



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DEL CONOCIMIENTO: CIENCIAS DE LA SALUD
CAMPO DISCIPLINARIO: EPIDEMIOLOGÍA

Exposición Prenatal a Disruptores Endocrinos y Maduración Pulmonar en Niños: Un Estudio de Cohorte

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

María Consuelo Escamilla Núñez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Hugo Borja Aburto
Atención Primaria a la Salud, IMSS

COMITE TUTOR

Dr. Albino Barraza Villarreal,
Instituto Nacional de Salud Pública

Dr. Carlos A. Aguilar Salinas,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Rogelio Pérez Padilla,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a mis padres, José Escamilla y María de los Ángeles Núñez con todo mi cariño.

Por ser las mejores guías que Dios me dio y un ejemplo a seguir, mi papá siempre firme, fuerte, responsable y trabajador; y mi mamá callada pero presente, incondicional con su familia y siempre apoyando.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a Dios por darme la oportunidad de convivir con personas que han marcado mi estancia por este mundo.

A mi familia que amo y respeto; Edi, Quetzalli, Renata, Gio, Pingüinito; a mis hermanos Jaque, Arturo, Javier y Beto, que siempre han estado presentes en mi camino en los buenos y malos momentos.

A mis amigos y compañeros que me han apoyado y enseñado a ver las cosas desde una perspectiva más comfortable; Paula, Rosalba, Dra. Isabel, Lety, Jorge, Lulú, Laura, Paulina, Lilia, Salvador, Carmen, Horte, David, a todos ellos y a muchos más les agradezco infinitamente su paciencia, comprensión y sus enseñanzas para continuar y no desistir en mis propósitos.

A mi tutor Dr. Víctor Borja Aburto, por su humildad, recibirme como su alumna cuando más necesitaba de alguien que me acogiera en la UNAM, por hablarme con paciencia, tranquilidad haciéndome ver las cosas desde otro punto y, sobre todo por enseñarme a no avanzar cuando no tenemos la certeza de lo que proponemos.

Epígrafe

La gratitud, como ciertas flores, no se da en la altura y mejor reverdece en la tierra buena de los humildes.

No te rindas

*No te rindas, aun estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.*

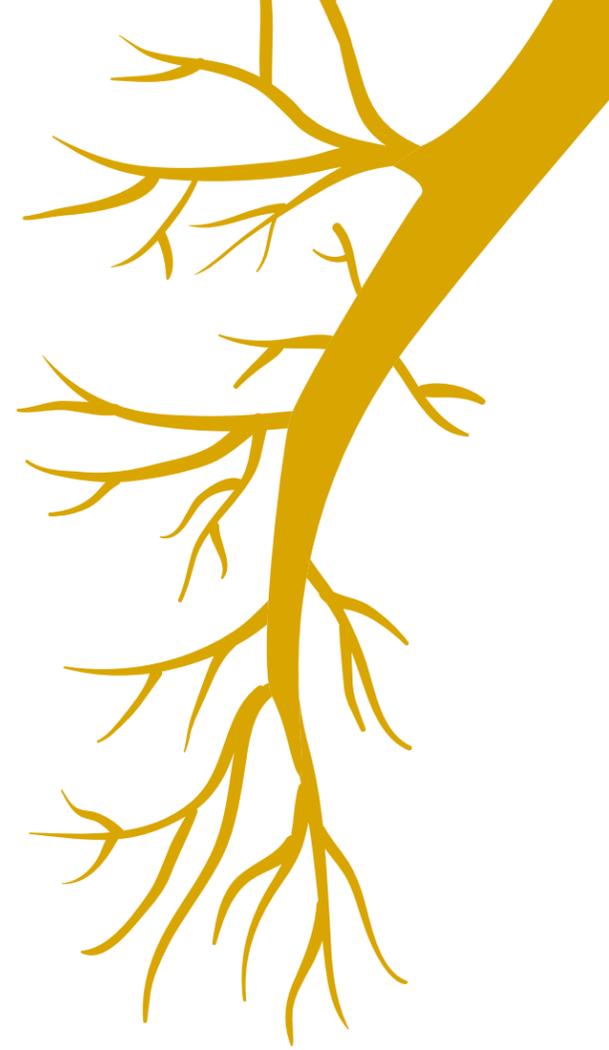
*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.*

*Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.*

*Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos,*

*No te rindas por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada dia es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero.*

Mario Benedetti



RESUMEN

Los disruptores endocrinos son químicos capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, tienen la capacidad de provocar efectos negativos sobre la salud de un organismo o de su progenie. La evidencia sobre el efecto de los disruptores endocrinos sobre el desarrollo y maduración pulmonar es aún insuficiente. **Material y Métodos.** A partir de un ensayo clínico aleatorizado doble ciego, en Morelos, México donde se incluyeron mujeres embarazadas para recibir suplemento de DHA desde la semana 18-22 de gestación hasta el parto. Se dio seguimiento a 290 binomios madre-hijo desde el nacimiento hasta los 9 años. A los niños se les realizaron pruebas de oscilometría y antropometría en sus consultas anuales de revisión a los 3, 4, 5, 7, 8 y 9 años. A partir de muestras de orina materna recolectadas durante el embarazo se obtuvieron las concentraciones de metabolitos de ftalatos y niveles de bisfenol A. Al explorar las mediciones de función pulmonar un error de medición fue identificado y rectificado con el propósito de no obstaculizar el propósito del estudio, sin embargo, esto obligó a realizar un análisis de sensibilidad y cálculo de la potencia estadística. El efecto de los disruptores endocrinos sobre el desarrollo de la función pulmonar se evaluó a partir de modelos mixtos, que se ajustaron por potenciales confusores. Se utilizaron modelos mixtos y simulaciones estadísticas con la intención de proponer alternativas en presencia de errores de medición. **Resultados.** Al evaluar el efecto de la exposición prenatal sobre la función pulmonar del niño se pudo observar un efecto controversial al estratificar por grupo de suplementación. El efecto de todos los metabolitos de ftalatos y BPA resultó negativo en el grupo de niños de madres suplementadas con DHA, pero solo fue significativo ($p < 0.05$) los metabolitos derivados del Di(2-Etilhexil) ftalato) y el metabolito mono(n-Butyl) ftalato, en contraste, con el grupo de niños cuyas madres recibieron placebo. **Conclusiones.** Nuestros resultados deberán tomarse con cautela debido a la falta de potencia estadística, sin embargo, para aclarar la controversia que encontramos podría incitar a una nueva investigación donde se considere un tamaño de muestra ad hoc a la pregunta de investigador, así como una dosis más alta de DHA en el embarazo y esta se prolongue hasta la lactancia para evaluar su efecto protector en etapas tempranas, al igual que valorar los niveles de los metabolitos de ftalatos durante la primera infancia.

Palabras clave: Función pulmonar, Disruptores endocrinos, Bisfenol A y Ftalatos, sesgos.



TABLA DE CONTENIDO

Resumen	5
Cuadros y figuras	8
Antecedentes	13
Generalidades	13
Exposición a ftalatos y bisfenol A	14
Función Pulmonar	17
Ventana de exposición	20
Estado de Morelos	20
Planteamiento del Problema	21
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos específicos	24
Metas y productos	24
Material y Métodos	25
Diseño de estudio y población de estudio	25
Criterios de selección	27
Recolección de la información	28
Plan de análisis estadístico	29
Aspectos éticos	30
Infraestructura	32
Desarrollo del proyecto	33
Exposición a ftalatos y bisfenol A	35
Curvas de crecimiento pulmonar en niños sanos desde los 3 hasta los 9 años de edad, Cuernavaca México	40
Efecto de los ftalatos y bisfenol A sobre la función pulmonar	55
Discusión	67
Resultados obtenidos	67
Circunstancias que se presentaron durante el seguimiento del proyecto	68
Conclusiones, propuestas y recomendaciones	72
Bibliografía	73
Anexos	85
Productos derivados de la investigación	86
Currículum vitae del autor de la tesis	87
Anexo 1	89
Anexo 2	92
Anexo 3	114
Anexo 4	123
Anexo 5	130

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Características de los participantes en el estudio (n = 290).

Cuadro 2. Concentraciones de los metabolitos de ftalato y bisfenol A en 290 muestras de orina materna.

Cuadro 3. Correlaciones entre factores comunes rotados y las concentraciones de metabolitos de ftalato y bisfenol A (n = 290).

Cuadro 4. Características basales de la población de estudio por sexo.

Cuadro 5. Promedio de las mediciones de resistencia y reactancia por grupos de edad.

Cuadro 6. Características de una submuestra de la población de estudio, n=221.

Cuadro 7. Características basales de la población de estudio por sexo.

Cuadro 8. Características basales de la función pulmonar por sexo.

Cuadro 9. Crecimiento de la función pulmonar

Cuadro 10. Características de la población de estudio.

Cuadro 11. Concentraciones promedio (en $\mu\text{g/g}$ de creatinina) de los metabolitos de ftalato y bisfenol A en muestras de orina de mujeres embarazadas.

Cuadro 12. Efecto de los ftalatos sobre la Resistencia a frecuencia 6 Hz ($\text{hPa}\cdot\text{s}\cdot\text{L}^{-1}$) por grupo de tratamiento.

Cuadro 13. Efecto de los ftalatos sobre la Reactancia a frecuencia 6 Hz ($\text{hPa}\cdot\text{s}\cdot\text{L}^{-1}$) por grupo de tratamiento.

Figura 1. Correlaciones entre metabolitos de ftalato y bisfenol A provenientes de orina de mujeres mexicanas embarazadas (n = 290) en escala logarítmica.

Figura 2. Distribución de las mediciones de Rrs y Xrs por edad en meses.

Figura 3. Comparación de la distribución de Rr6 y Xr6 de nuestro estudio versus los del INER, por edad y talla.

Figura 4. Seguimiento de la función pulmonar por edad.

Figura 5. Predicciones de la resistencia y reactancia a 6, 8 y 10 hertz con respecto a la edad y a la puntuación z- de la talla para la edad.

Figura 6. Seguimiento de la resistencia y reactancia a frecuencia 6 y 20 Hz por grupo de suplementos y edad.

Figura 7. Interacciones entre el grupo de suplemento y el metabolito de ftalato.





◆◆ ANTECEDENTES

Generalidades

En los últimos años ha llamado la atención de los investigadores el incremento en la producción y el uso de materiales plastificantes. Los plastificantes se utilizan durante la fabricación del plástico con el propósito de mejorar la calidad, resistencia, flexibilidad y duración (Mitro, Johnson, y Zota 2015; Robinson y Miller 2015). Sin embargo, son sustancias químicas consideradas “disruptores endocrinos” (endocrine-disrupting chemicals, EDCs) porque tienen similitud estructural con las hormonas endógenas y pueden alterar las rutas metabólicas de estas (Gore et al. 2015). Dichas sustancias están presentes en gran cantidad de productos de uso cotidiano y carecen de normativas, de tal forma que la salud de la población y del medio ambiente está en riesgo debido a sus características toxicológicas (Romano Mozo, Dolores 2012; U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 2013).

Dentro de los principales compuestos clasificados como disruptores endocrinos se han descrito a los ftalatos y al bisfenol A (BPA) (Balabanić et al., 2011). Conocer los mecanismos y modos de acción es una de las prioridades de la investigación en el campo de la salud. En los últimos años ha habido avances importantes, pero el mecanismo por el que alteran el equilibrio hormonal aún es controversial.

Los ftalatos o ésteres de ftalato se comenzaron a producir en 1920 y su uso se incrementó a partir de nacimiento del PVC. Se estima que anualmente se producen en el mundo alrededor de 400,000 toneladas de ftalatos. Se utilizan mucho en diversas industrias, como la industria de los alimentos para el resguardo y/o empaquetado (López-Carrillo et al. 2009; C.-G. Bornehag et al. 2004; Rudel y Perovich 2009; Heudorf, Mersch-Sundermann y Angerer 2007); en la industria de los cosméticos, perfumes y otros productos para el cuidado personal (lacas para el cabello, jabones, champú, esmaltes para uñas y cremas humectantes).; en juguetes flexibles de plástico y de vinilo; en cortinas para ducha y persianas de vinilo. También están presentes en terminados para madera, detergentes, adhesivos, tuberías de plástico para plomería, lubricantes, disolventes, insecticidas, materiales de construcción, pisos de vinilo. Incluso se encuentran en tubos y bolsas para líquidos de uso médico y en dispositivos médicos como cubiertas de píldoras o sondas y catéteres. La exposición a los ftalatos se da a gran escala a través de la ingestión (agua y alimentos), la inhalación, por contacto (juguetes) y al usar equipos y dispositivos médicos (Lewis et al. 2013; Parlett, Calafat, y Swan 2012).



Entre los diferentes tipos de ftalatos, los más empleados son el Di(2-Etilhexil) ftalato (DEHP), Di(iso-Decil) ftalato (DiDP), Di(iso-nonil) ftalato (DiNP), Dimetil ftalato (DMP), DiEtil ftalato (DEP) y Di(n-Butil) ftalato (DnBP). El DEHP es el plastificador más usado en el PVC, mientras que los DEP, DBP y DMP son usados en los productos cosméticos.

La propiedad plastificante de los ftalatos proviene de su estructura química. Los ftalatos representan una amplia familia de productos químicos que contiene un anillo de benceno, dos grupos carbonilo y dos grupos de alcohol que generan una estructura de diéster. Las ramificaciones comunes de DEHP, DBP, BBP, DINP y la función de cadena ramificada de alcohol contiene de 6 a 13 átomos de carbono. Los ftalatos lineales contienen grupos lineales e incluyen una cadena de alcohol corta. El DEP y DMP y otros ftalatos tienen cadenas con longitudes de siete a 11 átomos de carbono y se utilizan para impartir una mayor flexibilidad a bajas temperaturas.

La estructura del anillo de los ftalatos de benceno ayuda a reducir su viscosidad, pero también los hace más difíciles de degradar. Los ftalatos se mueven libremente a través del polímero PVC para impartir flexibilidad y otras características. Puesto que no se enlazan covalentemente con el polímero, son fácilmente liberados al aire, agua, saliva, sangre, soluciones intravenosas, fórmulas nutricionales y otros materiales de extracción. Los ftalatos tienden a ser solubles en grasa por lo que se lavan más rápido en soluciones que contienen lípidos. Dependiendo de las circunstancias de uso, del 2 al 50% del contenido de ftalatos puede salir del producto durante su vida útil (DiGangi J et al. 2002).

La tendencia actual en toxicología es evaluar el efecto de mezclas de contaminantes y su impacto sobre la salud humana, dado que se acerca más a la realidad de las exposiciones en los individuos (Altenburger et al. 2013). Una herramienta esencial para realizar este tipo de evaluaciones es la generación de índices de exposición que permitan evaluar el efecto conjunto o combinado en la salud (Larsson et al. 2014) pues a bajas concentraciones, o combinados entre sí, podrían causar alteraciones a nivel hormonal que se reflejen en la salud, sobre todo en la de población infantil.

Exposición a ftalatos y bisfenol A

Ftalatos

La exposición durante la gestación a ftalatos ha sido relacionada con efectos a nivel reproductivo en los recién nacidos del género masculino, como disminución de la distancia anogenital (Bustamante-Montes et al. 2013; Swan et al. 2005), con el tamaño



del feto (Latini et al. 2006; Adibi et al. 2009; Meeker et al. 2009; Whyatt et al. 2009), abortos (Ferguson, McElrath, y Meeker 2014), efectos potenciales sobre el neurodesarrollo e incremento en el Índice de Masa Corporal (IMC) y la circunferencia de la cintura (Engel et al. 2010; Kobrosly et al. 2014; Philippat et al. 2017), . Por su parte, la exposición a BPA se ha relacionado con abortos (Sugiura-Ogasawara et al. 2005); con inhibición de la liberación de adiponectina, hormona específica de los adipocitos que aumenta la sensibilidad a la insulina y que, por lo tanto, tiene la posibilidad de agravar la resistencia a la insulina y la susceptibilidad a los síndromes relacionados con la obesidad, como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (Hugo et al. 2008; Alonso-Magdalena et al. 2010).

Harley y colaboradores evaluaron el IMC, la grasa corporal y la presencia de sobrepeso u obesidad en niñas de 9 años en un estudio prospectivo sobre la exposición prenatal y postnatal al BPA. Encontraron un efecto negativo significativo de la exposición prenatal a BPA sobre el IMC, la grasa corporal y la probabilidad de tener sobrepeso u obesidad. Sin embargo, este efecto fue positivo al considerar la exposición postnatal (Harley et al. 2013).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) estima que 5% de las mujeres en edad reproductiva en Estados Unidos están contaminadas con el 75% o más del nivel de solo uno de los ftalatos. Muchas de estas mujeres también están regularmente expuestas a cantidades significativas de BBP y DEHP por lo que sus exposiciones globales plantean riesgos aún mayores (DiGangi J et al. 2002; Robins J et al. 2011).

En la población general, la principal fuente de exposición es a través del consumo o ingestión de alimentos contaminados, seguida de la inhalación. Los niños están relativamente más expuestos por la ingestión de polvo dentro de las casas, alimentos, juguetes, etc. (Clark K, Cousins IT, y Mackay D 2003).

Los ftalatos se metabolizan y excretan rápidamente y no se acumulan en el organismo (Anderson et al. 2001). Los diésteres de ftalatos ingeridos se hidrolizan en el intestino transformándose en el correspondiente monoéster que es absorbido. Los metabolitos de los ftalatos hidrofóbicos como DEHP y DINP se excretan por la orina y a través de la leche materna (Genuis et al. 2012).

Estudios recientes han mostrado que la exposición a ftalatos tiene un efecto negativo en la salud respiratoria de los niños: obstrucción bronquial, sibilancias persistentes, tos y flema, asma y niveles de óxido nítrico exhalado en niños menores de 8 años (Jouni J.K. Jaakkola y Knight 2008; Kimber y Dearman 2010; C. G. Bornehag y Nanberg 2010; Just et al. 2012; Choi et al. 2010;) Sin embargo, Hoppin no encontró en niños alguna relación entre estos metabolitos y los síntomas respiratorios (Hoppin et al. 2013).



En la población adulta también se ha encontrado evidencia de que la exposición a los materiales de plástico provocan asma (J. J. K. Jaakkola 2006; Kanazawa et al. 2010). En ratones se ha encontrado una posible correlación entre la exposición a ftalatos y el asma puede a través de su efecto en la diferenciación de las células Th2 (principalmente en la producción de IgG1 e IgE) y la inducción de la producción de mastocitos y eosinófilos, que son parte importante de la primeras etapas de la inflamación y parte importante del mecanismo de la patogénesis del asma (C. G. Bornehag y Nanberg 2010).

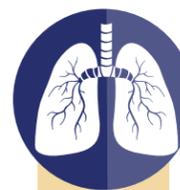
Son pocos los estudios que han evaluado la exposición de los metabolitos de los ftalatos en orina a través del tiempo para determinar un posible efecto sobre el desencadenamiento del asma (Tillett 2013).

Exposición a Bisfenol A

Por otro lado, el bisfenol A (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano, n.º CAS 80-05-7) es una sustancia química que se produce en grandes cantidades y se usa en la manufactura de algunos plásticos y resinas epoxi (poliepóxido). Las resinas epoxi se usan como lacas en productos metálicos, latas, tapas de botellas y tubos de suministro de agua. Algunos selladores dentales y materiales compuestos pueden contribuir a la exposición al bisfenol A (Red Internacional de Autoridades en Materia de Inocuidad de los Alimentos (International Food Safety Authorities Network, INFOSAN) 2009)

La principal vía de exposición humana al bisfenol A es a través de la dieta (Wilson et al. 2007). El aire, el polvo, y el agua son también otras fuentes posibles de la exposición. Esta sustancia puede filtrarse en los alimentos proveniente de los revestimientos protectores internos de resina epoxi de las latas y de vajillas de policarbonato, los recipientes para almacenar alimentos, las botellas de agua y los biberones. Los plásticos de policarbonato se encuentran en envases de bebidas, incluso en las botellas de agua, en los biberones, y los dispositivos médicos; están presentes en los discos compactos, equipos de seguridad resistente al impacto. El grado en que el bisfenol A se filtra de las botellas de policarbonato al líquido, depende de la temperatura del líquido o botella y la edad del recipiente. El Bisfenol A también se ha encontrado en la leche materna (Loganathan y Kannan 2011; Fenichel, Chevalier, y Brucker-Davis 2013).

Desafortunadamente, hay poca información acerca de la variabilidad y vías de exposición al bisfenol A en mujeres embarazadas (Braun et al. 2011). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2003-2004 (NHANES III) realizada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) encontró niveles detectables de bisfenol A en 93% de las 2.517 muestras de orina de personas de seis años y más (Calafat et al. 2008; Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction 2008).



Se ha reportado la inducción de asma experimental en ratones causada por la exposición perinatal al bisfenol, pero esta relación no ha sido valorada en los seres humanos (Bonds y Midoro-Horiuti 2013). Actualmente el Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental (NIEHS) y el programa nacional de Toxicología de los E.U. tienen un consorcio para concentrar los recursos para investigaciones realizadas en los últimos cuatro años sobre el bisfenol A con el objeto de resolver controversias sobre los posibles efectos en la salud humana de la exposición a bajos niveles de agentes con actividad endocrina (Birnbaum et al. 2012; Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction 2008).

Numerosos estudios han mostrado que la exposición a contaminantes del aire tiene un efecto adverso sobre la salud respiratoria, específicamente provocando disminución de la función pulmonar, asma, síntomas nasales, bronquitis y sensibilización a alérgenos inhalados, tanto en niños como en adultos (Calderón-Garcidueñas et al. 2003, 2006; Barraza-Villarreal et al. 2008). Aunque la evidencia de una relación entre la exposición a plásticos y sibilancias está creciendo, hasta la fecha no hay estudios que de forma contundente hayan reportado una relación entre la exposición a ftalatos y bisfenol A y efectos dañinos sobre el desarrollo y la maduración pulmonar que a futuro podrían repercutir en la salud individual.

El efecto sobre la salud de los niños podría ser mayúsculo dada la vulnerabilidad de este grupo pues en esta etapa los están en proceso de maduración. Además, en los niños, las enfermedades respiratorias son más comunes y se manifiestan por síntomas respiratorios, disminución de la función pulmonar y mayor incidencia de consultas de urgencia en hospitales por estos padecimientos.

Función Pulmonar

El desarrollo y crecimiento pulmonar se inicia en la etapa fetal y postnatal y finaliza hasta los 18 años de edad (Iñiguez F., Sánchez I. 2008; Nicolás Cobos, Silvia Gartner y Conrad Reverté, s/f). Durante estas etapas el pulmón puede presentar alteraciones congénitas o adquiridas que pueden evidenciarse en edades más avanzadas y en cuyo daño puede ser irreversible.

Período Prenatal

Durante la etapa prenatal el crecimiento pulmonar se presenta en cuatro fases: La embrionaria, pseudoglandular, canalicular y sáculo-alveolar caracterizadas por hallazgos histológicos distintos, que van desde desarrollo de las vías aéreas mayores, desarrollo



de vías aéreas y bronquiolos terminales (diferenciación de bronquios, bronquiolos y acino), vascularización y mayor desarrollo de acinos hasta la subdivisión de sáculos y formación de alvéolos, aunque el 85 % de los alvéolos se desarrolla en el período postnatal. Mientras que el desarrollo pulmonar se da a partir de la embriogénesis (desarrollo del embrión), morfogénesis (desarrollo del aspecto externo e interno de la configuración pulmonar, vías aéreas y zonas de intercambio gaseoso), diferenciación (desarrollo de las células especializadas a partir de primitivas precursoras) y crecimiento (expansión volumétrica pulmonar y masa tisular); esta última etapa ocurre en la vida fetal y en la postnatal (Nicolás Cobos, Silvia Gartner, y Conrad Reverté, s/f; Iñiguez F., Sánchez I. 2008; Burri 2006).

Período Postnatal

Las vías aéreas del recién nacido están ya completamente desarrolladas, mientras que sus unidades respiratorias se encuentran aún en fase de crecimiento. Antes de los tres años, más que aumentar en tamaño, los alvéolos se multiplican (Kotecha 2000a, 2000b; Hislop 2002) y madura la vascularidad. Entre los tres y los ocho años, los alveolos se siguen desarrollando y aumentando en número, pero el crecimiento celular pulmonar excede al corporal. Posteriormente, el pulmón crece al mismo ritmo que el resto del organismo hasta los 18 años. Se estima que al nacer el número de alvéolos es de 20 a 50 millones. Para los 8 años este número ha alcanzado unos 300 millones, muy semejante al del adulto. En cuanto a la superficie de intercambio gaseoso, se estima que esta corresponde a unos 2.8 m² al nacer, 32 m² hacia los 8 años y 75 m² en la vida adulta (Kotecha 2000b; Sánchez I 2001; Lumb AB 2005; Iñiguez F., Sánchez I. 2008; Burri 2006).

El desarrollo del pulmón es especialmente sensible a una gran cantidad de agresiones durante la gestación y durante los primeros años de la vida. Muchas de las enfermedades del adulto tienen su origen probablemente “in útero” o durante la primera infancia. Posiblemente algunos de los tratamientos a los que sometemos a los niños afectan la maduración pulmonar

Evaluación mecánica del pulmón

En el sistema respiratorio en constante crecimiento y desarrollo del niño sano o enfermo, es importante poder evaluar la parte mecánica a través de la oscilometría o espirometría, dependiendo de la edad del paciente.

El desarrollo y crecimiento normal del pulmón durante la infancia es esencial para alcanzar los niveles máximos de función pulmonar en la edad adulta. Un crecimiento disminuido de la función pulmonar está representado por valores bajos de volúmenes



y flujos pulmonares, incrementando el riesgo de presentar síntomas graves durante infecciones respiratorias o exacerbaciones de asma, o de presentar efectos adversos tras la exposición a toxinas respiratorias y, en definitiva, un incremento de riesgo de desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en la edad adulta (Miller y Marty 2010; Kajekar 2007). La asociación entre FEV1 bajo y el incremento en el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares (de Miguel Díez, Chancafe Morgan y Jiménez García, 2013) o de mortalidad (Mascarenhas, Azevedo, y Betten-court 2010) por cualquier causa enfatizan la importancia de alcanzar un nivel máximo de función pulmonar.

Oscilometría

Un parámetro ampliamente utilizado para evaluar el decremento en la función pulmonar en los niños se basa en el flujo espiratorio al 1er segundo y en la capacidad vital forzada, medidos a través de la espirometría. Sin embargo, estos parámetros son muy sensibles y dependen de la participación del paciente y de las características físicas del ambiente. Una alternativa que se ha evaluado en los últimos años para utilizar en población preescolar es la oscilometría de flujo, que se basa en la técnica de oscilación forzada (FOT, por sus siglas en inglés). Ésta mide la resistencia compleja del aparato respiratorio sobre una escala de frecuencias, denominada *Impedancia Respiratoria* (Zrs) y tiene 2 componentes: la Resistencia (Rrs) y la Reactancia (Xrs). La *resistencia* representa la resistencia al flujo de la vía aérea y la *reactancia* corresponde a la *elasticidad* (la relación entre la presión y el volumen) tóracopulmonar y los cambios proporcionales de volumen pulmonar. Normalmente la resistencia va disminuyendo con la frecuencia del flujo respiratorio, mientras que la reactancia va aumentando (Komarow et al. 2012).

Esta técnica ha resultado apropiada para pacientes de corta edad dado que no requiere de una cooperación muy activa, por lo que es factible usarla tanto en niños sanos como enfermos a partir de los 2 o 3 años de edad para detectar el inicio o el progreso de alguna enfermedad, así como la respuesta al tratamiento. Clínicamente la FOT ha mostrado ser más sensible que la espirometría en la detección de patrones pulmonares obstructivos. Diversos estudios principalmente realizados en Europa han demostrado que esta técnica es útil para medir la respuesta a broncodilatadores en niños asmáticos (Delacourt et al. 2000) y para determinar la severidad de la obstrucción de la vía aérea durante el asma agudo en niños más pequeños que no pueden realizar espirometría (Ducharme y Davis 1997).



En población mexicana no existen estudios que reporten la evaluación de la función pulmonar a través de esta técnica, por lo que no se cuenta con valores de referencia. Sin embargo, la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS), recomiendan utilizar la FOT para medir la función pulmonar (Oostveen et al. 2003; Beydon et al. 2007).

Ventana de exposición

En los últimos años se ha reconocido el origen fetal de algunas enfermedades y es común que este origen sea identificado como “programación” o como la hipótesis de Braker. Se refiere a una alteración permanente de la estructura y función de los órganos y tejidos por factores que actúan sobre el feto o el lactante, ocasionando la aparición de enfermedades en edades más tardías (Barker et al. 1991; Godfrey et al. 1996; WHO (World Health Organization)/UNEP (United Nations Environment Programme) 2013). Algunos de los factores implicados en la "programación" del sistema respiratorio corresponden a la nutrición fetal, la exposición fetal al tabaquismo materno durante el embarazo, y la exposición ambiental a alérgenos o infecciones respiratorias de origen viral durante la infancia (Langley-Evans, Phillips, y Jackson 1997; Langley et al. 1994; Warner et al. 1998; Warner 1999). El asma infantil o la atopia pueden ser el resultado de una predisposición genética y factores del entorno. Algunos de estos factores también son programadores potenciales del sistema inmunológico en desarrollo. Específicamente los efectos del tabaco sobre el feto han sido motivo de múltiples estudios; los hijos de madres fumadoras presentan alteraciones irreversibles en el crecimiento pulmonar con la consiguiente alteración de la función pulmonar (Wang y Pinkerton 2008; Hoo et al. 1998; Dezateux y Stocks 1997).

Estado de Morelos

El Estado de Morelos tiene 1,777,227 habitantes (2010), que representan 1.6% de la población total de México. Es una población joven ya que 47% es menor de 23 años, de los cuales 28% son niños menores de 14 años. La densidad de población promedio es de 364 habitantes por kilómetro cuadrado, similar a la de la mayoría de los países desarrollados. No obstante, la población se concentra en las áreas urbanas (84% de la población vive en localidades urbanas y el 72% de la misma radica en las zonas metropolitanas de Cuernavaca y Cuautla) (“Censo de Población y Vivienda 2010”).

Morelos es una región altamente industrializada que ocupa el 7o lugar en producción física manufacturera a nivel nacional (Secretaría de Desarrollo Económico de Morelos (SEDECO) con datos de INEGI, 2011”). El 24% de su producto Interno Bru-



to depende de la industria manufacturera y 9% de la agricultura y ganadería. Cuenta con tres parques industriales dos de los cuales se encuentran en la zona metropolitana de Cuernavaca: la Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca (CIVAC) y el Parque Industrial de Emiliano Zapata (EZ). El tercero se encuentra en la zona metropolitana de Cuautla llamada el Parque Industrial de Cuautla (PIC). CIVAC es una de las ciudades industriales con mayor tradición en el interior del país y en ella se localiza gran parte de las industrias químico-farmacéutica y automotriz. Por otro lado, el Parque Industrial de Emiliano Zapata es un espacio industrial de 25 hectáreas que se encuentra urbanizado casi en su totalidad y está ubicado al sur del área metropolitana de Cuernavaca y cuenta con importantes desarrollos industriales entre los cuales destacan la producción de los derivados del petróleo y del carbón, industrias químicas, del plástico y del hule.

Sí bien la literatura indica que la principal fuente de exposición a ftalatos o bisfenol A es a través de la dieta por el uso de utensilios y el plástico que se utiliza para el empaque de alimentos, la dieta como tal es solo una ruta importante de exposición. Otra ruta es la inhalada y el efecto sobre la salud respiratoria de la población infantil es sinérgico, dadas las condiciones del entorno en las que viven. Tanto los ftalatos como el bisfenol A se localizan en el aire, agua, suelo y materiales de uso común.

En Cuernavaca hay industrias de plástico y automotrices que necesariamente utilizan estos químicos que contaminan los mantos acuíferos que aún subsisten en la periferia de la ciudad, el aire y suelo.

◆◆ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por un lado, en los últimos años la Ciudad de Cuernavaca y municipios conurbados han crecido de forma desmedida. Se ha incrementado el tráfico vehicular, el parque industrial y los desechos industriales y urbanos que contaminan barrancas y acuíferos. Por otro lado, el uso de materiales de plástico o polímeros es desmedido ya que estos han venido a sustituir en gran medida al acero y el vidrio. En los últimos años, las enfermedades respiratorias se encuentran dentro de las principales causas de morbilidad a nivel estatal y nacional, en particular, las infecciones respiratorias agudas y el asma (SSM/EPI/SUIVE/2010/ SUIVE-1-2011-Proceso-Departamento de Epidemiología-Coord. de Vigilancia Epidemiológica 2008).

Los niños que padecen infecciones respiratorias recurrentes pueden presentar limitación crónica del flujo aéreo causado por alteraciones en el desarrollo pulmonar.



Las infecciones respiratorias severas o recurrentes a lo largo de la primera infancia interfieren con el desarrollo del parénquima pulmonar o de las vías aéreas (Amin et al. 2000; Pino, García Río, y González Pérez-Yarza 2008).

El pulmón del recién nacido no es el pulmón de un adulto en miniatura. La capacidad residual funcional aumenta de 80 mL a 3.000 mL. El peso aumenta de 60 gr a 750 gr y la mayor proporción de este crecimiento afecta a la zona respiratoria. En una primera fase los alvéolos aumentan en número, y más tarde en tamaño. Son muchas las posibilidades de alterar el desarrollo y crecimiento pulmonar postnatal, tanto de índole terapéutico como patológico (Pino, García Río, y González Pérez-Yarza 2008).

El desarrollo del pulmón es especialmente vulnerable frente a una gran cantidad de agresiones durante la gestación y durante los primeros años de la vida. Muchas de las enfermedades del adulto tienen su origen probablemente “in útero” o durante la primera infancia. Posiblemente algunos factores, entre otros los tratamientos a los que sometemos a los niños, el estado socioeconómico, la herencia, los factores de la vivienda, los estilos de vida, la convivencia con animales y la exposición a contaminantes ambientales afectan la maduración de sus pulmones.

La exposición a ftalatos y bisfenol A ha sido relacionada con problemas de salud reproductiva, malformaciones y neurotoxicidad. Actualmente existe controversia sobre el efecto de estos químicos sobre la función pulmonar de la población infantil. Sin embargo, son pocos los estudios epidemiológicos a nivel mundial, que hayan evaluado el efecto de los ftalatos y del bisfenol A sobre la función pulmonar en niños preescolares midiendo la función pulmonar a través de oscilometría de flujo. Este método ha mostrado mayor sensibilidad para detectar patrones pulmonares obstructivos.

◆◆ JUSTIFICACIÓN

Se sabe que, algunas enfermedades respiratorias como el asma y las enfermedades alérgicas se han incrementado alrededor del mundo (Meltzer, Szwarcberg, y Pill 2004), y en Latinoamérica y México constituyen un importante problema de salud pública (Mallol et al. 2000; Baena-Cagnani et al. 1999). Son responsables de altos costos de atención médica, (Newacheck y Stoddard 1994) de elevación del ausentismo escolar (Rubio-Padilla et al. 2009), de disminución en calidad de vida y tienen un alto costo socioeconómico (Böcking, Renz, y Pfefferle 2012). Son muchos los estudios alrededor del mundo que han documentado los efectos adversos sobre la salud respiratoria



infantil causada por la exposición a contaminantes del aire (Heinrich et al. 2005; Host et al. 2012), pero son pocos los que han estudiado la exposición a ftalatos y menos aún a bisfenol A y los resultados han sido contradictorios.

La evidencia experimental en animales sugiere que los ftalatos y el bisfenol A pueden tener un impacto negativo en la salud respiratoria. Resultados publicados recientemente indican que en la dieta se encuentran importantes cantidades de metabolitos de ftalatos (Trasande et al. 2013; Bradley et al. 2013; Anderson et al. 2001).

La Ciudad de Cuernavaca y municipios conurbados son áreas con un importante desarrollo industrial, densamente pobladas y con un alto tráfico vehicular, por lo que los problemas de contaminación de aire, suelo y agua se han incrementado de manera importante.

Debido al crecimiento desmedido de las industrias en la zona conurbana de la Ciudad de Cuernavaca, entre las cuales destacan la industria de plástico y hule nos interesa documentar la exposición al los ftalatos y el bisfenol A, determinar su magnitud y los mecanismos por los que podrían influir en el desarrollo de enfermedades respiratorias e identificar aquellos factores que puedan ser modificables y puedan ser usados para establecer medidas preventivas (Denburg et al. 2005).

Los niños tanto en países industrializados como en vías de desarrollo están expuestos a una gran variedad de agentes químicos, físicos y biológicos. Los ftalatos y el bisfenol A pueden ser particularmente dañinos dadas las condiciones de vulnerabilidad de los niños en etapas del crecimiento y desarrollo por el contacto que tienen con material manufacturado con estos químicos, como juguetes o contenedores de alimentos. Los sistemas inmunológico y respiratorio están sujetos a cambios rápidos de crecimiento y a cambios relacionados con la diferenciación de elementos claves en sus funciones esenciales durante etapas tempranas por lo que son ejemplos claros de sistemas muy vulnerables (Meltzer, Szwarcberg, y Pill 2004).

◆◆ HIPÓTESIS

- ◆ La exposición prenatal a ftalatos reduce el crecimiento y desarrollo pulmonar del niño y se refleja en la disminución de la función pulmonar.
- ◆ La exposición prenatal a bisfenol A reduce el crecimiento y desarrollo pulmonar del niño y se refleja en la disminución de la función pulmonar.



◆◆ OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el efecto de la exposición prenatal a (ftalatos y bisfenol A (disruptores endocrinos) sobre la función pulmonar en niños residentes de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.

Objetivos específicos:

- ◇ Determinar las concentraciones de los metabolitos de ftalatos y bisfenol A en muestras de orina materna obtenidas durante el embarazo.
- ◇ Evaluar el crecimiento pulmonar de los 3 a los 9 años en niños a partir de las mediciones oscilométricas.
- ◇ Evaluar la relación entre la función pulmonar y la exposición prenatal a cada uno de los metabolitos de los ftalatos mono(3-carboxipropil) ftalato, monoetil ftalato, mono(2-etil-5-carboxipentil) ftalato, mono(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato, mono(n-butil) ftalato, mono(isobutil) ftalato, mono(2-etil-5-oxohexil) ftalato, monobencil ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato y al bisfenol A en niños de Cuernavaca, Morelos.

◆◆ METAS Y PRODUCTOS

A partir de los objetivos se propusieron las siguientes metas:

1. Determinación de las concentraciones de metabolitos de ftalatos y BPA provenientes de muestras de orina materna tomadas durante el embarazo.
2. Continuar con el seguimiento de los niños hasta los 9 años de edad.
3. Validar, estandarizar y concentrar la información obtenida en el estudio de seguimiento del binomio madre-hijo desde la etapa prenatal hasta los 9 años de edad.
4. Analizar la información para obtener los productos.

Como productos, se establecieron 3 artículos con el propósito de describir y evaluar cada parte importante del proyecto. En la primera parte, exposición prenatal, se



describen las concentraciones obtenidas de los metabolitos de ftalatos y BPA analizados, así como la relación entre sí, y se proponen índices generados a través de la estructura de correlación observada. La segunda corresponde a la función pulmonar desde los 3 años hasta los 9 años, en la cual se evalúa el crecimiento pulmonar promedio a partir de los 3 años y hasta los 9 años, explorando la parte mecánica del pulmón por medio de la oscilometría utilizando la técnica de oscilación forzada. La tercera y última parte describe el efecto de la exposición prenatal de estos químicos sobre la función pulmonar.

Artículo 1. Índices de exposición a Ftalatos y BPA y su potencial uso en estudios epidemiológicos.

Artículo 2. Curvas de crecimiento pulmonar en niños sanos desde los 3 hasta los 9 años de edad, Cuernavaca México.

Artículo 3. Efecto de los ftalatos y bisfenol A sobre la función pulmonar

Desafortunadamente, durante el seguimiento se identificó un patrón de comportamiento no esperado en las mediciones de función pulmonar durante la segunda fase del proyecto que afectaron los resultados, por lo que los artículos 2 y 3, aunque fueron desarrollados y trabajados como artículos, no son publicables.

◆◆ MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de estudio y población de estudio

La presente propuesta surge y se basa en un ensayo clínico aleatorizado doble ciego (diseño de bloques aleatorizado doblemente cegado) en mujeres embarazadas asignadas aleatoriamente para recibir 400 mg de ácido docosahexaenoico (DHA) o un placebo (en 2 capsulas de 200 mg cada una) todos los días a partir de la mitad del embarazo (18 a 22 semanas de gestación) hasta el momento del parto (INSP en México: # CI-011, en ensayos clínicos. gov: NCT00646360). Este estudio se realizó en colaboración con el Departamento de Hubert de Salud Global, Escuela de Salud Pública Rollins, Universidad de Emory, Georgia Atlanta, EE.UU.; el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), México; y por el Hospital General del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Cuernavaca, México. El protocolo fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Emory y por los Comités de Ética y Bioseguridad del INSP y del IMSS. Todos los procedimientos se explicaron a las participantes quie-

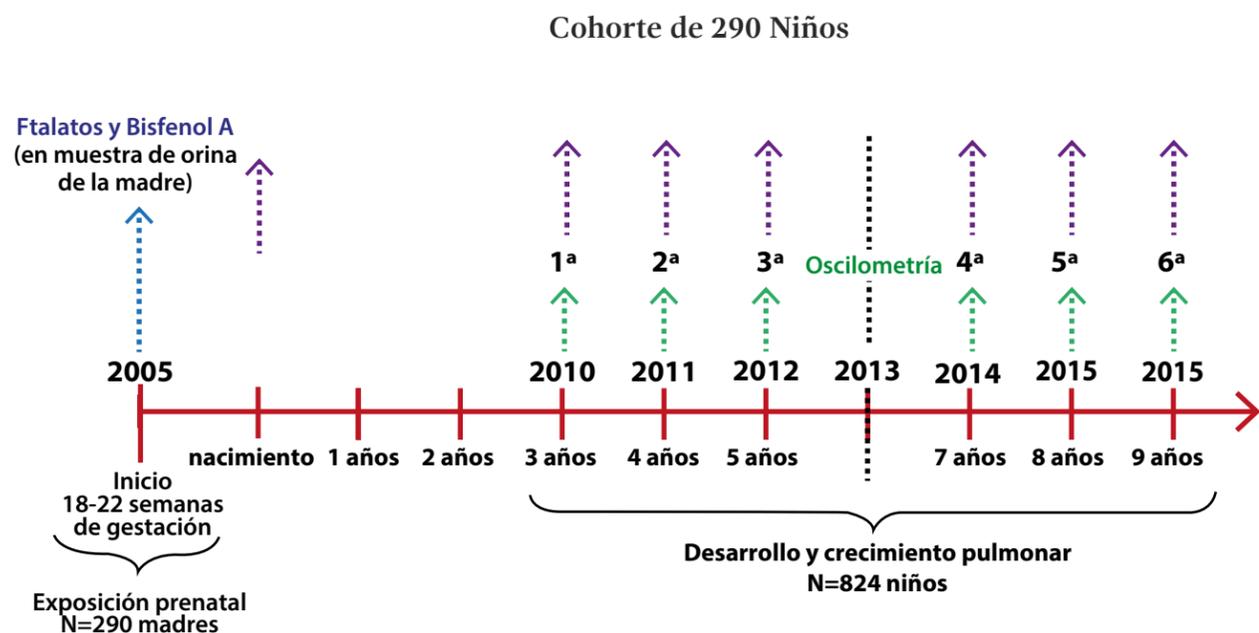


nes firmaron una carta de consentimiento informado. Los datos del estudio fueron revisados periódicamente por un Comité externo de Monitoreo de Seguridad y Datos (DSMC). Para más detalles consultar el artículo de Usha Ramakrishnan, 2010 (Ramakrishnan et al. 2010).

Las participantes fueron reclutadas en el Hospital General del IMSS de Cuernavaca, durante las visitas de rutina prenatal entre febrero del 2005 y febrero del 2007. Las mujeres incluidas en el ensayo clínico tenían entre 18 y 35 años y fueron reclutadas entre las 18 y 22 semanas de gestación y seguidas durante la gestación, al momento del parto y después del parto junto con sus hijos. Se obtuvo información socioeconómica, antropométricas dieta, actividad física y antecedentes familiares asociadas a enfermedades respiratorias.

Diseño de estudio

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se estableció un estudio de cohorte a partir del ensayo clínico previamente descrito con 290 binomios madre-hijo. La cohorte de niños inició al momento de su nacimiento y se siguió hasta los 9 años. La exposición prenatal a los disruptores endocrinos bisfenol A y ftalatos se evaluó a partir de muestras de orina de la madre durante el embarazo. La función pulmonar se evaluó en los niños a los 3, 4, 5, 7, 8 y 9 años.



Población de estudio

Se planeó incluir en la cohorte anidada 290 binomios madre-hijo con información de exposición prenatal a ftalatos y BPA y datos de seguimiento para oscilometría, antropometría y síntomas respiratorios de los infantes hasta los 9 años de edad, así como otras variables como antecedente de IgE de la madre, tiempo que la madre tomó el suplemento, IMC, educación y exposición a humo de tabaco. Las características sociodemográficas de las madres fueron obtenidas mediante un cuestionario aplicado en el momento que ingresaron al estudio. El antecedente de atopia materna se obtuvo midiendo los niveles de IgE específica materna en plasma (IU/ml); las mediciones de oscilometría, antropometría y síntomas respiratorios de los niños se obtuvieron desde los 3 hasta los 9 años de edad en la revisión de salud anual durante la cual se aplicó un cuestionario y se registró la presencia de síntomas respiratorios durante los 15 últimos días; después se midió el peso y luego se realizó la oscilometría.

La potencia estadística que se obtuvo con base en la muestra de 290 niños y 6 mediciones repetidas en promedio fue de 66%, considerando el tipo de diseño y 2 grupos de comparación.

Criterios de selección

Para la selección y reclutamiento de los niños participantes se consideraron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- ◇ Niños que continuaran con su participación en la cohorte desde su nacimiento.
- ◇ Residentes de Cuernavaca y otros municipios de Morelos quienes tuvieran la intención de continuar con su residencia en los próximos 5 años.
- ◇ Libres de algún padecimiento mental o enfermedad crónica como trastornos endocrinos (hipertiroidismo, etc.) de la infancia al momento de ingresar al estudio.
- ◇ Deseo y aceptación de participar mediante la firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- ◇ Presencia de trastornos somatodismórficos.
- ◇ Uso crónico de medicamentos para enfermedades como la epilepsia u otras.



Recolección de la información

Variables dependientes o de interés

La evaluación del crecimiento pulmonar de los niños se valoró a partir de la función mecánica pulmonar evaluada por medio de la técnica de oscilación forzada (FOT por sus siglas en inglés) (equipo I2M; Chess Medical, Belgium, marketed in Italy by Cos-med) siguiendo las especificaciones de la Sociedad Respiratoria Europea (*European Respiratory Society*, ERS) (Oostveen et al. 2003). Se obtuvo la reactancia (Xrs) y la resistencia (Rrs) a diferentes frecuencias de oscilación, entre 2 y 48 Hertz (Hz). Para nuestro análisis reportamos resultados a 6 y 20 Hz; la primera frecuencia evalúa las vías pequeñas y el parénquima pulmonar, mientras que las frecuencias altas valoran primordialmente las vías aéreas grandes (Brashier y Salvi 2015). Todas las pruebas fueron realizadas por los mismos técnicos. Se seleccionaron las tres mejores pruebas técnicamente aceptables para promediarlas y representar la medida de la Rrs y Xrs. Para ver con más detalle el procedimiento que se siguió, revisar el artículo de Shackleton y colaboradores (Shackleton et al. 2013).

Las pruebas se repitieron cada año en dos lapsos del tiempo, la primera fase incluyó los 3, 4 y 5 años de edad y la segunda los 7, 8 y 9 años.

Exposición Prenatal a ftalatos y BPA

A partir de muestras de orina materna se evaluó la exposición prenatal a ftalatos y BPA. Se determinaron nueve metabolitos de ftalatos monoéster (mono-2-etilhexil ftalato (MEHP), 2-etil-5-carboxifenil ftalato (MECPP), 2-etil-5-hidroxihexil ftalato (MEHHP), mono-2-etilo-5-oxohexilo ftalato (MEOHP), monobenzil ftalato (MBzP), Mono-n-butil ftalato (MBP), mono-iso-butil ftalato (MiBP), monoetil ftalato (MEP), Mono-carboxipropil ftalato (MCP) y bisfenol A (BPA). Las muestras de orina se encontraban almacenadas en alícuotas de 5 ml congeladas a -70°C hasta el análisis y se procesaron por desconjugación enzimática de los glucurónidos seguida de extracción en fase sólida.

Para la determinación del ftalato, se procesaron 1-2 ml de alícuotas de orina y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con dilución isotópica acoplada con espectrometría de masas en tándem. Los análisis de BPA se realizaron mediante espectrometría de masas por cromatografía de gases, de acuerdo con un método establecido (Blount et al. 2000). Las concentraciones urinarias de ftalato y BPA se informan en microgramos por litro de orina y en microgramos por gramo de creatinina urinaria ($\mu\text{g/g}$ de creatinina). La determinación de creatinina se realizó

usando cromatografía líquida de alta resolución y los niveles se usaron para corregir la dilución de orina.

Las variables correspondientes a las concentraciones de los metabolitos de ftalatos y BPA fueron transformadas a logaritmo natural para eliminar el sesgo que presentaban.

Signos y síntomas respiratorios.

A partir de su nacimiento, los niños fueron seguidos cada 3 meses hasta los 18 meses de edad y posteriormente cada año aplicándoles un cuestionario clínico que proporcionó información sobre la presencia o ausencia de los signos y síntomas respiratorios desde el nacimiento hasta los 9 años de edad. Los indicadores que consideramos en nuestro análisis fueron: 1) tos, 2) tos seca, 3) tos con flemas y/o congestión nasal, 4) tos con infección en la garganta y 5) sibilancias, además del diagnóstico de asma.

Otras variables

La información sociodemográfica en el hogar fue obtenida mediante entrevistas con la madre durante una visita a domicilio, realizada durante el segundo trimestre del embarazo. El cuestionario incluía preguntas sobre la educación de los padres, ingreso familiar, y características del hogar (aspectos estructurales, entorno familiar y factores ambientales asociados a alérgenos).

A partir de la edad, peso y talla del niño, obtenidas antes de que se realizara la prueba de oscilometría, se construyeron el índice de talla para la edad (z-talla-edad) y el índice de peso corporal para la edad (z-BMI-age) según la OMS (WHO Multicentre Growth Reference Study Group 2006).

La información de tabaquismo se obtuvo 2 veces, a través de un cuestionario administrado a las madres durante el embarazo y en la visita de los 4 años de edad de los niños, respondiendo la pregunta “¿Fuman usted o alguien más dentro de la casa y/o en presencia del infante?”.

Niveles de IgE específica materna: Durante el embarazo se tomó una muestra de sangre materna para la determinación de los niveles de IgE específica en plasma, los cuales fueron evaluados usando un sistema de citometría de flujo Luminex Immune Tech, Inc, Menlo Park, CA. Los resultados fueron clasificados en dos categorías: como positiva $\text{IgE} \geq 0.70 \text{ IU/ml}$ (madre atópica) y como negativa $\text{IgE} < 0.70$ (madre no atópica).

Plan de análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características, sociodemográficas, exposición ambiental, antecedentes de atopia materna, así como las relacionadas con la exposi-





ción a disruptores endocrinos y los datos del seguimiento de la función pulmonar, y otras involucradas en el proceso del análisis.

A partir de las concentraciones de metabolitos (MEHP, MECPP, MEHHP, MEOHP, MCPP, MBzP, MnBP, MiBP y MEP) se generaron índices de los metabolitos de ftalatos y BPA a través de la técnica de factores, con el objeto de estudiar las correlaciones que hay entre ellos, así como su plausibilidad. Posteriormente se evaluó de manera conjunta el efecto de los ftalatos sobre los indicadores de la función pulmonar (reactancia y resistencia).

Para evaluar el crecimiento pulmonar se construyeron curvas de crecimiento usando modelos mixtos con intercepto aleatorio donde la variable de respuesta fue la resistencia o la reactancia a frecuencias 6 y 20 Hertz.

Para evaluar la asociación entre la función pulmonar y la exposición (metabolitos de ftalatos y BPA) se usaron modelos mixtos considerando intercepto aleatorio y matriz de covarianza sin estructura. Todos los modelos tomaron en cuenta la variable de exposición prenatal a priori y se ajustaron por las siguientes variables: alguna persona en casa fuma, lactancia exclusiva por 6 meses (0: menor a 6 meses 1: 6 meses de lactancia exclusiva), sexo del niño, z-score de la talla para la edad y el tiempo de seguimiento. Se evaluaron también las variables de estatus socioeconómico, sobrepeso de la madre, niveles de IgE total en el cordón umbilical del niño, el orden de nacimiento, el tipo de parto, la presencia de mascotas en casa, la humedad, los antecedentes de tabaquismo y la presencia de síntomas respiratorios, que no resultaron ser significativas ($p > 0.10$) y no modificaron los coeficientes por más del 10%. Por otro lado, cuando se evaluó la interacción entre el grupo de suplementación y cada variable de exposición sobre la resistencia y reactancia a frecuencia 6 Hz, en algunos casos resultó estadísticamente significativa ($p \leq 0.10$). Cada modelo fue sometido a un diagnóstico mediante sus residuos y para seleccionar el mejor modelo se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) (Santos Nobre y da Motta Singer 2007).

Todos los análisis se realizaron utilizando STATA versión 14 (StataCorp LP).

Aspectos éticos

Consideramos que los riesgos potenciales en la colección de datos fueron mínimos, ya que no se utilizaron procedimientos de riesgo. Las muestras de orina fueron obtenidas de las madres y del niño durante su visita al hospital. Se tomaron las precauciones apropiadas para evitar alguna molestia o daño a los sujetos.



Procedimientos de protección de los sujetos

Los cuestionarios propuestos para este estudio han sido usados en estudios anteriores sin presentar problema alguno. Los protocolos e instrumentos han sido aprobados periódicamente por los Comités de Protección a Sujetos Humanos. El estudio del ensayo clínico del cual surge el presente trabajo contó con la aprobación de los Comités de Investigación y de Ética del IMSS y del Instituto Nacional de la Salud Pública en México.

El consentimiento informado se obtuvo en de todas las participantes en el momento del reclutamiento (gestación de 20-24 semanas) y para el niño o niña, al momento del nacimiento. Los detalles de los procedimientos de estudio se les explicó en cada una de las etapas correspondientes. Los sujetos tenían la libertad de retirarse del estudio en cualquier momento sin que se ejercieran coacción o prejuicio. Los entrevistadores leyeron la forma de consentimiento de la persona entrevistada y le ofrecieron la oportunidad de preguntar cualquier duda para contestarla. Después se obtuvo la firma de consentimiento. Se obtuvo consentimiento verbal antes de la administración de cada instrumento, mismo que fue documentada. Se proporcionó una copia de la carta de consentimiento a la participante y se obtuvo una carta de consentimiento adicional para el análisis genético.

Para el presente estudio se obtuvo un adendum de la Comisión de Ética con este objetivo secundario del estudio y la carta de consentimiento informado para los objetivos de este estudio fue firmada por cada una de las participantes.

Procedimientos para asegurar la confidencialidad:

Se obtuvo un Certificado de Confidencialidad publicado por los Institutos Nacionales de la Salud para garantizar la total confidencialidad de a) todos los nuevos datos recolectados por el estudio y b) los datos nuevos obtenidos sean totalmente confidenciales. El objetivo de un Certificado de Confidencialidad es prevenir que alguien además de los investigadores del estudio tenga acceso a los datos coleccionados para los objetivos de la investigación. Los sujetos de estudio se aseguran de que la información revelada por ellos durante una entrevista o reunión será guardada de forma confidencial y no puede ser citada u obtenida por medios legales excepto con su permiso.

Los trabajadores de campo fueron entrenados en los procedimientos para minimizar en lo posible el potencial de violación a la confidencialidad, las entrevistas fueron conducidas en lugares privados, y ninguna conversación sobre los participantes del estudio se realizó en lugares públicos.

El nombre y algún otro dato que permita la identificación del sujeto fueron removidos del cuestionario antes de la captura de los mismos y no fueron incluidos en la



base electrónica. Los identificadores numéricos usados para el estudio serán incluidos de modo que los datos de varios instrumentos puedan ser vinculados; sin embargo, éstos no estarán disponibles para observadores ocasionales y no tendrán acceso a los archivos originales. Todos los ficheros de datos serán mantenidos bajo resguardo y se requerirá de una clave para acceder a estos.

A cada participante se le informó acerca del estudio, así como los riesgos que puede tener en el mismo, y solo se incluyó en el estudio a quien dio su consentimiento informado. La información que se utilice durante la presente propuesta será utilizada únicamente con fines de investigación y no se evidenciará información particular de los participantes.

Infraestructura

Financiamiento

El protocolo de investigación se deriva del proyecto aceptado El Instituto Nacional de Salud Pública es una institución cuya misión es mejorar la salud de la población mexicana. Para lograr esto es importante formar recursos humanos a nivel de maestría y doctorado que desarrolle junto con el personal académico investigación de alto impacto. El INSP cuenta con una red de computadoras que permiten que los investigadores tengan un mejor acceso a la utilización de información, así como al software (STATA, SAS y otros) para facilitar el análisis de información.

Este protocolo se deriva del proyecto aceptado para financiamiento por parte de CONACYT de la convocatoria SSA/IMSS/ISSSTE 2013.

Nombre del proyecto	Referencia CONACyT
Exposición Prenatal a Ftalatos y Bifenol A, Crecimiento Acelerado y Riesgo de Sobrepeso u Obesidad en una Cohorte de Niños Escolares Mexicanos	SALUD-2013-01-202062

DESARROLLO DEL PROYECTO

Para cumplir con el objetivo del proyecto de investigación “Exposición Prenatal a Disruptores Endocrinos y Maduración Pulmonar en Niños: Un Estudio de Cohorte” fue necesario modificar el plan de trabajo inicial a medida que el proyecto se desarrollaba de tal forma que se ajustara a los hechos y tiempos reales.

Para la evaluación de la exposición prenatal se analizaron 290 muestras de orina materna obtenidas por la mañana durante el tercer trimestre del embarazo y almacenadas en alícuotas de 5ml a -70° centígrados hasta el momento de su análisis en el laboratorio de medicina de la Escuela Rollins de Salud Pública de la Universidad de Emory, Atlanta, GA. E.U. Se determinaron las concentraciones de Bisfenol A (BPA) y de los siguientes nueve metabolitos mono esteres de ftalatos:

1. Mono(3-CarboxyPropyl) ftalato (MCP)P
2. Mono(Ethyl) ftalato (MEP)
3. Mono(2-EthylHexyl) ftalato (MEHP)
4. Mono(2-Ethyl-5-CarboxyPentyl) ftalato (MECPP)
5. Mono(2-Ethyl-5-HydroxyHexyl) ftalato (MEHHP)
6. Mono(2-Ethyl-5-OxoHexyl) ftalato (MEOHP)
7. Mono(n-Butyl) ftalato (MnBP)
8. Mono(isoButyl) ftalato (MiBP)
9. Mono(Benzyl) ftalato (MBzP)

La función pulmonar de los niños preescolares y escolares se evaluó a través de oscilometría utilizando la técnica de oscilación forzada. La función pulmonar fue la variable de desenlace de la investigación. Como resultados se obtuvieron la resistencia respiratoria (Rrs) y la reactancia reapirotoria (Xrs) a diferentes frecuencias de oscilación, entre 2 y 48 Hz. A partir de las pruebas técnicamente aceptables se construyeron indicadores de reactancia y resistencia. Se obtuvo el promedio de las mediciones para cada una de las frecuencias respiratorias (Rrs y Xrs) de cada año de seguimiento. Para nuestro análisis solo consideramos la frecuencia a 6 y 20 Hertz (Hz), aunque nuestro interés estaba centrado en la frecuencia 6Hz debido que a frecuencias bajas (<15 Hz) los impulsos generados al respirar viajan distancias más largas y penetran más profundamente en el pulmón, alcanzando las pequeñas vías aéreas y el parénquima pulmonar, lo cual permite evaluar la función mecánica del pulmón.

Otra variable de interés fue el grupo de suplementación (1= placebo y 2= DHA) debido a que estudios previos han reportado que la suplementación con DHA durante





el embarazo protege de alergias durante los primeros años de vida. Las alergias se relacionan con enfermedades respiratorias y, por ende, con posibilidad de disminución de la función pulmonar.

Se obtuvieron otros indicadores paralelos a las mediciones de oscilometría tales como índices de antropometría (peso para la edad, talla para la edad e índice de masa corporal para la edad de acuerdo con los parámetros de la OMS), presencia o ausencia de síntomas respiratorios. Durante la etapa prenatal se midieron los indicadores de fumador pasivo, presencia de atopia materna (IgE positivo: $IgE \geq 0.70$ IU/mL), estado socioeconómico, escolaridad, paridad y edad de la madre.

Desafortunadamente, durante el proceso de integración de la información se identificó un error de medición de la resistencia y la reactancia que afectó el desenlace del estudio. Las pruebas de función pulmonar por oscilometría se realizaron anualmente en dos fases del estudio, a los 3, 4 y 5 años de edad de los niños y a los 7, 8 y 9 años. Al momento de concentrar la información de forma longitudinal se identificó una discordancia en las mediciones de Rrs y Xrs tomadas durante la segunda fase del seguimiento de los niños. Lo esperado es que las mediciones de resistencia disminuyan a medida que aumenta la edad y que ocurra lo contrario con la reactancia, como se observó durante la primera fase del estudio (3-5 años de edad) con las 3 frecuencias consideradas (6, 8 y 10 Hz). Sin embargo, durante la segunda fase del estudio las resistencias de los 7 a los 9 años de edad eran mayores en lugar de ser menores en comparación con las resistencias de la primera fase. Lo mismo sucedió con las reactancias, en lugar de ser más grandes que en la primera fase, los valores registrados eran menores. (Figura 2)

Otra situación que se identificó durante el proceso de integración fue la pérdida de observaciones. Solo teníamos información completa de 184 binomios madre-hijo (un promedio de 3 mediciones por sujeto). Esto afectó principalmente a los resultados de desenlace que evaluaban el efecto de la exposición a disruptores endocrinos sobre la función pulmonar.

En consecuencia, de los tres artículos comprometidos como productos finales (el primero sobre la exposición prenatal a ftalatos y BPA, el segundo sobre la evaluación del crecimiento pulmonar y el tercero sobre la evaluación del efecto de los disruptores endocrinos sobre la función pulmonar de los niños desde los 3 hasta los 9 años de edad) solo se concretó el primero. Al primer artículo se le realizaron varios ajustes al título y quedó como “*Exposure indices for phthalates and BPA and their potential use in epidemiological studies*”. Los resultados se presentan de forma resumida en la sección del desarrollo del proyecto, exposición a ftalatos y bisfenol A” y el documento completo se presenta en el anexo 1.



Para corregir el error sistemático de la segunda fase, se utilizaron modelos mixtos para predecir una media general de resistencia o reactancia, retroalimentados con los datos de oscilometría de la primera fase. Este valor se utilizó en las mediciones de la segunda fase para trasladar los valores de esta etapa y mantener la variabilidad de los datos observados. (Figura 4, Cuadro 8 y Figura 5) Esta información corregida de la función pulmonar, con sus limitaciones, se utilizó para realizar los análisis estadísticos que respaldan la redacción de los dos artículos restantes, no publicables. El artículo “Curvas de crecimiento pulmonar” no fue publicable porque los datos presentados no corresponden a los realmente observados. No obstante, se decidió utilizar dicha información para evaluar su relación con la exposición a ftalatos y BPA y cumplir con el propósito del proyecto. Al evaluar el efecto de la exposición prenatal a disruptores endocrinos (ftalatos y bisfenol A) sobre la función pulmonar en los niños se obtuvieron resultados controversiales, “a medida que se incrementan las concentraciones de ftalatos la función pulmonar se mejora”. A pesar de esta situación se continuó con el análisis estadístico y la redacción del artículo, con la esperanza de poder encontrar alguna explicación biológica del comportamiento de la información. Al no encontrarla, se desistió de su publicación puesto que no se tenían suficiente soporte para defender los resultados debido al error que se había presentado en las mediciones de función pulmonar.

En las siguientes secciones se presentan los resultados de los análisis, así como la descripción de cada uno de ellos, para posteriormente discutirlos en términos de errores de medición y sesgos.

Exposición a ftalatos y bisfenol A.

La exposición a disruptores endocrinos como los ftalatos y bisfenol A (BPA) es actualmente un importante problema de salud pública pues puede provocar cambios en las vías metabólicas y generar problemas de salud.

Uno de los objetivos del presente estudio fue medir las concentraciones de metabolitos de estos productos químicos en la orina de la madre embarazada y utilizar los resultados para desarrollar índices de exposición del individuo en gestación.

Se recogieron muestras de orina de 290 mujeres durante el embarazo, y se analizaron para detectar BPA y nueve metabolitos de ftalato: mono(3-carboxipropil) ftalato, monoetil ftalato; mono(2-etil-5-carboxipentil) ftalato, mono(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato, mono(n-butil) ftalato, mono(isobutil) ftalato, mono(2-etil-5-oxohexil) ftalato, monobencil ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato. El análisis factorial se utilizó para construir los índices de exposición.



Resultados

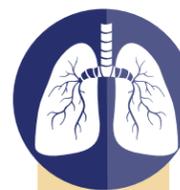
El cuadro 1 muestra las características sociodemográficas de la población de estudio. La edad promedio de las mujeres fue de 26.1 años (DE = 4.7), solo 55.4% completó la secundaria y 34.5% de las madres tenían un nivel socioeconómico bajo. Asimismo, más de la mitad tenía sobrepeso (55.2%), 42.8% de las mujeres había tenido dos embarazos, incluyendo el actual, y 17.6%, 3 o más.

Cuadro 1. Características de los participantes en el estudio (n = 290)

Variable	Media (DE)
Edad, años	26.1 (4.7)
Secundaria o más, n (%)	160 (55.4)
Nivel socioeconómico, n (%)	
Tercil 1	100 (34.5)
Tercil 2	104 (35.9)
Tercil 3	86 (29.6)
Medidas antropométricas	
Talla, cm	155.0 (5.6)
Peso, k	62.6 (11.4)
Índice de masa corporal (IMC), k/m ²	26.0 (4.4)
Sobrepeso (IMC>24.9), n (%)	160 (55.2)
Paridad, incluye el parto actual, n (%)	
1	96 (33.1)
2	124 (42.8)
3	51 (17.6)
4 o más	19 (6.6)

DE: Desviación estándar

Los resultados de los nueve metabolitos de ftalato estudiados, indican que las concentraciones promedio más altas (Cuadro 2) fueron las de MEP con 106.8 µg/g de creatinina (intervalo de confianza del 95% (IC 95%): 88.7, 128.6), MnBP a 77.6 µg/g de creatinina (95% IC: 66.2, 91.0) y MECPP con 46.8 µg/g de creatinina (IC 95%: 39.6, 55.2). Por el contrario, los niveles de BPA (2.1 µg/g de creatinina, IC 95%: 1.8, 2.5) y MCPP (2.8 µg/g de creatinina, IC 95%: 2.4, 3.2) fueron bajos.



Cuadro 2. Concentraciones de los metabolitos de ftalato y bisfenol A en 290 muestras de orina materna.

Compuesto principal de ftalato	Media Geométrica (IC 95%)
Metabolitos de ftalato y bisfenol A, µg/g de creatinina	(IC 95%)
<i>DnOP</i>	
MCCP	2.8 (2.4, 3.2)
<i>DEP</i>	
MEP	106.8 (88.7, 128.5)
<i>DEHP</i>	
MEHP	4.0 (3.4, 4.7)
MECPP	46.8 (39.6, 55.2)
MEHHP	33.3 (27.7, 40.1)
MEOHP	17.6 (14.8, 20.9)
<i>DnBP</i>	
MnBP	77.6 (66.2, 91.0)
<i>DiBP</i>	
MiBP	6.2 (5.2, 7.2)
<i>BzBP</i>	
MBzP	10.3 (8.5, 12.3)
<i>BPA</i>	2.1 (1.8, 2.5)

A partir de la matriz de correlación (Figura 1), identificamos correlaciones fuertes ($r > 88\%$) y significativas ($p < 0.05$) entre los metabolitos Ln (MEHP), Ln (MECPP), Ln (MEHHP) y Ln (MEOHP), y relaciones más débiles entre los metabolitos Ln (MnBP), Ln (MiBP) y Ln (MBzP) ($r > 68\%$, $p < 0.05$). Las altas correlaciones entre Ln (MECPP), Ln (MEHHP) y Ln (MEOHP) podrían atribuirse al hecho de que tres de estos metabolitos se derivan de MEHP.

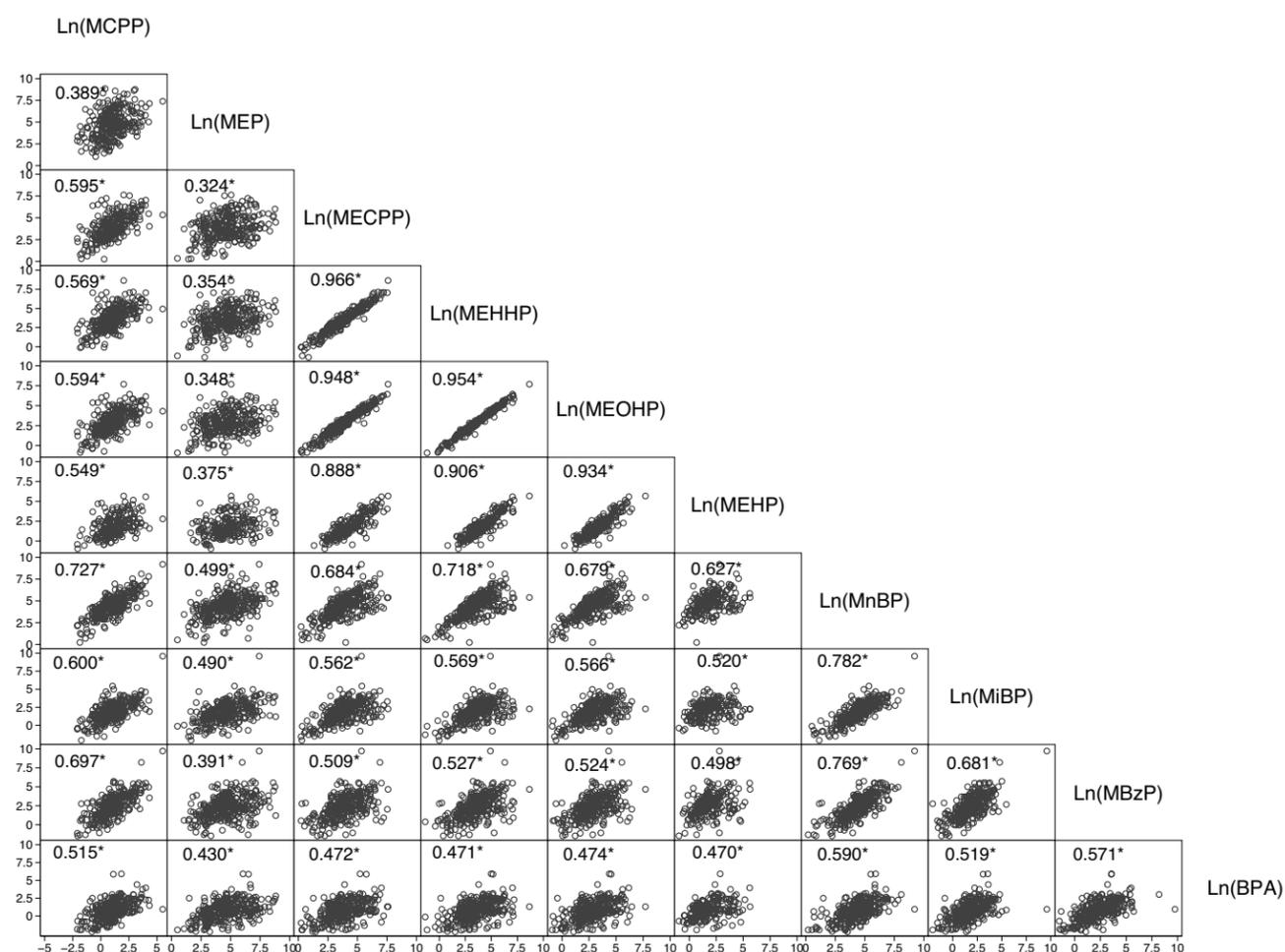


Figura 1. Correlaciones entre metabolitos de ftalato y bisfenol A provenientes de orina de mujeres mexicanas embarazadas (n = 290), en escala logarítmica

En el cuadro 3 se muestran las correlaciones entre los metabolitos de ftalato y el BPA con los factores resultantes del análisis multivariado, representados por factores comunes rotados. El factor uno estaba fuertemente relacionado con los metabolitos de ftalato Ln(MEHHP), Ln(MECP), Ln(MEOHP) y Ln(MEHP), que se derivan de DEHP, y débilmente relacionados con los metabolitos de ftalato restantes y el BPA. El factor dos estaba fuertemente relacionado con los metabolitos de ftalato Ln (MnBP), Ln (MBzP), Ln (MiBP) y Ln (MCPP) que se producen por transformación metabólica de DnOP, bencil butil ftalato, dibutil ftalato y diisobutil ftalato, respectivamente. También, estaba débilmente relacionado con Ln (BPA) y Ln (MEP), que se deriva de DEP y el resto de los metabolitos de ftalato. Por lo tanto, el Factor 1 es para los metabolitos de ftalato que se derivan en las etapas posteriores del metabolismo del DEHP y el Factor 2 para una mezcla de metabolitos de ftalato y BPA. (Cuadro 3) Cada factor obtenido representa un índice de exposición, que hemos etiquetado como mezclas de 2-etil, haciendo referencia al resto de los metabolitos de ftalato o BPA que contiene. La correlación de los factores comunes rotados de promax (3) fue del 62.6%.

Cuadro 3. Correlaciones entre factores comunes rotados y las concentraciones de metabolitos de ftalato y bisfenol A (n = 290).

Variable	Factor 1	Factor 2
Metabolito		
Ln(MEHHP)	0.982	0.656
Ln(MECP)	0.976	0.636
Ln(MEOHP)	0.973	0.638
Ln(MEHP)	0.927	0.595
Ln(MnBP)	0.683	0.927
Ln(MBzP)	0.505	0.841
Ln(MiBP)	0.552	0.824
Ln(MCPP)	0.574	0.772
Ln(BPA)	0.466	0.645
Ln(MEP)	0.339	0.535
Media(desviación estándar)	0.000 (0.993)	0.000 (0.963)
Mediana (P ₂₅ , P ₇₅)	-0.072(-0.678, 0.666)	0.011(-0.672, 0.618)
Mínimo, Máximo	-2.711, 3.121	-2.431, 4.196





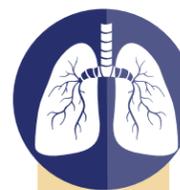
Matriz de estructura: correlaciones entre variables y factores comunes rotados promax (3). La matriz de correlación de los factores comunes rotados de promax (3) fue 0.626. (Anexo 1. *Exposure indices for phthalates and BPA and their potential use in epidemiological studies*. Artículo publicado)

Curvas de crecimiento pulmonar en niños sanos desde los 3 hasta los 9 años de edad, Cuernavaca México

En este apartado se presentan los resultados de la evaluación de los cambios de la reactancia y resistencia pulmonar en niños sanos desde los 3 hasta los 9 años en Cuernavaca, México.

Si bien el recién nacido tiene la capacidad de respirar, no es sino hasta los 18 años cuando el desarrollo y crecimiento pulmonar finaliza. El pulmón puede presentar alteraciones congénitas o adquiridas las cuales se pueden ver reflejadas en edades más avanzadas y en muchas ocasiones el daño puede ser irreversible. El desarrollo y crecimiento normal del pulmón durante la infancia es esencial para alcanzar los niveles máximos de función pulmonar en la edad adulta. Un crecimiento disminuido se refleja en la función pulmonar por valores bajos de volúmenes y flujos pulmonares, lo que incrementa el riesgo de presentar síntomas graves durante las infecciones respiratorias o las exacerbaciones del asma, o de presentar efectos adversos tras la exposición a toxinas respiratorias y, en definitiva, un incremento en el riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en la edad adulta.

La técnica de oscilación forzada es un instrumento útil para evaluar la mecánica pulmonar en diversas enfermedades respiratorias. Se requiere una cooperación mínima de las personas, por lo que su uso en niños en edad preescolar resulta muy atractivo. Actualmente, los rangos de referencia de la FOT son específicos para el tipo de equipo utilizado (señal u oscilometría de impulso [IOS por sus siglas en inglés], lo que obliga a un pseudo- ruido aleatorio) y corresponden a las características geográficas o étnicas de la población para los que fueron creados. Estos aspectos han limitado la utilidad clínica de la FOT y en la actualidad, la espirometría es la prueba más común para medir la función pulmonar, ya que sus valores de referencia se encuentran bien establecidos en la edad escolar, y consideran la etnia, el sexo y la edad; sin embargo, este no es el caso para la edad preescolar, por lo que valorar el crecimiento pulmonar en niños sanos empleando la técnica de oscilación forzada resultaba interesante porque permitiría contrastar con otros estudios los valores observados en relación a la velocidad de crecimiento pulmonar a través del tiempo y se obtendría una estimación



de la maduración alcanzada, como método diagnóstico y de control evolutivo.

Con la información del seguimiento de los niños en la cohorte hasta los 9 años de edad se buscaba evaluar los cambios de la función pulmonar de los niños entre los 3 y 9 años de edad, a través de la resistencia respiratoria (Rrs) y la reactancia (Xrs), estos parámetros se generan a partir de un equipo FOT comercial, y se ajustaron por edad y por los percentiles de la talla para la edad propuestos por la OMS. No obstante, como se mencionó arriba, al conjuntar la información de manera longitudinal y comparar los resultados de Rrs y Xrs de la primera y segunda fase del estudio se identificó un comportamiento atípico en las mediciones de la segunda etapa (7, 8 y 9 años). Este se corrigió a partir de un proceso de modelación estadística que permitió generar nuevos valores de Rrs y Xrs a partir de una ponderación de los mismos con la finalidad de hacer el ejercicio de dar respuesta al objetivo principal del estudio de “Evaluar el efecto de la exposición prenatal a disruptores endocrinos (ftalatos y bisfenol A) sobre la función pulmonar en niños residentes de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos, México”. Las curvas de crecimiento pulmonar se desarrollaron con el fin de responder al objetivo primario. Debido al error de medición estos resultados no fueron publicados.

Material y Métodos

Diseño del estudio y participantes

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se consideró una cohorte de 824 niños que inicia al momento del nacimiento y continúa hasta los 9 años de edad. Se obtuvieron mediciones anuales de oscilometría y antropometría de los niños en dos lapsos de tiempo (fases). En la primera fase (3, 4 y 5 años) de edad y, en un segundo momento a los 7, 8 y 9 años de edad. También se reportó la exposición a humo de tabaco en el hogar y la presencia o no de síntomas respiratorios durante los últimos 15 días previos a la visita de la prueba de función pulmonar.

Recopilación de la información

Variables interés

Para evaluar la función pulmonar los niños realizaron pruebas oscilométricas utilizando la técnica de oscilación forzada cada seis meses desde los 3 a los 5 años de edad. Las pruebas se realizaron con un equipo comercialmente disponible, (I2M; Chess Medical, Belgium, marketed in Italy by Cosmed) y de acuerdo con las especificaciones de la ERS (Beydon et al. 2007). Como resultados, se obtuvieron la reactancia (Xrs) y la resistencia (Rrs) a diferentes frecuencias de oscilación, entre 2 y 48 Hertz (Hz). Para nuestro análisis utilizamos las frecuencias de 6, 8 y 10 Hertz (Hz) debido que a



frecuencias bajas (<15 Hz) los impulsos generados al respirar viajan distancias más largas y penetran a mayor profundidad en el pulmón, alcanzando las pequeñas vías aéreas y el parénquima pulmonar; Esto permite evaluar la función mecánica del pulmón (Brashier y Salvi 2015). Todas las pruebas fueron realizadas por los mismos técnicos, y se seleccionaron las tres mejores pruebas técnicamente aceptables para posteriormente promediarlas y representar la medida de la Rrs y Xrs, respectivamente, el detalle del procedimiento puede consultarse en el artículo de Shackleton y colaboradores (Shackleton et al. 2013).

Otras variables

A partir de la edad, peso y talla del niño, obtenidas antes de realizar la prueba de oscilometría, se construyeron el índice de talla para la edad (z-talla-edad) y el índice de peso corporal para la edad (z-BMI-age) de acuerdo con los parámetros OMS. Posteriormente se calcularon los percentiles de z-talla-edad. Simultáneamente se obtuvo información sobre la presencia de síntomas respiratorios durante los 15 días previos a la prueba de oscilometría.

La información de exposición al humo del tabaco se captó 2 veces, a través de un cuestionario administrado a las madres durante el embarazo y en la visita de los 4 años de edad de los niños, seleccionando la pregunta “¿Fuman usted o alguien más dentro de la casa y/o en presencia del infante?”.

Plan de análisis estadístico

El crecimiento de la función pulmonar con respecto a la edad se evaluó a partir de modelos mixtos considerando intercepto aleatorio y matriz de covarianza sin estructura. Todos los modelos fueron ajustados por los percentiles del z-score de la talla para la edad y el sexo del niño.

Resultados

Población de estudio

La población de estudio fue formada por 824 niños y niñas, 46.8% del sexo femenino, y con un promedio de 4.3 ± 1.4 mediciones de oscilometría por niño durante el seguimiento. La cohorte inició en la primera etapa con 100 niños de 3 a 5 años de edad y durante la segunda etapa (7, 8 y 9 años) se incluyó al resto de la población de estudio (724 niños); el 79.9% de los niños tienen 3 o más mediciones repetidas. Las estadísticas que se reportan en el cuadro 4 corresponden a las características basales de los niños y niñas en el estudio y no se observaron diferencias significativas por sexo.



La edad promedio de los participantes fue de 52.1 ± 12.1 meses, presentaron un peso promedio de 16.8 ± 3.9 kg, una talla de 103.2 ± 7.7 cm, una puntuación Z de talla para la edad promedio de -0.4 ± 0.9 ; la mayoría de los niños (44.9%) se concentraron entre el percentil 15 y 50. En 40.8% de los hogares hay por lo menos alguien que fuma en presencia del niño. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Características basales de la población de estudio por sexo

Variable	Femenino (n=386, 46.8%)	Masculino (n=438, 53.2%)	Todos (n=824, 100.0%)
Edad, meses	52.0(12.9)	52.2(11.4)	52.1(12.1)
Peso, kg	16.6(4.2)	17.0(3.7)	16.8(3.9)
Talla, cm	102.4(8.0)	103.9(7.3)	103.2(7.7)
Z-talla-edad	-0.5(0.9)	-0.4(0.9)	-0.4(0.9)
Percentiles,	34.7(25.8)	39.1(26.0)	37.0(26.0)
[P ₁ -P ₃)	6.4(4.1)	7.8(4.0)	7.0(4.1)
[P ₃ -P ₁₅)	31.0(9.9)	30.6(9.9)	30.8(9.9)
[P ₁₅ -P ₅₀)	64.5(9.8)	64.6(10.2)	64.6(10)
[P ₅₀ -P ₈₅)	91.3(2.9)	90.0(2.9)	90.5(3.0)
[P ₈₅ and more)	98.5(1.1)	99.3(0.7)	98.9(0.9)
Z-IMC-edad	0.1(1)	0.1(1.1)	0.1(1.1)
Alguna persona fuma en casa* n=720(100%)	122(36.6)	172(44.4)	294(40.8)

Los valores correspondientes a la media y desviación estándar. Z-talla-edad: puntuación z-talla para la edad. Z-IMC-edad: Puntuación z del Índice de Masa Corporal para la edad.

*Los totales no coinciden debido a las variaciones en la respuesta de las preguntas del cuestionario.

Función pulmonar observada a través del tiempo

El número de niños durante el seguimiento del estudio fue incrementándose, pasando de 100 al inicio (a los 3 años de edad) a 824 niños al final del seguimiento (9 años de edad). Se obtuvieron en promedio 3 mediciones de Rrs y de Xrs por niño. Tanto en las



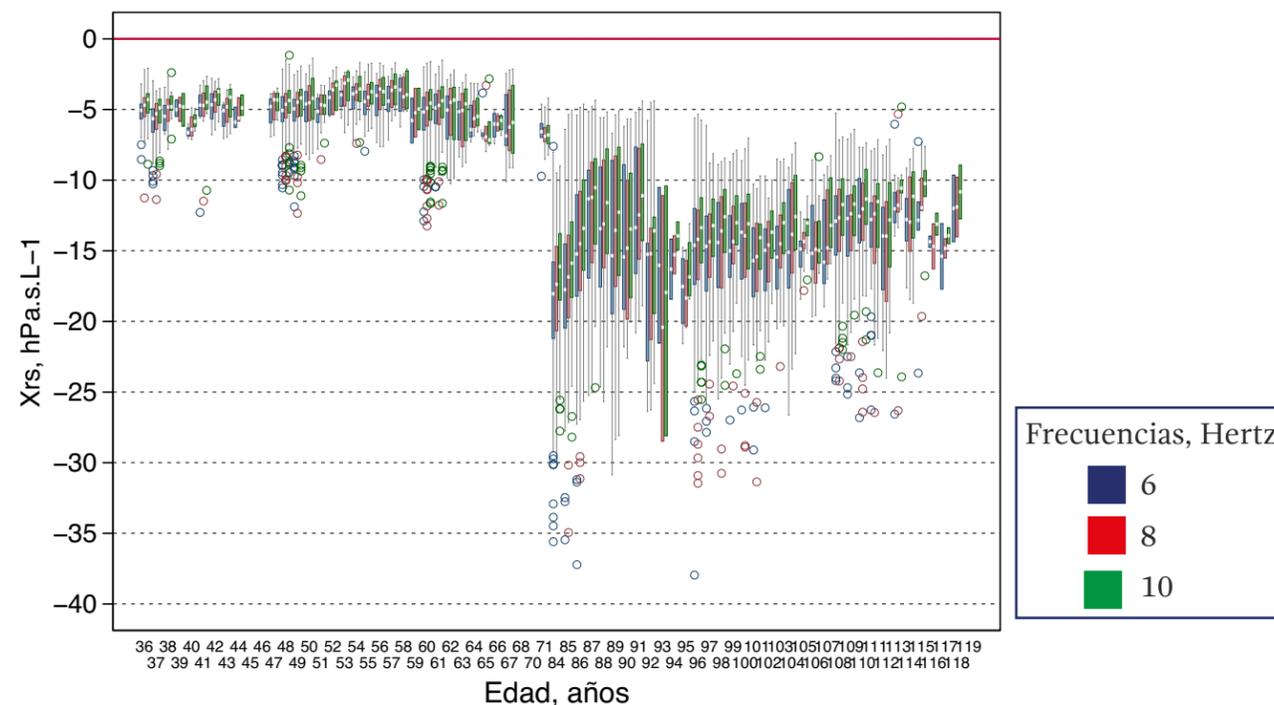
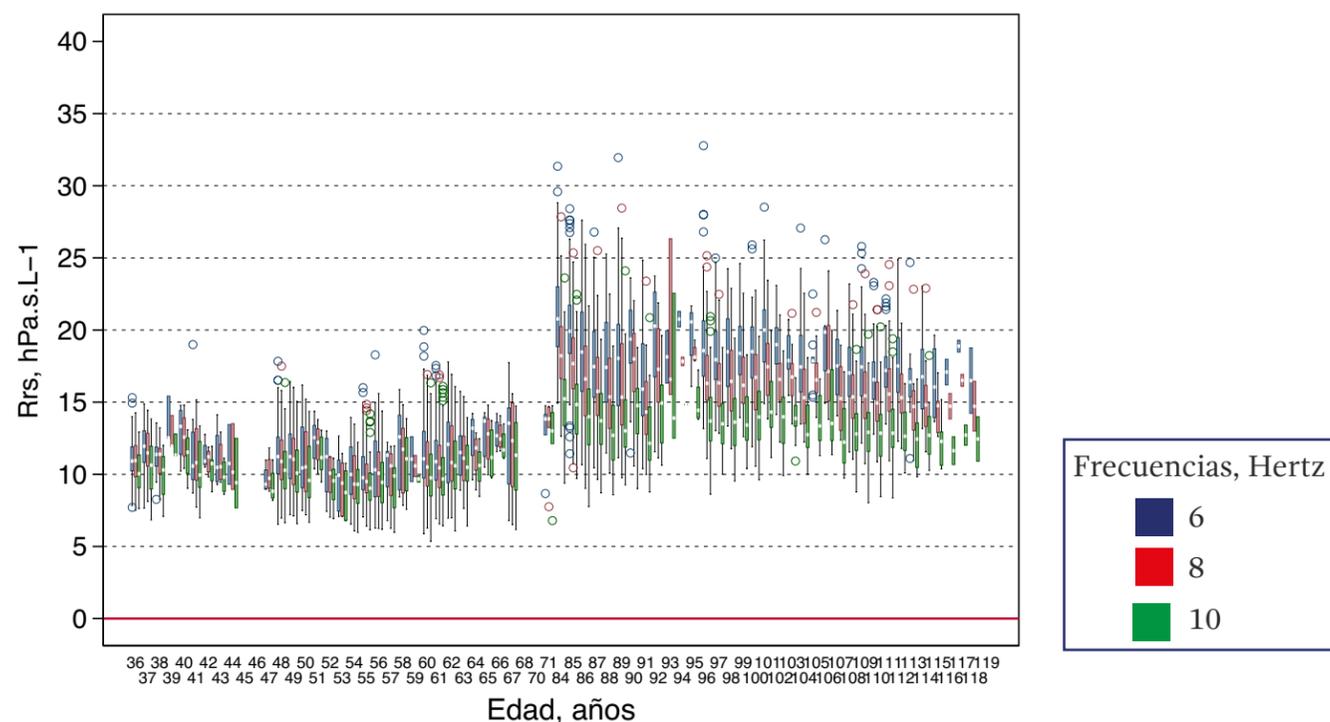
mediciones de la resistencia como en las de reactancia obtenidas en la primera etapa de los 3 a los 5 años, se observó que las diferencias en las frecuencias (6, 8 y 10 Hz) fueron en promedio de 1 hPa.s.L⁻¹, mientras que en la segunda etapa estas diferencias ascienden a 5 hPa.s.L⁻¹ en promedio. Con respecto a la edad, entre los 3 y 5 años no se observó un patrón decreciente en Rrs y creciente en Xrs. Sin embargo, como ya fue mencionado, este comportamiento atípico se presentó en las edades de 7 a 9 años y se discutirá más adelante.

Cuadro 5. Promedio de las mediciones de resistencia y reactancia por grupos de edad

Grupos de edad en meses, mediciones repetidas	Resistencia (Rrs), hPa.s.L ⁻¹			Reactancia (Xrs), hPa.s.L ⁻¹		
	6 Hz	8 Hz	10 Hz	6 Hz	8 Hz	10 Hz
36-47, n=157	11.5(1.8)	8 Hz 11.2(1.6)	8 Hz 11.2(1.6)	-5.5(1.5)	-5.2(1.5)	-4.8(1.3)
48-59, n=606	11.1(2.1)	10.8(2.0)	10.1(1.9)	-5.0(1.4)	-4.6(1.5)	-4.4(1.4)
60-71, n=602	11.5(2.4)	11.0(2.3)	10.2(2.2)	-5.4(1.7)	-5.2(1.9)	-4.8(1.8)
84-95, n=621	19.6(3.6)	17.4(3.3)	14.5(2.7)	-16.7(5.5)	-16.0(5.2)	-14.7(4.6)
96-107, n=524	18.7(2.8)	16.6(2.4)	13.9(2.2)	-15.2(4.1)	-15.0(4.1)	-13.7(3.3)
108-119, n=453	17.2(2.5)	15.5(2.3)	12.9(1.9)	-13.5(3.6)	-13.2(3.6)	12.1(3.0)

Los valores corresponden a la media y desviación estándar

Figura 2. Distribución de las mediciones de Rrs y Xrs por edad en meses



En el cuadro 5 y en la figura 2, se observa el desfase de hasta 11 hPa.s.L⁻¹ en todas las mediciones de Rrs y Xrs durante el seguimiento, en el caso de Xr6, en el grupo de edad de 5 a 6 años la medición promedio fue de -5.4 ± 1.7 hPa.s.L⁻¹ y en el grupo subsecuente de -16.7 ± 5.5 hPa.s.L⁻¹. Es muy probable que el desfase sea el resultado de por lo menos un incumplimiento de las mínimas recomendaciones técnicas internacionales emitidas por la Sociedad Americana del Tórax (ATS) y de la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) al iniciar la segunda etapa del proyecto. Al inicio del proyecto el equipo y software fue instalado por técnicos especializados que forman parte de la empresa donde se adquirió el equipo. Los valores de las primeras mediciones, de los 3 a los 5 años de edad, fueron analizados y revisados por el Dr. Peter Sly, experto del área y en la técnica (Shackleton et al. 2013). Sin embargo, al iniciar la segunda etapa, fue el personal previamente capacitado quien se encargó de inicializar el equipo y el software nuevamente.

Para comparar los valores obtenidos en nuestro estudio con los reportados en la literatura científica mexicana, seleccionamos de nuestros datos una medición por sujeto de manera aleatoria. Primero se obtuvo una muestra de 803 niños y niñas y, posteriormente, se eligieron a todos los menores a 5 años de edad (n=221). Las características en cuanto sexo, edad, talla y peso se presentan el cuadro 6, así como las distribuciones de la resistencia y reactancia a frecuencia 6 Hz por edad y talla. El 48.9% de la población fue del sexo femenino, la edad oscila entre 3 años y 4.8 años, con talla





y peso promedio para hombres y mujeres de 100.2±5.2 y 101.6±5 cm, respectivamente y peso promedio de 15.7±2.5 y 16.1±2.4 kg, respectivamente.

Cuadro 6. Características de una submuestra de la población de estudio, n=221.

Característica	Media(DE)	Mediana(P25, P75)	Mínimo-Máximo
Femenino (n=108)			
Edad, meses	47.6(6.1)	48(48, 50)	36-58
Talla, cm	100.2(5.2)	100.3(96.7, 104.2)	87.3-113.8
Peso, kg	15.7(2.5)	15.2(14.1, 17)	11.5-24.5
Masculino (n=113)			
Edad, meses	47.9(4.9)	48(48, 49)	36-57
Talla, cm	101.6(5)	101.7(98.2, 104.7)	89.4-114.8
Peso, kg	16.1(2.4)	15.7(14.5, 17.1)	11.5-27

Las mediciones de Rr6 y Xr6 provenientes de la submuestra (n=221) de nuestro estudio se compararon con las reportadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Rr5 y Xr5) por la Dra. Laura Gochicoa y colaboradores (Gochicoa-Rangel et al. 2015). La discrepancia en la frecuencia se debe al equipo ya que uno emite frecuencias pares y el otro impares. Al contrastar los valores con respecto a la edad, las mediciones en el rango de edad de 3 a 5 años de edad, en ambos estudios la Rrs oscila entre 7.5 y 15 hPa.s.L⁻¹ aproximadamente y la Xrs entre 2.5 y -7.5 hPa.s.L⁻¹ y estos valores se conservan cuando se considera la talla en el rango de 85 a 120 cm (Figura 3).

Figura 3. Comparación de la distribución de Rr6 y Xr6 de nuestro estudio versus los del INER, por edad y talla.

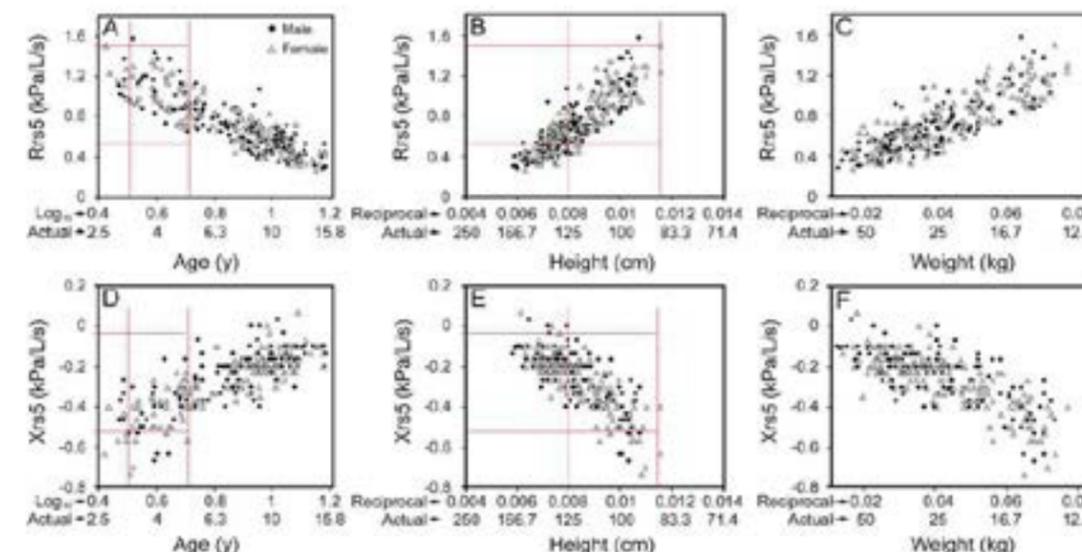
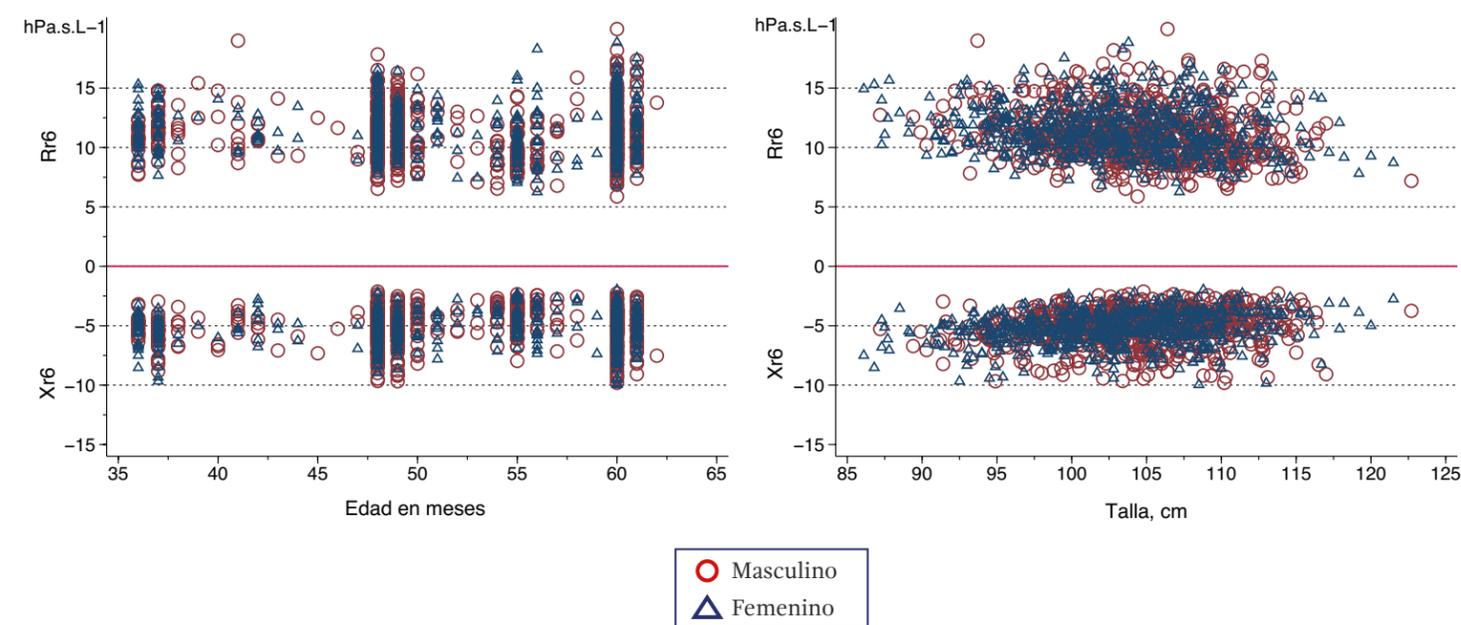


Fig. 1. Association of selected impulse oscillometry variables with age, height, and weight in a population of 283 healthy children and adolescents. Data corresponding to x-axes were transformed into the respective log₁₀ (age) or reciprocal (height and weight) values to yield better linearity. Symbols correspond to male (filled circles) and female (empty triangles) subjects.

Referencia: Values of Impulse Oscillometry in Healthy Mexican Children and Adolescents. Laura Gochicoa-Rangel, Luis Torre-Bouscoulet, David Martínez-Briceño, Luis Rodríguez-Moreno, Gabriela Cantú-González, and Mario H Vargas. Respiratory Care Paper, 2014. [DOI: 10.4187/respcare.03374]



Identificado el error de medición en la segunda etapa, se decidió corregirlo a partir de técnicas estadísticas que permitieran trasladar los valores de la segunda etapa de medición sin perder la variabilidad de las mediciones. Para ello, se propuso un modelo mixto con intercepto aleatorio por cada oscilometría de impulso a utilizar, y de cada uno se usó el valor de la constante para trasladar las mediciones de la segunda etapa.

De esta manera se obtuvieron los valores de la reactancia y resistencia a diferentes frecuencias, 6, 8, 10 y 20 Hz con dos propósitos: el primero, construir las curvas de crecimiento pulmonar, y el segundo, utilizar los valores para cumplir con el objetivo principal del proyecto. Si bien era un hecho que el artículo correspondiente a la estimación de las curvas de crecimiento pulmonar quedaría descartado, se continuó con el plan de trabajo debido a que no se tenía la certeza de que los resultados del producto final no se verían afectados.

Curvas de crecimiento pulmonar

La población de estudio estuvo formada por 824 niños y niñas, 46.8% del sexo femenino, con un promedio de 4.3 ± 1.4 mediciones de oscilometría por niño durante el seguimiento. La cohorte inició con 100 niños en una primera etapa (de 3 a 5 años de edad) y en la segunda etapa (7, 8 y 9 años) se reunió al resto de la población de estudio (724 niños); el 79.9% de los niños tienen 3 o más mediciones repetidas. Las estadísticas que se presentan en el cuadro 7 corresponden a las características basales de los niños por sexo y no se observaron diferencias significativas. La edad promedio de los participantes fue de 52.1 ± 12.1 meses, con un peso promedio de 16.8 ± 3.9 kg, una talla de 103.2 ± 7.7 cm, una puntuación Z de talla para la edad promedio de -0.4 ± 0.9 . La mayoría (44.9%) de los niños se concentraron entre los percentiles 15 y 50. En 40.8% de los hogares hay por lo menos alguien que fuma en presencia del niño. (Cuadro 7)

Cuadro 7. Características basales de la población de estudio por sexo.

Variable	Femenino (n=386, 46.8%)	Masculino (n=438, 53.2%)	Todos (n=824, 100.0%)
Edad, meses	52.0(12.9)	52.2(11.4)	52.1(12.1)
Peso, kg	16.6(4.2)	17.0(3.7)	16.8(3.9)
Talla, cm	102.4(8.0)	103.9(7.3)	103.2(7.7)
Z-talla-edad	-0.5(0.9)	-0.4(0.9)	-0.4(0.9)
Percentiles,	34.7(25.8)	39.1(26.0)	37.0(26.0)
[P ₁ -P ₃)	6.4(4.1), [n=27]	7.8(4.0) , [n=16]	7.0(4.1), [n=43]
[P ₃ -P ₁₅)	31.0(9.9), [n=80]	30.6(9.9) , [n=77]	30.8(9.9), [n=157]
[P ₁₅ -P ₅₀)	64.5(9.8), [n=175]	64.6(10.2) , [n=195]	64.6(10), [n=370]
[P ₅₀ -P ₈₅)	91.3(2.9), [n=84]	90.0(2.9) , [n=122]	90.5(3.0), [n=206]
[P ₈₅ y más)	98.5(1.1), [n=20]	99.3(0.7) , [n=28]	98.9(0.9), [n=48]
Z-IMC-edad	0.1(1)	0.1(1.1)	0.1(1.1)
Alguien fuma en casa*, n=720(100%)	122(36.6)	172(44.4)	294(40.8)

Cuadro 8. Características basales de la función pulmonar por sexo

Variable	Femenino (n=386, 46.8%)	Masculino (n=438, 53.2%)	Todos (n=824, 100.0%)
Resistencia a 6, 8 y 10 Hz, hPa.s.L ⁻¹			
Rrs6,	11.0(2.2)	10.9(2.4)	11.0(2.3)
Rrs8	10.6(2.2)	10.4(2.3)	10.5(2.2)
Rrs10	9.7(2.3)	9.6(2.3)	9.7(2.3)
Reactancia a 6, 8 y 10 Hz, hPa.s.L ⁻¹			
Xrs6,	-5.1(1.4)	-5.0(1.6)	-5.1(1.5)
Xrs8	-4.8(1.5)	-4.6(1.6)	-4.7(1.5)
Xrs10	-4.5(1.5)	-4.4(1.5)	-4.5(1.5)

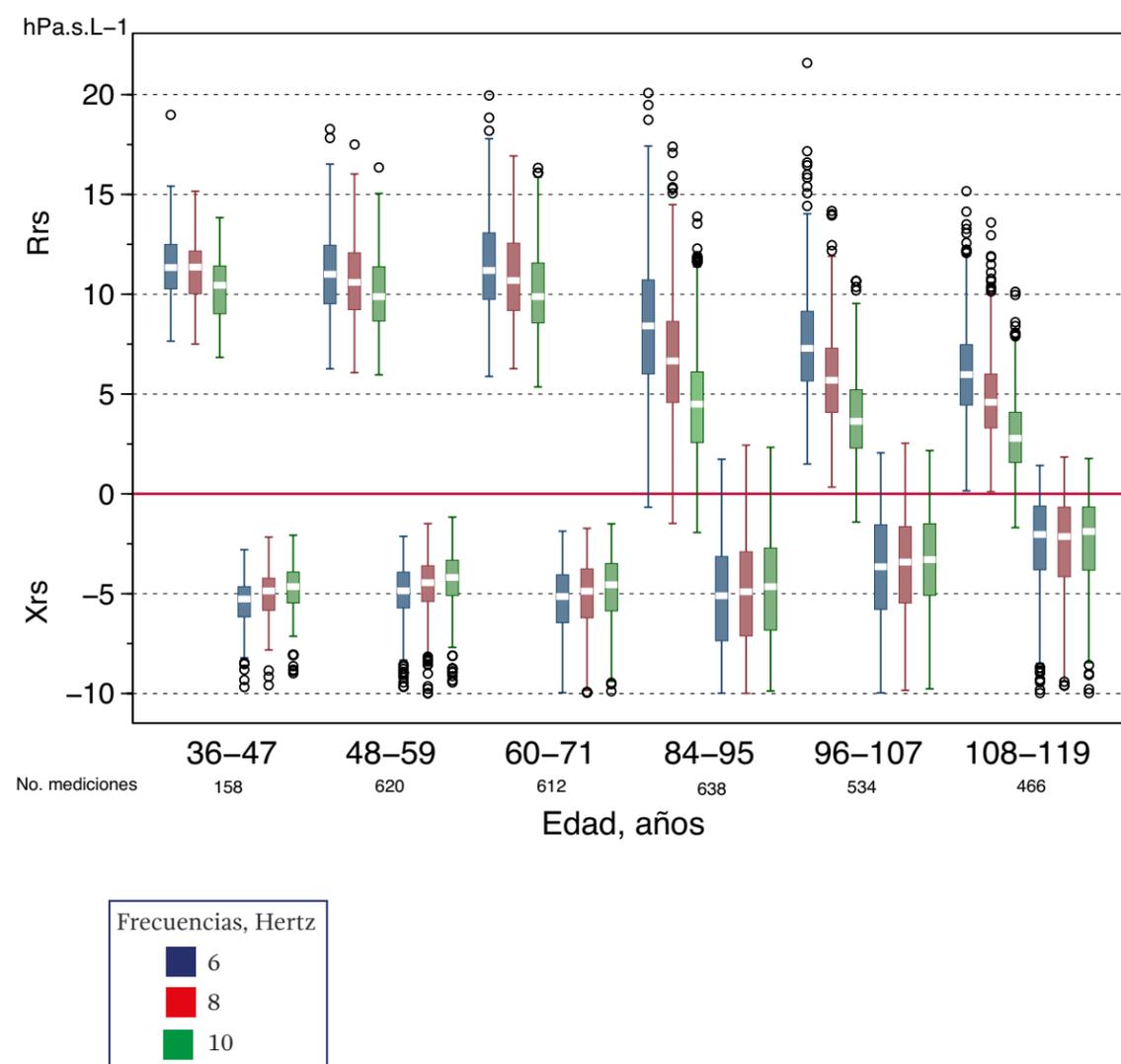
Los valores corresponden a la media y desviación estándar. *Z-talla-edad*: Puntuación z-talla para la edad. *Z-IMC-edad*: Puntuación z-Índice de Masa Corporal para la edad. * Los totales pueden no coincidir por variaciones en la no respuesta en las preguntas de los cuestionarios.





Con respecto a las mediciones de la resistencia y la reactancia, las diferencias en las frecuencias de oscilación (6, 8 y 10 Hz) fueron entre una y dos décimas de un hPa.s.L⁻¹. Los promedios para la primera medición (Rrs) fueron ligeramente menores en el grupo de los niños que en el de las niñas. Lo contrario ocurrió con la reactancia (Xrs). Se observó un patrón en las mediciones de la Rrs y la Xrs, las cuales tuvieron mayor valor en las frecuencias (6, 8, y 10 Hz), con ligero decremento en las Rrs e incremento en las Xrs. (Cuadro 8) Un patrón similar se advirtió en el seguimiento, a medida que aumenta la edad disminuye la Rrs y se incrementa la Xrs. (Figura 4)

Figura 4. Seguimiento de la función pulmonar por edad



El crecimiento de la función pulmonar con respecto a la edad, se evaluó a partir de modelos mixtos considerando intercepto aleatorio y matriz de covarianza sin estructura. Todos los modelos fueron ajustados por los percentiles de la puntuación z de talla para la edad y el sexo del niño. Otras variables como el peso, la exposición al humo de tabaco y la presencia de síntomas respiratorios se consideraron, pero no resultaron ser variables confusoras ni modificadoras de efecto. Cada modelo fue sometido a un diagnóstico mediante sus residuos (Santos Nobre y da Motta Singer 2007) y para seleccionar el mejor modelo se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC).

Después de ajustar los modelos por edad, percentiles del Z-talla-edad y sexo del niño, se obtuvo un efecto estimado significativo ($p < 0.05$) de la edad y de los percentiles del Z-talla-edad sobre la reactancia y resistencia, y una diferencia significativa entre niñas y niños en la resistencia. En el caso de la resistencia, el decremento promedio a través del tiempo de Rr6 fue de -0.083 hPa.s.L⁻¹ cada vez que la edad se incrementa un mes; para Rr8 fue de -0.105 y para Rr10 de -0.130 hPa.s.L⁻¹ cada vez que el Z-talla-edad aumenta un percentil; la Rr6 y Rr10 disminuyó en -0.008 y Rr8 en -0.007 hPa.s.L⁻¹. En cuanto al sexo, en los niños la Rr6 disminuyó en -0.322 hPa.s.L⁻¹ con respecto a las niñas; la Rr8 en -0.433 y la Rr10 en -0.497 . Lo contrario sucedió en los efectos observados en las Xrs; el incremento promedio estimado a través del tiempo para la Xr6, Xr8 y Xr10 fue de 0.032 hPa.s.L⁻¹, 0.028 hPa.s.L⁻¹ y 0.26 hPa.s.L⁻¹ cada vez que la edad aumenta un mes de los niños; y de 0.006 para Xr6 hPa.s.L⁻¹ y 0.004 hPa.s.L⁻¹ para Xr8 y Xr10 por un cambio de un percentil de la Z-talla-edad. En el caso de las Xrs, no se encontró una diferencia significativa entre niños y niñas. (Cuadro 9)



Cuadro 9. Crecimiento de la función pulmonar

Covariable	Resistencia (Rrs), hPa.s.L ⁻¹		Reactancia (Xrs), hPa.s.L ⁻¹	
	Coefficiente (IC95%)	valor p	Coefficiente (IC95%)	valor p
Frecuencia 6 Hz				
Edad, meses	-0.083(-0.087, -0.079)	<0.001	0.032(0.029, 0.036)	<0.001
PZ-talla-edad	-0.008(-0.012, -0.003)	0.001	0.006(0.002, 0.009)	0.003
Sexo, masculino	-0.322(-0.569, -0.075)	0.011	0.044(-0.158, 0.247)	0.667
<i>Efecto aleatorio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>
Intercepto	1.8(1.5, 2.1)	5.5(5.2, 5.8)	0.9(0.7, 1.1)	4.1(3.8, 4.4)
Frecuencia 8 Hz				
Edad, meses	-0.105(-0.109, -0.102)	<0.001	0.028(0.024, 0.031)	<0.001
PZ-talla-edad	-0.007(-0.011, -0.003)	0.001	0.004(0.001, 0.008)	0.023
Sexo, masculino	-0.433(-0.660, -0.207)	<0.001	-0.031(-0.234, 0.172)	0.767
<i>Efecto aleatorio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>
Intercepto	1.5(1.2, 1.8)	4.7(4.5, 5.0)	0.9(0.7, 1.1)	4.2(3.9, 4.4)
Frecuencia 10 Hz				
Edad, meses	-0.130(-0.133, -0.126)	<0.001	0.026(0.023, 0.029)	<0.001
PZ-talla-edad	-0.008(-0.012, -0.005)	<0.001	0.004(0.001, 0.008)	0.017
Sexo, masculino	-0.497(-0.693, -0.302)	<0.001	0.090(-0.108, 0.287)	0.374
<i>Efecto aleatorio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>	<i>Varianza</i>	<i>Residual</i>
Intercepto	0.9(0.7, 1.1)	4.3(4.1, 4.6)	0.9(0.8, 1.2)	3.7(3.4, 3.9)

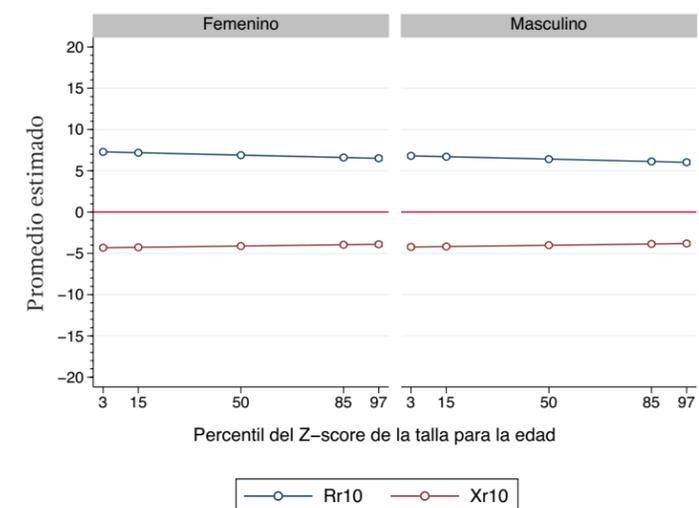
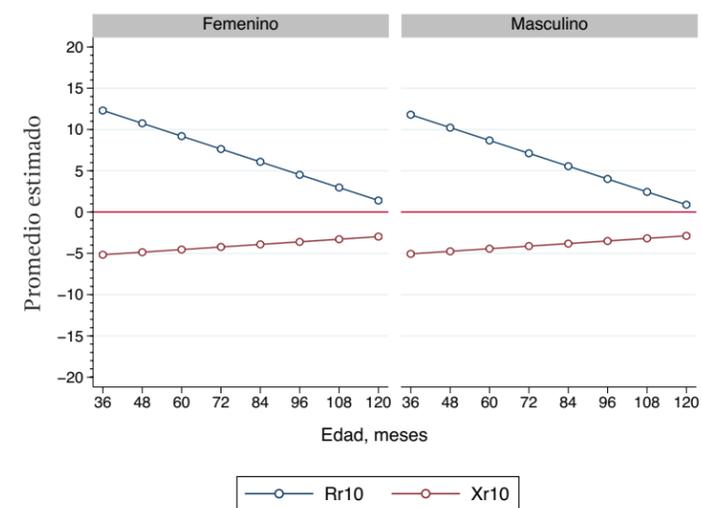
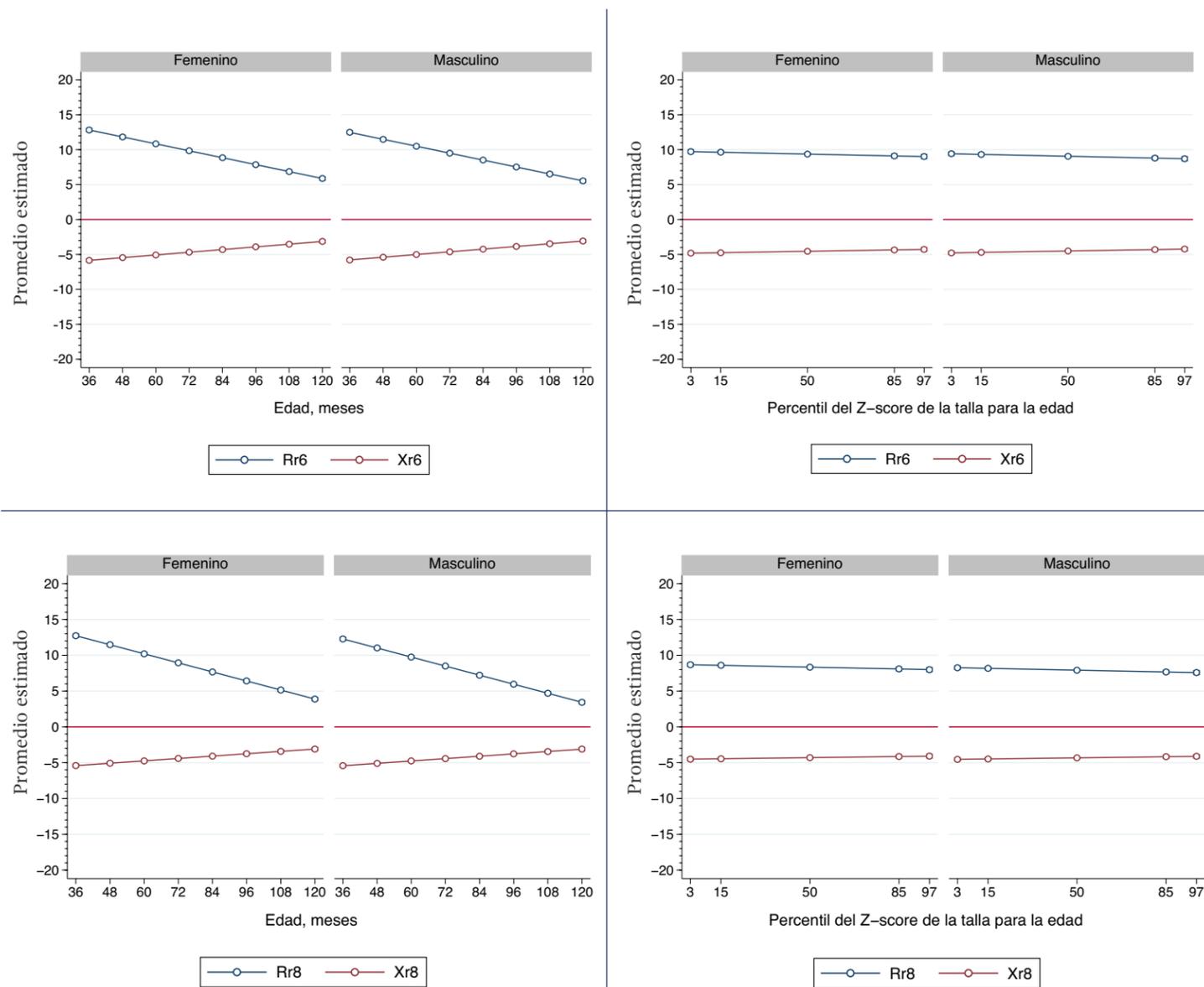
PZ-talla-edad: percentiles del puntaje z- de talla para edad. Todos los modelos mixtos con intercepto fueron ajustados por PZ-talla-edad, sexo y edad en meses. Los modelos de Rrs incluyeron a 811 niños con 2651 mediciones repetidas y para Xrs 822 sujetos con un total de 3028 mediciones.



En la figura 5, se presenta el crecimiento de la reactancia y resistencia estimada a través de la edad y percentiles del índice de la talla para la edad (puntaje z-talla para edad) por sexo. Se aprecia como disminuye la resistencia a medida que se incrementa la edad de los niños y el patrón se repite al considerar los percentiles del Z-talla-edad; el decremento de la resistencia es mayor cuando se considera la edad que cuando se consideran los percentiles del Z-talla-edad, es decir, un niño o niña que está en un percentil alto (P85) con respecto a uno que se encuentra en el percentil bajo (P15), muestra una diferencia de 0.53 hPa.s.L⁻¹ en su Rr6; mientras que la diferencia entre un niño o niña de 48 meses y uno de 108 meses es de 4.96 hPa.s.L⁻¹. El decremento de la resistencia es gradual por categoría del percentil del Z-talla-edad, y el decremento menor se presenta en la frecuencia de 10 hertz. Lo contrario se observa con las reactancias, se incrementan en las diferentes frecuencias oscilatorias con respecto a la edad y el rango de los percentiles del Z-talla-edad.

Por otra parte, la variación de las Rrs y Xrs fue estadísticamente significativa entre los niños, por lo que se controló al considerar el intercepto aleatorio en el modelo, lo que indica sustanciales diferencias de niño a niño en los niveles promedio de las oscilometrías. La correlación intraclase en todos los modelos estuvo entre el 11.8% y 19.3% y fue estadísticamente significativa, es decir, existe una diferencia promedio en los niveles de las oscilometrías entre los niños durante el seguimiento.

Figura 5. Promedio estimado de la resistencia y reactancia a 6, 8 y 10 hertz con respecto a la edad y a la puntuación del z-score de la talla para la edad



Importancia del crecimiento pulmonar a través del tiempo

La medición de la función pulmonar en niños preescolares es una tarea compleja, que tiene una contribución importante en el área de salud. En nuestro estudio evaluamos la función pulmonar a través de oscilometrías con respecto a la edad del niño y a los percentiles del índice de la talla para la edad (puntuación Z-talla-edad), de acuerdo con la OMS (WHO, 2006). Su importancia radica en que nos da idea del crecimiento normal de la talla para la edad del niño, es uno de los indicadores de salud del niño y nos permite determinar si la función pulmonar con respecto a la edad y talla del niño es la adecuada.

Los resultados tanto de la reactancia como de la resistencia se presentaron a diferentes frecuencias de oscilación (6, 8 y 10 Hertz) debido que a frecuencias bajas (<15 Hz) los impulsos generados al respirar viajan distancias más largas y penetran más profundamente en el pulmón, alcanzando las pequeñas vías aéreas y el parénquima pulmonar; lo que permite evaluar la función mecánica del pulmón (Brashier y Salvi 2015).

El efecto estimado del índice Z-talla-edad sobre la función pulmonar fue muy parecido al considerar una frecuencia u otra. Entre más pequeña sea la frecuencia oscilatoria considerada, mayor será la posibilidad de evaluar la parte mecánica del pulmón (Brashier y Salvi 2015) por lo que centramos la atención en el efecto estimado para



Rrs6, que se expresa en un decremento de $-0.008 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ cada vez que se incrementa en un percentil el Z-talla-edad del niño y de -0.083 al aumentar un mes la edad del niño. Además, se nota un incremento de $0.006 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ y de $0.032 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ en Xrs6 cuando se considera la puntuación Z-de talla-edad y la edad del niño. Los resultados muestran cómo se incrementa o decreta la resistencia o la reactancia pulmonar al considerar niños de talla para la edad más grande; lo mismo sucede al considerar la edad. Estos resultados sin duda resultan relevantes para el área de la salud ya que proporcionan la magnitud promedio de crecimiento de la función pulmonar de un niño sano con respecto a su talla para la edad o su edad.

Si bien el efecto de los síntomas respiratorios de los niños antes de los 18 meses de edad no influyó en la relación entre la función pulmonar y la puntuación Z de talla-edad, estos fueron evaluados en los modelos porque se sabe que la presencia recurrente de signos y síntomas respiratorios a temprana edad pueden ser causa de infecciones respiratorias frecuentes, enfermedades inflamatorias, reacciones alérgicas o asma (Blümer et al. 2007) en etapas posteriores. Esto posiblemente se deba a una falla de la regulación de la tolerancia y la activación del sistema inmune (Kawano et al. 2016) Por lo que los periodos fetal y neonatal son clave para la adaptación inmunológica del individuo. Se cree que muchos procesos alérgicos y enfermedades inflamatorias de la vida adulta se originan en estos periodos cruciales (Gottrand 2008).

Efecto de los ftalatos y bisfenol A sobre la función pulmonar

Después de corregir el error de medición de la función pulmonar identificado en la segunda etapa del estudio, se continuó con el plan inicial de dar respuesta al objetivo principal del proyecto, (Evaluar el efecto de la exposición prenatal a disruptores endocrinos [ftalatos y bisfenol A] sobre la función pulmonar en niños residentes de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos, México). Para ello se concentró en una sola tabla de datos toda la información recopilada durante el seguimiento, desde los 3 hasta los 9 años de edad: función pulmonar, antropometría, síntomas respiratorios, antecedentes familiares y de exposición prenatal a ftalatos y BPA. 184 binomios madre-niño tuvieron información completa.

Variables de interés.

Se evaluó la función mecánica pulmonar por la técnica de oscilación forzada para obtener la reactancia (Xrs) y la resistencia (Rrs) a diferentes frecuencias de oscilación, entre 2 y 48 Hertz (Hz). Para nuestro análisis reportamos resultados a 6 y 20 Hz, la primera para valorar alguna afectación en vías pequeñas y en parénquima pulmonar, mientras que la segunda valora primordialmente vías aéreas grandes (Brashier y Salvi 2015).



Las pruebas se repitieron cada año en dos lapsos del tiempo, el primero a los 3, 4 y 5 años de edad y, en un segundo momento a los 7, 8 y 9 años de edad. Las mediciones del segundo momento resultaron afectadas por un error que fue corregido por medio de técnicas estadísticas que permitieron trasladar las mediciones y conservar la variabilidad observada entre y dentro de las mediciones en el tiempo. El procedimiento fue descrito en la sección anterior.

Exposición Ambiental.

A partir de muestras de orina materna se evaluó la exposición prenatal a ftalatos y BPA. Se determinaron las concentraciones de nueve metabolitos de ftalatos monoéster (mono-2-etilhexil ftalato (MEHP), 2-etil-5-carboxifenil ftalato (MECPP), 2-etil-5-hidroxihexil ftalato (MEHHP), mono-2-etilo-5-oxohexilo ftalato (MEOHP), monobenzil ftalato (MBzP), Mono-n-butil ftalato (MBP), mono-iso-butil ftalato (MiBP), monoetil ftalato (MEP), Mono-carboxipropil ftalato (MCP) y bisfenol A (BPA). Las muestras de orina se encontraban almacenadas en alícuotas de 5 ml congeladas a -70°C hasta el análisis y se procesaron por desconjugación enzimática de los glucurónidos, seguida de extracción en fase sólida.

Para la determinación del ftalato, se procesaron 1-2 ml de alícuotas de orina y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con dilución isotópica acoplada con espectrometría de masas en tándem. Los análisis de BPA se realizaron mediante espectrometría de masas por cromatografía de gases. Las concentraciones urinarias de ftalato y BPA se informan en microgramos por litro de orina y en microgramos por gramo de creatinina urinaria ($\mu\text{g/g}$ de creatinina). La determinación de creatinina se realizó usando cromatografía líquida de alta resolución y los niveles se usaron para corregir la dilución de la orina.

Las variables correspondientes a las concentraciones de los metabolitos de ftalatos y BPA fueron transformadas a logaritmo natural para eliminar el sesgo que presentaban.

Signos y síntomas respiratorios.

A partir de su nacimiento, los niños fueron seguidos cada 3 meses hasta los 18 meses de edad y posteriormente cada año aplicándoles un cuestionario clínico que proporcionó información sobre la presencia o ausencia de los signos y síntomas respiratorios desde el nacimiento hasta los 9 años. Además del diagnóstico de asma, consideramos en nuestro análisis los siguientes indicadores: 1) tos, 2) tos seca, 3) tos con flemas y/o congestión nasal, 4) tos con infección en la garganta 5) sibilancias.



Otras variables

A partir de la edad, peso y talla del niño, obtenidas antes de que se realizara la prueba de oscilometría, se construyó el índice de talla para la edad (Z-height-age) y el índice de peso corporal para la edad (Z-BMI-age) según la OMS (WHO Multicentre Growth Reference Study Group 2006).

La información de exposición al humo de tabaco se obtuvo 2 veces a través de un cuestionario administrado a las madres durante el embarazo y en la visita de los niños a los 4 años, respondiendo la pregunta “¿Fuman usted o alguien más dentro de la casa y/o en presencia del infante?”.

Para determinar los niveles de la IgE específica de la madre en plasma, durante el embarazo se tomó una muestra de sangre materna. Las muestras fueron evaluadas usando un sistema de citometría de flujo Luminex Immune Tech, Inc, Menlo Park, CA. Los resultados fueron clasificados en dos categorías: como positiva $IgE \geq 0.70$ IU/ml (madre atópica) y como negativa $IgE < 0.70$ (madre no atópica).

La información sociodemográfica en el hogar fue obtenida mediante entrevistas con la madre durante una visita al domicilio, realizada durante el segundo trimestre del embarazo. El cuestionario incluía preguntas sobre la educación de los padres, ingreso familiar, y características del hogar (como aspectos estructurales, entorno familiar y factores ambientales asociados a alérgenos).

Análisis Estadístico

Se obtuvieron las estadísticas descriptivas como media, desviación estándar o frecuencias en las variables sociodemográficas, de exposición ambiental, antecedentes de atopia materna y otras involucradas en el proceso del análisis. Se graficó la distribución de la resistencia y reactancia por grupos de edad durante el seguimiento de los 3 hasta los 9 años. Se presentan las estadísticas de las variables de exposición ambiental a través de su media, mediana, y para ver su variabilidad la desviación estándar y los percentiles 25 y 75, 5 y 95, así como los valores mínimos y máximos de cada variable de exposición.

Para evaluar la asociación entre la función pulmonar y la exposición (metabolitos de ftalatos y BPA) se usaron modelos mixtos considerando intercepto aleatorio y matriz de covarianza sin estructura. Todos los modelos consideran la variable de exposición prenatal a priori y se ajustaron por las siguientes variables: alguna persona en casa fuma, lactancia exclusiva por 6 meses (0: menor a 6 meses 1: 6 meses de lactancia exclusiva), sexo del niño, la puntuación z-de la talla para la edad y el tiempo de seguimiento. Otras variables que no cambian en el tiempo y fueron consideradas como



confusoras fueron el estatus socioeconómico, el sobrepeso de la madre, los niveles de IgE total en cordón umbilical del niño, el orden de nacimiento, el tipo de parto, la presencia de mascotas en casa, humedad y antecedentes de tabaco y la presencia de síntomas respiratorios fueron evaluadas y no resultaron ser significativas ($p > 0.10$), ni modificaron los coeficientes por más del 10%. Por otro lado, cuando se evaluó la interacción entre el grupo de suplementación (grupo=1 si las madres durante el embarazo fueron suplementadas con placebo y grupo=2 si fueron suplementadas con DHA) y cada variable de exposición sobre la resistencia y reactancia a frecuencia 6 Hz, en algunos casos está resultó estadísticamente significativa ($p \leq 0.10$).

Cada modelo fue sometido a un diagnóstico mediante sus residuos y para seleccionar el mejor modelo se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC).

Todos los análisis se realizaron utilizando STATA versión 14 (StataCorp LP).

Resultados

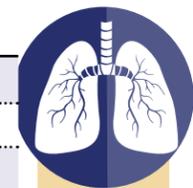
El cuadro 10 muestra las características sociodemográficas de la población de estudio, binomio madre-hijo. El 52.7% de los niños fue de sexo masculino, con un peso promedio al nacimiento de 3.2 Kg (Desviación Estándar (DE) =0.4) y un promedio de 39.1 semanas de gestación (DE=1.9), 53.3% nacieron por cesárea y 28.8% fueron primogénitos. El 40.2% de las madres reportaron haber alimentado durante los primeros 6 meses a su hijo exclusivamente con leche materna. Los síntomas respiratorios que presentaron con mayor frecuencia los niños 15 días antes de la realización de cada prueba de oscilometría fueron tos y tos con infección en la garganta, 37.9% y 37.0%, respectivamente.

Las madres al inicio del estudio tenían 26.0 años de edad promedio (DE=4.9), más de la mitad mostró sobrepeso (56.5%) y el 56.0% al menos cuenta con educación primaria o más. De acuerdo con los niveles de IgE específico 28.3% fueron clasificadas como madres atópicas. En 37.5% de los hogares declararon tener al menos a una persona fumadora dentro del hogar.



Cuadro 10. Características de la población de estudio

Variables	Grupo de tratamiento		
	Placebo	DHA	Total
	87 (47.3%)	97(52.7%)	184(100%)
Características del niño			
Sexo masculino (%)	44(50.6)	53(54.6)	97(52.7)
Período de gestación, semanas [Media (DE)]	39.3(2.0)	38.8(1.9)	39.1(1.9)
Peso al nacer, kg [Media (DE)]	3.2(0.4)	3.2(0.4)	3.2(0.4)
Talla al nacer, cm [Media (DE)]	50.6(1.9)	50.3(2.4)	50.5(2.2)
Bajo peso al nacer, <2500g (%)	14(16.1)	18(18.6)	32(17.4)
Orden de nacimiento, primer nacimiento (%)	25(28.7)	28(28.9)	53(28.8)
Tipo de parto, cesárea (%)	45(51.7)	53(54.6)	98(53.3)
Semana de gestación al momento de la aleatorización, [Media (DE)]	20.4(2.0)	20.3(1.9)	20.3(1.9)
Lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses	37(42.5)	37(38.1)	74(40.2)
Síntomas en los últimos 15 días, [Sujeto (%), Episodios (%)]			
Síntomas en los últimos 15 días, [Sujeto (%), Episodios (%)]	24(40.7), 31(29.0)	23(35.4), 32(29.9)	47(37.9), 63(29.4)
Tos seca	6(10.0), 6(5.6)	5(7.7), 5(4.7)	11 (8 . 8) , 11(5.1)
Tos con flema y congestión nasal	19(21.8), 25(7.2)	21(21.7), 25(6.6)	40 (21 . 7) , 50(6.9)
Tos con infección en la garganta	37(42.5), 54(15.5)	31(32.0), 38(10.0)	68 (37 . 0) , 92(12.6)
Sibilancias	4(4.6), 6(1.7)	4(4.1), 5(1.3)	8 (4 . 4) , 11(1.5)
Diagnóstico de asma	9(10.3), 14(4.0)	3(3.1), 4(1.1)	12 (6 . 5) , 18(2.5)



Variables	Grupo de tratamiento		
	Placebo	DHA	Total
Características de la madre			
Edad de la madre, años [Media (DE)]	25.8(4.7)	26.2(5.0)	26.0(4.9)
IMC de la madre [Media (DE)]	26.4(4.9)	26.0(4.2)	26.2(4.5)
Sobrepeso, BMI>25	47(54.0)	57(58.8)	104(56.5)
Educación (%)			
Secundaria terminada o más	51(58.6)	52(53.6)	103(56.0)
Estado socioeconómico (%)			
Bajo	34(39.1)	30(30.9)	64(34.8)
Medio	30(34.5)	36(37.1)	66(35.9)
Alta	23(26.4)	31(32.0)	54(29.4)
Atopia materna (%)	22(26.5)	28(29.8)	50(28.3)
Alguien fuma en casa (%)	31(35.6)	38(39.2)	69(37.5)

DHA = Ácido docosahexaenoico; IMC = índice de masa corporal; IgE = Inmunoglobulina E

El metabolito de ftalato MEP tuvo la concentración más alta con una mediana de 106.5 µg/g creatinina (Intervalo de Confianza de 95% (IC 95%): 32.2, 376.2) MnBP con 84.5(IC 95%: 36.2, 194.8), seguido por MECPP y MEHHP con 50.4 µg/g de creatinina (IC 95%: 15.8, 147.4) y 37.2(IC 95%: 13.3, 114.5), respectivamente. (Cuadro 11)



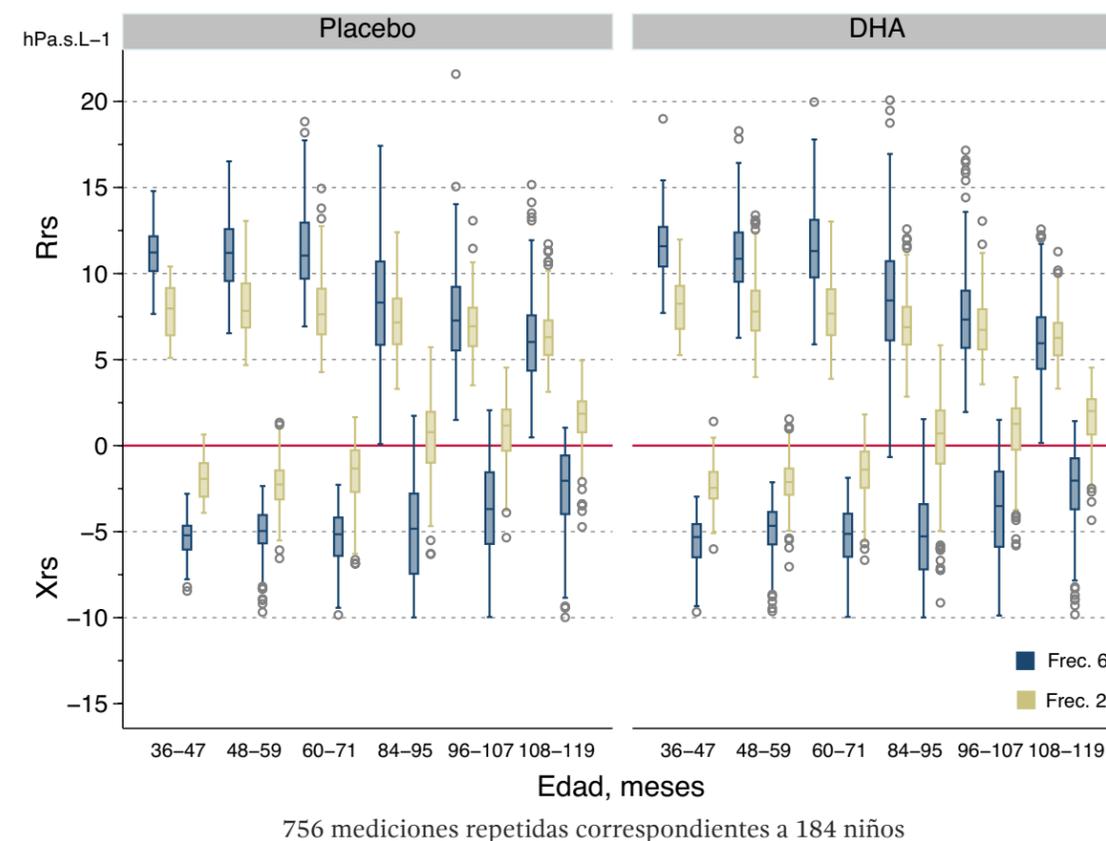
Cuadro 11. Concentraciones promedio (en $\mu\text{g/g}$ de creatinina) de los metabolitos de ftalato y bisfenol A en muestras de orina de mujeres embarazadas.

Metabolito de ftalato y Bisfenol	Placebo, n=87		DHA, n=97		Total	
	Mediana (P25, P75)	P5 - P95	Mediana (P25, P75)	P5 - P95	Mediana (P25, P75)	P5 - P95
MCCP	2.9(1.3, 6.8)	(0.5 - 25.8)	2.7(1.2, 5.2)	(0.4 - 31.3)	2.8(1.4, 6.0)	0.5 - 21.8
MEP	103.2 (32.2, 376.2)	(10.4 - 1433.9)	100.2 (33.3, 278.0)	(7.4 - 1785.1)	106.5 (32.2, 376.2)	7.5 - 1433.9
MECPP	45.6(26.5, 125.6)	(8.0 - 667.5)	46.5(15.6, 99.0)	(3.3 - 452.1)		
MEHHP	37.2(17.0, 97.3)	(4.5 - 516.8)	30.9(10.4, 101.7)	(1.3 - 354.9)	37.2(13.3, 114.5)	2.2 - 511.4
MEOHP	19.0(8.5, 46.5)	(2.4 - 289)	17.2(7.0, 52.3)	(1.0 - 165.1)	19.4(7.0, 52.3)	1.2 - 219.0
MEHP	3.9(1.9, 10.0)	(0.6 - 63.3)	3.4(1.8, 8.5)	(0.3 - 42.2)	3.6(1.8, 9.6)	0.4 - 57.1
MnBP	84.5(36.0, 172.6)	(13.6 - 530.9)	79.5(23.4, 218.6)	(2.4 - 1019.5)	84.5(36.2, 194.8)	6.9 - 775.6
MiBP	6.9(2.7, 16.9)	(0.5 - 65.9)	6.4(2.9, 13.6)	(0.4 - 69.8)	6.5(2.7, 16.2)	0.5 - 65.9
MBzP	12.2(4.1, 34.4)	(1.0 - 207)	10.1 (4.1, 31.8)	(0.8 - 143.0)	11.0(4.0, 31.8)	1.0 - 121.0
BPA	2.3(1.2, 6.0)	(0.4 - 20.3)	2.2(0.7, 4.7)	(0.2 - 12.6)	2.3(1.1, 5.0)	0.2 - 15.8

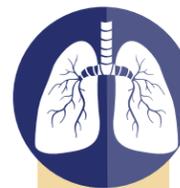
En cuanto la función pulmonar, durante el seguimiento se obtuvo un promedio de 4 mediciones de resistencia y reactancia por sujeto. La resistencia a frecuencia 6 y 20 Hz cae con la edad (menor a 20 que a 6 Hz) y la reactancia se incrementa (menor Xrs6 que la Xrs20) como se puede observar en la figura 6. La resistencia promedio a frecuencia 6 Hz durante el seguimiento fue de 9.1 hPa.s.L^{-1} con una variabilidad entre las mediciones de los niños (ve) de 1.7 y de 2.7 entre las mediciones de cada niño (vd), para Rrs20 el promedio fue de 8.9 hPa.s.L^{-1} , con una variabilidad entre los niños de 1.1 y dentro de ellos de 1.5 hPa.s.L^{-1} . En cuanto la reactancia promedio observada

en Xrs6 fue de -4.5 (ve=1.4, vd=1.8) y de -3.1 (ve=1.3, vd=1.8) hPa.s.L^{-1} . Estas estadísticas fueron similares entre los grupos placebo y DHA. (No se muestran los datos)

Figura 6. Seguimiento de la resistencia y reactancia a frecuencia 6 y 20 Hz por grupo de suplementos y edad.



Al evaluar el efecto de la exposición prenatal sobre la función pulmonar del niño por grupo de suplementación, se observó un efecto positivo, pero no significativo en el grupo de niños cuyas madres fueron suplementadas con placebo, es decir, a medida que se incrementan los metabolitos o el BPA en escala logarítmica, la resistencia a frecuencia 6 Hz se incrementó, pero no de manera significativa. En contraste, en el grupo de niños de madres suplementadas con DHA, este efecto fue negativo con todos los metabolitos y BPA, pero solo fue significativo ($p < 0.05$) en $\text{Ln}(\text{MECPP})$, $\text{Ln}(\text{MEHHP})$, $\text{Ln}(\text{MEOHP})$, $\text{Ln}(\text{MEHP})$ y $\text{Ln}(\text{MnBP})$. Por cada incremento en escala logarítmica de MECPP, la resistencia de los niños disminuyó en $0.298 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC 95%: $-0.521, -0.076$), en el caso de MEHHP en $0.295 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC 95%: $-0.484, -0.105$), MEOHP en 0.271 (IC95%: $-0.489, -0.053$), $\text{Ln}(\text{MEHP})$ en 0.252 (IC 95%: $-0.485, -0.019$) y $\text{Ln}(\text{MnBP})$ en 0.271 (IC95%: $-0.491, -0.050$).





Cuadro 12. Efecto de los ftalatos sobre la Resistencia a frecuencia 6 Hz (hPa.s.L⁻¹) por grupo de tratamiento

Metabolito de ftalato / BPA	Placebo (N=87, n=361)		DHA (N=97, n=395)		Global (N=184, n=756)		P valor #
	Coefficiente (IC95%)	P valor	Coefficiente (IC95%)	P valor	Coefficiente (IC95%)	P valor	
Ln(MCPP)	0.06(-0.184, 0.303)	0.630	-0.241(-0.534, 0.053)	0.108	-0.096(-0.288, 0.096)	0.328	0.103
Grupo, DHA					0.018(-0.452, 0.488)	0.940	
Ln(MEP)	0.088(-0.1, 0.277)	0.357	-0.057(-0.272, 0.158)	0.603	0.005(-0.138, 0.149)	0.941	0.317
Grupo, DHA					0.022(-0.448, 0.493)	0.926	
Ln(MECP)	0.013(-0.212, 0.239)	0.907	-0.298(-0.521, -0.076)	0.009	-0.172(-0.333, -0.011)	0.037	0.052
Grupo, DHA					-0.05(-0.52, 0.421)	0.836	
Ln(MEHHP)	0.031(-0.171, 0.234)	0.761	-0.295(-0.484, -0.105)	0.002	-0.166(-0.307, -0.025)	0.021	0.020
Grupo, DHA					-0.057(-0.525, 0.412)	0.813	
Ln(MEOHP)	0.019(-0.193, 0.231)	0.863	-0.271(-0.489, -0.053)	0.015	-0.146(-0.3, 0.009)	0.065	0.055
Grupo, DHA					-0.027(-0.497, 0.442)	0.909	
Ln(MEHP)	0.107(-0.104, 0.317)	0.320	-0.252(-0.485, -0.019)	0.034	-0.081(-0.242, 0.08)	0.324	0.025
Grupo, DHA					-0.012(-0.486, 0.462)	0.961	
Ln(MBP)	0.132(-0.13, 0.395)	0.323	-0.271(-0.491, -0.05)	0.016	-0.136(-0.305, 0.034)	0.118	0.025
Grupo, DHA					-0.008(-0.477, 0.461)	0.973	
Ln(MiBP)	0.113(-0.121, 0.347)	0.344	-0.063(-0.315, 0.189)	0.625	0.014(-0.16, 0.189)	0.873	0.312
Grupo, DHA					0.023(-0.448, 0.494)	0.924	
Ln(BPA)	0.124(-0.124, 0.372)	0.328	-0.163(-0.436, 0.11)	0.243	-0.035(-0.22, 0.151)	0.713	0.092
Grupo, DHA					0.011(-0.463, 0.484)	0.965	



Interacción entre los metabolitos de los ftalatos o el BPA y el grupo de suplementación (1 = placebo y 2 = DHA). Todos los modelos fueron ajustados por alguien fuma en casa, lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses, sexo, puntaje z de talla para la edad por cada medición y el tiempo de seguimiento.

El mismo patrón de comportamiento se observó las Xrs6 para estos metabolitos. Considerando al grupo de niños cuyas madres recibieron DHA, a medida que se incrementan Ln(MECP), Ln(MEHHP), Ln(MEOHP) y Ln(MEHP), la reactancia a frecuencia 6 Hz se incrementa significativamente, en 0.189 hPa.s.L⁻¹(IC 95%: 0.003, 0.376)], 0.185(IC 95%: 0.026, 0.344), 0.170 (IC 95%: -0.012, 0.352) y 0.164 hPa.s.L⁻¹ (IC95%: -0.030, 0.357), respectivamente. (Cuadros 12 y 13)

Cuadro 13. Efecto de los ftalatos sobre la Reactancia a frecuencia 6 Hz (hPa.s.L⁻¹) por grupo de tratamiento

Metabolito de ftalato / BPA	Placebo (N=87, n=326)		DHA (N=96, n=352)		Global (N=183, n=678)		Interacción P valor #
	Coefficiente (95%CI)	P valor	Coefficiente (95%CI)	P valor	Coefficiente (95%CI)	P valor	
Ln(MCPP)	-0.098(-0.319, 0.122)	0.381	0.079(-0.168, 0.327)	0.530	-0.014(-0.18, 0.151)	0.864	0.245
Grupo, DHA					-0.2(-0.602, 0.202)	0.330	
Ln(MEP)	-0.027(-0.199, 0.144)	0.755	0.002(-0.179, 0.183)	0.985	-0.012(-0.137, 0.112)	0.845	0.948
Grupo, DHA					-0.201(-0.603, 0.201)	0.327	
Ln(MECP)	-0.05(-0.252, 0.151)	0.624	0.189(0.003, 0.376)	0.047	0.094(-0.044, 0.232)	0.183	0.078
Grupo, DHA					-0.16(-0.564, 0.244)	0.437	
Ln(MEHHP)	-0.004(-0.186, 0.178)	0.967	0.185(0.026, 0.344)	0.023	0.112(-0.009, 0.232)	0.069	0.110
Grupo, DHA					-0.146(-0.548, 0.256)	0.477	
Ln(MEOHP)	0.006(-0.196, 0.184)	0.949	0.17(-0.012, 0.352)	0.067	0.097(-0.036, 0.229)	0.152	0.160
Grupo, DHA					-0.166(-0.568, 0.236)	0.419	
Ln(MEHP)	-0.102(-0.291, 0.087)	0.289	0.164(-0.03, 0.357)	0.098	0.037(-0.101, 0.174)	0.602	0.048
Grupo, DHA					-0.184(-0.59, 0.221)	0.373	



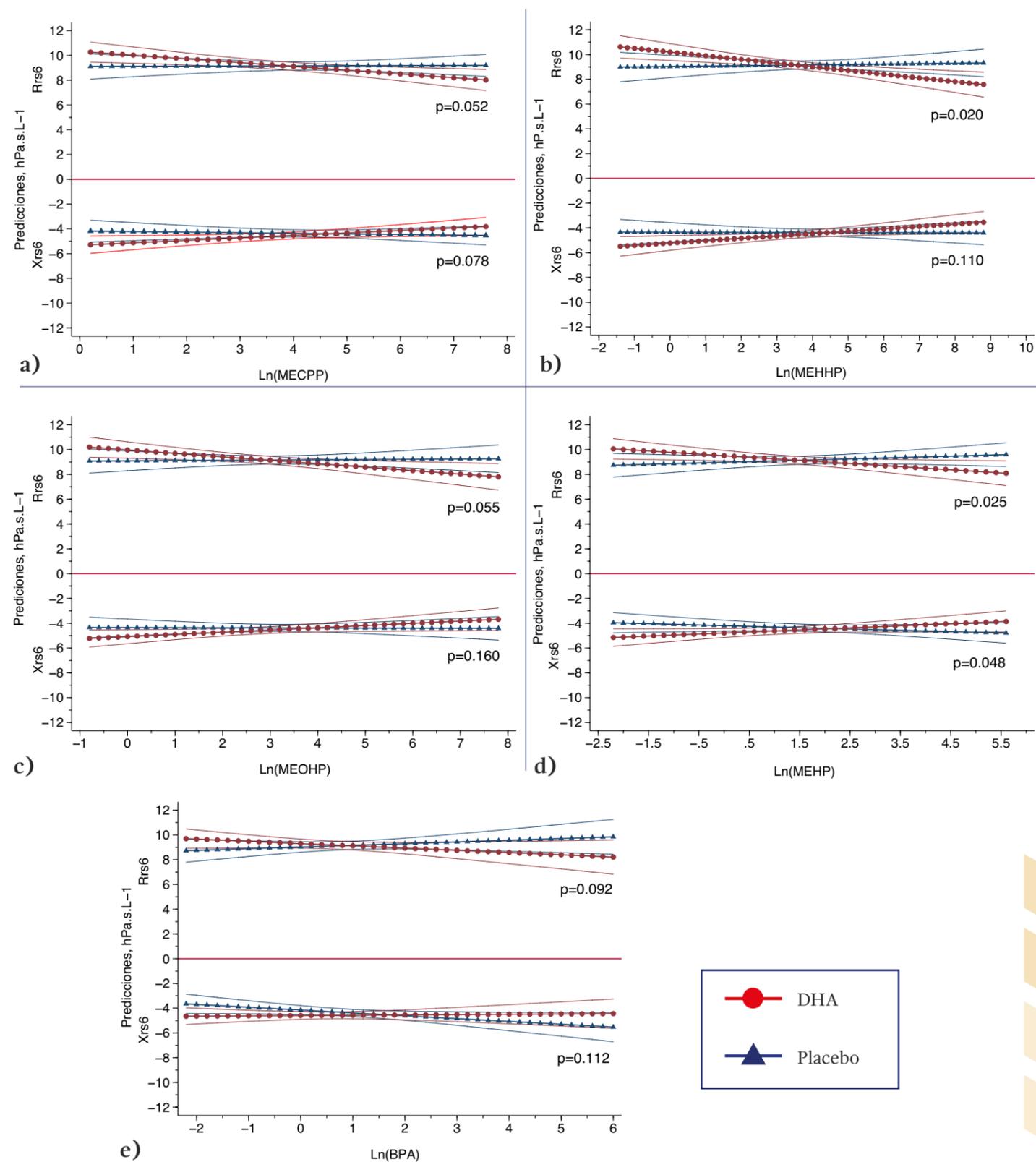
Ln(MBP)	0.006(-0.234, 0.246)	0.961	0.149(-0.038, 0.336)	0.119	0.097(-0.05, 0.244)	0.196	0.332
Grupo, DHA					-0.178(-0.578, 0.223)	0.385	
Ln(MiBP)	-0.007(-0.219, 0.205)	0.947	0.028(-0.182, 0.238)	0.792	0.012(-0.137, 0.162)	0.871	0.786
					-0.198(-0.6, 0.205)	0.336	
Ln(BPA)	-0.238(-0.454, -0.021)	0.031	0.014(-0.215, 0.243)	0.905	-0.095(-0.253, 0.063)	0.238	0.112
Grupo, DHA					-0.229(-0.633, 0.175)	0.266	

Interacción entre los metabolitos de los ftalatos o el BPA y el grupo de suplementación (1 = placebo y 2 = DHA). Todos los modelos fueron ajustados por alguien fuma en casa, lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses, sexo, puntaje z de talla para la edad en cada medición y tiempo de seguimiento.

Por otro lado, se observó una interacción significativa ($p < 0.10$) entre el grupo de suplementación y las concentraciones en escala logarítmica de los metabolitos Ln(-MECPP), Ln(MEHHP), Ln(MEOHP), Ln(MEHP) y Ln(BPA) sobre la resistencia y la reactancia a frecuencia 6 Hz. En promedio la Rrs6 de los niños disminuyó significativamente cuando sus madres fueron suplementadas con DHA durante el embarazo, a diferencia del grupo de niños cuyas madres recibieron placebo durante esta etapa, donde el decremento fue mínimo o nulo, y no significativo. La reactancia, se incrementó en el grupo de DHA, pero el incremento fue mínimo o nulo en el placebo. Es decir, el efecto del DHA pareciera contrarrestar el efecto negativo de los ftalatos sobre la medición de la resistencia. (Figura 7)

Para el caso de las Rr20y Rx20, en ninguno de los dos grupos se observó un efecto significativo en presencia de estos químicos. (No se muestran los datos)

Figura 7. Interacciones entre el grupo de suplemento y el metabolito de ftalato.



Todos los modelos fueron ajustados por alguien fuma en casa, lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses, sexo, puntaje z de talla para la edad en cada medición y tiempo de seguimiento.



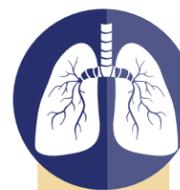
Los resultados muestran una relación positiva entre algunos metabolitos de ftalatos y la función pulmonar en el grupo cuyos niños fueron suplementados con DHA. No obstante, debido a la incertidumbre creada por el error en el segundo momento de la medición de la resistencia y la reactancia, los resultados no son publicables. (Anexo 2. Asociación entre la función pulmonar y los disruptores endocrinos. Artículo no publicable). Sin embargo, es importante discutir los sesgos y errores de medición, de manera que concluiremos nuestro trabajo discutiendo los resultados en términos del error de medición. También se discutirán las ventajas y desventajas del estudio.

DISCUSIÓN

Resultados obtenidos

La función pulmonar (Rr6 y Xr6) de los niños cuyas madres recibieron DHA durante el embarazo no fue afectada de manera significativa en función de los niveles de los metabolitos que provienen del ftalato DEHP. Los hijos de madres suplementadas con placebo mostraron una menor función pulmonar al incrementarse los metabolitos, aunque el decremento no tuvo significancia estadística.

Biológicamente, algunos estudios han sugerido que la exposición a ftalatos durante el desarrollo fetal puede provocar alteraciones durante o posterior a esta etapa de la vida. Este proceso inicia cuando los químicos atraviesan la barrera placentaria, permitiéndoles llegar hasta la circulación sanguínea del feto en desarrollo. Otros estudios han mostrado que la exposición a ftalatos se relaciona con procesos proinflamatorios TNF-alfa y un incremento en las sustancias reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que puede inducir estrés oxidativo y apoptosis en las células placentarias que ocasionan complicaciones en el embarazo o predisponen a enfermedades a largo plazo, como el asma. Por otro lado, las vías por las cuales el DHA actúa como un antiinflamatorio no son del todo claras. Algunos autores señalan que el DHA eleva las citoquinas Th2, IL5 e IL13 mientras que disminuye el estrés oxidativo a través de su acción sobre los niveles de F-isoprostano. Otros autores apoyan la hipótesis de un



cambio epigenético causado por la incorporación del DHA a la dieta materna durante el embarazo que se ve reflejado en el sistema inmune en etapas posteriores al nacimiento.

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran una clara relación entre el efecto de los ftalatos sobre la función pulmonar y el grupo de suplementación.

Lo anterior probablemente se deba a alguna de las circunstancias que se presentaron durante el desarrollo del estudio, como el hecho de que las dosis de DHA que se administraron fueron bajas (400 mg por día) y a que no se continuó con la suplementación durante la lactancia; la falta de potencia estadística para detectar un efecto convincente pudo ser otro factor, al igual que la presencia del error de medición de la función pulmonar. A continuación, se aborda el impacto de las situaciones que se dieron durante el desarrollo del proyecto sobre el desenlace del presente estudio.

Circunstancias que se presentaron durante el seguimiento del proyecto

Errores de medición en la función pulmonar

La técnica de oscilación forzada ofrece una ventaja indiscutible frente a la espirometría al medir la función pulmonar en niños de edad preescolar, en adultos mayores o en personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) porque es una técnica que evalúa la parte mecánica del pulmón sin necesidad de que el paciente realice un esfuerzo de respiración ya que se realiza durante la respiración continua y suave. Sin embargo, los resultados de la resistencia y reactancia obtenidos en nuestro estudio presentan dos errores, uno que proviene del equipo utilizado i2M (Chess Medical, Belgium, marketed in Italy by Cosmed) y otro producto de error, probablemente de calibración del aparato, cometido por el personal encargado de realizar estas mediciones.

El primer error en las mediciones de Rrs y Xrs a frecuencias bajas (6, 8 y 10 Hz) fue identificado y reportado recientemente por el Dr. Peter Sly y colaboradores (Sly et al. 2018), error originario desde la fabricación del equipo i2M, específicamente en el procedimiento de calibración indicado por los fabricantes, al considerar una impedancia estática baja ($2 \text{ hPa}\cdot\text{s L}^{-1}$) y especulando que se corrige con la adaptación de una boquilla con filtro en la boca para sellar los labios y que el paciente respire tranquilamente; el patrón de respiración del niño es variable y por ende su impedancia respiratoria es superior a $2 \text{ hPa}\cdot\text{s L}^{-1}$, por lo que este error se incrementaría en el caso de los niños pequeños y pacientes con EPOC debido a que emiten impedancias altas.



Los autores lo demuestran y proponen como estándar de oro añadiendo un tubo de ondas al equipo i2M y una calibración de ganancia de presión. Concluyen que el equipo i2M sistemáticamente subestima el Rrs y sobreestima la Xrs. Estos errores significativos repercuten en el diagnóstico clínico, sobre todo cuando se trata de pacientes con EPOC. Sugieren utilizar un procedimiento de calibración dinámico que utilice un modelo de pulmón que simule los cambios en Zrs observados durante la respiración tidal para obtener estimaciones precisas de Zrs, para posteriormente reemplazar los valores estándar que hasta ahora se han propuesto con el equipo i2M. Lo anterior indica que es necesario evaluar las mediciones que provienen de otros equipos que se usan con frecuencia para descartar este problema.

El segundo error fue identificado durante el análisis estadístico de mediciones de Rrs y Xrs tomadas a los niños de 7, 8 y 9 años en la segunda fase del estudio. Es un **error sistemático** que afecta por igual todas las mediciones de los participantes del estudio. Se sospecha que la causa fue que el equipo i2M no fue calibrado al inicio de la segunda fase de la misma manera que al inicio del estudio. Entre la fase 1 y 2, el equipo estuvo apagado por el lapso de un año.

El error compromete la validez interna del estudio ya que las mediciones no válidas de Rrs y Xrs conducen a una respuesta errónea a la pregunta de investigación (Hernández Ávila Mauricio 2007). De no corregir el error, se incurriría en un sesgo de información inherente al proceso de recolección de la información de oscilometrías y en consecuencia la estimación de los ftalatos sobre la función pulmonar sería errónea. Para solventar esta situación se aplicaron técnicas estadísticas para corregir el error en las mediciones de la segunda fase con ayuda de las mediciones de la primera fase del estudio.

Un sesgo de información puede llevar a un error de clasificación diferencial o no diferencial, por falta de control de calidad en la información. En nuestro caso nos encontramos ante un error de clasificación no diferencial o aleatoria ya que el error cometido afectó por igual a todas las mediciones de los participantes durante la segunda fase del estudio, independientemente de su exposición (Hernández Ávila Mauricio 2007).

Para evaluar el sesgo presentado en nuestro trabajo, calculamos el coeficiente de correlación de concordancia entre las mediciones predichas de reactancia y resistencia provenientes de las ecuaciones propuestas por Gochicoa y colaboradores (INER) (Gochicoa-Rangel et al. 2015) y las del modelo que propusimos para evaluar las curvas de crecimiento pulmonar. En este análisis se observa poca concordancia entre ambas, pero una alta precisión en todas las mediciones, además de la presencia del error sistemático. (Anexo 3)



Pérdidas de información

Una suposición importante para el cálculo de las tasas de incidencia en un estudio de cohorte es que los individuos que se pierden durante el seguimiento son similares a los que se mantienen bajo observación tanto en lo que concierne a la exposición como en lo relativo a la enfermedad (desenlace). En caso contrario se obtendría un riesgo relativo sesgado (sesgo de selección por las pérdidas en el seguimiento) (Sklo Moyses y Nieto Javier 2018). El sesgo de selección puede afectar la validez externa del estudio, es decir, la generalización. En nuestro caso se planeó un diseño de cohorte con información de 290 binomios madre-hijo y un seguimiento de mediciones de función pulmonar de los niños en dos fases del estudio, la primera a los 3,4 y 5 años y la segunda fase a los 7, 8 y 9 años de edad. Debido a las circunstancias que se presentaron durante la marcha, el tamaño de muestra y el número de mediciones repetidas planeadas se redujo. A la edad de 3 años asistieron 187 niños a la evaluación de su función pulmonar (vista anual de rutina al hospital), pero solo 33 correspondían a los 290 niños seleccionados como población de estudio porque se disponía de la información de exposición prenatal. A medida que el estudio avanzó, se fueron incorporando más niños hasta llegar a 184 de los 290 niños inicialmente seleccionados. A pesar de que hubo pérdidas durante el seguimiento, a medida que avanzaba el estudio se recuperaron más niños. No todos los niños asistieron a las 6 visitas programadas, pero el promedio de asistencia a las visitas fue de 4 por niño durante el seguimiento. Por tanto la potencia estimada para detectar un efecto negativo de la exposición prenatal sobre la función pulmonar se afectó debido a que el tamaño de muestra disminuyó 36.6% y la potencia estimada de 66% a 49% (Bruin J 2006).

Por tanto, consideramos que la validez externa de nuestro estudio se vio afectada por la falta de la potencia estimada. Por tanto, existe incertidumbre en los resultados obtenidos sobre la asociación entre los ftalatos y la función pulmonar ya que desde el inicio no tuvo la suficiente potencia estadística para discriminar el efecto negativo de los ftalatos sobre la función pulmonar.

Sin embargo, las medidas correspondientes a la función pulmonar (Rrs y Xrs) no se vieron afectadas por la reducción del tamaño de la muestra que pasó de 290 a 184 sujetos. (Anexo 4)

Ventajas y desventajas del estudio

Nuestro estudio tiene la ventaja de provenir de un ensayo clínico, doble ciego aleatorizado, en el que las madres nunca supieron a qué grupo pertenecían y la población



involucrada en este trabajo (binomio madre-hijo) conservó la aleatorización, con características basales parecidas en el grupo de placebo y el de DHA, lo que garantiza la validez interna del estudio.

Otra ventaja es que el seguimiento de los niños se mantuvo hasta los 9 años de edad y se pudo observar el comportamiento de las mediciones antropométricas, función pulmonar y registro de síntomas respiratorios en los últimos 15 días previos a la aplicación de las pruebas de función pulmonar de los niños. Sin embargo, estuvieron presentes las siguientes limitaciones: 1) restricción del tamaño de muestra a 290 binomios madre-hijo desde un inicio, 2) falta de medición posnatal de la exposición a ftalatos y BPA, 3) pérdida de niños durante el seguimiento, 4) pérdida de información de covariables importantes durante el seguimiento y 4) error de medición en las mediciones de reactancia y resistencia identificado en la segunda fase del estudio.

Si bien todos los resultados presentan un grado de incertidumbre, lo que se busca al hacer estudios de investigación es minimizarlo con el propósito de que los resultados sean válidos. En nuestro caso, la incertidumbre se acentuó debido al error de medición de Rrs y Xrs y a la falta de potencia estadística.

◆◆ CONCLUSIONES, PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

En nuestro país es frecuente que el tamaño de la muestra de un proyecto de investigación se proponga con base al presupuesto disponible en lugar de hacer una estimación que permita considerar otros factores que puedan discriminar apropiadamente el efecto deseado. El presente estudio no fue la excepción, se propuso desde la planeación un tamaño de muestra de 290 binomios madre-hijo porque solo se disponía de presupuesto para determinar metabolitos de ftalatos y BPA en 290 muestras. Además, la falta de información a priori sobre la relación entre estos químicos y las medidas oscilométricas impidió que se calculara la potencia correctamente. La potencia estadístico del estudio se vio afectado porque se necesitaba un tamaño mayor para poder observar el efecto negativo de los ftalatos o del BPA sobre la resistencia y reactancia pulmonar durante los primeros años de vida de los niños.

Aunque hubo error en las mediciones de nuestras variables de desenlace (Rrs y Xrs), creemos que estas no se vieron afectadas gravemente y la falta de claridad en el efecto que se observa en la relación final entre la exposición a ftalatos y la función pulmonar se debe a la falta de potencia y no al error de medición.





◆◆ BIBLIOGRAFÍA

- Adibi, J. J., R. Hauser, P. L. Williams, R. M. Whyatt, A. M. Calafat, H. Nelson, R. Herrick, y S. H. Swan. 2009. “Maternal Urinary Metabolites of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate in Relation to the Timing of Labor in a US Multicenter Pregnancy Cohort Study”. *American Journal of Epidemiology* 169 (8): 1015–24. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp001>.
- Alonso-Magdalena, Paloma, Elaine Vieira, Sergi Soriano, Lorena Menes, Deborah Burks, Ivan Quesada, y Angel Nadal. 2010. “Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring”. *Environmental Health Perspectives* 118 (9): 1243–50. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001993>.
- Altenburger, Rolf, Thomas Backhaus, Wolfgang Boedeker, Michael Faust, y Martin Scholze. 2013. “Simplifying Complexity: Mixture Toxicity Assessment in the Last 20 Years”. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 32 (8): 1685–87. <https://doi.org/10.1002/etc.2294>.
- Amin, K, D Lúdvíksdóttir, C Janson, O Nettelbladt, E Björnsson, G M Roomans, G Boman, L Sevéus, y P Venge. 2000. “Inflammation and Structural Changes in the Airways of Patients with Atopic and Nonatopic Asthma. BHR Group”. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (6): 2295–2301. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.9912001>.
- Anderson, W A, L Castle, M J Scotter, R C Massey, y C Springall. 2001. “A Biomarker Approach to Measuring Human Dietary Exposure to Certain Phthalate Diesters”. *Food Additives and Contaminants* 18 (12): 1068–74. <https://doi.org/10.1080/02652030110050113>.
- Baena-Cagnani, C E, C M Patiño, M N Cuello, M C Minervini, A M Fernández, E A Garip, K D Salvucci, M L Sancho, S Corelli, y R M Gómez. 1999. “Prevalence and Severity of Asthma and Wheezing in an Adolescent Population”. *International Archives of Allergy and Immunology* 118 (2–4): 245–46. <https://doi.org/24087>.
- Barker, D J, K M Godfrey, C Fall, C Osmond, P D Winter, y S O Shaheen. 1991. “Relation of Birth Weight and Childhood Respiratory Infection to Adult Lung Function and Death from Chronic Obstructive Airways Disease”. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 303 (6804): 671–75.



- Barraza-Villarreal, Albino, Jordi Sunyer, Leticia Hernandez-Cadena, Maria Consuelo Escamilla-Nuñez, Juan Jose Sienna-Monge, Matiana Ramírez-Aguilar, Marlene Cortez-Lugo, et al. 2008. “Air Pollution, Airway Inflammation, and Lung Function in a Cohort Study of Mexico City Schoolchildren”. *Environmental Health Perspectives* 116 (6): 832–38. <https://doi.org/10.1289/ehp.10926>.
- Beydon, Nicole, Stephanie D Davis, Enrico Lombardi, Julian L Allen, Hubertus G M Arets, Paul Aurora, Hans Bisgaard, et al. 2007. “An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Pulmonary Function Testing in Preschool Children”. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (12): 1304–45. <https://doi.org/10.1164/rccm.200605-642ST>.
- Birnbaum, Linda S., John R. Bucher, Gwen W. Collman, Darryl C. Zeldin, Anne F. Johnson, Thaddeus T. Schug, y Jerrold J. Heindel. 2012. “Consortium-Based Science: The NIEHS’s Multipronged, Collaborative Approach to Assessing the Health Effects of Bisphenol A”. *Environmental Health Perspectives*, septiembre. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205330>.
- Blount, Benjamin C., K. Eric Milgram, Manori J. Silva, Nicole A. Malek, John A. Reidy, Larry L. Needham, y John W. Brock. 2000. “Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC–APCI–MS/MS”. *Analytical Chemistry* 72 (17): 4127–34. <https://doi.org/10.1021/ac000422r>.
- Blümer, N., S. Sel, S. Virna, C. C. Patrascan, S. Zimmermann, U. Herz, H. Renz, y H. Garn. 2007. “Perinatal Maternal Application of Lactobacillus Rhamnosus GG Suppresses Allergic Airway Inflammation in Mouse Offspring”. *Clinical & Experimental Allergy* 37 (3): 348–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02671.x>.
- Böcking, C, H Renz, y P I Pfefferle. 2012. “[Prevalence and socio-economic relevance of allergies in Germany]”. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55 (3): 303–7. <https://doi.org/10.1007/s00103-011-1427-6>.
- Bonds, Rana S, y Terumi Midoro-Horiuti. 2013. “Estrogen Effects in Allergy and Asthma”. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13 (1): 92–99. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835a6dd6>.
- Bornehag, C. G., y E. Nanberg. 2010. “Phthalate exposure and asthma in children”. *International Journal of Andrology* 33 (2): 333–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01023.x>.
- Bornehag, Carl-Gustaf, Jan Sundell, Charles J. Weschler, Torben Sigsgaard, Björn Lundgren, Mikael Hasselgren, y Linda Hägerhed-Engman. 2004. “The Association between Asthma and Allergic Symptoms in Children and Phthalates in House Dust: A Nested Case-Control Study”. *Environmental Health Perspectives* 112 (14): 1393–97. <https://doi.org/10.1289/ehp.7187>.



- Bradley, Emma L, Richard A Burden, Karim Bentayeb, Malcolm Driffield, Nick Harmer, David N Mortimer, Dennis R Speck, Jana Ticha, y Laurence Castle. 2013. "Exposure to Phthalic Acid, Phthalate Diesters and Phthalate Monoesters from Foodstuffs: UK Total Diet Study Results". *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 30 (4): 735–42. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.781684>.
- Brashier, Bill, y Sundeep Salvi. 2015. "Measuring Lung Function Using Sound Waves: Role of the Forced Oscillation Technique and Impulse Oscillometry System". *Breathe* 11 (1): 57–65. <https://doi.org/10.1183/20734735.020514>.
- Braun, J. M., A. E. Kalkbrenner, A. M. Calafat, K. Yolton, X. Ye, K. N. Dietrich, y B. P. Lanphear. 2011. "Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children". *PEDIATRICS* 128 (5): 873–82. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1335>.
- Bruin J. 2006. "Newtest: command to compute new test." UCLA: Statistical Consulting Group. <https://stats.idre.ucla.edu/stata/ado/analysis/>.
- Burri, Peter H. 2006. "Structural Aspects of Postnatal Lung Development - Alveolar Formation and Growth". *Biology of the Neonate* 89 (4): 313–22. <https://doi.org/10.1159/000092868>.
- Bustamante-Montes, L. P., M. A. Hernández-Valero, D. Flores-Pimentel, M. García-Fábila, A. Amaya-Chávez, D. B. Barr, y V. H. Borja-Aburto. 2013. "Prenatal Exposure to Phthalates Is Associated with Decreased Anogenital Distance and Penile Size in Male Newborns". *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 4 (04): 300–306. <https://doi.org/10.1017/S2040174413000172>.
- Calafat, Antonia M., Jennifer Weuve, Xiaoyun Ye, Lily T. Jia, Howard Hu, Steven Ringer, Ken Huttner, y Russ Hauser. 2008. "Exposure to Bisphenol A and other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants". *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800265>.
- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Antonieta Mora-Tiscareño, Lynn A Fordham, Charles J Chung, Gildardo Valencia-Salazar, Silvia Flores-Gómez, Anna C Solt, et al. 2006. "Lung Radiology and Pulmonary Function of Children Chronically Exposed to Air Pollution". *Environmental Health Perspectives* 114 (9): 1432–37.
- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Antonieta Mora-Tiscareño, Lynn A Fordham, Gildardo Valencia-Salazar, Charles J Chung, Antonio Rodríguez-Alcaraz, Rogelio Paredes, et al. 2003. "Respiratory Damage in Children Exposed to Urban Pollution". *Pediatric Pulmonology* 36 (2): 148–61. <https://doi.org/10.1002/ppul.10338>.



- "Censo de Población y Vivienda 2010". s/f. http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010/princi_result/mor/17_principales_resultados_cpv2010.pdf.
- Center For The Evaluation of Risks To Human Reproduction. 2008. "NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A". National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/bisphenol/bisphenol.pdf>.
- Choi, Hyunok, Norbert Schmidbauer, Jan Sundell, Mikael Hasselgren, John Spengler, y Carl-Gustaf Bornehag. 2010. "Common Household Chemicals and the Allergy Risks in Pre-School Age Children". Editado por Dominik Hartl. *PLoS ONE* 5 (10): e13423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013423>.
- Clark K, Cousins IT, y Mackay D. 2003. *Assessment of critical exposure pathways. The Handbook of Environmental Chemistry*. In Staples CA. Vol. 3. Part Q: Phthalate Esters. New York, Springer.
- Delacourt, C, H Lorino, M Herve-Guillot, P Reinert, A Harf, y B Housset. 2000. "Use of the Forced Oscillation Technique to Assess Airway Obstruction and Reversibility in Children". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (3 Pt 1): 730–36. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.3.9904081>.
- Denburg, Judah A, Holly M Hatfield, Michael M Cyr, Lisa Hayes, Patrick G Holt, Roma Sehmi, Janet A Dunstan, y Susan L Prescott. 2005. "Fish Oil Supplementation in Pregnancy Modifies Neonatal Progenitors at Birth in Infants at Risk of Atopy". *Pediatric Research* 57 (2): 276–81. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000148279.72611.1D>.
- Dezateux, C, y J Stocks. 1997. "Lung Development and Early Origins of Childhood Respiratory Illness". *British Medical Bulletin* 53 (1): 40–57.
- DiGangi J, Schettler T, Cobbing M, y Rossi M. 2002. "Aggregate Exposures to Phthalates in Humans". *Health Care Without Harm*.
- Ducharme, F M, y G M Davis. 1997. "Measurement of Respiratory Resistance in the Emergency Department: Feasibility in Young Children with Acute Asthma". *Chest* 111 (6): 1519–25.
- Engel, Stephanie M., Amir Miodovnik, Richard L. Canfield, Chenbo Zhu, Manori J. Silva, Antonia M. Calafat, y Mary S. Wolff. 2010. "Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning". *Environmental Health Perspectives* 118 (4): 565–71. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901470>.
- Fenichel, Patrick, Nicolas Chevalier, y Françoise Brucker-Davis. 2013. "Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor". *Annales d'Endocrinologie* 74 (3): 211–20. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.04.002>.



- Ferguson, Kelly K., Thomas F. McElrath, y John D. Meeker. 2014. "Environmental Phthalate Exposure and Preterm Birth". *JAMA Pediatrics* 168 (1): 61. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.3699>.
- Genuis, Stephen J., Sanjay Beesoon, Rebecca A. Lobo, y Detlef Birkholz. 2012. "Human Elimination of Phthalate Compounds: Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study". *The Scientific World Journal* 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/615068>.
- Gochicoa-Rangel, L., L. Torre-Bouscoulet, D. Martinez-Briseno, L. Rodriguez-Moreno, G. Cantu-Gonzalez, y M. H. Vargas. 2015. "Values of Impulse Oscillometry in Healthy Mexican Children and Adolescents". *Respiratory Care* 60 (1): 119–27. <https://doi.org/10.4187/respcare.03374>.
- Godfrey, K, S Robinson, D J Barker, C Osmond, y V Cox. 1996. "Maternal Nutrition in Early and Late Pregnancy in Relation to Placental and Fetal Growth". *BMJ (Clinical Research Ed.)* 312 (7028): 410–14.
- Gore, A. C., V. A. Chappell, S. E. Fenton, J. A. Flaws, A. Nadal, G. S. Prins, J. Toppari, y R. T. Zoeller. 2015. "EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals". *Endocrine Reviews* 36 (6): E1–150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Gottrand, Frédéric. 2008. "Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Influence the Immune System of Infants". *The Journal of Nutrition* 138 (9): 1807S-1812S. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1807S>.
- Harley, Kim G., Raul Aguilar Schall, Jonathan Chevrier, Kristin Tyler, Helen Aguirre, Asa Bradman, Nina T. Holland, Robert H. Lustig, Antonia M. Calafat, y Brenda Eskenazi. 2013. "Prenatal and Postnatal Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Childhood in the CHAMACOS Cohort". *Environmental Health Perspectives*, febrero. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205548>.
- Heinrich, J, U Gehring, J Cyrus, M Brauer, G Hoek, P Fischer, T Bellander, y B Brunekreef. 2005. "Exposure to Traffic Related Air Pollutants: Self Reported Traffic Intensity versus GIS Modelled Exposure". *Occupational and Environmental Medicine* 62 (8): 517–23. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.016766>.
- Hernández Ávila Mauricio. 2007. *EPIDEMIOLOGIA: DISEÑO Y ANALISIS DE ESTUDIOS*. México: Médica PANAMERICANA.
- Heudorf, Ursel, Volker Mersch-Sundermann, y Jürgen Angerer. 2007. "Phthalates: Toxicology and exposure". *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210 (5): 623–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>.
- Hislop, Alison A. 2002. "Airway and Blood Vessel Interaction during Lung Development". *Journal of Anatomy* 201 (4): 325–34.



- Hoo, A F, M Henschen, C Dezateux, K Costeloe, y J Stocks. 1998. "Respiratory Function among Preterm Infants Whose Mothers Smoked during Pregnancy". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158 (3): 700–705.
- Hoppin, Jane A, Renee Jaramillo, Stephanie J London, Randi J Bertelsen, Päivi M Salo, Dale P Sandler, y Darryl C Zeldin. 2013. "Phthalate Exposure and Allergy in the U.S. Population: Results from NHANES 2005-2006". *Environmental Health Perspectives* 121 (10): 1129–34. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206211>.
- Host, S, E Chatignoux, C Leal, y I Grémy. 2012. "[Health risk assessment of traffic-related air pollution near busy roads]". *Revue d'épidémiologie et de santé publique* 60 (4): 321–30. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2012.02.007>.
- Hugo, Eric R., Terry D. Brandebourg, Jessica G. Woo, Jean Loftus, J. Wesley Alexander, y Nira Ben-Jonathan. 2008. "Bisphenol A at Environmentally Relevant Doses Inhibits Adiponectin Release from Human Adipose Tissue Explants and Adipocytes". *Environmental Health Perspectives* 116 (12): 1642–47. <https://doi.org/10.1289/ehp.11537>.
- Iñiguez F., Sánchez I. 2008. "Desarrollo pulmonar". 2 3: 148–55.
- Jaakkola, J. J. K. 2006. "Interior Surface Materials and Asthma in Adults: A Population-based Incident Case-Control Study". *American Journal of Epidemiology* 164 (8): 742–49. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj249>.
- Jaakkola, Jouni J.K., y Trudy L. Knight. 2008. "The Role of Exposure to Phthalates from Polyvinyl Chloride Products in the Development of Asthma and Allergies: A Systematic Review and Meta-analysis". *Environmental Health Perspectives* 116 (7): 845–53. <https://doi.org/10.1289/ehp.10846>.
- Just, Allan C., Robin M. Whyatt, Rachel L. Miller, Andrew G. Rundle, Qixuan Chen, Antonia M. Calafat, Adnan Divjan, et al. 2012. "Children's Urinary Phthalate Metabolites and Fractional Exhaled Nitric Oxide in an Urban Cohort". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (9): 830–37. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0398OC>.
- Kajekar, Radhika. 2007. "Environmental Factors and Developmental Outcomes in the Lung". *Pharmacology & Therapeutics* 114 (2): 129–45. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.011>.
- Kanazawa, A., I. Saito, A. Araki, M. Takeda, M. Ma, Y. Saijo, y R. Kishi. 2010. "Association between indoor exposure to semi-volatile organic compounds and building-related symptoms among the occupants of residential dwellings". *Indoor Air* 20 (1): 72–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2009.00629.x>.



- Kawano, Hideo, Hisako Kayama, Takekuni Nakama, Takashi Hashimoto, Eiji Umamoto, y Kiyoshi Takeda. 2016. "IL-10-Producing Lung Interstitial Macrophages Prevent Neutrophilic Asthma". *International Immunology* 28 (10): 489–501. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw012>.
- Kimber, Ian, y Rebecca J. Dearman. 2010. "An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses". *Toxicology* 271 (3): 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.020>.
- Kobrosly, Roni W., Sarah Evans, Amir Miodovnik, Emily S. Barrett, Sally W. Thurston, Antonia M. Calafat, y Shanna H. Swan. 2014. "Prenatal Phthalate Exposures and Neurobehavioral Development Scores in Boys and Girls at 6-10 Years of Age". *Environmental Health Perspectives*, febrero. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307063>.
- Komarow, Hirsh D, Jeff Skinner, Michael Young, Donna Gaskins, Celeste Nelson, Peter J Gergen, y Dean D Metcalfe. 2012. "A Study of the Use of Impulse Oscillometry in the Evaluation of Children with Asthma: Analysis of Lung Parameters, Order Effect, and Utility Compared with Spirometry". *Pediatric Pulmonology* 47 (1): 18–26. <https://doi.org/10.1002/ppul.21507>.
- Kotecha, S. 2000a. "Lung growth: implications for the newborn infant". *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 82 (1): F69–74. <https://doi.org/10.1136/fn.82.1.F69>.
- Kotecha, S. 2000b. "Lung Growth for Beginners". *Paediatric Respiratory Reviews* 1 (4): 308–13. <https://doi.org/10.1053/prrv.2000.0069>.
- Langley, S C, M Seakins, R F Grimble, y A A Jackson. 1994. "The Acute Phase Response of Adult Rats Is Altered by in Utero Exposure to Maternal Low Protein Diets". *The Journal of Nutrition* 124 (9): 1588–96.
- Langley-Evans, S C, G J Phillips, y A A Jackson. 1997. "Fetal Exposure to Low Protein Maternal Diet Alters the Susceptibility of Young Adult Rats to Sulfur Dioxide-Induced Lung Injury". *The Journal of Nutrition* 127 (2): 202–9.
- Larsson, Kristin, Karin Ljung Björklund, Brita Palm, Maria Wennberg, Lennart Kaj, Christian H. Lindh, Bo A.G. Jönsson, y Marika Berglund. 2014. "Exposure Determinants of Phthalates, Parabens, Bisphenol A and Triclosan in Swedish Mothers and Their Children". *Environment International* 73 (diciembre): 323–33. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.08.014>.
- Latini, Giuseppe, Antonio Del Vecchio, Marika Massaro, Alberto Verrotti, y Claudio DE Felice. 2006. "In Utero Exposure to Phthalates and Fetal Development". *Current Medicinal Chemistry* 13 (21): 2527–34.



- Lewis, Ryan C., John D. Meeker, Karen E. Peterson, Joyce M. Lee, Gerry G. Pace, Alejandra Cantoral, y Martha María Téllez-Rojo. 2013. "Predictors of urinary bisphenol A and phthalate metabolite concentrations in Mexican children". *Chemosphere*, septiembre. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.038>.
- Loganathan, Sudan N., y Kurunthachalam Kannan. 2011. "Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61 (1): 68–73. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9634-y>.
- López-Carrillo, Lizbeth, Raúl U. Hernández-Ramírez, Antonia M. Calafat, Luisa Torres-Sánchez, Marcia Galván-Portillo, Larry L. Needham, Rubén Ruiz-Ramos, y Mariano E. Cebrián. 2009. "Exposure to Phthalates and Breast Cancer Risk in Northern Mexico". *Environmental Health Perspectives* 118 (4): 539–44. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901091>.
- Lumb AB. 2005. *Pregnancy, neonates and children*. In: Lumb AB. Ed. Nunn's Applied Respiratory Physiology. New York: Elsevier Limited.
- Mallol, J, D Solé, I Asher, T Clayton, R Stein, y M Soto-Quiroz. 2000. "Prevalence of Asthma Symptoms in Latin America: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)". *Pediatric Pulmonology* 30 (6): 439–44.
- Mascarenhas, Joana, Ana Azevedo, y Paulo Bettencourt. 2010. "Coexisting Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Heart Failure: Implications for Treatment, Course and Mortality". *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 16 (2): 106–11. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328335dc90>.
- Meeker, John D., Howard Hu, David E. Cantonwine, Hector Lamadrid-Figueroa, Antonia M. Calafat, Adrienne S. Ettinger, Mauricio Hernandez-Avila, Rita Loch-Caruso, y Martha María Téllez-Rojo. 2009. "Urinary Phthalate Metabolites in Relation to Preterm Birth in Mexico City". *Environmental Health Perspectives* 117 (10): 1587–92. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800522>.
- Meltzer, Eli O, Javier Szwarcberg, y Michael W Pill. 2004. "Allergic Rhinitis, Asthma, and Rhinosinusitis: Diseases of the Integrated Airway". *Journal of Managed Care Pharmacy: JMCP* 10 (4): 310–17.
- Miguel Díez, Javier de, Jorge Chancafe Morgan, y Rodrigo Jiménez García. 2013. "The Association between COPD and Heart Failure Risk: A Review". *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 8: 305–12. <https://doi.org/10.2147/COPD.S31236>.
- Miller, Mark D, y Melanie A Marty. 2010. "Impact of Environmental Chemicals on Lung Development". *Environmental Health Perspectives* 118 (8): 1155–64. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901856>.



- Mitro, Susanna D., Tyiesha Johnson, y Ami R. Zota. 2015. "Cumulative Chemical Exposures During Pregnancy and Early Development". *Current Environmental Health Reports* 2 (4): 367–78. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0064-x>.
- Newacheck, P W, y J J Stoddard. 1994. "Prevalence and Impact of Multiple Childhood Chronic Illnesses". *The Journal of Pediatrics* 124 (1): 40–48.
- Nicolás Cobos, Silvia Gartner, y Conrad Reverté. s/f. "Desarrollo del aparato respiratorio. Fisiología Aplicada. En: La Exploración Funcional Respiratoria en Niños". Pino JM, Garcia Río F(Eds), Sanitaria 2000. http://www.sanitaria2000.com/pdfs/exploracion_respiratoria.pdf.
- Oostveen, E, D MacLeod, H Lorino, R Farré, Z Hantos, K Desager, F Marchal, y ERS Task Force on Respiratory Impedance Measurements. 2003. "The Forced Oscillation Technique in Clinical Practice: Methodology, Recommendations and Future Developments". *The European Respiratory Journal* 22 (6): 1026–41.
- Parlett, Lauren E, Antonia M. Calafat, y Shanna H Swan. 2012. "Women's exposure to phthalates in relation to use of personal care products". *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 23 (2): 197–206. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.105>.
- Philippat, Claire, Dorothy Nakiwala, Antonia M. Calafat, Jérémie Botton, Maria De Agostini, Barbara Heude, y Rémy Slama. 2017. "Prenatal Exposure to Nonpersistent Endocrine Disruptors and Behavior in Boys at 3 and 5 Years". *Environmental Health Perspectives* 125 (9). <https://doi.org/10.1289/EHP1314>.
- Pino, J. M, F García Río, y E González Pérez-Yarza. 2008. *La exploración funcional respiratoria en niños*. [Madrid: Sanitaria 2000.
- Ramakrishnan, Usha, Aryeh D Stein, Socorro Parra-Cabrera, Meng Wang, Beth Imhoff-Kunsch, Sergio Juárez-Márquez, Juan Rivera, y Reynaldo Martorell. 2010. "Effects of Docosahexaenoic Acid Supplementation during Pregnancy on Gestational Age and Size at Birth: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Mexico". *Food and Nutrition Bulletin* 31 (2 Suppl): S108-116.
- Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de, y los Alimentos (INFO-SAN). 2009. "BISFENOL A (BPA) – Estado actual de los conocimientos y medidas futuras de la OMS y la FAO". WHO,INFOSAN,FAO. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_sp.pdf.
- Robins J, Marsit C, Padbury J, y Sharma S. 2011. "ENDOCRINE DISRUPTORS, ENVIRONMENTAL OXYGEN, EPIGENETICS AND PREGNANCY" 3 (marzo): 690–700.



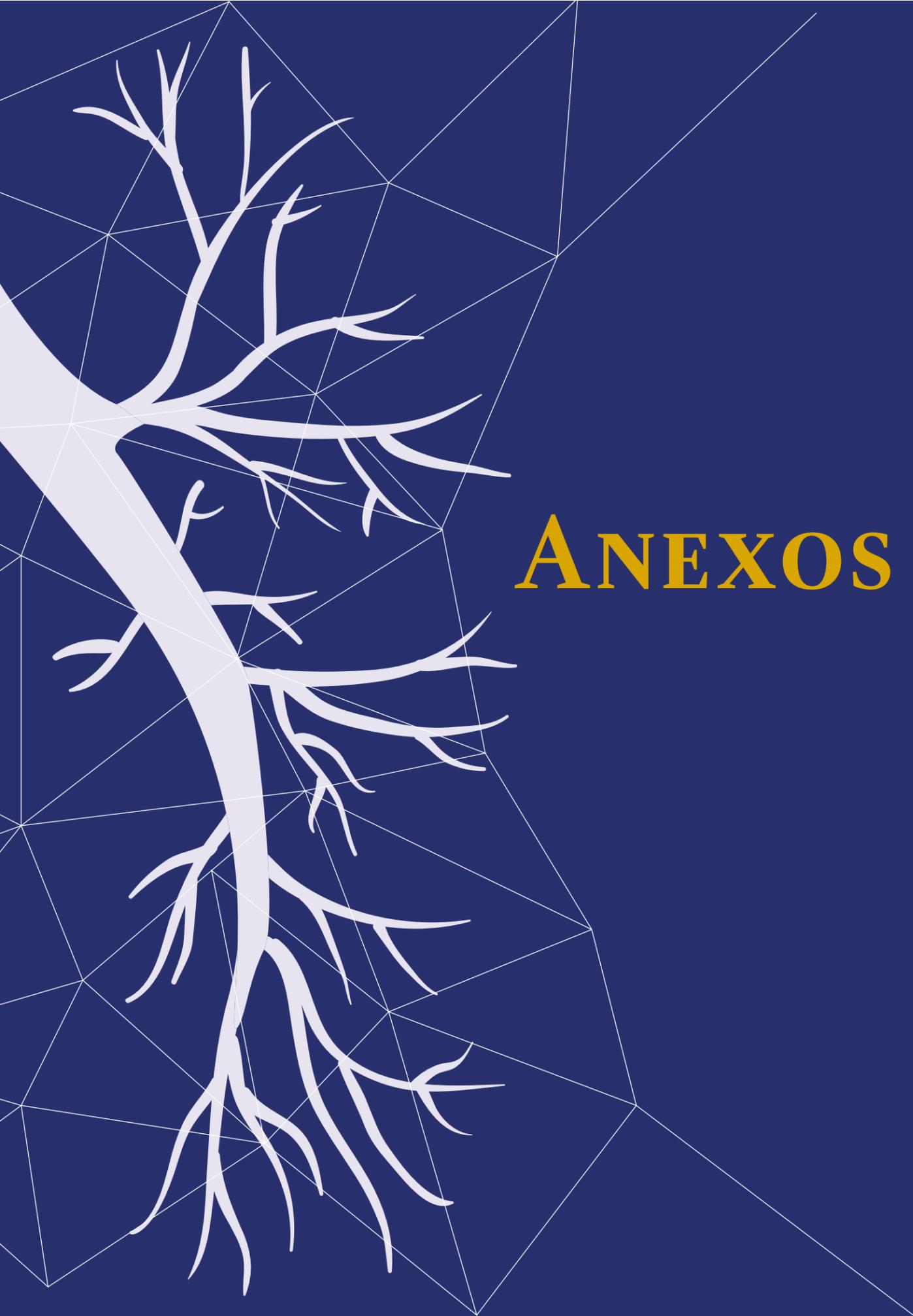
- Robinson, Lacey, y Rachel Miller. 2015. "The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: A Review of Latest Findings". *Current Environmental Health Reports* 2 (4): 379–87. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0066-8>.
- Romano Mozo, Dolores. 2012. "Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos". https://saludsindanio.org/sites/default/files/documents-files/2177/disruptores_endocrinos_final.pdf.
- Rubio-Padilla, Marta, Blanca Estela del Río-Navarro, Nora Hilda Segura, y Juan José Luis Sienra-Monge. 2009. "[Difficult-to-control asthma. A bibliographical review]". *Revista alergía Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993)* 56 (4): 115–23.
- Rudel, Ruthann A., y Laura J. Perovich. 2009. "Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air". *Atmospheric Environment* 43 (1): 170–81. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.025>.
- Sánchez I. 2001. "Desarrollo del aparato respiratorio y diferencias anatómicas y funcionales entre el lactante y el adulto" 17: 251–54.
- Santos Nobre, Juvêncio, y Julio da Motta Singer. 2007. "Residual Analysis for Linear Mixed Models". *Biometrical Journal* 49 (6): 875–875. <https://doi.org/10.1002/bimj.200790008>.
- "Secretaría de Desarrollo Económico Morelos (SEDECO) con datos de INEGI, 2011". s/f. <http://www.negociosenmorelos.gob.mx/morelos/listaGastoIndustrial.aspx>.
- Shackleton, Claire, Albino Barraza-Villarreal, Linping Chen, Catherine L. Gangell, Isabelle Romieu, y Peter D. Sly. 2013. "Rangos de referencia en niños preescolares mexicanos con el empleo de la técnica de oscilación forzada". *Archivos de Bronconeumología* 49 (8): 326–29. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.01.014>.
- Sklo Moyses, y Nieto Javier. 2018. *Epidemiology. Beyond the Basics*. Fourth edition.
- Sly, Peter D., Claire Shackleton, Dorottya Czovek, y Zoltan Hantos. 2018. "Systematic Error in Respiratory Impedance Using Commercial Equipment Calibrated According to the Manufacturer's Instructions". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197 (4): 532–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.201704-0713LE>.
- SSM/EPI/SUIVE/2010/ SUIVE-1-2011-Proceso-Departamento de Epidemiología-Coord. de Vigilancia Epidemiológica. 2008. "Síntesis Estadística de los Servicios de Salud de Morelos (SSM)". Servicios de Salud de Morelos.



- Sugiura-Ogasawara, Mayumi, Yasuhiko Ozaki, Shin-ichi Sonta, Tsunehisa Makino, y Kaoru Suzumori. 2005. "Exposure to Bisphenol A Is Associated with Recurrent Miscarriage". *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (8): 2325–29. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh888>.
- Swan, Shanna H., Katharina M. Main, Fan Liu, Sara L. Stewart, Robin L. Kruse, Antonia M. Calafat, Catherine S. Mao, et al. 2005. "Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure". *Environmental Health Perspectives* 113 (8): 1056–61. <https://doi.org/10.1289/ehp.8100>.
- Tillett, Tanya. 2013. "Phthalates and Childhood Asthma: Revealing an Association through Urinary Biomarkers". *Environmental Health Perspectives* 121 (2): a59–a59. <https://doi.org/10.1289/ehp.121-a59>.
- Trasande, Leonardo, Sheela Sathyanarayana, Mary Jo Messito, Rachel S Gross, Teresa M Attina, y Alan L Mendelsohn. 2013. "Phthalates and the Diets of US Children and Adolescents". *Environmental Research*, septiembre. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.07.007>.
- "Urinary Biomarkers for Phthalates Associated with Asthma in Norwegian Children". 2012. *Environmental Health Perspectives* 121 (2): 251–56. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205256>.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2013. "Endocrine Disruptor Screening Program; Final Policies and Procedures for Screening Safe Drinking Water Act Chemicals". EPA. <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPPT-2007-1080-0058>.
- Wang, Lei, y Kent E Pinkerton. 2008. "Detrimental Effects of Tobacco Smoke Exposure during Development on Postnatal Lung Function and Asthma". *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 84 (1): 54–60. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20114>.
- Warner, J A. 1999. "Primary Sensitization in Infants". *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 83 (5): 426–30. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62846-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62846-3).
- Warner, J A, C A Jones, T J Williams, y J O Warner. 1998. "Maternal Programming in Asthma and Allergy". *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 28 Suppl 5 (noviembre): 35–38; discussion 50-51.
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group. 2006. *WHO Child Growth Standards: Methods and development*. Geneva: World Health Organization.



- WHO (World Health Organization)/UNEP (United Nations Environment Programme). 2013. "The State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012". Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. Geneva:UNEP/WHO. <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html>.
- Whyatt, R. M., J. J. Adibi, A. M. Calafat, D. E. Camann, V. Rauh, H. K. Bhat, F. P. Perera, et al. 2009. "Prenatal Di(2-Ethylhexyl)Phthalate Exposure and Length of Gestation Among an Inner-City Cohort". *PEDIATRICS* 124 (6): e1213–20. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0325>.
- Wilson, Nancy K, Jane C Chuang, Marsha K Morgan, Robert A Lordo, y Linda S Sheldon. 2007. "An Observational Study of the Potential Exposures of Preschool Children to Pentachlorophenol, Bisphenol-A, and Nonylphenol at Home and Daycare". *Environmental Research* 103 (1): 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.04.006>.



ANEXOS

Productos derivados de la investigación

De los tres artículos establecidos como productos finales del proyecto, 1) “Índices de exposición para ftalatos y bisfenol A y su uso potencial en estudios epidemiológicos”, 2) “Evaluación de las curvas de crecimiento pulmonar” y 3) “Efecto de la exposición prenatal a disruptores endocrinos sobre la función pulmonar en niños residentes de Morelos, México”, solo el primero se pudo concretar.

1. **Artículo:** Exposure indices for phthalates and bisphenol A and their potential use in epidemiological studies.

Escamilla-Núñez MC, Barraza-Villarreal A, Hernández-Cadena L, Barbosa Sanchez AL, Romieu I, Barr DB, Gonsebatt ME, Pérez Padilla R, Aguilar-Salinas CA, Borja-Aburto VH. MOJ Toxicology Volume 4 Issue 3 – 2018.

2. **Artículo:** Efecto de la exposición prenatal a disruptores endocrinos sobre la función pulmonar en niños residentes de Morelos, México. (Artículo no publicable)
3. Concordancia entre los valores de referencia del INER y los del presente estudio.
4. Estimaciones, predicciones y simulación de modelos.
5. **Artículo:** Modelos de crecimiento, propuestas para corregir un sesgo en la medición (Borrador)





CURRÍCULUM VITAE DEL AUTOR DE LA TESIS

ESCAMILLA NÚÑEZ MARÍA CONSUELO, actuaria de la Facultad de Ciencias-UNAM, con especialización en estadística aplicada IM-MAS-UNAM. Maestría en ciencias con área de concentración en bioestadística de la Escuela de Salud Pública de México.

Investigadora en Ciencias Médicas D por el Instituto Nacional de Salud Pública y adscripción al Centro de Salud Poblacional de la Dirección de Salud Ambiental. Investigadora Nivel I por el Sistema Nacional de Investigadores.

El Área de interés: contaminación ambiental y enfermedades respiratorias en niños, contaminación ambiental y enfermedades crónicas degenerativas, son estos los temas relacionados con los artículos y proyectos de investigación donde tengo participación como autor principal o coautor.

Participación activa en docencia en los programas de posgrado del Instituto Nacional de Salud Pública de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas y Odontológicas y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Departamento de Biomedicina Molecular.

ANEXO 1



Research Article



Exposure indices for phthalates and bisphenol A and their potential use in epidemiological studies

Abstract

Exposure to endocrine disruptors such as phthalates and bisphenol A (BPA) are currently an important public health problem. Exposure to these chemicals can result in changes in an organism's metabolic pathways and cause health problems in the exposed population. The aim of the present study was to generate indices of exposure to endocrine disruptors based on concentrations obtained in maternal urine samples collected during pregnancy. 290 urine samples were collected and analyzed of BPA concentrations and nine phthalate (mono (3-carboxypropyl) phthalate, monoethyl phthalate; mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate, mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, mono-*n*-butyl phthalate, mono-isobutyl phthalate, mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate, monobenzyl phthalate, and mono (2-ethylhexyl) phthalate) metabolites were performed. Factor analysis was used to construct the exposure indices. Two indices were identified, and each one contained a group of chemicals who share mechanisms of action and sources of exposure. The first group is made up of the metabolites; mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate, mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate, which are commonly used to soften plastics and are frequently found in food. The second index contained the following compounds; mono-*n*-butyl phthalate, monobenzyl phthalate, mono-isobutyl phthalate, mono(3-carboxypropyl) phthalate, BPA and monoethyl phthalate, which are mainly found in solvents, additives, adhesives and cosmetic products. Our results showed strong correlations among chemical substances belonging to the same group, and those from the same source and they share toxicological characteristics. The exposure indices generated could be used to evaluate the effect of exposure to multiple endocrine disruptors in epidemiological studies.

Keywords: phthalate, bisphenol A, endocrine disruptor, pregnancy

Volume 4 Issue 3 - 2018

Escamilla-Núñez MC,¹ Barraza-Villarreal A,¹ Hernández-Cadena L,¹ Barbosa Sanchez AL,¹ Romieu I,¹ Barr DB,² Gonsebatt ME,³ Pérez-Padilla R,⁴ Aguilar-Salinas CA,⁵ Borja-Aburto VH⁶

¹Instituto Nacional de Salud Pública, México
²Department of Environmental Health, Emory University, USA
³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México
⁴Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México
⁵Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México
⁶Instituto Mexicano del Seguro Social, México

Correspondence: Albino Barraza Villarreal, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad # 655, Col. Santa María Ahuacatlán, C. P. 62100 Cuernavaca, Morelos, México, Tel 5277 7101 2981, Email abarraza@correo.insp.mx

Received: May 02, 2018 | Published: May 10, 2018

Abbreviations: BPA, bisphenol A; DEHP, di(2-ethylhexyl) phthalate; DnOP, di(*n*-octyl) phthalate; DEP, diethyl phthalate; HMW, high molecular weight; LOD, limited of detection; LMW, low molecular weight; MWs, molecular weights; MEHP, mono(2-ethylhexyl) phthalate; MECPP, mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate; MEHHP, mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate; MEOHP, mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate; MCPP, mono(3-carboxypropyl) phthalate; MnBP, mono-*n*-butyl phthalate; MiBP, mono-isobutyl phthalate; MBzP, monobenzyl phthalate; MEP, monoethyl phthalate; EDCs, the endocrine disrupting chemicals

Introduction

The Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), are chemicals that are structural analogs of endogenous hormones and can alter metabolic pathways.¹⁻³ The main compounds classified as EDCs are polychlorinated biphenyls, dioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates, bisphenol A (BPA), pesticides, alkylphenols, and some heavy metals.¹ Currently, in several countries, there are no established standards for control of these chemicals including Mexico.⁵ However, there is currently some regulation of use of phthalates in the USA, especially in child care products (Consumer product safety commission from U.S.A). Various studies have documented that gestational exposure to phthalates alters the regulation of embryo development, which negatively effects on reproductive health and neurodevelopment of individuals and their progeny.^{1,4-12} Exposure

to BPA has been associated with miscarriage,¹³ development of gestational diabetes, reduced glucose tolerance, and an increase in plasma insulin, triglycerides, leptin concentrations, and obesity.¹⁴

Phthalates and BPA have been detected in the environment because of their use in the manufacture of plastics, where they are included as additives to provide flexibility, hardness, transparency, or durability to the plastic.^{15,16} These chemicals are also present in many common personal care products, cleaning products, construction materials, home furniture, electronics, food packaging, pharmaceutical products, and insecticides. Consequently, humans are frequently exposed to multiple EDCs.^{17,18} Phthalates are present in the environment as phthalate acid esters, which are lipophilic. On entering the human body, esterase's and lipases present in the intestine and parenchyma rapidly metabolize phthalates to their esters.^{19,20} Some of the primary metabolites in turn undergo hydroxylation, oxidation, and conjugation reactions, before being excreted.²¹

Phthalates have biological half-lives on the order of hours.²² The main phthalates and its metabolites that have been identified in human urine¹⁵ include di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di(*n*-octyl) phthalate (DnOP), dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, benzyl butyl phthalate, and diethyl phthalate (DEP).²³ Each of these are metabolized to primary or secondary esters. Approximately 75% of DEHP is excreted in the urine within the first 48 h of exposure as mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and other chemicals from oxidative metabolism, including mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)

phthalate (MECPP), mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP), and mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP).^{12,24} DnOP is metabolized to mono(3-carboxypropyl) phthalate (MCP). Dibutyl phthalate and diisobutyl phthalate are metabolized to mono-*n*-butyl phthalate (MnBP) and mono-isobutyl phthalate (MiBP), respectively.²⁵⁻²⁷ Benzyl butyl phthalate is transformed into monobenzyl phthalate (MBzP), and the main metabolite of DEP is monoethyl phthalate (MEP).^{19,23,28}

Lipophilic BPA, is synthesized by combination of two moles of phenol and one mole of acetone, and is moderately soluble (120–300mg/L at pH 7).^{29,30} To date, its metabolism has not been completely characterized. However, this compound has been investigated in international studies for the estrogenic effects.³⁰ Exposure to phthalates and BPA can be transplacental, inhalatory, dermal, and/or oral, with the latter being the most common.^{30,31} Although, there are a lot evidence of the health risks of exposure to these substances,³² the mechanisms and modes of action of these chemicals are not yet clear. Because humans are usually exposed to mixtures of these chemicals rather than each one in isolation³³ and through many different pathways,^{17,38} current toxicology methods focus on evaluating the effect of mixtures of contaminants on human health. Exposure indices are important for performing this type of evaluation.³⁴ Different authors have used different ways to represent exposure to these substances.³⁴⁻³⁶ used the sum of the phthalate metabolites from the same parent phthalate. Christensen et al.³⁷ used the cumulative risk index generated by the sum of the ratios between the current level of exposure and the acceptable level of phthalate exposure (reference value). Trasande & coworkers³⁸ considered the sum of the metabolites according to molecular weight for both high and low molecular weight groups. The aim of the present study was to develop exposure indices for phthalates and BPA from urine samples of pregnant women. These indices could be applied for the evaluation of the individual and combined effects of these chemicals on the health of a study population. They could also be used as risk markers in later stages of development in neonates.

Materials and methods

Women in the present study were from mother and child pairs who participated in a large randomized clinical trial (National Institute of Public Health/Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) Mexico: CI-011 in clinicaltrials.gov; NCT00646360). Participants were recruited at the General Hospital of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) in Cuernavaca, Mexico. Generally, the IMSS enrollees were of middle to low socioeconomic status.³⁹ The study protocol was approved by Emory University's Human Investigations Board (Atlanta, GA, USA), the Ethic Committee of INSP (Cuernavaca, Mexico), and the IMSS General Hospital's Human Subjects Boards. All procedures were explained to the participants, who signed an informed consent form. For the present report, we selected a sub-sample of 290 binomials from the 1094 women participants of a cohort. Eligible binomial were those who had complete information.

Determination of phthalate metabolites and BPA

The first morning urine samples were collected from the mothers during the third trimester of pregnancy. Containers prewashed and pollution free were provided to the participants and they were instructed on sample collection procedures. After sampling, 5-mL aliquots were stored frozen at -70°C until analysis. Analysis was conducted to determine the presence of nine monoester phthalate metabolites (MEHP, MECPP, MEHHP, MEOHP, MBzP, MnBP,

MiBP, MEP, and MCPP) and BPA in the laboratory of the Emory University of Atlanta, USA. Human urine samples were processed using enzymatic deconjugation of the glucuronides followed by solid-phase extraction. For phthalate determination, 1–2mL urine aliquots were processed. The assay precision was improved by incorporating a ¹³C₄-labeled internal standard for each analyte, and a conjugated internal standard to monitor deconjugation efficiency. The analytes of interest were released in their second conjugated phase and isolated by solid-phase extraction. The samples were analyzed by isotope dilution high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC/MS). The concentration of each analyte was calculated from a calibration curve prepared using a standard. The Limits of detection (LODs) for all analytes were 0.1ng/mL, except for MEHP (0.5ng/mL) and MCP (0.5ng/mL).⁴⁰

For quality control purposes, targets for the method, overburdened samples with known levels (n=10% of the samples), standards, and blind samples whose concentrations were compared with known levels were analyzed.

BPA analyses were performed using gas chromatography mass spectrometry according to an established method.⁴¹ Phthalate and BPA urinary concentrations are reported both in micrograms per liter of urine and in micrograms per gram of urinary creatinine (µg/g creatinine). Creatinine determination was realized using high-resolution liquid chromatography and the levels were used to correct for urine dilution.

Statistical analysis

All 290 samples of maternal urine were used for statistical analysis of the phthalate metabolite and BPA results. The geometric means and the 50th, 75th, and 90th percentiles of the concentrations of the phthalate metabolites and BPA were calculated. Phthalate metabolite concentrations below of the limited of detection (LOD) were assigned a value equal to the LOD divided by the square root of the assigned value,⁴² taking into account that the missing values did not exceed 5% of the sample size. Likewise, we used multiple imputation⁴³ for obtaining estimate values of MEHP. Later, these were transformed into a natural logarithm (Ln (corresponding metabolite)) because of the asymmetrical distribution of the data. The multiple imputation is an iterative process of estimation that it is repeat several times for each complete data set, we considered to the analyses the method that uses Markov Monte Carlo chain (MCMC) procedures; we assume that all the variables in the imputation model have a joint multivariate normal distribution. The imputation was evaluated from variance (within, between and total), relative increase in variance, the fraction of missing information and relative efficiency, well as the used of graphs to evaluate the residues, atypical values for each data set imputed single, as well for evaluating the convergence of model. To investigate grouping patterns in the data, we used Pearson correlation matrix and dispersion graphs. For constructing the exposure indices and considering that there is intercorrelations between factors, we used confirmatory factor analysis with the promax procedure, which uses oblique rotation,⁴⁴ we considered maximum likelihood as method to estimate the parameters of the model and the regression method to extracted factors. The model was examined and evaluated its goodness of fit.

The model of factorial analysis is given for equations:

$$Ln(MEHHP) = 0.94F_1 + 0.07F_2 + Ln(MEHP)$$

$$\text{Ln}(MECPP) = 0.95F_1 + 0.04F_2 + u_{\text{Ln}(MECPP)}$$

($u_{\text{Ln}(MECPP)}$ = 0.94, 0.07, 0.95, 0.04, 0.97, 0.04, ..., 0.006, 0.53 considering $i=1, \dots, 10$ variables and $j=1, 2$ factors)

$$\text{Ln}(MEP) = 0.006F_1 + 0.53F_2 + u_{\text{Ln}(MEP)}$$

Where $\text{Ln}(MEHHP)$, $\text{Ln}(MECPP)$, ..., $\text{Ln}(MEP)$ are variables transformed with log-natural of phthalate metabolites and BPA; F_1 and F_2 common factors; $u_{\text{Ln}(MEHHP)}$, $u_{\text{Ln}(MECPP)}$ and $u_{\text{Ln}(MEP)}$ the unique or specific factors and the set of linear the coefficients.

($u_{\text{Ln}(MEHHP)}$ = 0.94, 0.07, 0.95, 0.04, 0.97, 0.04, ..., 0.006, 0.53 considering $i=1, \dots, 10$ variables and $j=1, 2$ factors) factor loadings.

Analyses were performed using Stata 14 statistical software (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Results

Table 1 shows the sociodemographic characteristics of the study population. Mean age of women was 26.1 years (SD=4.7), more than one-half were overweight (55.2%), and only 55.4% completed secondary school. Parity, 42.8% of women had two deliveries, include current pregnancy and 17.6%, 3 or more. In addition, 34.5% of the mothers they had a low socioeconomic level. Among the nine phthalate metabolites studied, the highest average concentrations (Table 2) were for MEP at 106.8µg/g creatinine (95% confidence interval (95%CI): 88.7, 128.6), MnBP at 77.6µg/g creatinine (95%CI: 66.2, 91.0), and MECPP at 46.8µg/g creatinine (95%CI: 39.6, 55.2). By contrast, the levels of BPA (2.1µg/g creatinine; 95%CI: 1.8, 2.5) and MCPP (2.8µg/g creatinine; 95%CI: 2.4, 3.2) were low. From the correlation matrix (Figure 1), we identified strong ($r > 88\%$) and significant ($p < 0.05$) correlations among the metabolites Ln(MEHP), Ln(MECP), Ln(MEHP), and Ln(MEOHP), and weaker relationships among the metabolites Ln(MnBP), Ln(MiBP), and Ln(MBzP) ($r > 68\%$, $p < 0.05$). The high correlations among Ln(MECP), Ln(MEHP), and Ln(MEOHP) could be attributed to the fact that three of these metabolites are derived from MEHP. Table 3 shows the correlations between phthalate metabolites and BPA with the resulting factors from multivariate analysis, represented

by rotated common factors. Factor one was strongly related to the phthalate metabolites Ln(MEHP), Ln(MECP), Ln(MEOHP), and Ln(MEHP), which are derived from DEHP (Table 4), and weakly related to the remaining phthalate metabolites and BPA. Factor two was strongly related to the phthalate metabolites, Ln(MnBP), Ln(MBzP), Ln(MiBP) and Ln(MCPP) which are produced by metabolic transformation of DnOP, benzyl butyl phthalate, dibutyl phthalate, and diisobutyl phthalate, respectively. It was weakly related to Ln(BPA) and Ln(MEP), which is derived from DEP, and the rest of the phthalate metabolites. Therefore, Factor 1 is for phthalate metabolites that are derived in the later stages of metabolism of DEHP and Factor 2 is for a mixture of phthalate metabolites and BPA (Table 3) (Figure 2). Each factors obtained represents an exposure index, which we labeled as 2-ethyl and phthalate mixtures in reference to the rest of the phthalate metabolites or BPA that they contained. The correlation of the promax (3) rotated common factors was 62.6%. Finally in Table 4 shows the physical and chemical characteristics of the metabolites studied.

Table 1 Characteristics of the study participants (n = 290)

Variable	Mean	(SD)
Age, years	26.1	(4.7)
High school (12 y or more), n(%)	160	(55.4)
Socioeconomic level, n(%)		
Tertile 1	100	(34.5)
Tertile 2	104	(35.9)
Tertile 3	86	(29.6)
Anthropometric measurements		
Height, m	155.0	(5.6)
Weight, k	62.6	(11.4)
Body Mass Index (BMI), k/m2	26.0	(4.4)
Overweight (BMI>24.9), n(%)	160	(55.2)
Parity, include current pregnancy, n(%)		
1	96	(33.1)
2	124	(42.8)
3	51	(17.6)
4 or more	19	(6.6)

SD, standard deviation

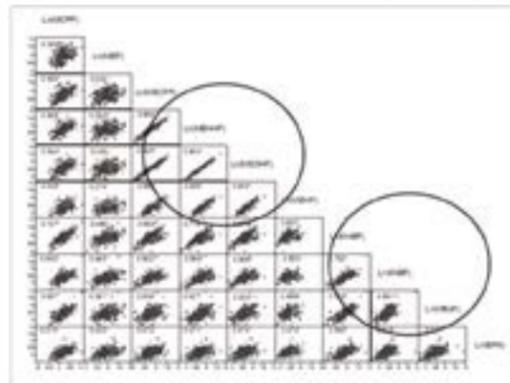


Figure 1 Correlations between phthalate metabolites and bisphenol A in urine from pregnant Mexican women (n =290) on a logarithmic scale. Values correspond to Pearson correlations.

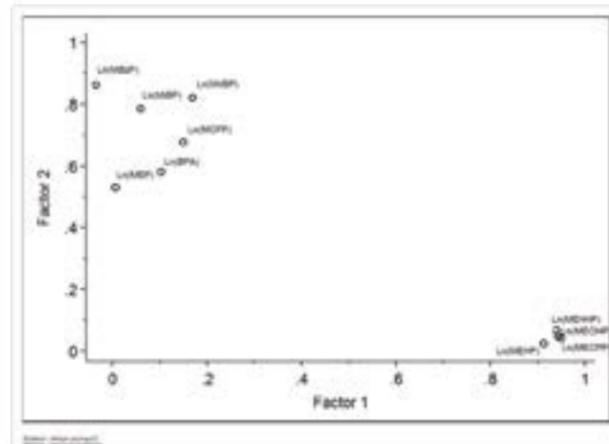


Figure 2 Map of clusters among phthalate metabolites and bisphenol A.

Table 2 Average concentrations (in µg/g creatinine) of phthalate metabolites and bisphenol A in 290 urine samples taken from pregnant women in the third trimester of pregnancy in Mexico

Phthalate parent compound Phthalate metabolites and bisphenol A	Geometric mean (95% CI)	Percentile			
		50	75	90	95
DnOP					
MCPP	2.8 (2.4, 3.2)	2.7 (2.4, 2.9)	5.7 (4.9, 6.8)	16.9 (11.6, 20.4)	25.4 (19.3, 36.8)
DEP					
MEP	106.8 (88.7, 128.5)	2 (83.7, 121.1)	304.6 (232.2, 452)	970.2 (760, 1242.1)	1526.4 (1141.6, 2590.1)
DEHP					
MEHP	4.0 (3.4, 4.7)	3.4 (2.8, 3.9)	9.5 (7, 12.6)	34.9 (19.6, 48.2)	62.9 (42.7, 85.8)
MECPP	46.8 (39.6, 55.2)	42.4 (35.2, 50.4)	126.9 (91.4, 172.2)	315.9 (238, 454.4)	612.5 (426.8, 727.5)
MEHHP	33.3 (27.7, 40.1)	30.7 (26.5, 37.2)	99.6 (71.1, 132.5)	270.9 (187.1, 417.5)	486.3 (351.3, 827.3)
MEOHP	17.6 (14.8, 20.9)	15.7 (13.6, 18.8)	46.7 (36.9, 61.7)	130.8 (88, 171.6)	227.5 (152.4, 326.5)
DnBP					
MnBP	77.6 (66.2, 91.0)	80.1 (67.5, 92.6)	184.1 (159.2, 217.8)	383.2 (344.7, 529.4)	728.9 (492.7, 1032.8)
DiBP					
MiBP	6.2 (5.2, 7.2)	6.4 (5.2, 7.1)	15.5 (11.9, 19.7)	34.5 (26.9, 43.7)	56.4 (39.3, 74.0)
BzBP					
MBzP	10.3 (8.5, 12.3)	10.1 (7.9, 12.2)	31.8 (21.7, 38.6)	71.6 (55.3, 106.3)	145.7 (95.6, 242)
BPA	2.1 (1.8, 2.5)	2.2 (1.9, 2.5)	5.0 (4, 6.5)	12.4 (9.9, 14.2)	16.5 (13.8, 21.5)

Table 3 Correlations between rotated common factors and the concentrations of phthalate metabolites and bisphenol A in urine from pregnant Mexican women (n=290)

Variable	Factor 1	Factor 2
Metabolites		
Ln(MEHP)	0.982	0.656
Ln(MECP)	0.976	0.636
Ln(MEOHP)	0.973	0.638
Ln(MEHP)	0.927	0.595
Ln(MnBP)	0.683	0.927
Ln(MBzP)	0.505	0.841
Ln(MiBP)	0.552	0.824
Ln(MCPP)	0.574	0.772
Ln(BPA)	0.466	0.645
Ln(MEP)	0.339	0.535
Mean (standard deviation)	0.000 (0.993)	0.000 (0.963)
Median (P ₂₅ , P ₇₅)	-0.072(-0.678, 0.666)	0.011(-0.672, 0.618)
Max, Min	-2.711, 3.121	-2.431, 4.196

Structure matrix: correlations between variables and promax(3) rotated common factors. Correlation matrix of the promax(3) rotated common factors was 0.626.

Table 4 Physicochemical characteristics of phthalates and their metabolites, well as of the bisphenol A

Phthalate parent compound / Bisphenol A				Primary metabolites in human urine					
Name (abbreviation)	CAS registry number	Molecular weight	Partition coefficient	Water Solubility	Name (abbreviation)	CAS registry number	Molecular weight	Name (abbreviation)	Molecular weight
Di(2-EthylHexyl) Phthalate (DEHP) $C_{24}H_{38}[COOCH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_4CH_3]_2=C_{42}H_{66}O_4$	117-81-7	390.6	7.60	0.27 mg/L at 25°C	Mono(2-Ethyl-5-CarboxyPentyl) Phthalate (MECPP)	4376-20-9	278.3	Mono(2-Ethyl-5-HydroxyHexyl) Phthalate (MEHHP)	308.3
					Mono(2-Ethyl-5-OxoHexyl) Phthalate (MEOHP)			294.3	
					Mono(2-Ethyl-5-HydroxyHexyl) Phthalate (MEHHP)			292.3	
Di(n-Octyl) Phthalate (DnOP) $C_{24}H_{38}[COO(CH_2)_7CH_3]_2=C_{42}H_{66}O_4$	117-84-0	390.6	8.10	0.022 mg/L at 25°C	Mono(3-CarboxyPropyl) Phthalate (MCPP)	SN	278.3		
Benzyl Butyl Phthalate (BtBP) $CH_3(CH_2)_3OOCCH_2COOCH_2C_6H_5=C_{22}H_{30}O_4$	85-68-7	312.36	4.73	2.69 mg/L at 25°C	Mono(Benzyl) Phthalate (MBzP)	2528-16-7	256.3		
Di(n-Butyl) Phthalates (DnBP) $C_{24}H_{38}[COO(CH_2)_3CH_3]_2=C_{42}H_{66}O_4$	84-74-2	278.3	4.9	13 mg/L at 25°C	Mono(n-Butyl) Phthalate (MnBP)	131-70-4	222.2		
Di(iso-Butyl) phthalate (DiBP) $C_{24}H_{38}[COOCH_2CH(CH_3)_2]_2=C_{42}H_{66}O_4$	84-69-5	278.3	4.11	6.2 mg/L at 24°C	Mono(isoButyl) Phthalate (MiBP)	SN	222.2		
Bisphenol A (BPA) $(C_6H_5)_2C(CH_3)_2=C_{15}H_{16}O_2$	80-05-7	228.3	3.32	300 mg/L at 25°C					
DiEthyl Phthalate (DEP) $C_{24}H_{38}(COOC_2H_5)_2=C_{22}H_{34}O_4$	84-66-2	222.2	2.47	1,080 mg/L at 25°C	Mono(Ethyl) Phthalate (MEP)	2306-33-4	194.2		

Discussion

Compared with previously reported exposure indices,^{24,34-38,45} the two developed in our study (2-ethyl and phthalate mixtures) could be more consistent because they were obtained from the relationships among the compounds, using accurate data, and show its correlation with each other, that is, they are not independent indices.⁴⁵ Therefore, it could be used as a useful exposure indicator to evaluate the effects on health and it could be used to develop tools to better evaluate exposure to EDCs at life stages when humans are particularly susceptible to their effects. Few studies have investigated prenatal phthalate exposure in Mexican populations. Meeker et al.⁴ analyzed phthalate metabolites in two groups of women residing in Mexico City (Mexico) who delivered either at-term (≥ 37 weeks of gestation) or pre-term (<37 weeks of gestation). The phthalate concentrations detected in samples from women with a pre-term delivery were greater than those in women with at-term deliveries were. Compared with the concentrations observed in the present study, the concentrations of three phthalate metabolites in the Meeker study were higher in both groups (MEOHP 18.5 and 25.3 $\mu\text{g/g}$ creatinine, MECPP 52.8 and 68.5 $\mu\text{g/g}$ creatinine, and MEP 200.0 and 274.0 $\mu\text{g/g}$ creatinine for at-

term and pre-term deliveries, respectively). In another study carried out in the State of Mexico the metabolites MEHP, MBzP, MnBP, and MEP, showed lower concentrations than those obtained in our study.⁶ In both earlier studies, the participants had some common sociodemographic characteristics, including their age (average age, 27 years), social class (middle-low), and area of residence (Valley of Mexico). The observed differences in phthalate concentrations may be suggestive of differences in sources, characteristics of participants and lifestyles, despite the demographic similarities. Likewise, the results also suggest that the mixtures of phthalates that individuals are exposed to vary and are different.

To the best of our knowledge, only Cantonwine D et al.⁴⁶ and Johns LE et al.⁴⁷ have studied prenatal exposure to BPA. Cantonwine report an average phthalate concentration of 1.95 $\mu\text{g/g}$ creatinine and a maximum value of 7.47 $\mu\text{g/g}$ creatinine. Johns et al found an average of BPA concentrations of 1.28 at median 10 wk of gestation, concentrations that are below those found by us derived from the fact that the average value found by us was of 2.1 $\mu\text{g/g}$ creatinine and the maximum value found by us was more than twice that found by Cantonwine and colleagues.

Compared with the concentrations reported in the 4th Report on Human Exposure to Chemical Substances from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) in the U.S.,⁴⁸ which looked at samples from both pregnant and non-pregnant women, the concentrations found in this study for phthalate metabolites were higher by 2.3 to 59.8 $\mu\text{g/g}$ creatinine for the geometric means. Only the concentrations of MCPP and MiBP were lower by 0.5 and 2.9 $\mu\text{g/g}$ creatinine (geometric means), respectively, in our study than in the NHANES,⁴⁸ while BPA concentrations were similar. NHANES⁴⁸ in another study, Woodruff et al. used a subsample of pregnant and non-pregnant women from the NHANES, and found high concentrations of MBzP, MiBP, MnBP, MEP, and BPA in urine. In this case, the concentrations of MEP, MBzP, and BPA in the pregnant women were higher than the concentrations detected in our study. For MnBP, the results obtained in the present work were higher than those from the NHANES and Woodruff et al. For MiBP, the highest average concentration was detected in the NHANES study (7.5 $\mu\text{g/L}$), while the concentration in our study was slightly lower (7.2 $\mu\text{g/L}$), and lower in the Woodruff study (3.5 $\mu\text{g/L}$). These differences could be caused by several factors such as differences in the populations studied, for example, whether the participants were pregnant or not, differences in exposure for U.S. and Mexican populations, and different phthalate regulation in the U.S.

Other studies around the world have evaluated exposure to these chemicals in prenatal samples, and variations in concentrations have been detected with differences in ethnic background and socioeconomic status. Higher concentrations than those found in our study have been reported in France, where the concentrations of all phthalate metabolites, except MnBP, were up to five times those found in our study.⁴⁹ In Spain, high concentrations have been detected for MEP, MEHP, MiBP, and MBzP,⁵⁰ and in Denmark, high concentrations have been detected for MiBP (35.3 $\mu\text{g/g}$ creatinine).⁵¹ In this study, because of the high correlation between phthalate metabolites and BPA, and because exposure is frequently to a mixture of chemicals, we used the results to establish exposure indices. Other studies have proposed the generation of indices using the sum of the metabolites derived from the principal metabolite,³⁴⁻³⁶ or from the accumulated risk, generated from the sum of the coefficients between the present level of exposure and the acceptable level of phthalate exposure (the reference value).³⁷ Further studies have looked at using the sum of the molecular weights (MWs) of the metabolites,³⁸ and differentiating between low molecular weight (LMW) and high molecular weight (HMW) metabolites. We compared our results with the following indices proposed by other studies: the DEHP index, which was generated as the sum of the metabolites MEHP, MECPP, MEHHP, and MEOHP, the HMW index, which was generated as the sum of the metabolites MEHP, MECPP, MEHHP, MEOHP, MBzP, and MCPP, the LMW phthalates index, which was generated as the sum of MEP, MnBP and MiBP; and the LMW BPA index, which was generated as the sum of MEP, MnBP, MiBP, and BPA. We observed highly significant correlations ($p < 0.05$) between the 2-ethyl index proposed in this study and the DEHP index was ($r=99.7\%$), and the HMW index ($r=95.8\%$). These correlations could be attributed to the fact that these three indices share many of the same metabolites. The only exceptions were the inclusion of MBzP and MCPP in the HMW index. These metabolites are not included in the other two indices because they differ in water solubility to the other metabolites. The second index developed in this study, phthalate mixtures, had a significant correlation of 91.3% ($p < 0.05$) with the LMW phthalates index, and a

significant correlation of 92.7% ($p < 0.05$) with the LMW BPA index. These comparisons show that our indices take into consideration more than one chemical characteristic, such as molecular weight or water solubility, reflecting the correlation between our indices and the indices proposed by other authors. On one hand, there is a high correlation between the 2-ethyl index with DEHP index and with HMW index, because the metabolites are HMW compounds derived from DEHP. The molecular weight is important to consider because it is a parameter that affects the process of metabolization.

In a study in rats at 7 days post-exposure,⁵² the amounts of derivatives of phthalate esters excreted in urine and feces decreased as the MWs increased. This may be because the LMW phthalates are rapidly metabolized to their monomers, whereas metabolism of HMW phthalates requires oxidation.⁵³⁻⁵⁵ On the other hand, the solubility of a phthalate also determines how long it is retained in an organism (Table 4), and phthalate solubility is known to decrease as the number of carbons in the molecule increases.⁵⁶⁻⁵⁸ Phthalates with more carbons are more liposoluble, which can also affect their residence time in an organism. Furthermore, the use of each type of phthalate depends on its physicochemical characteristics, including its MW, the alkyl group to which it is bound, its volatility, and its solubility. From a statistical viewpoint, these groupings are the result of correlations among the metabolites, that is, women who presented with a high concentration of a given metabolite also had a high concentration of another metabolite in the same group but not of metabolites in other groups. In this regard, the exposure indices can be explained by the sources of the phthalates and high scores for the same index should indicate similar exposure sources.

The 2-ethyl index contains metabolites originating from the metabolism of DEHP, which is mainly consumed as a contaminant in foods that are high in fat, such as milk, fish, or oil.^{26,59,60} Exposure to DEHP can be primarily attributed to the materials used to package food.⁶¹ Additional sources of exposure to DEHP include medical devices, with patients undergoing hemodialysis, neonates, and women having a Cesarean-section delivery being more vulnerable because of the direct contact that they have with these substances in medical equipment.²⁸ In our study, we analyzed samples taken during pregnancy, and analyses were also conducted for the same metabolites in samples taken at delivery in a subsample of 10 women. For these women, there was a correlation, which fluctuated between 10% and 62%, between the concentrations of the phthalate metabolites during pregnancy and at delivery. However, although some studies have shown that DEHP concentrations differ according to delivery type,^{62,63} we couldn't confirm these observations due to our small sample size at the moment of delivery. In our study, the concentrations of the primary metabolite MEHP showed a correlation of 48% when both samples (during pregnancy and at delivery) were taken into consideration, but this was probably because of our small sample size.

Phthalates in the phthalate mixtures index group are used main to provide softness and flexibility to plastics in floor coverings, carpets, paints, glues, industrial solvents, printer inks, vinyl gloves, packaging sealants, bottle top coatings, cans for food,^{64,65} and cigarette filters.⁶⁶⁻⁶⁸ These phthalates are prohibited in toys, childcare products, and cosmetics.⁶⁵ Our findings are encouraging because they provide an indication of the potential risk of the toxic effects caused by exposure to this group of EDCs that although, they are known as low risk for the environment, if they constitute a risk to the health of the exposed population derived for their toxicological characteristics. In addition

this index contain DEP, which is used in personal care products, which is also found in polluted water sources as well BPA.^{32,69}

A possible limitations of our study are; first: that of not having the measurement of other metabolites of phthalates, this is reflecting in a poor correlation of some metabolites of phthalates as is the case with MEP and BPA and others lesser extent with the second index and second, to have only one measurement of the metabolites during pregnancy, since it is assumed that the temporary variations of the exposure follow the same pattern for the whole pregnancy, however, another measurement was taken in a subsample at the time of delivery and observed good correlation between both measurements for various metabolites. In conclusion, our results showed strong correlations among chemical substances belonging to the same group, and those from the same source and they share toxicological characteristics. Therefore, the exposure indices generated in our study could be used to evaluate the effect of exposure to multiple endocrine disruptors in exposed population and for use in epidemiological studies in environmental health.

Acknowledgements

We would like to express our very great appreciation to the participants in the project.

Financial support

This study was supported by the National Council of Sciences and Technology (CONACYT) [Grant numbers 2013-01-202062]. The study protocol was approved by Emory University's Human Investigations Board (Atlanta, GA, USA), the Ethic Committee of INSP (Cuernavaca, Mexico), and the IMSS General Hospital's Human Subjects Boards.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

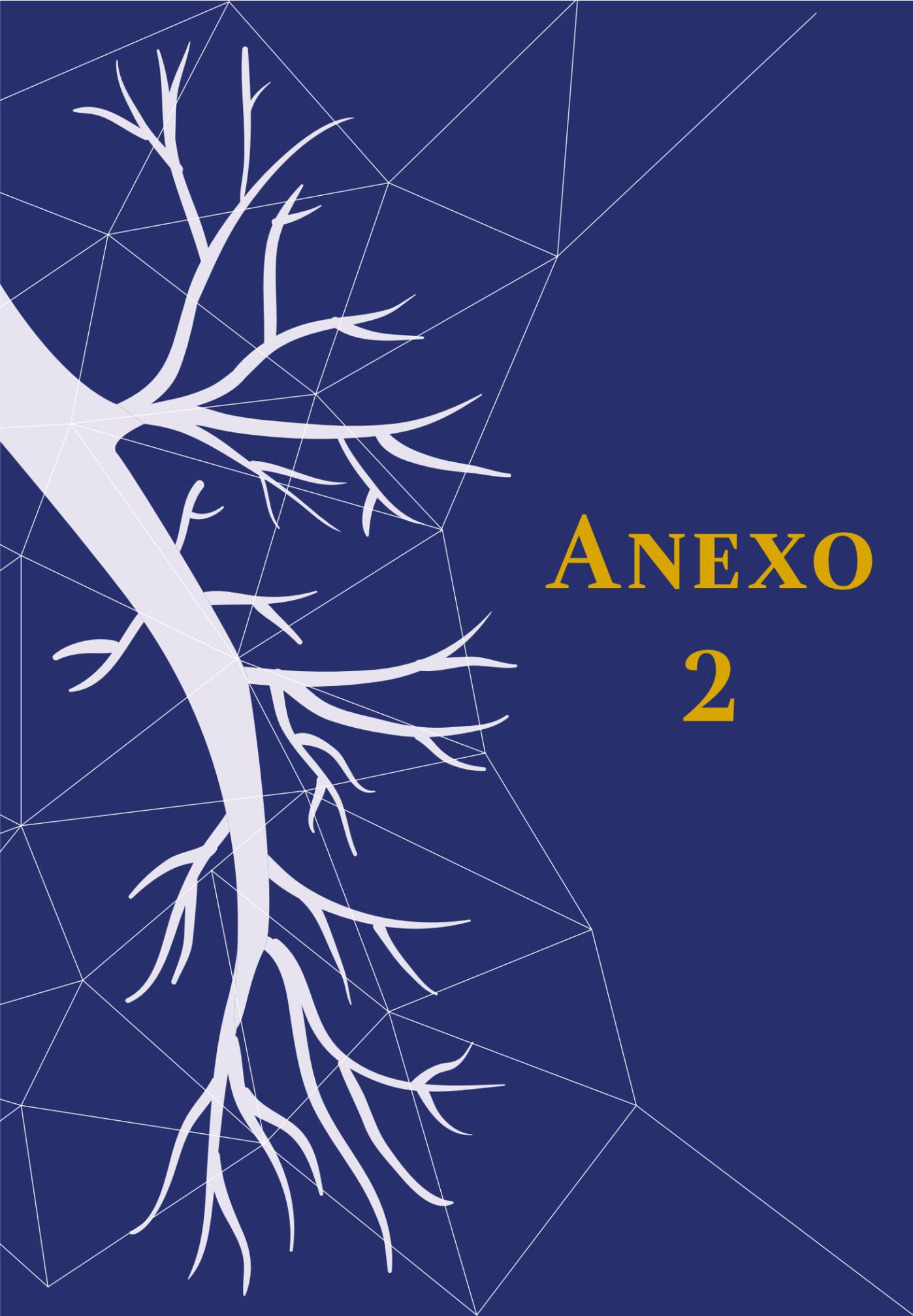
- Balabanić D, Rupnik M, Klemenčić AK. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fert Dev*. 2011;23(3):403–416.
- Dentzer S. Embarking On A New Course: Environmental Health Coverage. *Health Affairs*. 2011;30:810–810.
- Koch HM, Rossbach B, Drexler H, et al. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res*. 2003;93:177–185.
- Meeker JD, Hu H, Cantonwine DE, et al. Urinary phthalate metabolites in relation to preterm birth in Mexico City. *Environ Health Perspect*. 2009;117(10):1587–1592.
- Romano Mozo D. Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS). Madrid: España; 2012.
- Bustamante Montes LP, Hernández Valero MA, Flores-Pimentel D, et al. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis*. 2013;4(4):300–306.
- Swan SH, Main KM, Liu F, et al. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(8):1056–1061.

- Latini G, De Felice C, Presta G, et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2003;111(14):1783–1785.
- Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, et al. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem*. 2006;13(21):2527–2534.
- Whyatt RM, Adibi JJ, Calafat AM, et al. Prenatal Di(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure and Length of Gestation Among an Inner-City Cohort. *Pediatrics*. 2009;124(6):e1213–e1220.
- Engel SM, Miodovnik A, Canfield RL, et al. Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ Health Perspect*. 2010;118(4):565–571.
- Engel SM, Zhu C, Berkowitz GS, et al. Prenatal phthalate exposure and performance on the Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic birth cohort. *Neurotoxicology*. 2009;30(4):522–528.
- Sugiyama Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, et al. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. 2005;20(8):2325–2329.
- Alonso Magdalena P, Vieira E, Soriano S, et al. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect*. 2010;118(9):1243–1250.
- Casas L, Fernández MF, Llop S, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ Int*. 2011;37(5):858–866.
- Center for Devices and Radiological Health, U.F. and D.A., 2002. Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. Rockville, MD.
- Mitro SD, Johnson T, Zota AR. Cumulative Chemical Exposures During Pregnancy and Early Development. *Curr Environ Health Rep*. 2015;2(4):367–378.
- Robinson L, Miller R. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Curr Environ Health Rep*. 2015;2(4):379–387.
- Calafat AM, Silva MJ, Reidy JA, et al. Mono-(3-carboxypropyl) phthalate, a metabolite of di-n-octyl phthalate. *J Toxicol Environ Health A*. 2006;69(3-4):215–227.
- Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36(5):459–479.
- Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol*. 2004;78(3):123–130.
- Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environ Int*. 2011;37(5):893–898.
- Romero Franco M, Hernández Ramírez RU, Calafat AM, et al. Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women. *Environ Int*. 2011;37(5):867–871.
- Lorber M, Angerer J, Koch HM. A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to Di-2-ethylhexyl phthalate. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2010;20(1):38–53.
- Toxicological profile for Di-n-butyl Phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2001.
- Koch HM, Lorber M, Christensen KLY, et al. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(6):672–681.

- U.S. Environmental Protection Agency, 2013. America's Children and the Environment. Biomonitoring: Phthalates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Health Canada, DEHP in Medical Devices: an exposure and toxicity assessment. Medical Devices Bureau, Therapeutic Products Directorate, Health Products and Food Branch. Ottawa, Canada, 2002.
- Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, et al. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;35(10):2149–2173.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):139–177.
- Bekö G, Callesen M, Weschler CJ, et al. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environ Res*. 2015;137:432–439.
- Konieczki D, Wang R, Moody RP, et al. Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environ Res*. 2011;111(3):329–336.
- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, et al. Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(8):1685–1687.
- Larsson K, Ljung Björklund K, Palm B, et al. Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. *Environ Int*. 2014;73:323–333.
- López Carrillo L, Hernández Ramírez RU, Calafat AM, et al. Exposure to Phthalates and Breast Cancer risk in Northern Mexico. *Environ Health Perspect*. 2010;118(4):539–544.
- Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2097–2113.
- Christensen KLY, Makris SL, Lorber M. Generation of hazard indices for cumulative exposure to phthalates for use in cumulative risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014;69(3):380–389.
- Trasande L, Sathyanarayana S, Trachtman H. Dietary phthalates and low-grade albuminuria in US children and adolescents. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;9(1):100–109.
- Ramakrishnan U, Stein AD, Parra Cabrera S, et al. Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Mexico. *Food Nutr Bull*. 2010;31(2):S108–116.
- Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, et al. Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem*. 2000;72(17):4127–4134.
- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, et al. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. 2005;113(2):192–200.
- Croghan E, Egeghy P. Methods of Dealing with Values Below the Limit of Detection Using SAS. Presented at Southeastern SAS User Group. St. Petersburg, FL, 2003.
- White IR, Royston P, Wood AM. Multiple imputation using chained equations: Issues and guidance for practice. *Statistics in Medicine*. 2011;30(4):377–399.
- Zamora Muñoz S, Monroy Cazorla L, Chavez Alvarez C. Análisis factorial: una técnica para evaluar la dimensionalidad de las pruebas. 2009.
- Kang Y, Man YB, Cheung KC, et al. Risk Assessment of Human Exposure to Bioaccessible Phthalate Esters via Indoor Dust around the Pearl River Delta. *Environ Sci Technol*. 2012;46(15):8422–8430.

- Cantonwine D, Meeker JD, Hu H, et al. Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health*. 2010;9:62.
- Johns LE, Ferguson KK, Cantonwine DE, et al. Urinary BPA and Phthalate Metabolite Concentrations and Plasma Vitamin D Levels in Pregnant Women: A Repeated Measures Analysis. *Environ Health Perspect*. 2017;125(8):087026.
- Services, D. of H. and H., 2014. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals.
- Zeman F, Boudet C, Tack K, et al. Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: Results of the ELFE pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013;216(3):271–279.
- Gascon M, Casas M, Morales E, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):370–378.
- Tefre de Renzy Martin K, Frederiksen H, Christensen JS, et al. Current exposure of 200 pregnant Danish women to phthalates, parabens and phenols. *Reproduction*. 2014;147(4):443–453.
- Elsisi AE, Carter DE, Sipes IG. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. *Toxicology Sciences*. 1989;12(1):70–77.
- Koch HM, Wittassek M, Brüning T, et al. Exposure to phthalates in 5–6 years old primary school starters in Germany—A human biomonitoring study and a cumulative risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(3):188–195.
- Silva M, Samandar E, Preaur J, et al. Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography*. 2007;860(1):106–112.
- Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *International Journal of Andrology*. 2008;31(2):131–138.
- Australian Government, Phthalates Hazard Compendium. A summary of physicochemical and human health hazard data for 24 ortho-phthalate chemicals. Sydney: Australia; 2008.
- Barr DB, Silva MJ, Kato K, et al. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect*. 2003;111(9):1148–1151.
- Ellington JJ. Octanol/Water Partition Coefficients and Water Solubilities of Phthalate Esters. *J Chem Eng*. 1999;44(6):1414–1418.
- Kappenstein O, Vieth B, Luch A, et al. Toxicologically Relevant Phthalates in Food. In: Luch A editor. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Springer Basel: Basel; 2012. pp. 87–106.
- Serrano SE, Braun J, Trasande L, et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health*. 2014;13(1):43.
- Rudel RA, Gray JM, Engel CL, et al. Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environ Health Perspect*. 2011;119(7):914–920.
- Vandentorren S, Zeman F, Morin L, et al. Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: Implications for large-scale biomonitoring studies. *Environmental Research*. 2011;111(6):761–764.
- Yan X, Calafat A, Lashley S, et al. Phthalates Biomarker Identification and Exposure Estimates in a Population of Pregnant Women. *Human and ecological risk assessment*. 2009;15(3):565–578.
- Toxicological profile for Di-n-octylphthalate (DNOP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta: GA; 1997.
- European Commission Environment Directorate General, 15th Meeting of Competent Authorities for REACH and CLP (CARACAL), 2014.

66. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(1):571–576.
67. Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, et al. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2008;83(3):157–395.
68. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks S. Additives used in tobacco products (Opinion 1) Tobacco Additives 1, 2016.
69. Hubinger JC. A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. *J Cosmet Sci*. 2010;61(6):457–465.



ANEXO 2



EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A DISRUPTORES ENDOCRINOS SOBRE LA FUNCIÓN PULMONAR EN NIÑOS RESIDENTES DE MORELOS, MÉXICO

Introducción

En los últimos años, se han publicado estudios que relacionan la exposición en períodos de vulnerabilidad a determinadas sustancias químicas a bajas concentraciones, o a combinaciones de éstas, con efectos adversos en la salud de los individuos que pueden prevalecer a lo largo de la vida (1–5). Algunos de estos compuestos se conocen como disruptores endocrinos porque sus efectos inciden sobre el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario. Entre ellos se encuentran los ftalatos y el bifenol A (BPA), sustancias que son ampliamente usados en la industria del plástico y que carecen de normatividad a nivel mundial (2,6–10). Dichos compuestos se usan para dar al plástico la elasticidad, flexibilidad y resistencia requerida para el producto específico. En la población general la principal fuente de exposición a estos compuestos es a través del consumo de alimentos contaminados, seguida de su inhalación (9–11).

La exposición a ftalatos y BPA ha sido relacionada con problemas de salud reproductiva, malformaciones y neurotoxicidad, pero son pocos los estudios que han evaluado su asociación con la salud respiratoria. Estudios recientes indican que la exposición a ftalatos tiene un efecto negativo sobre la salud respiratoria de los lactantes que se manifiesta por obstrucción bronquial, asma y altos niveles de óxido nítrico en el aire exhalado (12–15). En población adulta también se han relacionado con asma. Sin embargo, el estudio de Hoppin et al. no encontró relación entre los metabolitos de estos compuestos y síntomas respiratorios en niños (12–19).

Debido a la vulnerabilidad de los niños, cuyos pulmones se encuentran en crecimiento y desarrollo, el efecto sobre su salud podría ser mayúsculo. En la niñez, las enfermedades respiratorias son más comunes y se manifiestan por síntomas respiratorios que pueden llegar hasta la disminución de la función pulmonar y a consultas de urgencia en hospitales.

Otros autores señalan que la ingesta de ácido *docosahexaenoico* (*docosahexaenoic acid*, DHA) durante el embarazo a partir de la semana 20 contrarresta el efecto negativo de estos químicos sobre enfermedades inflamatorias como el asma y las alergias en eta-



pas posteriores al nacimiento (20–23). La dosis ideal y el tiempo de suplementación no se ha establecido, pero se ha observado que los suplementos de DHA administrados a dosis altas (1.1 g - 3.7 g) durante el embarazo protegen de las alergias posnatales, a diferencia de las dosis menores; también se ha reportado un efecto protector con suplementos de DHA a bajas dosis cuando el tratamiento se prolonga durante la lactancia (24, 25). Sin embargo, los estudios son escasos y la evidencia todavía no es concluyente.

El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición prenatal a ftalatos y bisfenol A sobre la función pulmonar medida por oscilación en niños desde los tres hasta los nueve años residentes en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos, México, y su interacción con la suplementación de DHA.

Métodos

Diseño del estudio

El diseño de la presente investigación es de cohorte anidada y forma parte del estudio POSGRAD “Prenatal Omega-3 Fatty Acid Supplements, Growth, and Development” (NCT00646360). Es un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, diseñado para evaluar el efecto de la administración del suplemento prenatal de ácido docosahexaenoico (DHA) en el crecimiento y desarrollo de los hijos de las participantes reclutadas durante las visitas de rutina prenatal entre febrero de 2005 y febrero de 2007 en el Hospital General del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Cuernavaca, México. Las mujeres recibieron la indicación de tomar 2 capsulas diarias de DHA o de placebo a la misma hora cada día desde la semana 18 o 22 hasta el momento del parto. Las cápsulas de DHA contenían 200 mg y las de placebo contenían aceite de oliva y eran similares en apariencia y sabor a las cápsulas de DHA.

El protocolo fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Emory y por los Comités de Ética y de Bioseguridad del INSP. Todos los procedimientos fueron explicados a las participantes, quienes firmaron una carta de consentimiento informado. Los datos del estudio fueron revisados periódicamente por un comité externo de monitoreo de seguridad y datos (DSMC). Para más detalles consultar el artículo de Usha Ramakrishnan, 2010 (26).



La cohorte anidada está constituida por 184 binomios madre-hijo con información completa de exposición prenatal a ftalatos y BPA y datos de seguimiento de oscilometría, antropometría y síntomas respiratorios de los niños hasta los 9 años, así como otras variables como antecedente de IgE de la madre, tiempo que la madre tomó el suplemento, IMC, educación y exposición a humo de tabaco. Las características socio-demográficas de las madres se obtuvieron mediante un cuestionario que se aplicó en el momento en que ingresaron al estudio. El antecedente de atopia materna se basó en los niveles de IgE específica materna en plasma (IU/ml); las mediciones de oscilometría, antropometría y síntomas respiratorios en niños se obtuvieron desde los 3 hasta los 9 años. En la revisión anual de salud del niño se aplicó un cuestionario en el cual se registró la presencia de síntomas respiratorios durante los 15 últimos días; después se le midió, pesó y se realizaron las mediciones de oscilometrías.

La potencia estadística obtenido a partir de la muestra seleccionada para el presente análisis fue de 66%, considerando una muestra de 290 niños con 6 mediciones repetidas y 2 grupos de comparación.

Variables de interés.

Se evaluó la función mecánica pulmonar utilizando la técnica de oscilación forzada (*forced oscillation technique*, FOT) con equipo I2M, Chess Medical, Belgium marketed in Italy by Cosmed) siguiendo las especificaciones de la SER (27). Se obtuvieron resultados de la reactancia (Xrs) y la resistencia (Rrs) a diferentes frecuencias de oscilación, entre 2 y 48 Hertz (Hz). Para nuestro análisis reportamos resultados a 6 y 20 Hz; la primera oscilación valora las vías pequeñas y el parénquima pulmonar, mientras que las frecuencias altas valoran primordialmente vías aéreas grandes (28). Todas las pruebas fueron realizadas por los mismos técnicos que seleccionaron las tres mejores pruebas técnicamente aceptables para promediarlas y representar la medida de la Rrs y Xrs. Para ver con más detalle el procedimiento que se siguió, revisar el artículo de Shackleton y colaboradores (29).

Las pruebas se repitieron cada año en dos lapsos del tiempo, el primero a los 3, 4 y 5 años y, en un segundo momento, a los 7, 8 y 9 años.

Exposición Ambiental.

La exposición prenatal a ftalatos y BPA se evaluó en muestras de orina materna. Se midieron nueve metabolitos de ftalatos monoéster (mono-2-etilhexil ftalato (MEHP),



2-etil-5-carboxifenil ftalato (MECPP), 2-etil-5-hidroxihexil ftalato (MEHHP), mono-2-etilo-5-oxohexilo ftalato (MEOHP), monobenzil ftalato (MBzP), Mono-n-butil ftalato (MBP), mono-iso-butil ftalato (MiBP), monoetil ftalato (MEP), Mono-carboxi-propil ftalato (MCP) y bisfenol A (BPA). Las muestras de orina se encontraban almacenadas en alícuotas de 5 ml que se mantuvieron congeladas a -70°C hasta el momento del análisis. Se procesaron por desconjugación enzimática de los glucurónidos, seguida de extracción en fase sólida.

Para la determinación del ftalato, se procesaron 1-2 ml de alícuotas de orina y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con dilución isotópica acoplada con espectrometría de masas en tándem. Los análisis de BPA se realizaron mediante espectrometría de masas por cromatografía de gases, de acuerdo con un método establecido (30). Las concentraciones urinarias de ftalato y BPA se informan en microgramos por litro de orina y en microgramos por gramo de creatinina urinaria ($\mu\text{g/g}$ de creatinina). La determinación de creatinina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución y los niveles se usaron para corregir la dilución de orina. Las variables correspondientes a las concentraciones de los metabolitos de ftalatos y BPA fueron transformadas a logaritmo natural para eliminar el sesgo que presentaban. Signos y síntomas respiratorios.

A partir de su nacimiento, los niños fueron seguidos cada 3 meses hasta los 18 meses de edad y posteriormente cada año, aplicándoles un cuestionario clínico que proporcionó información sobre la presencia o ausencia de signos y síntomas respiratorios desde el nacimiento hasta los 9 años. Los indicadores que consideramos en nuestro análisis fueron: 1) tos, 2) tos seca, 3) tos con flema y/o congestión nasal, 4) tos con infección en la garganta 5) sibilancias, además del diagnóstico de asma.

La información sociodemográfica en el hogar se obtuvo mediante entrevistas con la madre durante una visita a domicilio realizada durante el segundo trimestre del embarazo. El cuestionario incluía preguntas sobre la educación de los padres, ingreso familiar y características del hogar aspectos estructurales, entorno familiar y factores ambientales relacionados con alérgenos.

Otras variables

A partir de la edad, peso y talla del niño obtenidas antes de que se realizara la prueba de oscilometría, se construyó el índice de talla para la edad (Z-height-age) y el índice de peso corporal para la edad (Z-BMI-age) de la OMS (31).



La información de tabaquismo se obtuvo a través de un cuestionario administrado a las madres durante el embarazo. Respondieron la pregunta “¿Fuman usted o alguien más dentro de la casa y/o en presencia del infante?”

Niveles de IgE específica materna: Durante el embarazo se tomó una muestra de sangre materna para la determinación de los niveles de IgE específica en plasma, los cuales fueron evaluados usando un sistema de citometría de flujo Luminex Immune Tech, Inc, Menlo Park, CA. Los resultados fueron clasificados en dos categorías: positiva cuando $IgE \geq 0.70$ IU/ml (madre atópica) y negativa cuando $IgE < 0.70$ IU/ml (madre no atópica).

Análisis Estadístico

Se obtuvieron las estadísticas descriptivas como media, desviación estándar o frecuencias para las variables sociodemográficas, de exposición ambiental, antecedentes de atopia materna y otras involucradas en el proceso del análisis. Se graficó la distribución de la resistencia y reactancia por grupos de edad durante el seguimiento de los 3 hasta los 9 años. Las estadísticas de las variables de exposición ambiental se presentan a través de su media y mediana; y para ver su variabilidad la desviación estándar, los percentiles 25 y 75, 5 y 95 y valores mínimos y máximos de cada variable de exposición.

Para evaluar la relación entre la función pulmonar y la exposición (metabolitos de ftalatos y BPA) se usaron modelos mixtos considerando intercepto aleatorio y matriz de covarianza sin estructura (32). Todos los modelos consideraron la variable de exposición prenatal a priori y se ajustaron por las siguientes variables: alguna persona fuma en casa, lactancia exclusiva por 6 meses (0: menor a 6 meses 1: 6 meses de lactancia exclusiva), sexo del niño, z-score de la talla para la edad y el tiempo de seguimiento. Se evaluaron otras variables como el estatus socioeconómico, el sobrepeso de la madre, los niveles de IgE total en cordón umbilical del niño, el orden de nacimiento, el tipo de parto, la presencia de mascotas en casa, la humedad, los antecedentes de tabaquismo y la presencia de síntomas respiratorios, pero no fueron significativas ($p > 0.10$) y no modificaron los coeficientes por más del 10%. Por otro lado, cuando se evaluó la interacción entre el grupo de suplementación y cada variable de exposición sobre la resistencia y reactancia a frecuencia 6 Hz, en algunos casos resultó estadísticamente significativa ($p \leq 0.10$).



Cada modelo fue sometido a un diagnóstico mediante sus residuos; para seleccionar el mejor modelo se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC).

Todos los análisis se realizaron utilizando STATA versión 14 (StataCorp LP).

Resultados

El cuadro 1 muestra las características sociodemográficas de la población de estudio binomio madre-hijo. El 52.7% de los niños eran de sexo masculino, con un peso promedio al nacimiento de 3.2 kg (Desviación Estándar (DE)=0.4) y un promedio de 39.1 semanas de gestación (DE=1.9); 53.3% nacieron por cesárea y el 28.8% fueron primogénitos. El 40.2% de las madres reportaron haber alimentado exclusivamente con leche materna durante los primeros 6 meses a su hijo. Los síntomas respiratorios que presentaron con mayor frecuencia los niños 15 días antes de la realización de cada prueba de oscilometría fueron tos (37.9% y tos con infección en la garganta (37.0%). Al inicio del estudio la edad promedio de las madres era de 26.0 años (DE=4.9), más de la mitad mostró sobrepeso (56.5%) y el 56.0% tenía al menos educación primaria o más escolaridad. De acuerdo con los niveles de IgE específica, 28.3% fueron clasificadas como madres atópicas. El 37.5% de los hogares declararon tener al menos a una persona fumadora dentro del hogar.

Las concentraciones más altas de los metabolitos de ftalatos fueron MEP con una mediana de 106.5 $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC 95%): 32.2, 376.2) MnBP con 84.5 (IC 95%: 36.2, 194.8), MECPP y MEHHP con 50.4 $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC 95%: 15.8, 147.4) y 37.2 (IC 95%: 13.3, 114.5), respectivamente. (Ver Cuadro 2)

En cuanto a la función pulmonar, durante el seguimiento se obtuvo un promedio de 4 mediciones de resistencia y reactancia por sujeto. La resistencia a frecuencia 6 y 20 Hz disminuye con la edad (menor a 20 que a 6 Hz) y la reactancia se incrementa (menor Xrs6 que la Xrs20) como se puede observar en la figura 1. La resistencia promedio a frecuencia 6 Hz durante el seguimiento fue de 9.1 hPa.s.L⁻¹ con una variabilidad entre las mediciones de los niños (ve) de 1.7 y de 2.7 entre las mediciones de cada niño (vd); para la Rrs20 el promedio fue de 8.9 hPa.s.L⁻¹, con una variabilidad entre los niños de 1.1 y de 1.5 hPa.s.L⁻¹ entre las mediciones de cada niño. La reactancia promedio observada en Xrs6 fue de -4.5 (ve=1.4, vd=1.8) y de -3.1 (ve=1.3, vd=1.8) hPa.s.L⁻¹. Estas estadísticas fueron similares entre los grupos placebo y DHA. (No se muestran los datos.)



Al evaluar el efecto de la exposición prenatal sobre la función pulmonar del niño por grupo de suplementación, se observó un efecto positivo, pero no significativo en el grupo de niños cuyas madres fueron suplementadas con placebo, es decir, a medida que se incrementan los metabolitos o el BPA en escala logarítmica, la resistencia a frecuencia 6 Hz se incrementó, pero no de manera significativa. En contraste, en el grupo de niños con madres suplementadas con DHA, este efecto fue negativo para todos los metabolitos y BPA, pero solo significativo ($p < 0.05$) en Ln(MECP), Ln(MEHHP), Ln(MEOHP), Ln(MEHP) y Ln(MnBP). Por cada incremento en escala logarítmica de MECP, la resistencia de los niños disminuyó en $0.298 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC95%: $-0.521, -0.076$), en el caso de MEHHP en $0.295 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC 95%:

$-0.484, -0.105$), MEOHP en 0.271 (IC 95%: $-0.489, -0.053$), Ln(MEHP) en 0.252 (IC 95%: $-0.485, -0.019$) y Ln(MnBP) en 0.271 (IC 95%: $-0.491, -0.050$).

El mismo patrón de comportamiento se observó al considerar la Xrs₆ para estos metabolitos. Considerando al grupo de niños cuyas madres recibieron DHA, a medida que Ln(MECP), Ln(MEHHP), Ln(MEOHP) y Ln(MEHP) se incrementaron, la reactancia a frecuencia 6 Hz se incrementó significativamente en $0.189 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC 95%: $0.003, 0.376$), 0.185 (IC 95%: $0.026, 0.344$), 0.170 (IC 95%: $-0.012, 0.352$) y $0.164 \text{ hPa.s.L}^{-1}$ (IC 95%: $-0.030, 0.357$), respectivamente. (Ver Cuadro 3 y 4)

Por otro lado, en el grupo de madres suplementado con DHA se observó una interacción significativa ($p < 0.10$) entre las concentraciones en escala logarítmica de los metabolitos Ln(MECP), Ln(MEHHP), Ln(MEOHP), Ln(MEHP) y Ln(BPA) y la resistencia y reactancia a frecuencia 6 Hz. En promedio la Rrs₆ de los niños disminuyó significativamente cuando sus madres tomaron suplementos de DHA durante el embarazo. En cambio, en el grupo de niños cuyas madres recibieron placebo durante esta etapa, el decremento fue mínimo y no significativo o nulo. En el caso de la reactancia, se identificó este mismo efecto, pero de manera inversa, es decir, la reactancia se incrementó en el grupo que tomó DHA, mientras que en el grupo que tomó placebo la reactancia no se incrementó o el incremento fue mínimo. Al parecer, el efecto del DHA contrarresta el efecto negativo de los ftalatos sobre la medición de la resistencia. (Ver Figura 2)

Las Rr₂₀ y Rx₂₀ no mostraron cambios significativos relacionados con los suplementos del DHA o placebo y las concentraciones de los compuestos químicos. (Datos no mostrados)

Discusión

Observamos que la función pulmonar (resistencia y reactancia) de los niños cuyas madres recibieron DHA durante el embarazo no se afectó de manera significativa al aumentar los niveles de ftalatos, mientras que los niños cuyas madres tomaron placebo mostraron una disminución en la función pulmonar al incrementarse los metabolitos, aunque sin llegar a tener significancia estadística. Por el contrario, los suplementos de DHA no tuvieron un efecto positivo directo sobre la Rrs y Rxs de los niños. Lo anterior probablemente se deba a que la dosis de DHA suplementario fue baja (400 mg por día) y no se continuó con la suplementación durante la lactancia, como se ha hecho en otros estudios.

La afectación de la función pulmonar a frecuencias bajas en el grupo de niños cuya madres recibieron placebo podría deberse a un daño a nivel de vías respiratorias bajas y/o de parénquima pulmonar (28) causado por la exposición a Di(2-EthylHexyl) (DEHP) que podría haber afectado de manera no significativa el crecimiento del pulmón o su desarrollo (33).

Estudios realizados con ratas han mostrado que la exposición a dosis altas de DEHP induce restricción en el crecimiento intrauterino, alteraciones en la maduración pulmonar (evidenciada por la disminución del tejido alveolar y/o el aumento de la proliferación de tejido intersticial pulmonar), y reducción de la superficie de intercambio gaseoso, sobre todo en etapas del desarrollo posnatal (34–36). Asimismo, estudios en humanos han reportado que la exposición a estas sustancias químicas pudieran aumentar los niveles de células inflamatorias, incluidos eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en el pulmón y en el líquido broncoalveolar y provocar irritación aguda de las vías respiratorias y un aumento en el número de macrófagos en el líquido broncoalveolar, (37–39).

En nuestro estudio solo los metabolitos que provienen del ftalato DEHP mostraron un efecto sobre la función pulmonar en los niños, probablemente porque el DEHP es de cadena larga, lo que favorece que la excreción sea más lenta ya que solo se excreta el 10% de una dosis oral del metabolito monoéster simple (40). Asimismo, algunos estudios han sugerido que la placenta no funciona como barrera para el metabolito primario MEHP, lo cual le permite llegar hasta la circulación sanguínea del feto en desarrollo y provocar sufrimiento fetal, pues este metabolito se ha encontrado en el meconio (41). El MEHP llega al intestino de feto a partir de la semana 12 de gestación





a través de la secreción de bilis y/o la ingestión fetal de líquido amniótico. El MEHP es un biomarcador de exposición a DEHP a largo plazo y se ha observado que desencadena la liberación citocina proinflamatoria TNF-alfa e inicia una posible diferenciación hacia macrófagos tipo M2 (antiinflamatorios) (42) y un incremento en las especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) que puede inducir estrés oxidativo en células placentarias y apoptosis que termina con complicaciones en el embarazo o con predisposiciones a enfermedades a largo plazo como el asma (43,44).

Las vías por las cuales el DHA actúa como antiinflamatorio no son del todo claras. Algunos autores señalan que el DHA eleva las citoquinas Th2, IL5 y IL13, mientras disminuye el estrés oxidativo a través de los niveles de F-isoprostano (45). Otros autores consideran que da lugar a un cambio epigenético que se ve reflejado en el sistema inmune en etapas posteriores al nacimiento cuando la dieta materna incluye DHA (20,46).

Como antecedente tenemos un estudio en esta población que se realizó a partir de una submuestra de 130 mujeres de cada grupo (placebo vs DHA) con el propósito de evaluar el efecto de la suplementación prenatal de DHA sobre la modulación los estados epigenéticos en el sistema inmune del bebé. El estudio encontró que el DHA equilibraba la metilación del ADN de los sitios del promotor de IL-13 e IFN- γ en las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical. La metilación del gen IL-13 bajo se compensó con una baja metilación del locus IFN- γ (46). Esto indica que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 como el DHA en la dieta materna puede tener un impacto en el resultado inmunológico del lactante que se reflejan en etapas posteriores de su vida a través de la inducción de cambios epigenéticos. Los autores de este estudio concluyeron que la suplementación materna con DHA durante el embarazo puede modular los niveles de metilación global y el equilibrio Th1/Th2 en los bebés (46).

Nuestro estudio tiene las ventajas propias de un ensayo clínico doble ciego aleatorizado; las madres nunca supieron a qué grupo pertenecían y la población madre-hijo involucrada en este trabajo conserva la aleatorización; las características basales fueron similares en ambos grupos (placebo vs DHA). Esto garantiza la validez interna del estudio. Otra ventaja es que el seguimiento a los niños se mantuvo hasta los 9 años, lo cual permitió observar el comportamiento de las mediciones antropométricas, la función pulmonar y el registro de síntomas respiratorios de los últimos 15 días previos



a la aplicación de las pruebas de función pulmonar de los niños. Como limitaciones están la pérdida de niños durante el seguimiento, (no mostraban características diferentes a los que permanecieron); registramos en promedio 3 mediciones por niño, cuando el seguimiento de la función pulmonar inicio a los 3 años de edad; la medición de la exposición a ftalatos y BPA solo se pudo realizar en una submuestra de 290 de las 1094 mujeres que participaron al inicio, dado el alto costo del análisis y no contaban con mediciones posteriores al nacimiento.

Conclusiones

Con nuestros resultados se evidencia que la exposición a ftalatos durante el embarazo tiene un efecto negativo en la función pulmonar del niño y que este efecto se puede contrarrestar administrando a la madre suplementos del DHA durante el embarazo. Es conveniente estudiar los efectos de dosis más altas de DHA en el embarazo, evaluar su efecto protector cuando se administra durante la lactancia y evaluar estos metabolitos durante la primera infancia.

Referencias Bibliográficas

1. Dentzer S. Embarking On A New Course: Environmental Health Coverage. *Health Aff (Millwood)*. el 1 de mayo de 2011;30(5):810–810.
2. Romano-Mozo. Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS). Madrid, España; 2012.
3. Scsukova S, Rollerova E, Bujnakova Mlynarcikova A. Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reprod Biol*. diciembre de 2016;16(4):243–54.
4. Prusinski L, Division of Translation Research, Department of Obstetrics and Gynecology, Augusta University, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA, Yang Q, Division of Translation Research, Department of Obstetrics and Gynecology, Augusta University, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA. Developmental Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals Alters the Epigenome: Identification of Reprogrammed Targets. *Gynecol Obstet Res - Open J*. el 29 de julio de 2016;3(1):1–6.
5. Yang Q, Diamond MP, Al-Hendy A. Early Life Adverse Environmental Exposures Increase the Risk of Uterine Fibroid Development: Role of Epigenetic Regulation. *Front Pharmacol [Internet]*. el 1 de marzo de 2016 [citado el 14 de marzo de 2018];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00040>



6. Meeker JD, Hu H, Cantonwine DE, Lamadrid-Figueroa H, Calafat AM, Ettinger AS, et al. Urinary Phthalate Metabolites in Relation to Preterm Birth in Mexico City. *Environ Health Perspect*. octubre de 2009;117(10):1587–92.
7. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Ait Bamai Y, Itoh S, Yamamoto J, et al. Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and fetal metabolic related biomarkers: The Hokkaido study on Environment and Children's Health. *Environ Res*. febrero de 2018;161:505–11.
8. Wu H, Ashcraft L, Whitcomb BW, Rahil T, Tougias E, Sites CK, et al. Parental contributions to early embryo development: influences of urinary phthalate and phthalate alternatives among couples undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* [Internet]. el 7 de diciembre de 2016 [citado el 14 de marzo de 2018]; Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dew301>
9. Dobrzyńska MM. Phthalates - widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 1. General characteristics, sources and human exposure. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2016;67(2):97–103.
10. Koch HM, Lorber M, Christensen KLY, Pålme C, Koslitz S, Brüning T. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hyg Environ Health*. noviembre de 2013;216(6):672–81.
11. Casas L, Fernández MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ Int*. julio de 2011;37(5):858–66.
12. Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gómez A, Luque N, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2015;135(2):370-378.e7.
13. Ku HY, Su PH, Wen HJ, Sun HL, Wang CJ, Chen HY, et al. Prenatal and Postnatal Exposure to Phthalate Esters and Asthma: A 9-Year Follow-Up Study of a Taiwanese Birth Cohort. Chen Y-C, editor. *PLOS ONE*. el 13 de abril de 2015;10(4):e0123309.
14. Li M-C, Chen C-H, Guo YL. Phthalate esters and childhood asthma: A systematic review and congener-specific meta-analysis. *Environ Pollut*. octubre de 2017;229:655–60.
15. Vernet C, Pin I, Giorgis-Allemand L, Philippat C, Benmerad M, Quentin J, et al. In Utero Exposure to Select Phenols and Phthalates and Respiratory Health in Five-Year-Old Boys: A Prospective Study. *Environ Health Perspect* [Internet]. el 8 de septiembre de 2017 [citado el 14 de marzo de 2018];125(9). Disponible en: <http://ehp.niehs.nih.gov/EHP1015>



16. Hoppin JA, Jaramillo R, London SJ, Bertelsen RJ, Salo PM, Sandler DP, et al. Phthalate Exposure and Allergy in the U.S. Population: Results from NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect* [Internet]. el 25 de junio de 2013 [citado el 14 de marzo de 2018]; Disponible en: <http://ehp.niehs.nih.gov/1206211/>
17. Kimber I, Dearman RJ. An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicology*. mayo de 2010;271(3):73–82.
18. Norbäck D, Wieslander G, Nordström K, Wålinder R. Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. noviembre de 2000;4(11):1016–25.
19. Strassle PD, Smit LAM, Hoppin JA. Endotoxin enhances respiratory effects of phthalates in adults: Results from NHANES 2005-6. *Environ Res*. abril de 2018;162:280–6.
20. Willemsen LEM. Dietary n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in allergy prevention and asthma treatment. *Eur J Pharmacol*. agosto de 2016;785:174–86.
21. Lumia M, Luukkainen P, Tapanainen H, Kaila M, Erkkola M, Uusitalo L, et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and the risk of asthma in the offspring: Maternal fatty acids and asthma in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol*. diciembre de 2011;22(8):827–35.
22. Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, et al. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr*. febrero de 2007;85(2):530–7.
23. Miyake Y, Tanaka K, Okubo H, Sasaki S, Arakawa M. Maternal fat intake during pregnancy and wheeze and eczema in Japanese infants: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Ann Epidemiol*. noviembre de 2013;23(11):674–80.
24. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, et al. Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. abril de 2003;33(4):442–8.
25. Furuholm C, Warstedt K, Fagerås M, Fälth-Magnusson K, Larsson J, Fredriksson M, et al. Allergic disease in infants up to 2 years of age in relation to plasma omega-3 fatty acids and maternal fish oil supplementation in pregnancy and lactation: Fish oil and allergy in infants. *Pediatr Allergy Immunol*. agosto de 2011;22(5):505–14.
26. Ramakrishnan U, Stein AD, Parra-Cabrera S, Wang M, Imhoff-Kunsch B, Juárez-Márquez S, et al. Effects of Docosahexaenoic Acid Supplementation During Pregnancy on Gestational Age and Size at Birth: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Mexico. *Food Nutr Bull*. junio de 2010;31(2_suppl2):S108–16.



27. Beydon N, Davis SD, Lombardi E, Allen JL, Arets HGM, Aurora P, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children. *Am J Respir Crit Care Med*. el 15 de junio de 2007;175(12):1304–45.
28. Brashier B, Salvi S. Measuring lung function using sound waves: role of the forced oscillation technique and impulse oscillometry system. *Breathe*. marzo de 2015;11(1):57–65.
29. Shackleton C, Barraza-Villarreal A, Chen L, Gangell CL, Romieu I, Sly PD. Rangos de referencia en niños preescolares mexicanos con el empleo de la técnica de oscilación forzada. *Arch Bronconeumol*. agosto de 2013;49(8):326–9.
30. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. febrero de 2005;113(2):192–200.
31. WHO Multicentre Growth Reference Study Grupo. WHO Child Growth Standards: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006. 312 p.
32. Singer JD, Willett JB. *Applied Longitudinal Data Analysis: Modeling Change and Event Occurrence*. Oxford University Press; 2003.
33. Paredi P, Goldman M, Alamen A, Ausin P, Usmani OS, Pride NB, et al. Comparison of inspiratory and expiratory resistance and reactance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. el 1 de marzo de 2010;65(3):263–7.
34. Chen S-Q, Chen J-N, Cai X-H, Chen G-R, Gao Y, Ge R-S, et al. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate leads to restricted growth and delayed lung maturation in newborn rats. *J Perinat Med [Internet]*. el 1 de enero de 2010 [citado el 6 de marzo de 2018];38(5). Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/jpme.2010.38.issue-5/jpm.2010.083/jpm.2010.083.xml>
35. Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Di Carlo V, Stefanini S. Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem Cell Biol*. el 1 de julio de 2003;120(1):41–9.
36. Rosicarelli B, Stefanini S. DEHP effects on histology and cell proliferation in lung of newborn rats. *Histochem Cell Biol*. abril de 2009;131(4):491–500.
37. Deutsche T, Reiter R, Butte W, Heinzow B, Keck T, Riechelmann H. A Controlled Challenge Study on Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in House Dust and the Immune Response in Human Nasal Mucosa of Allergic Subjects. *Environ Health Perspect*. el 7 de julio de 2008;116(11):1487–93.



38. Hansen JS, Larsen ST, Poulsen LK, Nielsen GD. Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology*. marzo de 2007;232(1–2):79–88.
39. Larsen ST, Hansen JS, Hammer M, Alarie Y, Nielsen GD. Effects of mono-2-ethylhexyl phthalate on the respiratory tract in BALB/c mice. *Hum Exp Toxicol*. noviembre de 2004;23(11):537–45.
40. Johns LE, Cooper GS, Galizia A, Meeker JD. Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. *Environ Int*. diciembre de 2015;85:27–39.
41. Li L-X, Chen L, Meng X-Z, Chen B-H, Chen S-Q, Zhao Y, et al. Exposure Levels of Environmental Endocrine Disruptors in Mother-Newborn Pairs in China and Their Placental Transfer Characteristics. Sun Q, editor. *PLoS ONE*. el 7 de mayo de 2013;8(5):e62526.
42. Kocbach Bølling A, Ovrevik J, Samuelsen JT, Holme JA, Rakkestad KE, Mathisen GH, et al. Mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP) induces TNF- α release and macrophage differentiation through different signalling pathways in RAW264.7 cells. *Toxicol Lett*. febrero de 2012;209(1):43–50.
43. Franken C, Lambrechts N, Govarts E, Koppen G, Den Hond E, Ooms D, et al. Phthalate-induced oxidative stress and association with asthma-related airway inflammation in adolescents. *Int J Hyg Environ Health*. abril de 2017;220(2):468–77.
44. Meruvu S, Zhang J, Bedi YS, Choudhury M. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through miR-16 in human first trimester placental cell line HTR-8/SVneo. *Toxicol In Vitro*. marzo de 2016;31:35–42.
45. D’Vaz N, Meldrum SJ, Dunstan JA, Lee-Pullen TF, Metcalfe J, Holt BJ, et al. Fish oil supplementation in early infancy modulates developing infant immune responses. *Clin Exp Allergy*. agosto de 2012;42(8):1206–16.
46. Lee H-S, Barraza-Villarreal A, Hernandez-Vargas H, Sly PD, Biessy C, Ramakrishnan U, et al. Modulation of DNA methylation states and infant immune system by dietary supplementation with ω -3 PUFA during pregnancy in an intervention study. *Am J Clin Nutr*. el 1 de agosto de 2013;98(2):480–7.



Cuadro 1. Características de la población de estudio

Variables	Grupo de tratamiento		
	Placebo	DHA	Total
	87 (47.3%)	97(52.7%)	184(100%)
Características del niño			
Sexo masculino (%)	44(50.6)	53(54.6)	97(52.7)
Período de gestación, semanas [Media (DE)]	39.3(2.0)	38.8(1.9)	39.1(1.9)
Peso al nacer, kg [Media (DE)]	3.2(0.4)	3.2(0.4)	3.2(0.4)
Talla al nacer, cm [Media (DE)]	50.6(1.9)	50.3(2.4)	50.5(2.2)
Bajo peso al nacer, <2500g (%)	14(16.1)	18(18.6)	32(17.4)
Orden de nacimiento, primer nacimiento (%)	25(28.7)	28(28.9)	53(28.8)
Tipo de parto, cesárea (%)	45(51.7)	53(54.6)	98(53.3)
Semana de gestación al momento de la afección, [Media (DE)]	20.4(2.0)	20.3(1.9)	20.3(1.9)
Lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses	37(42.5)	37(38.1)	74(40.2)
Síntomas en los últimos 15 días, [Niños (%), Episodios (%)]			
Tos	24(40.7), 31(29.0)	23(35.4), 32(29.9)	47(37.9), 63(29.4)
Tos seca	6(10.0), 6(5.6)	5(7.7), 5(4.7)	11(8.8), 11(5.1)
Tos con flema y congestión nasal	19(21.8), 25(7.2)	21(21.7), 25(6.6)	40(21.7), 50(6.9)
Tos con infección en la garganta	37(42.5), 54(15.5)	31(32.0), 38(10.0)	68(37.0), 92(12.6)
Sibilancias	4(4.6), 6(1.7)	4(4.1), 5(1.3)	8(4.4), 11(1.5)
Diagnóstico de asma	9(10.3), 14(4.0)	3(3.1), 4(1.1)	12(6.5), 18(2.5)



Variables	Grupo de tratamiento		
	Placebo	DHA	Total
Características de la madre			
Edad de la madre, años [Media (DE)]	25.8(4.7)	26.2(5.0)	26.0(4.9)
IMC de la madre [Media (DE)]	26.4(4.9)	26.0(4.2)	26.2(4.5)
Sobrepeso, IMCI>25	47(54.0)	57(58.8)	104(56.5)
Educación de la madre(%)			
Secundaria o más	51(58.6)	52(53.6)	103(56.0)
Estado socioeconómico (%)			
Bajo	34(39.1)	30(30.9)	64(34.8)
Medio	30(34.5)	36(37.1)	66(35.9)
Alta	23(26.4)	31(32.0)	54(29.4)
Atopia materna (%)	22(26.5)	28(29.8)	50(28.3)
Alguien fuma en casa (%)	31(35.6)	38(39.2)	69(37.5)

DHA = Ácido docosahexaenoico; IMC = Índice de Masa Corporal; IgE = Inmunoglobulina E

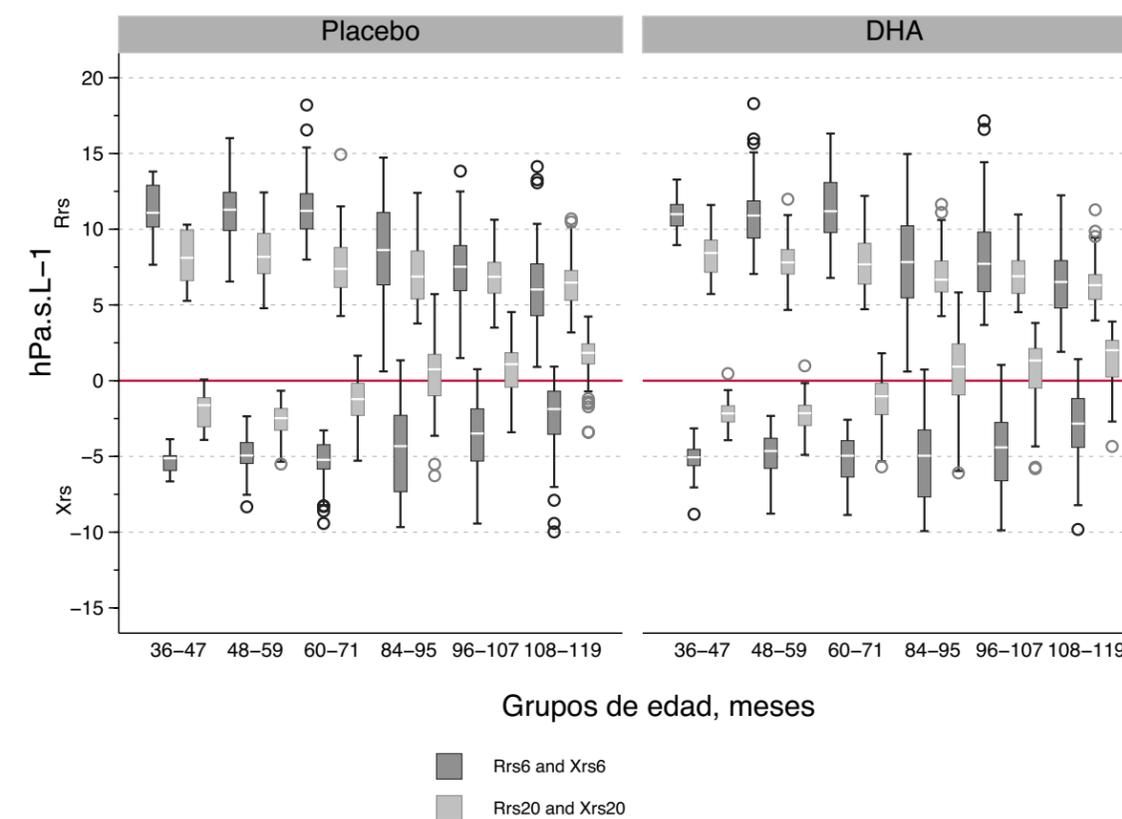


Cuadro 2. Concentraciones promedio (en $\mu\text{g/g}$ de creatinina) de metabolitos de ftalato y bisfenol A en muestras de orina de mujeres embarazadas.

Metabolito de ftalato y Bisfenol A	Placebo, n=87		DHA, n=97		Total	
	Mediana (P25, P75)	P5 - P95	Mediana (P25, P75)	P5 - P95	Mediana (P25, P75)	P5 - P95
MCPP	2.9(1.3, 6.8)	(0.5 - 25.8)	2.7(1.2, 5.2)	(0.4 - 31.3)	2.8(1.4, 6.0)	0.5 - 21.8
MEP	103.2 (32.2, 376.2)	(10.4 - 1433.9)	100.2 (33.3, 278.0)	(7.4 - 1785.1)	106.5 (32.2, 376.2)	7.5 - 1433.9
MECPP	45.6(26.5, 125.6)	(8.0 - 667.5)	46.5(15.6, 99.0)	(3.3 - 452.1)		
MEHHP	37.2(17.0, 97.3)	(4.5 - 516.8)	30.9(10.4, 101.7)	(1.3 - 354.9)	37.2(13.3, 114.5)	2.2 - 511.4
MEOHP	19.0(8.5, 46.5)	(2.4 - 289)	17.2(7.0, 52.3)	(1.0 - 165.1)	19.4(7.0, 52.3)	1.2 - 219.0
MEHP	3.9(1.9, 10.0)	(0.6 - 63.3)	3.4(1.8, 8.5)	(0.3 - 42.2)	3.6(1.8, 9.6)	0.4 - 57.1
MnBP	84.5(36.0, 172.6)	(13.6 - 530.9)	79.5(23.4, 218.6)	(2.4 - 1019.5)	84.5(36.2, 194.8)	6.9 - 775.6
MiBP	6.9(2.7, 16.9)	(0.5 - 65.9)	6.4(2.9, 13.6)	(0.4 - 69.8)	6.5(2.7, 16.2)	0.5 - 65.9
MBzP	12.2(4.1, 34.4)	(1.0 - 207)	10.1(4.1, 31.8)	(0.8 - 143.0)	11.0(4.0, 31.8)	1.0 - 121.0
BPA	2.3(1.2, 6.0)	(0.4 - 20.3)	2.2(0.7, 4.7)	(0.2 - 12.6)	2.3(1.1, 5.0)	0.2 - 15.8



Figura 1. Seguimiento de resistencia y reactancia a frecuencia 6 y 20 Hz por grupo de suplementos y edad.



756 medidas repetidas correspondientes a 184 niños



Cuadro 3. Efecto de los ftalatos en la resistencia a 6 Hz (hPa.s.L-1) por grupo de tratamiento

Metabolito de ftalato / BPA	Placebo (N=87, n=361)		DHA (N=97, n=395)		Global (N=184, n=756)		P valor #
	Coficiente (IC95%)	P valor	Coficiente (IC95%)	P valor	Coficiente (IC95%)	P valor	
Ln(MCPP)	0.06(-0.184, 0.303)	0.630	-0.241(-0.534, 0.053)	0.108	-0.096(-0.288, 0.096)	0.328	0.103
Grupo, DHA					0.018(-0.452, 0.488)	0.940	
Ln(MEP)	0.088(-0.1, 0.277)	0.357	-0.057(-0.272, 0.158)	0.603	0.005(-0.138, 0.149)	0.941	0.317
Grupo, DHA					0.022(-0.448, 0.493)	0.926	
Ln(MECP)	0.013(-0.212, 0.239)	0.907	-0.298(-0.521, -0.076)	0.009	-0.172(-0.333, -0.011)	0.037	0.052
Grupo, DHA					-0.05(-0.52, 0.421)	0.836	
Ln(MEHHP)	0.031(-0.171, 0.234)	0.761	-0.295(-0.484, -0.105)	0.002	-0.166(-0.307, -0.025)	0.021	0.020
Grupo, DHA					-0.057(-0.525, 0.412)	0.813	
Ln(MEOHP)	0.019(-0.193, 0.231)	0.863	-0.271(-0.489, -0.053)	0.015	-0.146(-0.3, 0.009)	0.065	0.055
Grupo, DHA					-0.027(-0.497, 0.442)	0.909	
Ln(MEHP)	0.107(-0.104, 0.317)	0.320	-0.252(-0.485, -0.019)	0.034	-0.081(-0.242, 0.08)	0.324	0.025
Grupo, DHA					-0.012(-0.486, 0.462)	0.961	
Ln(MBP)	0.132(-0.13, 0.395)	0.323	-0.271(-0.491, -0.05)	0.016	-0.136(-0.305, 0.034)	0.118	0.025
Grupo, DHA					-0.008(-0.477, 0.461)	0.973	
Ln(MiBP)	0.113(-0.121, 0.347)	0.344	-0.063(-0.315, 0.189)	0.625	0.014(-0.16, 0.189)	0.873	0.312
Grupo, DHA					0.023(-0.448, 0.494)	0.924	
Ln(BPA)	0.124(-0.124, 0.372)	0.328	-0.163(-0.436, 0.11)	0.243	-0.035(-0.22, 0.151)	0.713	0.092
Grupo, DHA					0.011(-0.463, 0.484)	0.965	



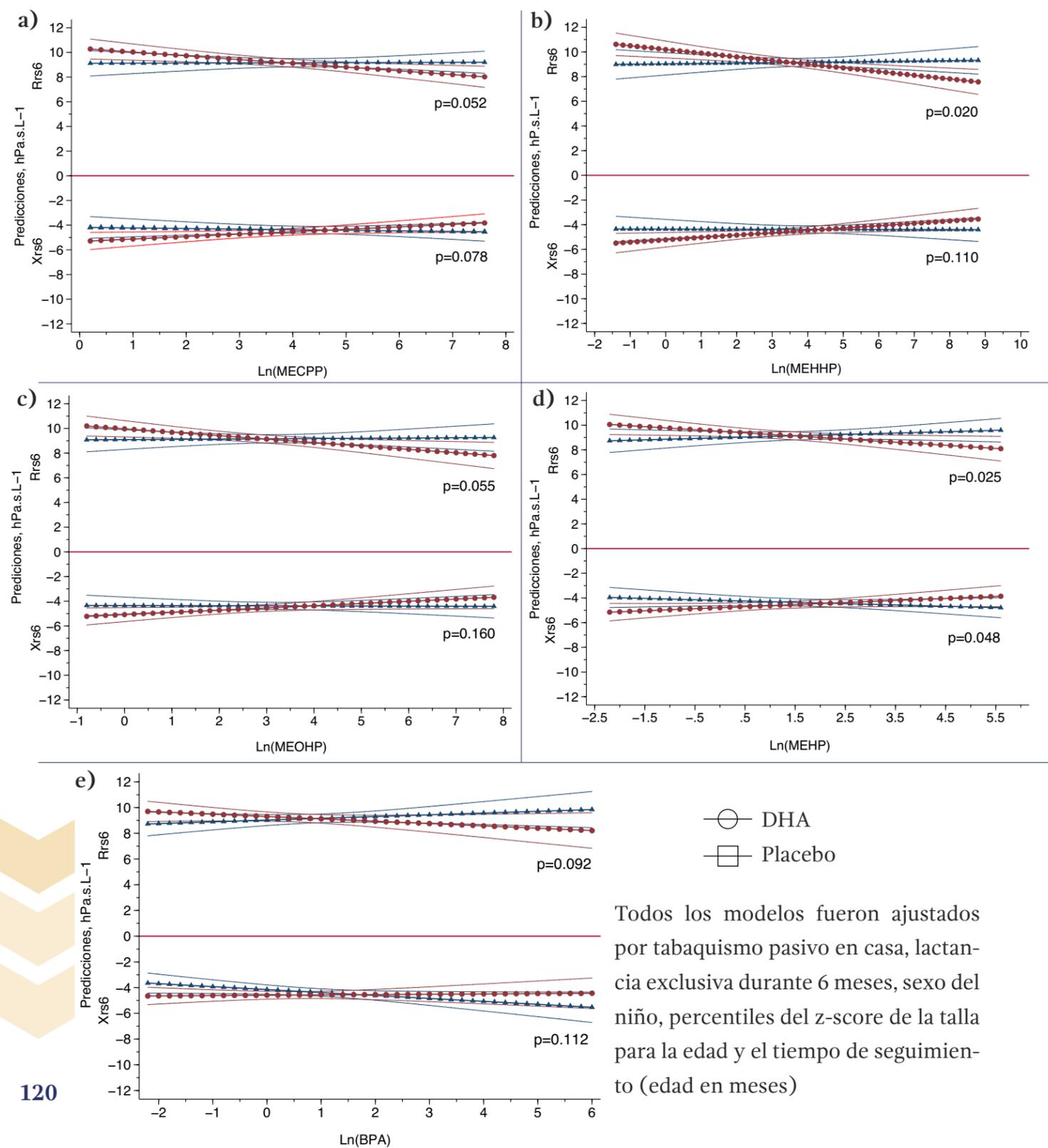
Interacción entre los metabolitos de los ftalatos o el BPA y el grupo de suplementación (1 = placebo y 2 = DHA). Todos los modelos fueron ajustados para alguien en el hogar fuma en casa, lactancia exclusiva a los 6 meses, sexo, para cada visita el puntaje z de altura para la edad y el tiempo de seguimiento.

Cuadro 4. Efecto de los ftalatos sobre la reactancia a 6 Hz (hPa.s.L-1) mediante tratamiento

Metabolito de ftalato / BPA	Placebo (N=87, n=326)		DHA (N=96, n=352)		Global (N=183, n=678)		Interacción P valor #
	Coficiente (95%CI)	P valor	Coficiente (95%CI)	P valor	Coficiente (95%CI)	P valor	
Ln(MCPP)	-0.098(-0.319, 0.122)	0.381	0.079(-0.168, 0.327)	0.530	-0.014(-0.18, 0.151)	0.864	0.245
Grupo, DHA					-0.2(-0.602, 0.202)	0.330	
Ln(MEP)	-0.027(-0.199, 0.144)	0.755	0.002(-0.179, 0.183)	0.985	-0.012(-0.137, 0.112)	0.845	0.948
Grupo, DHA					-0.201(-0.603, 0.201)	0.327	
Ln(MECP)	-0.05(-0.252, 0.151)	0.624	0.189(0.003, 0.376)	0.047	0.094(-0.044, 0.232)	0.183	0.078
Grupo, DHA					-0.16(-0.564, 0.244)	0.437	
Ln(MEHHP)	-0.004(-0.186, 0.178)	0.967	0.185(0.026, 0.344)	0.023	0.112(-0.009, 0.232)	0.069	0.110
Grupo, DHA					-0.146(-0.548, 0.256)	0.477	
Ln(MEOHP)	0.006(-0.196, 0.184)	0.949	0.17(-0.012, 0.352)	0.067	0.097(-0.036, 0.229)	0.152	0.160
Grupo, DHA					-0.166(-0.568, 0.236)	0.419	
Ln(MEHP)	-0.102(-0.291, 0.087)	0.289	0.164(-0.03, 0.357)	0.098	0.037(-0.101, 0.174)	0.602	0.048
Grupo, DHA					-0.184(-0.59, 0.221)	0.373	
Ln(MBP)	0.006(-0.234, 0.246)	0.961	0.149(-0.038, 0.336)	0.119	0.097(-0.05, 0.244)	0.196	0.332
Grupo, DHA					-0.178(-0.578, 0.223)	0.385	
Ln(MiBP)	-0.007(-0.219, 0.205)	0.947	0.028(-0.182, 0.238)	0.792	0.012(-0.137, 0.162)	0.871	0.786
Grupo, DHA					-0.198(-0.6, 0.205)	0.336	
Ln(BPA)	-0.238(-0.454, -0.021)	0.031	0.014(-0.215, 0.243)	0.905	-0.095(-0.253, 0.063)	0.238	0.112
Grupo, DHA					-0.229(-0.633, 0.175)	0.266	

Interacción entre los metabolitos de los ftalatos o el BPA y el grupo de suplementación (1 = placebo y 2 = DHA). Todos los modelos fueron ajustados para alguien en el hogar fuma en casa, lactancia exclusiva a los 6 meses, sexo, para cada visita el puntaje z de altura para la edad y el tiempo de seguimiento.

Figura 2. Interacciones entre grupo de suplemento y metabolito de ftalato.



ANEXO 3



CONCORDANCIA ENTRE LOS VALORES DE REFERENCIA DEL INER Y LOS DEL PRESENTE ESTUDIO

Para poder evaluar el grado de error presente en las mediciones oscilométricas utilizamos el coeficiente de correlación de concordancia (CCC) suponiendo como estándar de oro los valores de referencia generados a partir de las ecuaciones propuestas por investigadores del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Gochicoa-Rangel et al. 2015). El coeficiente de correlación de concordancia de Lin, se ha propuesto como la mejor medida de concordancia para dos métodos de medición de la misma característica que toma valores continuos, considerando la fuerza de acuerdo entre ellas. El acuerdo perfecto estaría indicado por todos los datos que se encuentran exactamente en la línea 1: 1, por lo que considera la cercanía a esta línea perfecta y a la variabilidad de los valores observados, es decir, combina una medida de precisión dada por el coeficiente de correlación y otra de exactitud representada por el coeficiente de corrección de sesgo (Lin 1989; Lin L 2000; McBride GB 2005; Cortes-Reyes E, Rubio-Romero, y Gaitan-Duarte H 2010; Song Jingli y Haber Michael 2002).

A partir de las ecuaciones propuestas por la Dra. Gochicoa y colaboradores del INER (Gochicoa-Rangel et al. 2015), se generaron valores de referencia para nuestra población de estudio con el propósito de contrastarlos con los predichos por el modelo propuesto en el presente estudio (modelo mixto con intercepto aleatorio) para evaluar las curvas de crecimiento pulmonar de nuestros niños en el rango de 3 a 9 años de edad. Se utilizaran las resistencias y reactancias a frecuencia 6 por ser la frecuencia en donde sobresalen los resultados finales de nuestro trabajo y los más próximos a la frecuencia 5, uno de los reportados por INER.

Las ecuaciones propuestas por INER para calcular los valores de referencia de Rr5 y Xr5 para niños y adolescentes sanos por sexo son:

Para Niños (masculino)

$$Y_{Rr5} = (-0.636 * X_{\log_{10}(\text{edada})}) + (99.506 * X_{(\frac{1}{\text{tallacm}})}) + 0.443$$

$$Y_{Xr5} = (0.228 * X_{\log_{10}(\text{edada})}) + (-46.787 * X_{(\frac{1}{\text{tallacm}})}) - 0.068$$

Para Niñas (femenino)

$$Y_{Rr5} = (-0.736 * X_{\log_{10}(\text{edada})}) + (78.861 * X_{(\frac{1}{\text{tallacm}})}) + 0.702$$

$$Y_{Xr5} = (0.309 * X_{\log_{10}(\text{edada})}) + (-42.906 * X_{(\frac{1}{\text{tallacm}})}) - 0.185$$

En la Figura 1, se presentan los valores predichos de resistencia y reactancia a frecuencia 5 y 6, los calculados a partir de las ecuaciones del INER (Rr5 y Xr5) y los generados a partir del modelo propuesto en el presente estudio (Rr6 y Xr6).

Previo al cálculo del CCC, se seleccionó aleatoriamente una medición de resistencia y reactancia a frecuencia 5 y 6 por niño (n=811) con la intención de asegurar independencia entre las observaciones.

En las gráficas donde se compara el grado de acuerdo entre los valores Rr5 (estándar de oro) y Rr6 con respecto a la línea de concordancia perfecta se puede observar la presencia de un sesgo ascendente constante, solo se visualiza un desplazamiento con pequeñas variaciones aleatorias, error sistemático. Los valores de Rr5 no concuerdan con los valores de Rr6, en menor y mayor medida, e caso más extremo se lo tienen los niños en la reactancia y resistencia. En el caso de la Rrs en niños y niñas, el límite inferior del CCC (Li_{pc}) fue 0.839 y 0.769, respectivamente, por lo que se considera una pobre fuerza de concordancia ($Li_{pc} < 0.90$) mientras que en la reactancia en ambos sexos esta fue escasa, aunque la precisión en todos los casos fue del 99%, es importante resaltar que esta medida no considera magnitud ni escala de medición. (Ver Cuadro 1 y 2; Figura 2.1 y 3.1)

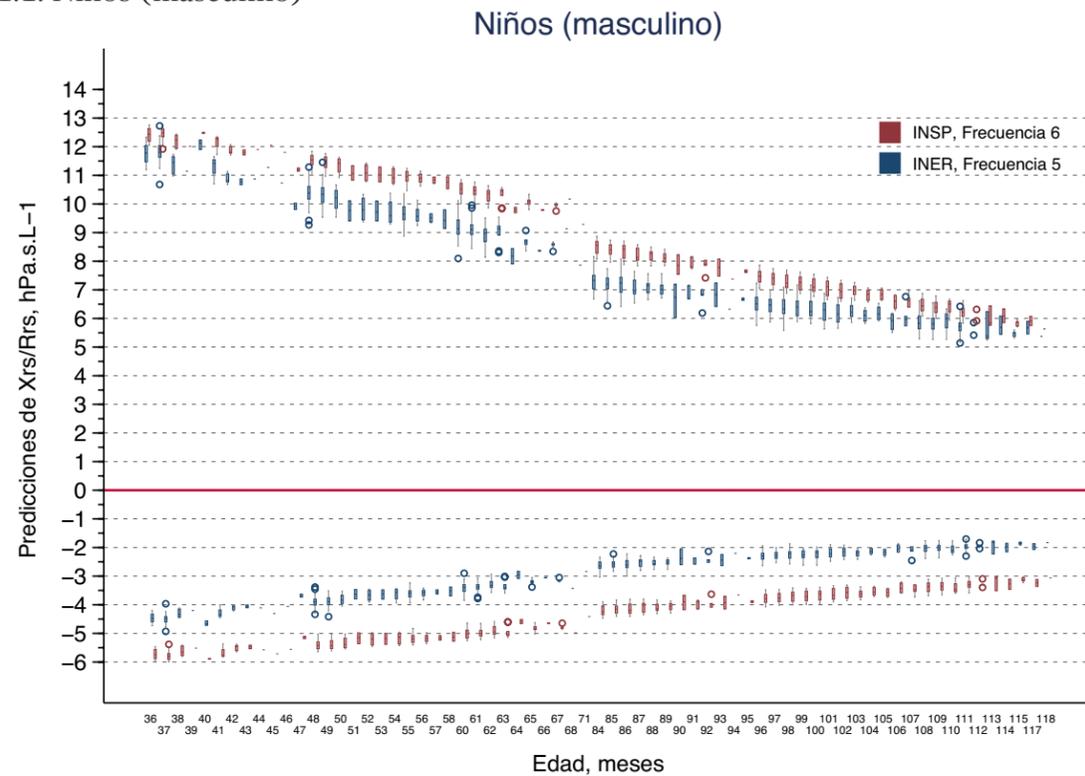
En el grupo de los niños, el promedio de las diferencias entre los valores de resistencia fue de -1.0 ± 0.3 hPa.s.L-1 y en las niñas de -1.3 ± 0.3 hPa.s.L-1, con respecto a las reactancias estas diferencias promedio fueron de 1.5 ± 0.1 en niños y 1.4 ± 0.1 en niñas, al igual en todas se puede apreciar que se no se trata de un error aleatorio sino sistemático, nos limitamos a describir las diferencias y no presentamos los límites de confianza dado que no se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianza ni el de normalidad en las diferencias. (Ver Cuadro 1 y 2; Figura 2.1 y 3.1)



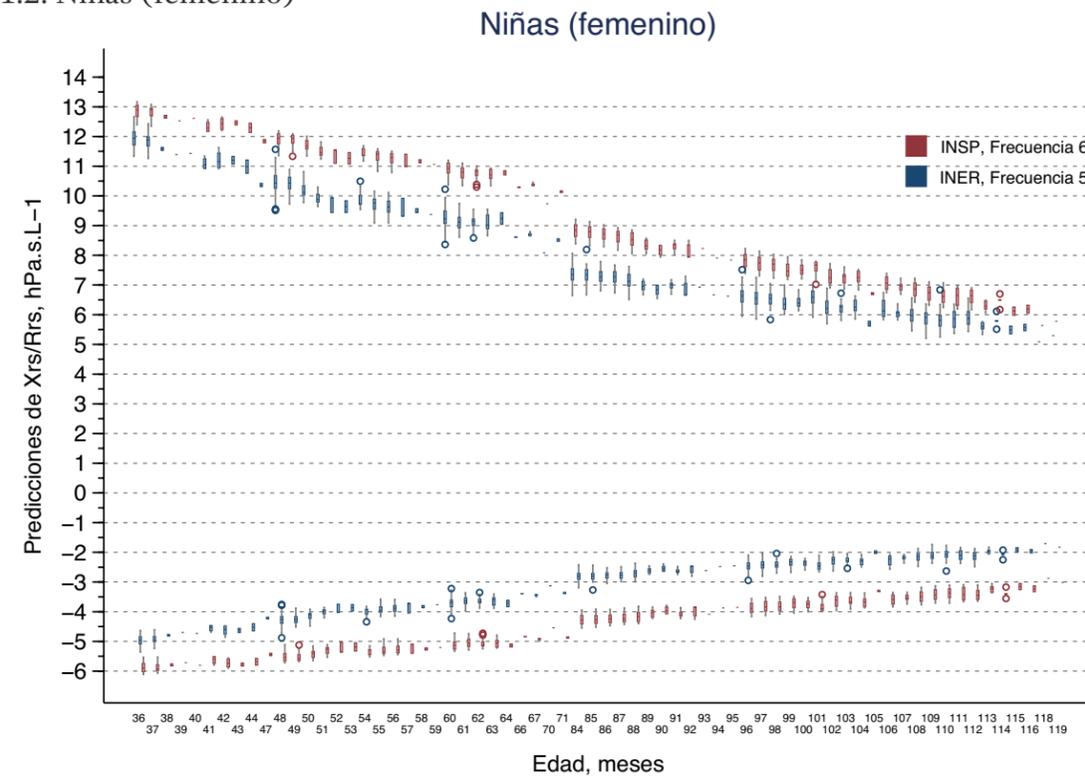


Figura 1. Valores predichos de Rr5 y Rr6

1.1. Niños (masculino)



1.2. Niñas (femenino)



Cuadro 1. En niños, medidas de reproducibilidad, precisión y exactitud entre medidas oscilométricas a frecuencia 5 y 6 Hz proveniente de 2 fuentes*

	Valor	(IC95%)	P valor
Resistencia: Rr5 vs Rr6			
Correlación de concordancia ($\rho_c = \rho C_s$)	0.857	(0.839, 0.874)	<0.001
Correlación de Pearson (ρ)	0.990		<0.001
Coefficiente de corrección del sesgo ($C_s = \frac{\rho_c}{\rho}$)	0.866		
Diferencia promedio (Desviación Estándar)	-1.048(0.295)		
Reactancia: Xr5 vs Xr6			
Correlación de concordancia (ρ_c)	0.348	(0.317, 0.378)	<0.001
Correlación de Pearson (ρ)	0.991		<0.001
Coefficiente de corrección del sesgo ($\frac{\rho}{\rho_c}$)	0.351		
Diferencia promedio (Desviación Estándar)	1.499(0.106)		

Medida de precisión= ρ ,

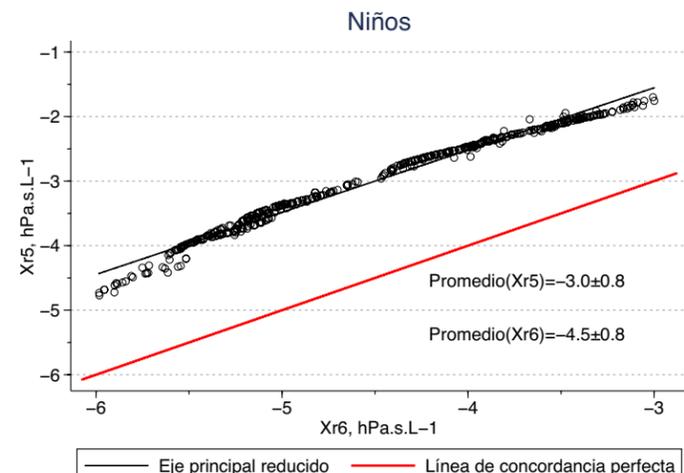
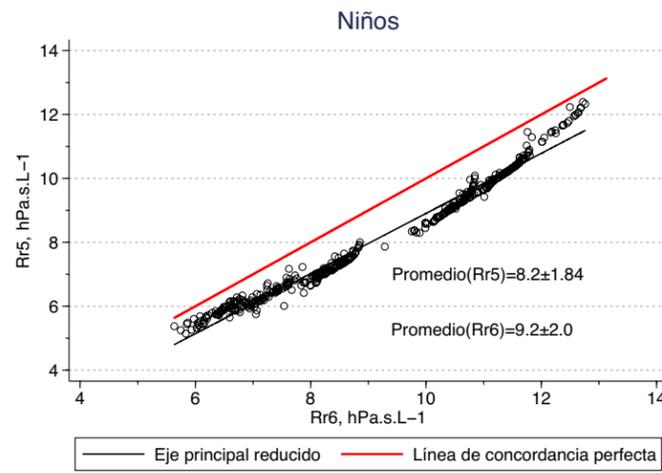
Medida de exactitud= C_s

* Mediciones de Rr5 y Xr5 provenientes del INER y, Rr6 y Xr6 del presente estudio.

Figura 2. Concordancias y diferencias entre los valores de reactancia y resistencia en niños

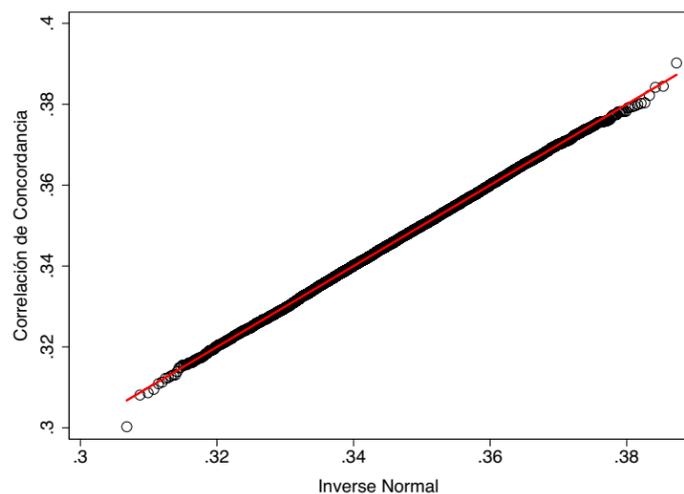
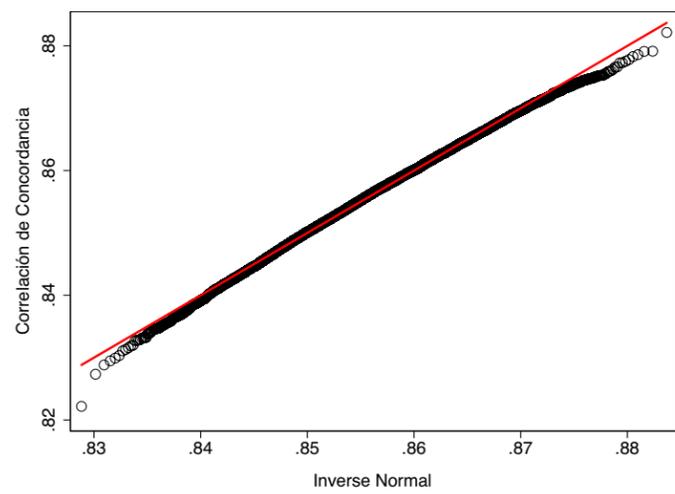
2.1 Resistencia (Rrs)

2.2 Resistencia (Xrs)



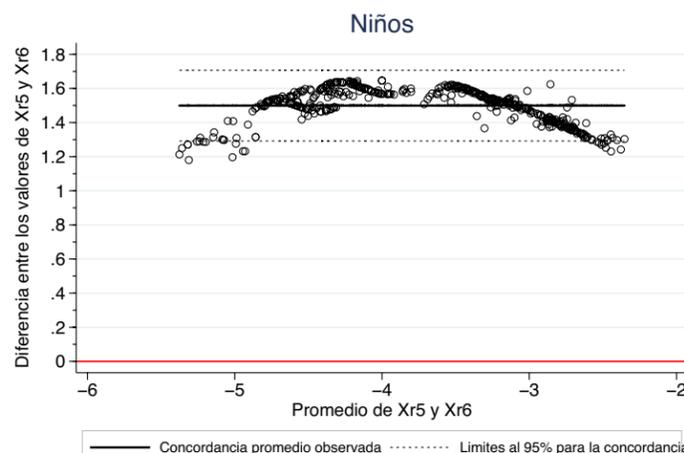
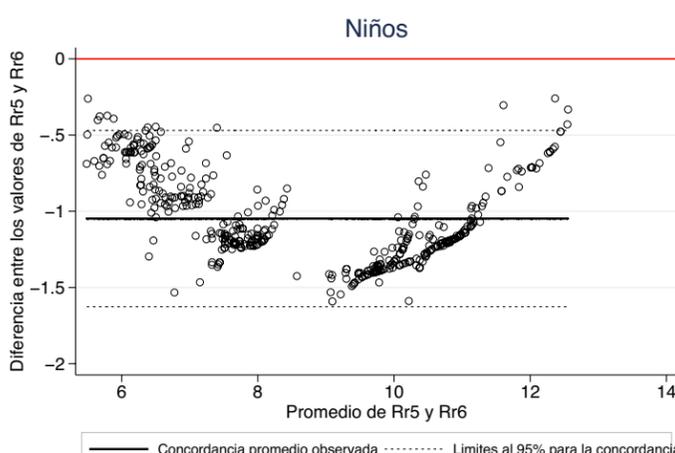
2.1 (a)

2.2 (a)



2.1 (b)

2.2 (b)



2.1 (c)

2.2 (c)

Cuadro 2. En niñas, medidas de reproducibilidad, precisión y exactitud entre medidas oscilométricas a frecuencia 5 y 6 Hz proveniente de 2 fuentes*

	Valor	(IC95%)	P valor
Resistencia: Rr5 vs Rr6			
Correlación de concordancia ($\rho_c = \rho C_s$)	0.793	(0.769, 0.818)	<0.001
Correlación de Pearson (ρ)	0.990		<0.001
Coefficiente de corrección del sesgo ($C_s = \frac{\rho_c}{\rho}$)	0.801		
Diferencia promedio (Desviación Estándar)	-1.325(0.307)		
Reactancia: Xr5 vs Xr6			
Correlación de concordancia (ρ_c)	0.428	(0.392, 0.463)	<0.001
Correlación de Pearson (ρ)	0.990		<0.001
Coefficiente de corrección del sesgo ($\frac{\rho}{\rho_c}$)	0.432		
Diferencia promedio (Desviación Estándar)	1.348 (0.133)		

Medida de precisión= ρ ,

Medida de exactitud= C_s

* Mediciones de Rr5 y Xr5 provenientes del INER y, Rr6 y Xr6 del presente estudio.

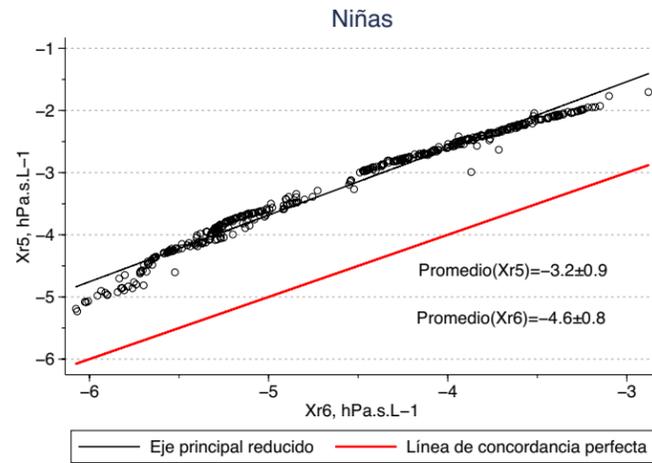
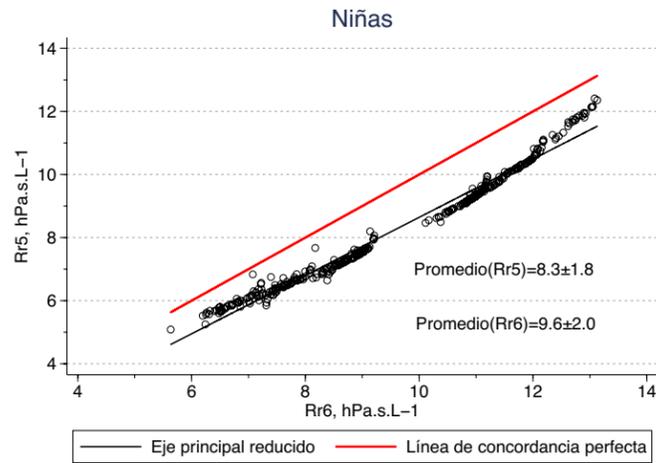




Figura 3. Concordancias y diferencias entre los valores de reactancia y resistencia en niñas

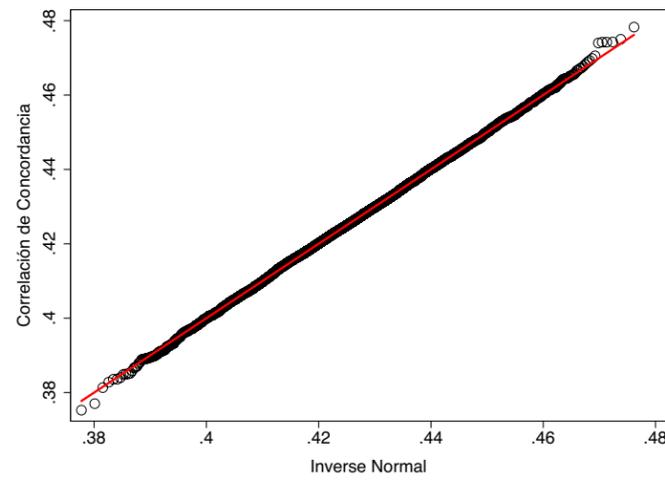
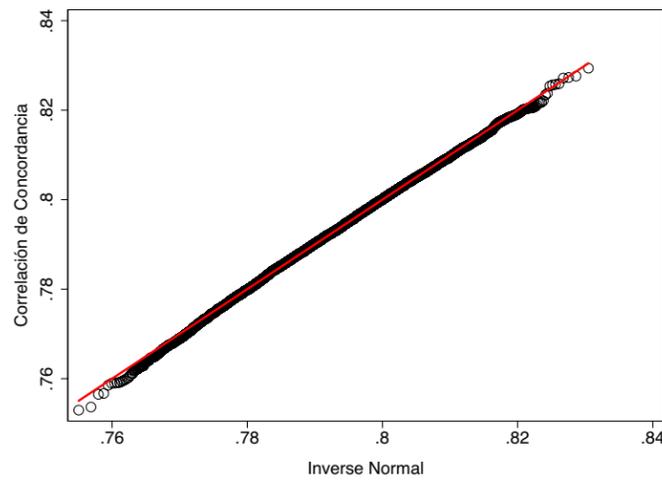
3.1 Resistencia (Rrs)

3.2 Resistencia (Xrs)



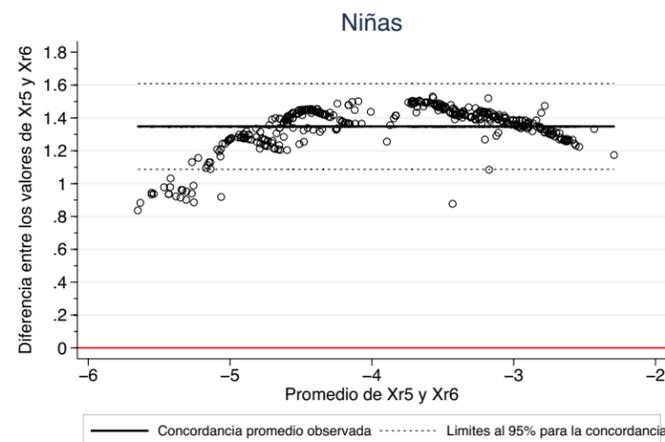
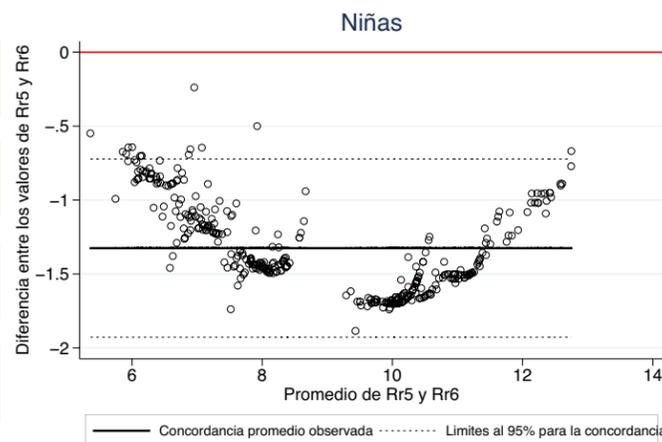
3.1 (a)

3.2 (a)



3.1 (b)

3.2 (b)



3.1 (c)

3.2 (c)

Referencias

Barnhart Huiman X. 2002. "Overall Concordance Correlation Coefficient for Evaluating Agreement Among Multiple Observers" 58 (4): 1020–27.

Cortes-Reyes E, Rubio-Romero, y Gaitan-Duarte H. 2010. "Métodos Estadísticos de Evaluación de la Concordancia y la Reproducibilidad de Pruebas Diagnósticas." 61 (3): 247–55.

Gochicoa-Rangel, L., L. Torre-Bouscoulet, D. Martinez-Briseno, L. Rodriguez-Moreno, G. Cantu-Gonzalez, y M. H. Vargas. 2015. "Values of Impulse Oscillometry in Healthy Mexican Children and Adolescents". *Respiratory Care* 60 (1): 119–27. <https://doi.org/10.4187/respcare.03374>.

Lin L. 2000. "A note on the concordance correlation coefficient" 56: 324–25.

Lin, L. I. 1989. "A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility". *Biometrics* 45 (1): 255–68.

McBride GB. 2005. "A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient" HAM2005-062.

ANEXO 4



ESTIMACIONES Y PREDICCIONES

Esta parte se incluye con la intención de comparar los diferentes resultados de las medidas oscilométricas realizadas, solo abordaremos el caso de resistencia a frecuencia 6 Hz (Rr6). Por lo que en el Cuadro A1 se presentan los resultados de diferentes modelos:

- 1.1. Modelo de componentes de varianza, 14.2% de la varianza total de las mediciones de Rr6 está representado por el nivel niño (es decir, nivel 2) por lo que sugiere incorporar en el modelo la parte aleatoria en la constante, intercepto aleatorio.
- 1.2. Modelo con intercepto aleatorio, modelo propuesto, considerando todas las observaciones (N=811). Se utilizó para describir las curvas de crecimiento pulmonar.
- 1.3. Modelo con intercepto aleatorio, modelo reducido (N=184), sólo considera a los niños involucrados en el modelo final que evalúa la relación entre función pulmonar y ftalatos.
- 1.4. Modelo con intercepto aleatorio, generado a partir de una simulación con 1000 muestras de tamaño 822.

Como se puede observar en el cuadro A1, las estimaciones de los coeficientes asociados al tiempo de seguimiento provenientes de las variantes de los modelos mixtos con intercepto aleatorio presentados son muy parecidos. Una diferencia de 0.13 hPa.s.L-1 en los hombres con respecto a las mujeres se presentó al comparar el modelo propuesto (N=811 sujetos) versus el modelo reducido que contempló 182 niños durante el seguimiento, otra fue identificada en el coeficiente asociado al percentil de la talla para la edad pero en menor medida, resultados de la simulación versus los otros modelos.

En la figura A1 se muestra el seguimiento de la Rr6 con respecto a la edad de los valores observados y de los valores predichos a partir de un modelo mixto con intercepto aleatorio que solo utiliza las mediciones de la primera etapa para la predicción de los valores de Rr6. Este modelo no se presenta en el cuadro A1 y no se consideraron sus estimaciones en la asociación final del proyecto, función pulmonar y ftalatos, debido a que se perdía la variabilidad de las observaciones de la segunda etapa. Por lo que se pensó en una estrategia que permitiera captar la variabilidad de todas las observaciones captadas durante el seguimiento, proponiendo una ponderación en las mediciones de la segunda etapa y posteriormente un modelo mixto con intercepto aleatorio “Modelo propuesto”.





En la figura A2, se presentan resultados de manera gráfica de 2 modelos, el propuesto y el reducido, con el objeto de compararlos de manera visual su similitud notada en los números del cuadro A1, la normalidad de los residuos, la tendencia y variabilidad en el tiempo de las mediciones de Rr6 y como se controla esta última y las predicciones de Rr6 para diferentes edades en el tiempo e seguimiento.

Cuadro A1. Estimaciones de modelos mixtos para resistencia a frecuencia 6 Hz (Rr6).

Estimador	Modelo de componentes de varianza		Modelo con intercepto aleatorio				
	Valor (IC95%)	P valor	Modelo propuesto		Modelo reducido		Simulación
			Valor (IC95%)	P valor	Valor (IC95%)	P valor	
N, n	811(2651)		811(2651)		184(756)		811(3244)
\bar{n} (min-max)	3.7(1-6)		3.7(1-6)		4.1(1-6)		4
β_0	9.3(9.1, 9.4)	<0.001	16.1(15.8, 16.5)	<0.001	16.2(15.5, 16.9)	<0.001	16.1(0.2)
$\beta_{(sexo, masculino)}$			16.1(15.8, 16.5)	0.007	-0.48(-0.95, -0.010)	0.045	-0.32(0.23)
β_{zlenp}			-0.01(-0.01, -0.003)	<0.001	-0.01(-0.02, -0.002)	0.002	-0.004(0.13)
$\beta_{(edad, meses)}$			-0.08(-0.09, 0.08)	<0.001	-0.08(-0.09, 0.07)	<0.001	-0.08(0.08)
$Var(\beta_0)$	1.6(1.2, 2.1)		1.7(1.4, 2.1)		1.3(0.8, 1.9)		
$Var(\epsilon)$	9.8(9.2, 10.4)		5.5(5.2, 5.8)		5.3(4.7, 5.9)		
ICC, %	14.2(10.9, 18.3)						

Mediciones observadas de la 1ª etapa del estudio (3, 4 y 5 años de edad) y ponderadas de la 2ª etapa (7,8 y 9 años). zlenp= percentiles del z-score de la talla para la edad, ICC=Correlación intraclass. N=Sujetos, n=Mediciones y \bar{n} = Promedio de mediciones repetidas de Rr6 durante el seguimiento.



Figura A1. Observados versus predichos a partir de las mediciones de la primera etapa (3, 4 y 5 años de edad)

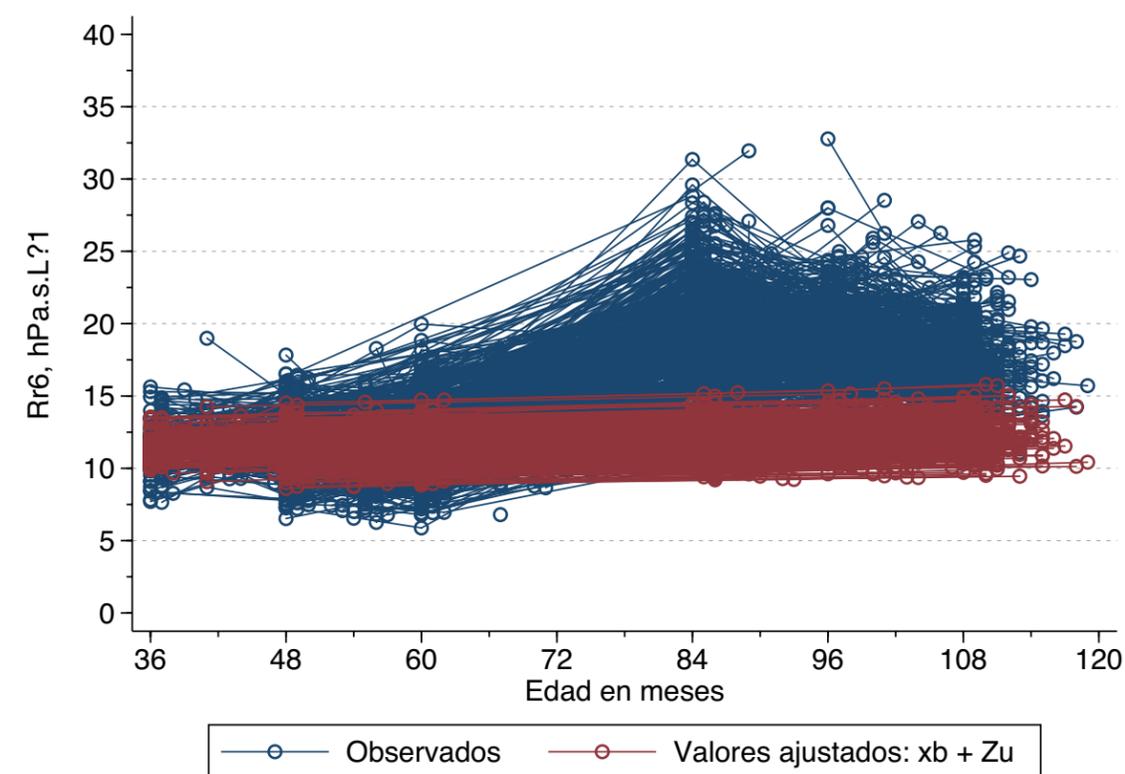
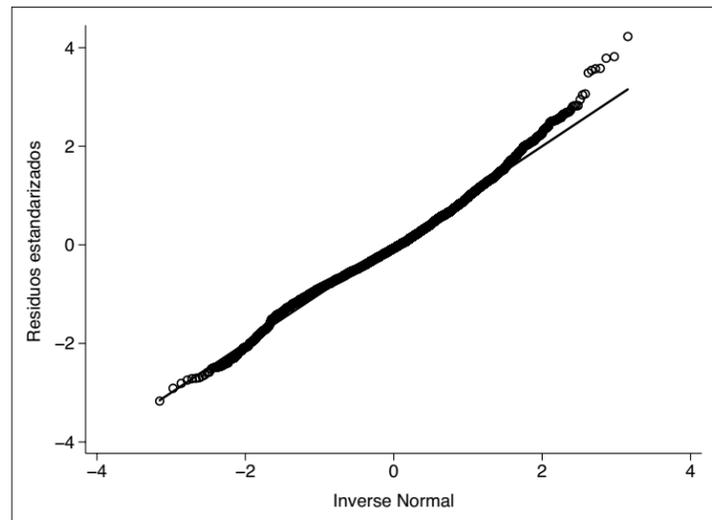




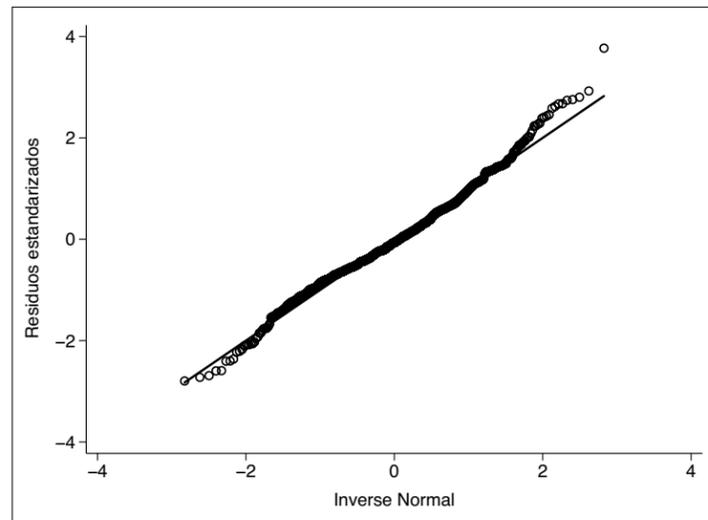
Figura A2. Modelos mixtos para Rr6*

Modelos con 822 sujetos

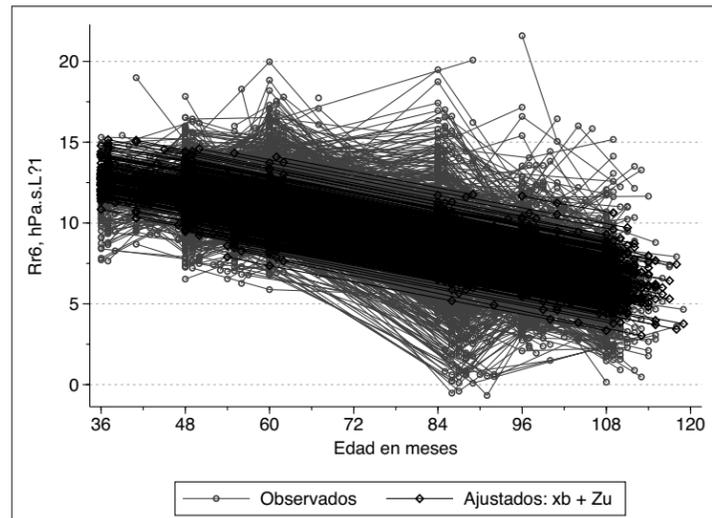


(1.2)

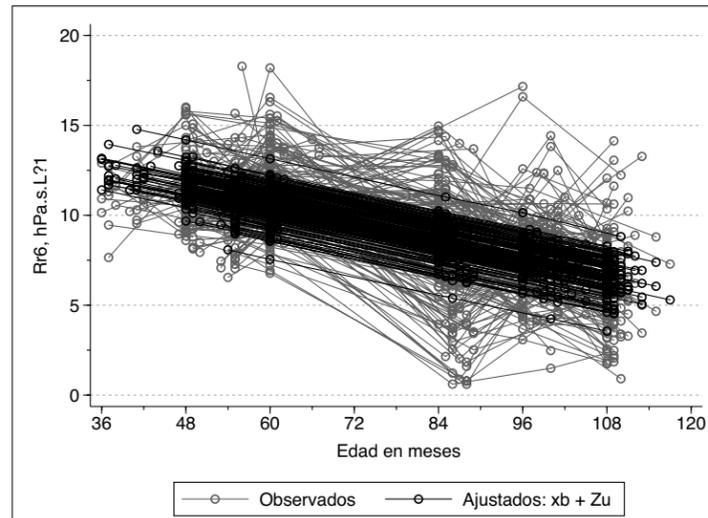
Modelos con 184 sujetos



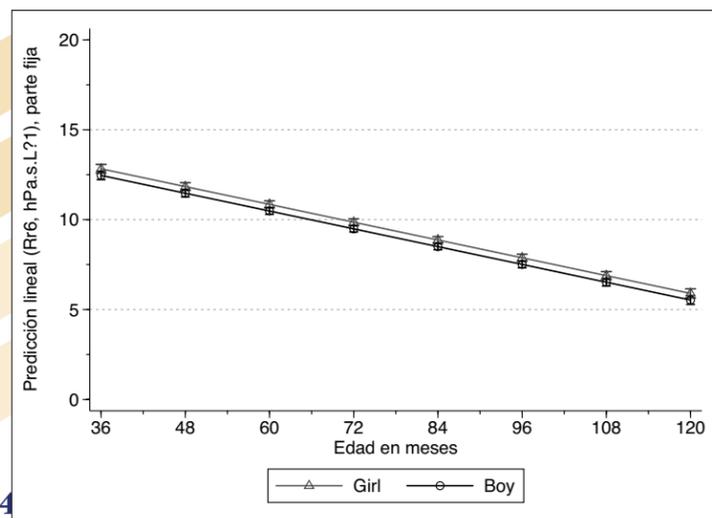
(2.2)



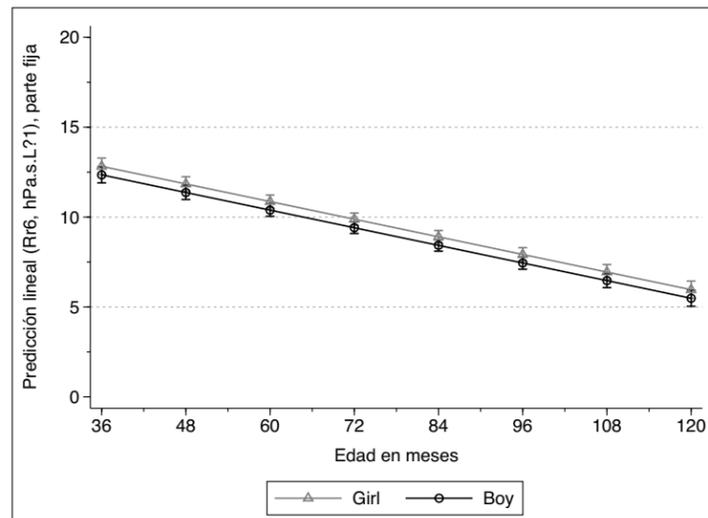
(1.3)



(2.3)



(1.4)



(2.4)

1. Simulación

A partir del modelo mixto con intercepto aleatorio, propuesto previamente para describir las curvas de crecimiento de función pulmonar se realizó una análisis de simulación.

Y_ij = (beta_0 + u_0j) + beta_1 x_1ij + beta_2 x_2ij + beta_3 x_3ij + epsilon_ij..... (M1)

Donde Y_ij es la respuesta, la Rr6; (beta_0 + u_0j) es el intercepto específico del niño, x_1ij es la covariable de sexo, x_2ij es la covariable de percentil del z-score de la talla para la edad, beta_3 x_3ij la correspondiente al tiempo (edad del niño en meses) y epsilon_ij es el componente de error específico del tiempo.

La simulación se realizó con el propósito de evaluar el rendimiento del modelo (M1), examinando el sesgo, la exactitud y la cobertura del coeficiente de regresión asociado al tiempo de seguimiento, edad de los niños en meses, derivado a que el propósito del modelo era describir las curvas de crecimiento pulmonar. Los métodos lineales asumen una distribución normal en la variable resultado y cuando esto no se cumple la presencia de un sesgo en los parámetros de regresión está presente.

Se realizó un estudio de simulación en el que se simularon 1000 situaciones del modelo mixto con intercepto aleatorio, M1. Los parámetros de M1, coeficientes y varianzas (varianza del intercepto aleatorio y varianza residual), fueron considerados como verdaderos y la variable de respuesta distribuida normal. El análisis de simulación consideró 4 mediciones (una de referencia y tres de seguimiento) en 811 niños. El sesgo estandarizado superior al 40% indica un impacto adverso en la eficiencia, cobertura y tasas de error en la estimación del parámetro de interés, en nuestro caso el sesgo obtenido fue mínimo, 1.47%. Se consideró un intervalo de confianza al 95% por lo que la cobertura ideal debería tener un puntaje del 95%. Se observó una cobertura del 95.2%, por lo que no tenemos problemas de cometer erro tipo I ni II, en la estimación de parámetro asociado al tiempo de seguimiento. Todos los análisis fueron realizados con STATA 14.

* Mediciones observadas de la 1ª etapa y ponderadas de la 2ª etapa.



Cuadro A2. Medidas de rendimiento para evaluar el coeficiente del tiempo (edad en meses del niño) en el modelo M1.

Criterios de evaluación	Formula	Valor(EE)
Sesgo	$\bar{\hat{\beta}} - \beta$	-0.001(0.003)
Error estándar empírico	$EE(\hat{\beta})$	0.085(0.002)
Porcentaje de sesgo estandarizado	$\left(\frac{\bar{\hat{\beta}} - \beta}{EE(\hat{\beta})}\right) * 100$	1.47
Precisión: Error cuadrático medio	$(\bar{\hat{\beta}} - \beta)^2 + (EE(\hat{\beta}))^2$	0.085(3.8e-05)
Cobertura, % de veces que el IC95% del coeficiente de regresión calculado, $\hat{\beta}$, incluyó el coeficiente de regresión "verdadero", β , en las 1000 simulaciones.	$\hat{\beta}_i \pm Z_{1-(\alpha/2)} EE(\hat{\beta}_i)$	95.2(0.7)

β =el verdadero valor para la estimación de interés. $\bar{\hat{\beta}} = \sum_{i=1}^B \frac{\hat{\beta}_i}{B}$, B= número de simulaciones. $\hat{\beta}_i$ =estimador de interés dentro de cada uno de las $i=1,2,\dots,B$ simulaciones. $EE(\hat{\beta})$ = Error estándar empírico del estimador de interés sobre todas las simulaciones. $EE(\hat{\beta}_i)$ = Error estándar de estimador de interés dentro de cada simulación y $Z_{1-(\alpha/2)}$ es el $1 - (\alpha/2)$ cuantil de la distribución normal estándar.

Por tanto, consideramos que la validez externa de nuestro estudio se vio afectada por la falta de potencia y no por el error de medición que se cometió en las mediciones de función pulmonar. Por tanto, la incertidumbre en los resultados obtenidos en la asociación entre ftalatos y función pulmonar está presente.

ANEXO 5



MODELOS DE CRECIMIENTO, PROPUESTAS PARA CORREGIR UN SESGO EN LA MEDICIÓN.

Antecedentes

La calidad de la información de cualquier estudio es determinante para la obtención de resultados y conclusiones válidas. Por lo que extremar el cuidado de los procesos de obtención de información es determinante para minimizar el error en las mediciones y de esta manera obtener resultados confiables.

El impacto de los errores está asociado al momento en el que ocurren; por ejemplo, durante la obtención de datos el efecto es mayor, dado que en la mayoría de los casos no se puede corregir. Sin embargo, cuando el error proviene de mediciones distorsionadas en las que el tamaño y la dirección del error sistemático se conocen se puede hacer frente al error. Una forma es la re-calibración del equipo o instrumento de medición para la obtención de los valores individuales y otra, la rectificación mediante métodos estadísticos. Otro tipo de error es el sesgo de selección que puede incluso tener un mayor impacto, ya que al no controlarse, afecta tanto la validez interna como la externa de un estudio. (1)

Los instrumentos de medición y los métodos analíticos generalmente están diseñados para ser precisos y reproducibles cuando se utilizan en condiciones similares, es decir, con el mismo protocolo. Dos posibles fuentes de diferencias sistemáticas que pueden ocurrir son el propio método de medición / análisis y la interferencia de otras sustancias presentes en el entorno medido. La reducción de estos errores en la investigación epidemiológica se puede realizar siguiendo las recomendaciones del fabricante / laboratorio, calibrando el instrumento bajo las condiciones que se miden, utilizando muestras blanco, y siguiendo otros procedimientos de control de calidad. (1) Por ejemplo, en el caso de un equipo de laboratorio, puede haber cambios en la precisión en las mediciones en el tiempo cuando no se estandariza y no se recalibra el equipo de laboratorio, es probable que se introduzcan datos a medida que avanza el tiempo calendario. En estudios a largo plazo como el de una cohorte, el instrumento utilizado para la medición puede cambiar con el tiempo y el agente de interés en muestras biológicas puede estar sujeto a degradación. Otra fuente de error ocurre a medida que el personal encargado de la recolección de datos y mediciones del estudio

adquiere más experiencia a lo largo del curso de éste, pudiendo incidir en cambios en el manejo de los procedimientos e instrumentos. (1)

En el área de salud se utilizan instrumentos basados en recomendaciones que buscan la reproducibilidad, precisión y validez. Esto permite evaluar el estado de salud de las personas, un ejemplo de ello es la evaluación de la función pulmonar, donde el instrumento de medición es específico de acuerdo al sexo, edad y condición de salud (asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC). En este contexto la técnica de oscilación forzada (resistencia y reactancia pulmonar a varias frecuencias) ofrece una ventaja indiscutible frente a la espirometría cuando se trata de medir la función pulmonar en niños preescolares, debido a que es una técnica que evalúa la parte mecánica del pulmón sin necesidad de un esfuerzo de respiración por parte del paciente, se realiza durante la respiración continua y suave.

En México, se han propuesto modelos para obtener valores de referencia de la resistencia pulmonar ($Rr5$) para población de niños y adolescentes mexicanos abarcando edades de 2.7 a 15.4 años.(2) Estos modelos pueden ser utilizados para contrastar nuevos modelos que surjan a partir de otros datos. Por lo que el objetivo de este trabajo es ofrecer alternativas para corregir un sesgo en la medición y para ello se toman datos longitudinales que fueron obtenidos para estimar curvas de crecimiento pulmonar y que presentaron un error sistemático en una medición.

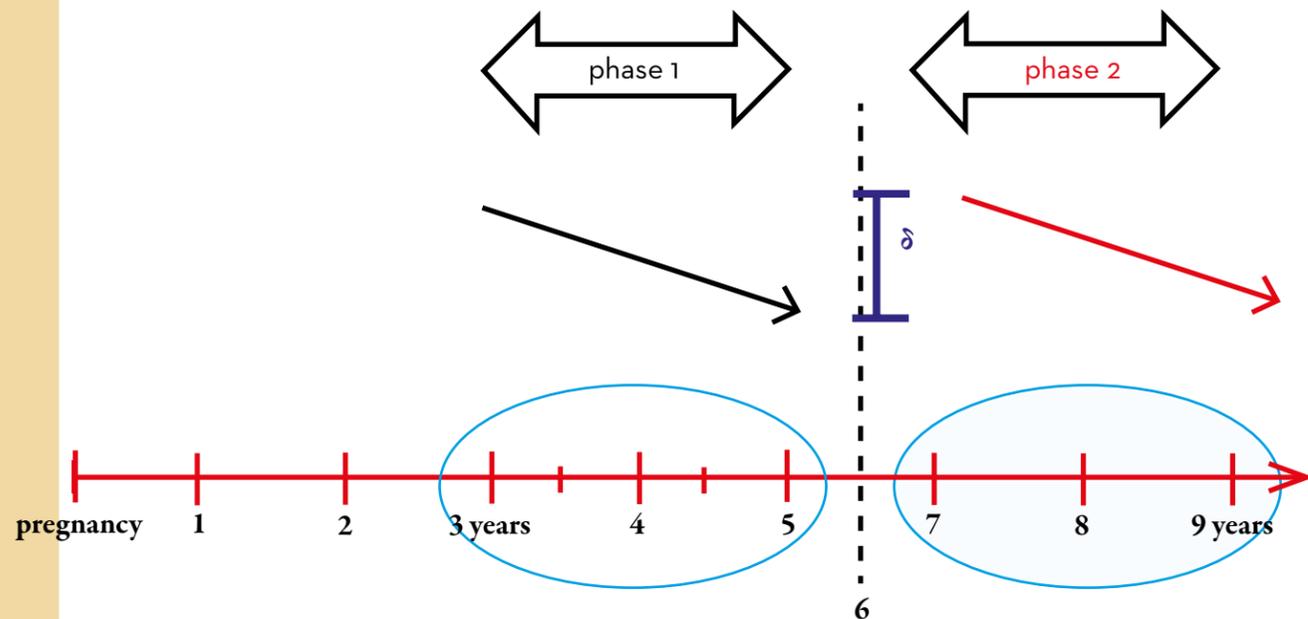
Métodos

A partir de un estudio de cohorte al nacimiento se obtuvieron mediciones anuales de reactancia y resistencia, con el propósito de evaluar la función pulmonar en niños sanos, de los 3 hasta los 9 años de edad. Las mediciones se obtuvieron durante dos períodos o etapas, la primera abarcó los 3, 4 y 5 años de edad y la segunda los 7, 8 y 9 años, entre una etapa y otra el equipo estuvo apagado por un año. Las mediciones de la segunda etapa se vieron afectadas por un error sistemático que produjo una sobreestimación en las mediciones. (Figura 1)





Figura XX. Diagrama del diseño del estudio



Propuesta para corregir el error

La sobreestimación de las mediciones puede ser corregida de varias maneras, en este trabajo nos enfocamos en la implementación de una alternativa estadística con el propósito de estimar el desfase observado de las mediciones de la resistencia pulmonar a frecuencia 6 (Rr6) “delta (δ)”, que permita trasladar los valores observados sobreestimados a valores alineados con los de la primera etapa, todo ello sin perder variabilidad.

A partir de este objetivo, se proponen tres escenarios que difieren en la técnica estadística utilizada para corregir el error. Cada escenario permitió corregir los datos observados sobreestimados y utilizarlos, junto con los datos de la primera fase, en el desarrollo de modelos de curvas de crecimiento pulmonar. Finalmente, se utilizaron las mediciones de resistencia a frecuencia 6 Hertz realizadas durante todo el periodo de estudio, desde los tres hasta los 9 años de edad, para evaluar el rendimiento de los tres modelos obtenidos.



Analytic strategy

Table 1. Analytic strategy of assessment performance

Scenario	→ The analysis development →		
	Stage 1: Model to correct the measurement error	Stage 2: Model to estimate the growth curve	Stage 3: Performance evaluation
S1	Mixed model with intercept and random slope	Mixed model with intercept random	bias, accuracy and coverage
S2	Mixed discontinuous model		bias, accuracy and coverage
S3	Mixed discontinuous model plus an error term		bias, accuracy and coverage

Escenario 1: Modelo mixto con intercepto y pendiente aleatoria.

Step 1. Se corrigió el error observado en las mediciones de resistencia a frecuencia 6 Hertz (Y_{ij2}) de la segunda etapa ($k=2$) del estudio y posteriormente se estimó la media de la resistencia ($\hat{\mu}_{(sex,pzsh eig)}$) por sexo y percentiles del z-score de la talla para la edad (percentiles: < 3, [3-15), [15-85), [85-97), 97 y más) a partir de modelos mixtos con intercepto aleatorio y los percentiles del z-score de la talla para la edad como pendiente aleatoria, matriz de covarianza sin estructura, ajustado por sexo y edad como variable tiempo de seguimiento. Utilizando las j-mediciones de la primera etapa del estudio (3, 4 y 5 años).



$$Y_{ij}=(\beta_0+u_{0j})+\beta_1 x_{1ij}+(\beta_2+u_{2j}) x_{2ij}+\beta_3 x_{3ij}+\varepsilon_{ij}..... \text{Modelo 1 (m1)}$$

Donde Y_{ij} es la respuesta, la Rr6; (β_0+u_{0j}) el intercepto específico del niño; x_{1ij} es la covariable de sexo, x_{2ij} la covariable de percentil del z-score de la talla para la edad por lo que (β_2+u_{2j}) representa la variabilidad que existe entre los percentiles de la talla de los niños en función de la Rr6, $\beta_3 x_{3ij}$ la correspondiente al tiempo (edad del niño en meses) y ε_{ij} es el componente de error específico del tiempo.

Step 2. A los valores observados de la segunda etapa se les resta la media estimada ($Y_{ij2}-\hat{\mu}_{(sex,pzsheig)}$), con el propósito de corregir los valores observados sobreestimados a partir de trasladarlos y alinearlos con los de la primera etapa, conservando la variabilidad de las mediciones.

Escenario 2. Modelo mixto discontinuo

Al observar el desfase (brinco) de las mediciones repetidas de Rr6 (Y_{ijk}) de una etapa a otra surge la propuesta de estimar el desfase a partir de un modelo de crecimiento discontinuo.

Step 1. Se estimó la magnitud de la diferencia “delta”(Δ) de las mediciones de Rr6 de una etapa a otra a través de un modelo discontinuo que considera diferente estructura de covarianza, antes y después del desfase. (3)

$$Y_{ij}=(\beta_0+u_{0j})+\beta_1 x_{1ij} + \beta_2 x_{2ij} + \beta_3 x_{3ij}+\varepsilon_{ij}..... \text{Modelo 2 (m2)}$$

Donde Y_{ij} es la respuesta, la Rr6; (β_0+u_{0j}) es el intercepto específico del niño, x_{1ij} es la variable de etapa, mide la transición de una etapa a otra, x_{2ij} es variable de recuperación, grado con el cual el evento altera la pendiente, $\beta_3 x_{3ij}$ la correspondiente al tiempo (edad del niño en meses) y ε_{ij} el componente de error específico del tiempo. El valor del coeficiente $\hat{\beta}_1$ corresponde al valor de “delta”(δ) .

Step 2. La rectificación de las mediciones de la segunda fase se hizo a partir de la diferencia entre las mediciones observadas en la segunda fase y la delta.

$$Y'_{ij2}=Y_{ij2}-\delta$$

Escenario 3. Modelo mixto discontinuo más un término de error

La propuesta se basa en el modelo mixto discontinuo anterior (m2), adicionando un término de error aleatorio atribuido a la delta. La incorporación de este término con-



sidera la variabilidad en la estimación del propio salto (delta).

$$Y'_{ij2}=Y_{ij2}-\delta+\varepsilon \quad \delta>0$$

$$\varepsilon\sim N(0,\sigma^2) \text{ y } \delta\sim N(\delta,\sigma^2)$$

Estimación de la curva de crecimiento pulmonar

La estimación se realizó a partir de un modelo mixto con intercepto aleatorio con matriz de covarianza sin estructura, ajustado por sexo, percentiles del z-score de la talla para la edad y la edad como variable tiempo de seguimiento. Otras variables como el peso, la exposición al humo de tabaco y la presencia de síntomas respiratorios fueron evaluadas como confusoras o modificadoras de efecto, sin resultar significativas ($p>0.05$). Cada modelo fue evaluado a través de sus residuos y seleccionado con el criterio de información de Akaike (AIC). (4)

$$Y_{ij}=(\beta_0+u_{0j})+\beta_1 x_{1ij} + \beta_2 x_{2ij} + \beta_3 x_{3ij}+\varepsilon_{ij}..... \text{Modelo 3 (m3)}$$

Donde Y_{ij} es la respuesta, la Rr6; (β_0+u_{0j}) el intercepto específico del niño; x_{1ij} es la covariable de sexo, x_{2ij} la covariable de percentil del z-score de la talla para la edad, $\beta_3 x_{3ij}$ la correspondiente al tiempo (edad del niño en meses) y ε_{ij} es el componente de error específico del tiempo.

Evaluación del rendimiento de los métodos utilizados

Se realizó una evaluación de desempeño en una submuestra de 801 participantes, evaluando los criterios de reproducibilidad, precisión y exactitud a partir de las medidas: el coeficiente de correlación de concordancia (CCC), la correlación de Pearson y coeficiente de corrección de sesgo. (5) para los tres escenarios utilizando solo una medición de \hat{R}_{r6} seleccionada aleatoriamente. Con el propósito de obtener la estimación de los valores de referencia (Rr5) se utilizaron los datos de edad y talla de estos mismos 801 niños.

Las estimaciones resultantes en cada escenario representan la curva de crecimiento pulmonar (\hat{R}_{r6}) y fueron contrastadas con los valores de referencia (Rr5) obtenidos de las siguientes ecuaciones:



Para niños (masculino)

$$\widehat{Rr}_{sm} = (-0.636 * \log_{10}(\text{Ageyears})) + (99.506 * ()) + 0.443$$

Para niñas (femenino)

$$\widehat{Rr}_{sf} = (-0.736 * \log_{10}(\text{Ageyears})) + (78.861 * ()) + 0.702$$

Resultados

Características de la población de estudio

De los 801 niños que conformaron la muestra, 46.3% fueron mujeres. El promedio de talla al inicio del estudio (3 años de edad) fue de 102.7 ± 7.3 cm, y el de peso fue de 14.3 ± 6.0 kg. Considerando los percentiles de la puntuación de la talla para la edad, el promedio fue de 36.7 ± 25.8 y el promedio del percentil de la puntuación del peso para la edad fue de 42.9 ± 28.5 ; no hubo diferencias significativas entre sexo. Con relación a la exposición al humo del tabaco dentro del hogar, 14.2% de las madres de los niños reportó haber fumado alguna vez en su vida, en 41.2% de los hogares alguna persona fuma dentro de casa y 38.5% de las parejas fuma. Por lo que respecta a la presencia de síntomas respiratorios en los niños 15 días antes de la visita al hospital, 27.4% de las madres manifestaron que sus hijos presentaron tos, tos seca 5.2%, tos con flema 6.7%, tos con infección en la garganta 11.2% y sibilancias 1.4% de los niños.

Mediciones de resistencia a frecuencia 6, Rr6, a través del tiempo

El número de niños durante el seguimiento del estudio fue incrementando, iniciando en 100 participantes a los 3 años de edad, hasta 801 niños al final del seguimiento a los 9 años de edad, obteniéndose en promedio 3.7 mediciones de Rr6 por niño. Un patrón decreciente no constante y un promedio de 11.3 hPa.s.L-1 fue observado en las mediciones de la Rr6 de los niños durante la primera etapa, de los 3 a los 5 años, mientras que en la segunda etapa este fue de 18.6 hPa.s.L-1. El desfase o diferencia que se observa es de hasta 11 hPa.s.L-1 en las mediciones de Rr6 de la segunda etapa versus la primera del estudio. (Figura 1)

Corrección del error de medición

Se observó, en los tres escenarios propuestos, una tendencia decreciente en las mediciones de Rr6 conforme los niños adquirieron más edad. En la segunda etapa del



estudio la resistencia pulmonar observada en los niños fue en promedio de 18.6 ± 3.2 hPa.s.L-1, al rectificar las mediciones se obtuvieron mediciones promedio de 7.4 ± 3.1 hPa.s.L-1 con el escenario 1, 10.8 ± 3.2 hPa.s.L-1 bajo el escenario 2 y 10.6 ± 4.5 hPa.s.L-1 en el 3. Siendo las más bajas, las mediciones rectificadas que resultaron de la metodología implementada en el escenario 1, seguidas del escenario 2 y 3, estas últimas con valores próximos entre sí, diferenciándose en una mayor variabilidad en las provenientes del escenario 3. (Figura 2)

Estimación de la curva de crecimiento pulmonar

Al estimar la curva de crecimiento pulmonar con respecto a la edad en el escenario 1, se obtuvo que la Rr6 decrece en promedio -0.082 hPa.s.L-1 (Intervalo de Confianza al 95% (IC95%): $-0.086, -0.079$) por cada incremento de un mes en la edad del niño y con la misma tendencia pero en diferente magnitud al considerar el escenario 2 y 3, -0.015 (IC95%: $-0.018, -0.011$) y -0.019 (IC95%: $-0.024, -0.014$), respectivamente. Un efecto negativo significativo ($p < 0.001$) se observó con los percentiles del z-score de la talla para la edad sobre la resistencia, y una diferencia significativa entre niñas y niños, siendo los niños los que mostraron mejor su función pulmonar (escenario 1: -0.348 (IC95%: $-0.602, -0.093$); escenario 2: -0.454 (IC95%: $-0.715, -0.194$) y en el escenario 3: -0.356 ($-0.662, -0.049$)). (Valores no mostrados). También se aprecia, que los valores estimados de Rr6, obtenidos en el escenario 1 son los que más se aproximan a los valores de referencia mexicanos, contrario a los obtenidos en los escenarios 2 y 3 (Figura 3).

Evaluación del rendimiento de los métodos utilizados

Para identificar cuál de los métodos empleados fue el mejor, se calculó la correlación de concordancia, la correlación de Pearson (medida de precisión), el coeficiente de corrección del sesgo (medida de exactitud) y las diferencias promedio entre las mediciones.

Al contrastar los valores estimados de Rr5 (gold standar) versus las mediciones estimadas Rr6 en cada uno de los escenarios, el mejor rendimiento para ambos sexos se obtuvo en el escenario 1. En niños, la precisión en el escenario 1 fue de 98.9% versus 80.2% en el escenario 2 y 82.6% en el escenario 3, la exactitud de 85.2% versus 17.7 y 22.2 y, en cuanto la reproducibilidad de los resultados de los escenarios 1, 2 y 3 se observó de 84.3% (IC95%: 82.7, 85.8), 14.2% (IC95%: 12.6, 16.0) y 18.3% (IC95%: 16.4, 20.4), respectivamente. Mientras que la diferencia promedio entre las mediciones contrastadas considerando los diferentes escenarios (1, 2 y 3) fue de 1.06 hPa.s.L-1 (IC95%: $-1.64,$



-0.49), -2.74 hPa.s.L⁻¹ (IC95%:-5.41, -0.08) y -2.69 hPa.s.L⁻¹ (IC95%:-5.15, -0.23), respectivamente. Un patrón similar fue observado al considerar al grupo de las niñas, la precisión en el escenario 1 fue de 99.1% *versus* 82.8% en el escenario 2 y 84.8% en el escenario 3, la exactitud de 80.7% *versus* 16.3 y 21.3 y, en cuanto la reproducibilidad de los resultados en los escenarios 1, 2 y 3 se observó de 80.0%(IC95%:78.1, 81.8), 13.5%(IC95%:11.9, 15.1) y 18.1%(IC95%:16.0, 20.1), respectivamente, y las diferencias promedio entre las mediciones fueron de de 1.32 hPa.s.L⁻¹ (IC95%:-1.92, -0.72), -3.14 hPa.s.L⁻¹ (IC95%:-5.85, -0.43) y -3.00hPa.s.L⁻¹ (IC95%:-5.49, -0.51) para los escenarios 1, 2 y 3 respectivamente. (Cuadro 1)

En la figura 4 se presenta gráficamente el proceso del análisis, primero las mediciones de Rr6 observadas, seguida de las mediciones de Rr6 rectificadas, mostrando finalmente la estimación de la curva de crecimiento pulmonar a partir de las mediciones de Rr6.

Discusión

En nuestro estudio se midió la función pulmonar a través de la resistencia y reactancia en niños. Sin embargo, estos se vieron afectados por un error de medición durante la segunda fase del estudio, 7, 8 y 9 años de edad. Si bien, un error de medición puede acarrear consecuencias graves e irreversibles, la importancia de reconocerlo, identificarlo y clasificarlo permite atenuar o subsanar el impacto cuando se trata de un error sistemático. En nuestro caso, estamos frente a un error sistemático, un sesgo de información ante una mala clasificación no diferencial o aleatoria por afectar por igual a todas las mediciones de los participantes durante la segunda fase del estudio, independientemente de su exposición (6); entre la fase 1 y 2 el equipo estuvo apagado por un lapso de un año, cuando se inició la segunda etapa el equipo i2M (Chess Medical, Belgium, marketed in Italy by Cosmed) no fue calibrado de la misma forma que al inicio de la primera fase, por lo que la fuente del error identificada es debida por la falta de control de calidad en la información, deficiente calibración del instrumento de medición en relación a las recomendaciones realizadas por la European Respiratory Society (ERS) para estandarizar la metodología y el equipo utilizado para técnica de oscilación forzada (FOT). (7)

Un error de este tipo compromete la validez interna del estudio y por ende conduce a una respuesta errónea a la pregunta de investigación (7). Ante esta situación se propusieron estrategias a partir de métodos estadísticos e epidemiológicos para resarcir



el error de medición identificado en las mediciones de oscilométricas de la segunda fase del estudio.

En los resultados se observó que bajo los diferentes escenarios la curva de crecimiento pulmonar estimada a lo largo del seguimiento tiene la misma tendencia decreciente como se espera en niños sanos, una función pulmonar que muestra un desarrollo significativo ($p < 0.001$) y satisfactorio para la edad, talla y sexo del niño. Aunque el escenario 1 es el que provee las estimaciones más cercanas a los valores de referencia para la población mexicana, los dos restantes proporcionan valores que están dentro del estándar esperado DS es ± 1.64 del valor predictivo y no exceden al 150% del valor predictivo, lo que sería equivalente a una disminución del 20% del volumen espiratorio forzado durante el primer segundo (VEF1) y un aumento del 50% de la resistencia de la vía aérea. (8–10)

La discrepancia entre los valores estimados entre el escenario 1 *versus* el 2 y 3, probablemente se debe a la forma específica en la que se corrigió el error de medición en el escenario 1; se estimaron diferentes medias por sexo y categoría del percentil de la talla para la edad, esto último debido a que estos son factores pronósticos de la función pulmonar, puesto que son proporcionales al tamaño corporal. (11,12) Mientras que bajo los escenarios 2 y 3 no se pudo considerar esta alternativa específica (estimaciones por sexo y percentiles de la talla para la edad) por tratarse de un modelo discontinuo el cual considera todo el seguimiento, de los 3 a los 9 años de edad para estimar la magnitud del salto (delta) de una fase a otra. Esta discrepancia es el reflejo de los valores obtenidos en los diferentes escenarios con respecto a la evaluación de reproducibilidad, precisión y exactitud. (5,13,14) Aunque el valor del CCC en el escenario 1 es menor al 90% de acuerdo, creemos que un 80% sería indicador bueno. Esto considerando que las mediciones de resistencia (Rr5 vs Rr6) provienen de diferente aparato y, por otro lado se trata de estudios poblacionales donde otros tipos de sesgo pudieran estar presente, causando ruido adicional.

Recomendaciones

En estudios de cohorte cuando el tiempo de seguimiento se prolonga se corre el riesgo de perder el control de la calidad de la información sino se sensibiliza y se recapacita a los actores involucrados. Por lo que es importante que periódicamente se contraste los instrumentos de medida para saber el error con que se trabaja (mide) y si es posible corregirlo, algunos instrumentos traen puntos de ajuste o calibración. Así mismo, re-



visar las normas de calidad con las que se rige el aparato además de llevar una bitácora de los registros de las contrastaciones y sus resultados.

Fortalezas y debilidades

Una de las ventajas que tuvimos es la disposición de varias mediciones repetidas de Rr6, las cuales permitieron evaluar y rectificar de diferentes formas el error.

Lo ideal hubiera sido evaluar el desempeño de los métodos propuestos considerando el mismo indicador, Rr6 proveniente del equipo i2M *versus* Rr6 (estándar de oro). Sin embargo, lo más cercano que había para población mexicana fue Rr5 (IOS was carried out with commercial equipment (MSIOS, Erich Jaeger, CareFusion, San Diego, California- MSION). Esta podría ser la causa de la diferencia entre las estimaciones que resultaron del escenario 1 *versus* el gold estándar.

Conclusión

En el escenario 1 se observó mejor precisión, exactitud y reproducibilidad tanto en niños como en niñas; sugiriendo que las mediciones estimadas Rr6 bajo este escenario son intercambiables con las mediciones estimadas a partir de las ecuaciones de referencia para población mexicana.

El escenario 1 resultó ser la mejor alternativa, posiblemente por la manera en la que se generaron los valores predichos (por sexo y pzsheight), siendo estas variantes importantes en la predicción de la función pulmonar.

Referencias

1. Ahrens W, Pigeot I, editores. Handbook of Epidemiology [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado el 4 de octubre de 2019]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-09834-0>
2. Gochicoa-Rangel L, Cantú-González G, Miguel-Reyes JL, Rodríguez-Moreno L, Torre-Bouscoulet L. Oscilometría de impulso: Recomendaciones y procedimiento. Neumol Cir Torax [Internet]. 2014 [citado el 4 de octubre de 2019];73(2):138–49. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462014000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=
3. Bliese PD, Wesensten NJ, Balkin TJ. Age and individual variability in performance during sleep restriction. J Sleep Res [Internet]. diciembre de 2006 [citado el 4 de octubre de 2019];15(4):376–85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118094>
4. Santos Nobre J, da Motta Singer J. Residual Analysis for Linear Mixed Models. Biometrical J [Internet]. el 1 de junio de 2007 [citado el 4 de octubre de 2019];49(6):863–75. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/bimj.200610341>
5. Collins LM, Schafer JL, Kam CM. A comparison of inclusive and restrictive strategies in modern missing data procedures. Psychol Methods [Internet]. diciembre de 2001 [citado el 4 de octubre de 2019];6(4):330–51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11778676>
6. Hernández Ávila M. Epidemiología : diseño y análisis de estudios [Internet]. Instituto Nacional de Salud Pública; 2007 [citado el 4 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/3868/Epidemiologia.html>
7. Beydon N, Davis SD, Lombardi E, Allen JL, Arets HGM, Aurora P, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Pulmonary Function Testing in Preschool Children. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. el 15 de junio de 2007 [citado el 4 de octubre de 2019];175(12):1304–45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545458>
8. van Noord JA, Clement J, van de Woestijne KP, Demedts M. Total Respiratory Resistance and Reactance as a Measurement of Response to Bronchial Challenge with Histamine. Am Rev Respir Dis [Internet]. abril de 1989 [citado el 4 de octubre de 2019];139(4):921–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2930070>



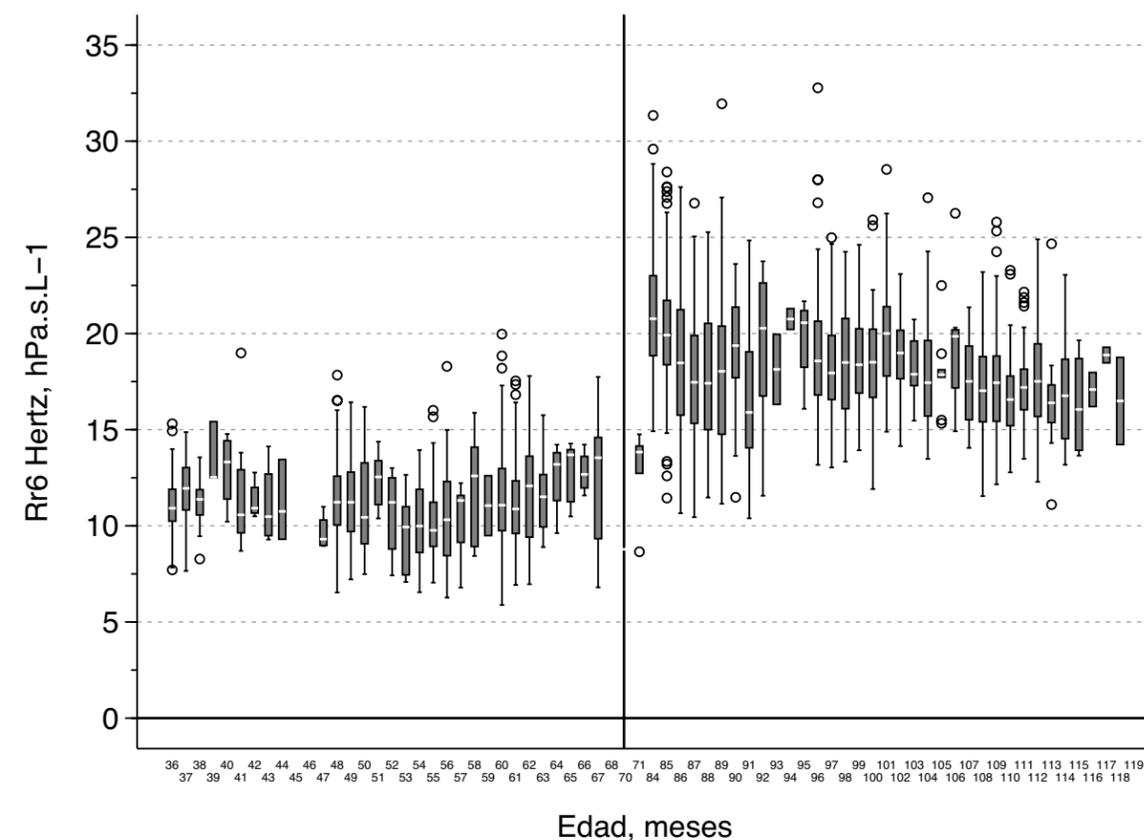


9. Duiverman EJ, Neijens HJ, Van der Snee-van Smaalen M, Kerrebijn KF. Comparison of forced oscillometry and forced expirations for measuring dose-related responses to inhaled methacholine in asthmatic children. *Bull Eur Physiopathol Respir* [Internet]. 1986 [citado el 4 de octubre de 2019];22(5):433–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542087>
10. Meyer Peirano R. Oscilometría de impulso (IOS) en niños. *Rev Neumol Pediátrica Soc Chil Neumol pediátrica* [Internet]. 2018;13(4):132–184. Disponible en: <http://www.neumologia-pediatria.cl/wp-content/uploads/2017/06/oscilometria.pdf%0Awww.neumologia-pediatria.cl>
11. Talaminos Barroso A, Márquez Martín E, Roa Romero LM, Ortega Ruiz F. Factors Affecting Lung Function: A Review of the Literature. *Arch Bronconeumol (English Ed)* [Internet]. el 1 de junio de 2018 [citado el 4 de octubre de 2019];54(6):327–32. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1579212918301320>
12. Sardón Prado O, Fidalgo Marrón L, González Pérez-Yarza E. Evaluación básica de la función pulmonar en el niño colaborador. *Protoc diagn ter pediátr* [Internet]. 2017 [citado el 4 de octubre de 2019];1:31–47. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/03_funcion_pulmonar_0.pdf
13. Lin LI-K. Assay Validation Using the Concordance Correlation Coefficient. *Biometrics* [Internet]. junio de 1992 [citado el 4 de octubre de 2019];48(2):599. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2532314?origin=crossref>
14. Lin LI-K. A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. *Biometrics* [Internet]. marzo de 1989 [citado el 4 de octubre de 2019];45(1):255. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2532051?origin=crossref>



Cuadros y Graficas

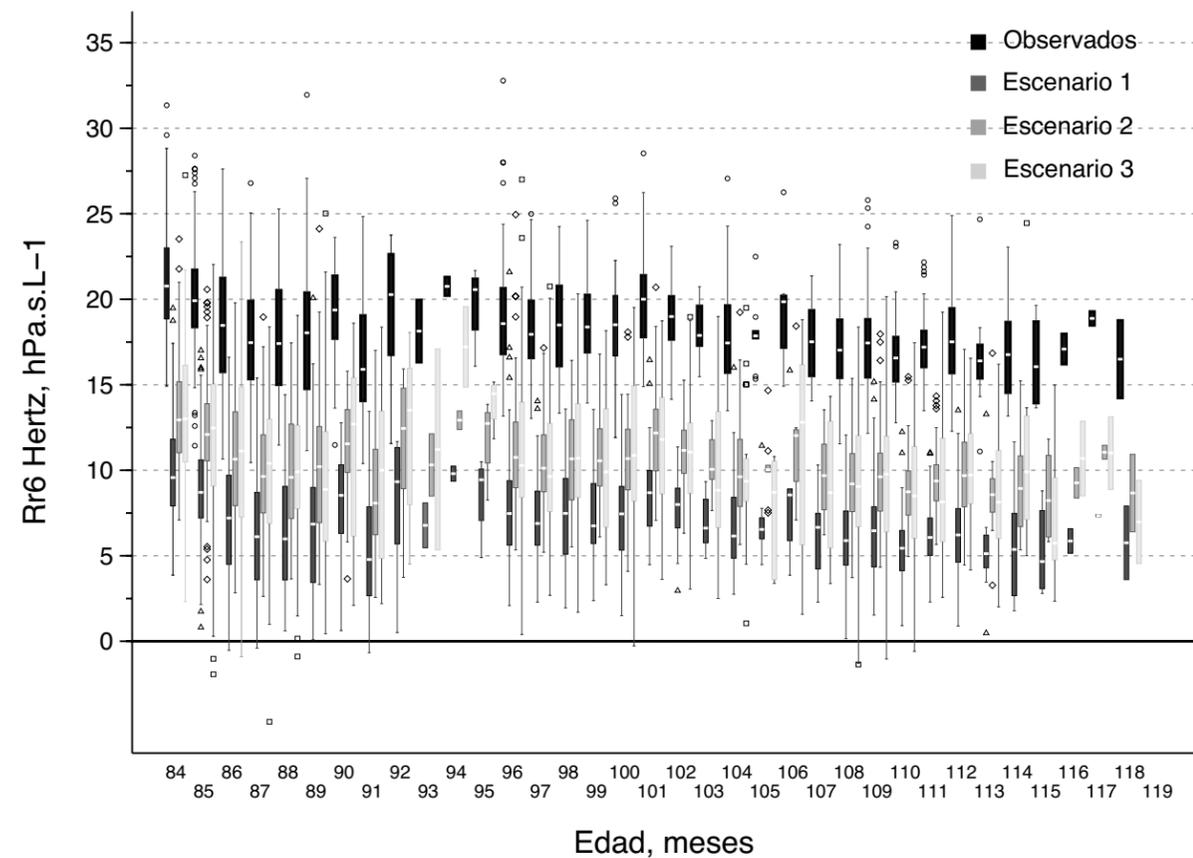
Figura 1. Distribución de las mediciones observadas de la Resistencia a frecuencia 6 Hertz (Rr6) en niños de 3 a 9 años de edad



2963 mediciones correspondientes a 801 niños durante el seguimiento



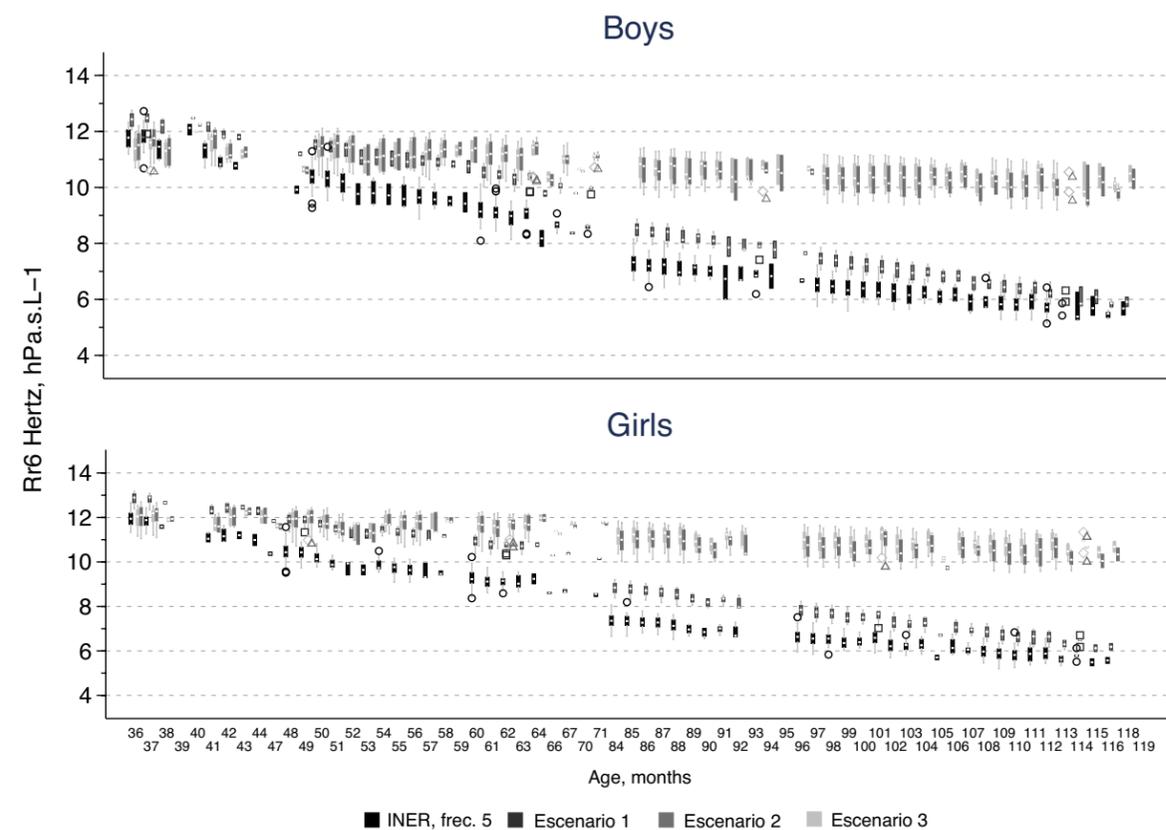
Figura 2. Observed and translated measurements of resistance at 6 Hz



1598 measurements corresponding to 698 children in the second period



Figura 3. Estimaciones de las curvas de crecimiento pulmonar





Cuadro 1. Evaluación de reproducibilidad, precisión y exactitud entre las medidas de referencia (Rr5) y las del estudio (Rr6).

Medidas	Scenario 1	Scenario 2	Scenario 3
	Valor (IC95%)	Valor (IC95%)	Valor (IC95%)
Boys (n=430)			
Concordance correlation coefficient ($\rho_c = \rho C_b$)	0.843(0.827, 0.858)	0.142(.126, 0.160)	0.183(0.164, 0.204)
Correlación de Pearson (ρ)	0.989*	0.802*	0.826*
Coefficiente de corrección del sesgo ($C_b = \frac{\rho_c}{\rho}$)	0.852	0.177	0.222
Diferencia promedio entre las mediciones	-1.06 (-1.64, -0.49)	-2.74(-5.41, -0.08)	-2.69(-5.15, -0.23)
Girls (n=371)			
Concordance correlation coefficient ($\rho_c = \rho C_b$)	0.800(0.781, 0.818)	0.135(0.119, 0.151)	0.181(0.160, 0.201)
Correlación de Pearson (ρ)	0.991*	0.828*	0.848*
Coefficiente de corrección del sesgo ($C_b = \frac{\rho_c}{\rho}$)	0.807	0.163	0.213 -3.00(-5.49, -0.51)
Diferencia promedio entre las mediciones	-1.32(-1.92, -0.72)	-3.14(-5.85, -0.43)	

* p<0.05

Medida de reproducibilidad: Correlación de concordancia

Medida de precisión: Correlación de Pearson

Medida de exactitud: Coeficiente de corrección del sesgo

Figura 4. Mejor modelo: Escenario 1 para estimar curvas de crecimiento pulmonar, Rr6

