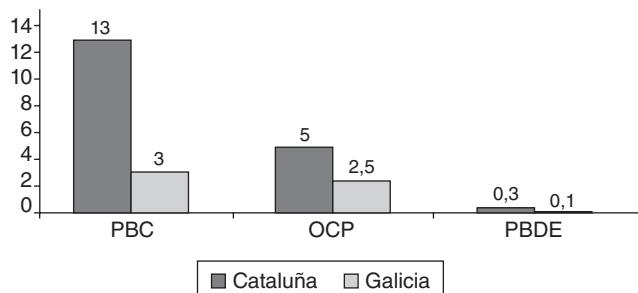


Figura 1b Concentración de tóxicos analizados según el lugar de residencia de la madre (nanogramos por gramo de grasa). OCP: pesticidas organoclorados; PBDE: éteres bifenilos policlorados; PCB: bifenilos policlorados.

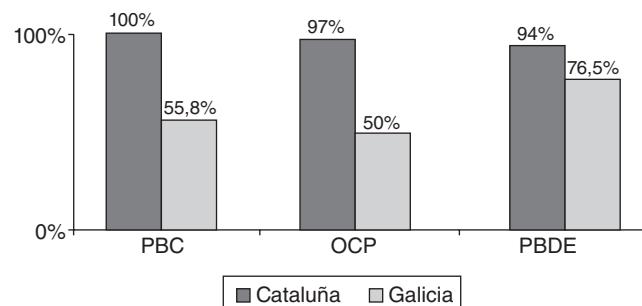


Figura 1c Porcentaje de muestras en las que se detectaron tóxicos sobre el total de muestras analizadas. OCP: pesticidas organoclorados; PBDE: éteres bifenilos policlorados; PCB: bifenilos policlorados.

de EDC se hace todavía más relevante cuando se compara con las diferencias en las tasas de oligospermia previamente reportadas para estas regiones. Como puede verse en la figura 1a, las concentraciones de PCB y OCP encontradas en la leche materna de las muestras de mujeres lactantes de Cataluña fueron en algunos casos unas 10 veces más altas que los valores obtenidos en las muestras de Galicia. Por lo tanto, la exposición fetal y perinatal a PCB y OCP en Cataluña fue respectivamente, unas 4,3 y 2 veces más alta que en Galicia (fig. 1b), en excelente acuerdo con las tasas de oligospermia reportadas en Cataluña del 22,7% y en Galicia del 8,5%, y las concentraciones espermáticas medias en se-

men de 59,3 y 91,7 millones/ml, respectivamente^{17,20}. Estos resultados son consistentes con la hipótesis previamente postulada de que si la tasa de oligospermia idiopática en hombres jóvenes sanos fuese determinada por la exposición a EDC durante el período fetal y perinatal, los niveles de EDC deberían ser más altos en la leche materna de madres de aquellas regiones con una prevalencia más alta de oligospermia. Los EDC que se acumulan en el tejido adiposo de la madre a lo largo de su vida podrían ser liberados a la circulación atravesando la placenta y afectar al feto^{17,20}. Un órgano que es especialmente sensible a los EDC durante el período fetal es el testículo. De llegar a ocurrir esto,

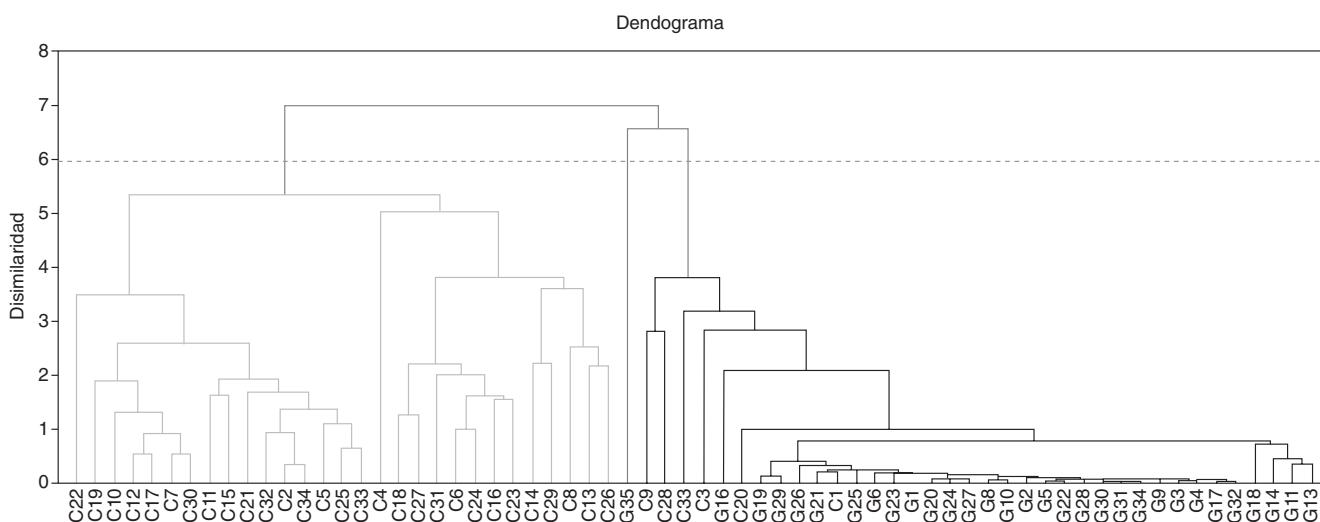


Figura 2 Dendrograma del análisis de clúster jerárquico.

explicaría, al menos en parte, por qué la incidencia de anomalías testiculares congénitas y de oligospermia es más alta en hombres de regiones con una exposición más alta a EDC. Como soporte adicional a esta hipótesis, la incidencia de criptorquidia en los recién nacidos de la comunidad de Galicia fue del 2,5% mientras que en Cataluña fue del 10,1%.

Una variable de confusión potencial en este estudio podrían haber sido las diferencias en paridad entre ambos grupos de mujeres lactantes, dado que se ha reportado que los niveles de EDC disminuyen con el número de partos²¹. Sin embargo, como se muestra en la tabla 2, el porcentaje de primíparas, secundíparas y multíparas fue similar en ambos grupos de mujeres.

Conclusiones

En conclusión, la bioacumulación y exposición a EDC durante el período fetal y perinatal en mujeres de Cataluña y Galicia parece estar correlacionada con la tasa de oligospermia en hombres jóvenes sanos de estas regiones. Si bien esto no prueba que exista una relación causa-efecto, sí apoya una vez más la noción de que la exposición a EDC durante el período fetal y perinatal podría resultar en daño testicular y oligospermia²²⁻²⁴.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a la Fundación Leonardo Marqués la financiación de este estudio.

Bibliografía

- Anderson HA, Wolff MS. Environmental contaminants in human milk. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2000;10:755-60.
- Brunetto R, León A, Burguera JL, Burguera M. Levels of DDT residues in human milk of Venezuelan women from various rural populations. *Sci Total Environ*. 1996;186:203-7.
- De Koning EP, Karraus W. PCB exposure in utero and via breast milk. A review. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2000;10:285-93.
- Devanathan G, Subramanian A, Someya M, Sudaryanto A, Isobe T, Takahashi S, et al. Persistent organochlorines in human breast milk from major metropolitan cities in India. *Environ Pollut*. 2009;157:148-54.
- Eljarrat E, Guerra P, Martínez E, Farré M, Álvarez JG, López-Teijón M. Hexabromocyclododecane in human breast milk: Levels and enantiomeric patterns. *Environ Sci Technol*. 2009;43: 1940-6.
- Polder A, Skaare JU, Skjerve E, Løken KB, Eggesbø M. Levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast milk (2002-2006), and factors that may predict the level of contamination. *Sci Total Environ*. 2009;407: 4584-90.
- Schuhmacher M, Kiviranta H, Ruokojärvi P, Nadal M, Domingo JL. Concentrations of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in breast milk of women from Catalonia, Spain: A follow-up study. *Environ Int*. 2009;35:607-13.
- Tao L, Ma J, Kunisue T, Libelo EL, Tanabe S, Kannan K. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ Sci Technol*. 2008;42:8597-602.
- Von Ehrenstein OS, Fenton SE, Kato K, Kuklenyik Z, Calafat AM, Hines EP. Polyfluoroalkyl chemicals in the serum and milk of breastfeeding women. *Reprod Toxicol*. 2009;27:239-45.
- Woodruff TJ, Parker JD, Darrow LA, Slaa R, Bell ML, Choi H, et al. Methodological issues in studies of air pollution and reproductive health. *Environ Res*. 2009;109:311-20.
- Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. *Int J Fertil*. 1983;28:91-5.

12. Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen H, Haavisto AM, Schmidt IM, et al. High and increasing prevalence of cryptorchidism in Denmark. *Ugeskr Læger*. 2004;166:4372-5.
13. Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, Kai CM, Damgaard IN, Suomi AM, et al. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: Prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4041-6.
14. Virtanen HE, Rajpert-De Meyts E, Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207:501-5.
15. Pant N, Shukla M, Kumar Patel D, Shukla Y, Mathur N, Kumar Gupta Y, et al. Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;231:112-6.
16. Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO, Li XK. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:139-45.
17. López-Teijón M, Elbaile M, Álvarez JG. Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. *Andrología*. 2008;40:318-28.
18. Eljarrat E, Lacorte S, Barceló D. Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2002;37:76-84.
19. Llorca M, Farré M, Picó Y, Barceló D. Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for perfluorinated compounds determination in fish. *J Chromatog A*. 2009;1216:7195-204.
20. López-Teijón M, García F, Serra O, Moragas M, Rabanal A, Olivares R. Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona. *Reprod Biomed Online*. 2007;15:434-44.
21. Czaja K, Ludwicki JK, Góralczyk K, Strucinski P. Effect of age and number of deliveries on mean concentration of organochlorine compounds in human breast milk in Poland. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1997;59: 407-13.
22. Sharpe RM, Skakkebæk NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;341:1392-5.
23. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette Jr, LJ, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspect*. 1996;104:741-803.
24. Baños Hernández I, Valdés Carrillo R, Castillo García I. Alteraciones de la fertilidad masculina por exposición a pesticidas. *Rev Int Androl*. 2009;7:98-105.