



Universidad
de Alcalá

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

Título: Evaluación de niveles de mercurio en
sangre en población gestante

Autor: Begoña García Barrado

Tutor: María José González Muñoz

Cotutores: María Teresa Llorente Ballesteros
José Luis López Colón

Curso: 2015/2016

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D^a María José González Muñoz

Profesora del Departamento de Toxicología

Como tutora del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de
D^a Begoña García Barrado

Titulado: Evaluación de niveles de mercurio en sangre en
población gestante

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por la alumna Begoña García Barrado bajo mi dirección, alcanzando los objetivos de aprendizaje y las competencias transversales previstas en la guía docente de la asignatura (artículo 10 de la presente Normativa).

Con esta fecha considero APTO el mencionado trabajo, y autorizo a su presentación y defensa pública.

Alcalá de Henares 5 de junio de 2016

Fdo.: María José González Muñoz

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.1.- ABSORCIÓN	2
1.1.2.- DISTRIBUCIÓN	2
1.1.3.- EXCRECIÓN	3
1.2.- EFECTOS SOBRE LA SALUD	4
1.3.- RECOMENDACIONES PARA DISMINUIR LA EXPOSICIÓN AL MeHg	5
1.4.- CONSIDERACIONES ÉTICAS	6
2.- HIPÓTESIS	6
3.- OBJETIVOS	6
3.1.- PRINCIPALES:	6
3.2.- SECUNDARIOS:	7
4.- MATERIALES Y MÉTODO	7
4.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN	7
4.3.1.- DE INCLUSIÓN	7
4.3.2.- DE EXCLUSIÓN	7
4.4.- MUESTREO	7
4.5.- TAMAÑO MUESTRAL	8
4.6.- VARIABLES DE ESTUDIO	8
4.6.1.- INDEPENDIENTES	8
4.6.2.- DEPENDIENTES	8
4.6.3.- SOCIODEMOGRÁFICAS Y/O DE CONTROL:	8
4.8.- PROCEDIMIENTO DE MEDIDA DE LAS VARIABLES	9
5.- RESULTADOS	9
5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	9
6.- DISCUSIÓN	18
7.- CONCLUSIONES	22
8.- BIBLIOGRAFÍA	23

ANEXO A – HOJA DE INFORMACIÓN PARA LAS GESTANTES

ANEXO B – DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO C – ENCUESTA REALIZADA A LAS GESTANTES

ANEXO D – MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS

ANEXO E – PROCESO ESTADÍSTICO

RESUMEN

Se ha realizado un estudio piloto para evaluar el nivel de mercurio (Hg) y de selenio (Se) en la población gestante.

Cuarenta y dos mujeres embarazadas en su primer trimestre de gestación, tras ser informadas y obtener su consentimiento, se les ha realizado una encuesta sobre su frecuencia de consumo de pescado y el nivel de información que tenían acerca de los riesgos de Hg. Posteriormente se han medido los niveles de Hg en las muestras de sangre, y de Se en las de suero.

Se ha observado que un elevado porcentaje de las participantes desconocen los riesgos que conlleva el consumo de pescado contaminado con Hg. Los resultados han mostrado la existencia de una correlación lineal estadísticamente significativa, entre la frecuencia de consumo de pescado y los niveles de Hg y de Se. Asimismo, se ha encontrado una correlación lineal entre el consumo de atún, principal pescado consumido por las gestantes, y el nivel de Se en suero, mientras que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, entre el consumo de este pescado y los niveles de Hg en las gestantes participantes en este estudio.

Palabras Clave: mercurio, selenio, pescado, gestante, evaluación de riesgo

ABSTRACT

A pilot study has been performed to assess the level of mercury (Hg) and selenium (Se) in pregnant women.

Once having informed and obtained the consent of forty-two pregnant women in their first trimester, they have taken part in a survey regarding the frequency of fish consumption and how much information they had about the risk associated to Hg. Subsequently, Hg levels and Se levels were measured from blood and serum samples.

It has been observed that a high percentage of the participants are unaware of the risks of eating fish contaminated with Hg. The results have shown the existence of a statistically significant linear correlation between the frequency of fish consumption and levels of Hg and Se.

Furthermore, a linear correlation between the consumption of tuna (main fish consumed by pregnant women), and the level of Se in serum, has been found. There have not been found statistically any significant difference between the consumption of tuna fish and the levels of Hg in the pregnant participants in this study.

Key words: mercury, selenium, fish, pregnant woman, risk assesment.

1.- INTRODUCCIÓN

El mercurio es un tóxico medioambiental, considerado el tercer elemento en el ranking de sustancias más peligrosas por la ATSDR (Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades), por detrás del plomo y el arsénico, siendo causante de numerosos efectos adversos en la salud humana^{1,2}.

En su ciclo acuático, una vez depositado, actúan sobre él unas determinadas bacterias sulfato reductoras, transformándolo en metilmercurio (MeHg), bioacumulándose en las proteínas de los organismos marinos (90-100% del mercurio total contenido) y quedando incorporado en la cadena trófica. También se biomagnifica, es decir, aumenta su contenido a medida que aumenta el tamaño de los peces, siendo el contenido más elevado a medida que aumenta el nivel trófico³, alcanzándose la mayor concentración de este tóxico en los grandes predadores como atún, pez espada y tiburón entre otros. Además, el MeHg al estar unido a las proteínas, hace imposible su eliminación mediante la limpieza o el cocinado del pescado.

En España, la principal fuente de exposición al mercurio es el consumo de pescado, debido a la elevada ingesta que se produce. Según los datos del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, durante un año (periodo comprendido entre Julio de 2007 y Junio de 2008), se registró un consumo de 36 Kg per capita⁴. Según los estudios de nutrición "EPIC" (*European investigation into cancer and nutrition*) (1992-2000), hay una elevada variabilidad del consumo entre los diferentes países europeos, siendo España el que ocupa el primer lugar y los países escandinavos también con un elevado consumo, aunque sólo de pescados grasos, como salmón, arenque y bacalao.

El consumo de pescado es una importante fuente de nutrientes como ácidos grasos omega-3 de cadena larga, proteínas de elevada calidad, selenio y vitamina D. Durante el embarazo y lactancia es necesaria la ingesta de ácidos docosahexanoico (DHA) y eicosapentanioco (EPA), puesto que son nutrientes fundamentales para el correcto desarrollo fetal y neurológico de los niños. No obstante, el tipo de pescado consumido resulta fundamental en función del contenido de MeHg, aunque se ha sugerido que el consumo de ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga previenen o mitigan la toxicidad del MeHg en general, y en particular de los efectos neurológicos y cardioventriculares⁵.

1.1.- TOXICOCINÉTICA

1.1.1.- ABSORCIÓN

El MeHg se puede absorber por vía inhalatoria, vía tópica o en el tracto gastrointestinal, por el que se absorbe aproximadamente en un 95%.

La absorción gastrointestinal varía en función de las diferentes formas del mercurio. Así, el mercurio elemental o metálico (Hg^0) se absorbe muy poco (< 0,1%), por lo que su toxicidad es mínima. Los compuestos inorgánicos se absorben entre un 10 y un 30%, según determinados factores (pH intestinal, dieta rica en lácteos e incremento de la actividad pinocítica en el tracto digestivo)¹. Por último, las diferentes formas orgánicas del Hg (etilmercurio, metilmercurio y fenilmercurio) se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal (80-95%). Para el caso del MeHg, la absorción es de aproximadamente el 95%, aunque puede verse afectada por interaccionar con otros nutrientes de la dieta, reduciendo su bioaccesibilidad la fibra, las frutas y verduras y los alimentos ricos en fitoquímicos (té verde, té negro y proteína de soja) al ser ingeridos simultáneamente con pescado. Los compuestos tiol hallados en el ajo, también actúan como quelantes del mercurio⁶.

1.1.2.- DISTRIBUCIÓN

Los compuestos orgánicos, tras una exposición oral, se distribuyen especialmente en los riñones y, al igual que el mercurio elemental, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta, acumulándose en el cerebro y feto.

Las formas de mercurio Hg^{2+} presentes en tejido cerebral, placenta y en el feto se oxida a Hg^0 y no vuelve a la circulación debido a la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Además el Hg^{2+} se une a especies de Selenio (Se) formando complejos insolubles que residen en el cerebro durante años⁷. El proceso de oxidación está mediado en parte por la catalasa, transfiriéndose en esta reacción 2 electrones del Hg al oxígeno.

El MeHg una vez absorbido pasa a sangre, en una proporción de 20 hematíes/1 plasma, donde tiene una vida media de 44-80 días. Se distribuye por todos los tejidos, atravesando con facilidad la placenta y la BHE, alcanzando una concentración en el cerebro de 5 veces mayor que en sangre, y en pelo 250 veces mayor. En el cerebro el MeHg se desmetila a mercurio inorgánico y forma complejos insolubles con el selenio Se, que se mantienen durante años⁷.

En el tracto gastrointestinal, una parte del MeHg entra en contacto con la flora intestinal que convierte el MeHg en Hg^0 , que al tener muy baja absorción se elimina por heces. Una vez absorbido, el MeHg puede unirse al grupo tiol de la cisteína, formando un complejo de estructura muy similar a la metionina, entrando en las células mediante los transportadores de aminoácidos neutros (LAT1 Y LAT2)⁸. Este tipo de transporte del complejo de MeHg-cis es inhibido por aminoácidos como la metionina.

El MeHg también puede pasar de las células hepáticas a la bilis mediante la formación de complejos con el transportador endógeno glutatión. Este complejo se rompe por enzimas extracelulares (γ -glutamyltranspeptidasa y dipeptidasa) liberando el MeHGen, un complejo con cisteína, que al ser reabsorbido en la vesícula biliar, pasa de nuevo al torrente sanguíneo como complejo con cisteína, aunque una parte se excreta de nuevo junto a algún complejo con glutatión.

1.1.3.- EXCRECIÓN

La excreción urinaria del Hg procede de la liberación directa del tejido renal y de la filtración glomerular.

El mercurio inorgánico se excreta principalmente por las heces, empezando el proceso en la excreción del mercurio del hígado a través de la bilis, mediante la formación de un complejo con glutatión, y de ahí al tracto gastrointestinal^{1, 7}.

La mayoría del Hg^{2+} absorbido vía oral se excreta en las heces, aunque permanece en el organismo un periodo variable de tiempo¹.

La excreción del MeHg tiene lugar principalmente a través de las heces (hasta un 90%), del pelo y una mínima parte a través de la orina (al desmetilarse a mercurio inorgánico)^{1, 9}. También puede excretarse a través de la leche materna.

1.2.- EFECTOS SOBRE LA SALUD

Toda la población está expuesta a bajos niveles de este tóxico. La aparición de los efectos adversos y su diferente severidad dependen de la forma química, dosis, edad, duración y vía de exposición al tóxico, y factores ambientales, nutricionales y genéticos. Estos últimos factores explicarían la susceptibilidad variable a su toxicidad^{10, 11}.

El Hg y sus compuestos son especialmente tóxicos para el sistema nervioso, riñones y sistema cardiovascular¹², siendo el MeHg el que presenta mayor toxicidad, especialmente durante el desarrollo de su órgano diana, el sistema nervioso. Por tanto, los grupos de población más vulnerable a los efectos neurotóxicos del MeHg son los niños y el feto en desarrollo.

Los efectos neurológicos del Hg son conocidos desde los años 50, tras una intoxicación masiva que se produjo en la bahía de Minamata (Japón) por el consumo de pescado contaminado que provocó multitud de afectados. Se constató la aparición de un cuadro análogo al de una parálisis cerebral grave, con importante retraso del desarrollo, ceguera, sordera y alteraciones del tono muscular y de los reflejos tendinosos profundos^{1, 13}. Además, los efectos fueron más difusos y extensos en cerebros en desarrollo que en personas adultas, dado que el MeHg afecta a los procesos de formación de microtúbulos, migración neuronal y división celular.

En cerebros en desarrollo, se relaciona la severidad de los efectos inducidos, con el tiempo de exposición al tóxico, es decir, cuanto más temprana sea la exposición, mayores son los efectos observados. Además, los efectos producidos sobre el Sistema Nervioso Central son multifocales y permanentes^{14, 15}. La toxicidad neurológica del MeHg en niños aparece a dosis mucho más bajas a las que causaron los efectos en Minamata, produciendo efectos en el área de la memoria^{16, 17}, la atención, el lenguaje, las habilidades verbales^{22, 23} y en la función visuoespacial y motora¹⁸.

Otra catástrofe similar tuvo lugar en Iraq (1971) tras el consumo de pan fabricado con harina obtenida de semillas de cebada tratadas con un fungicida a base de MeHg, detectándose cuadros de retraso mental en niños, retraso en las etapas

del desarrollo, alteraciones del tono muscular y de las funciones sensoriales, junto con sordera y ceguera en muchos de ellos¹⁹.

Tras estos graves accidentes, las investigaciones se orientaron a conocer los riesgos que este tóxico producía sobre la salud pública.

El primer gran estudio realizado se llevó a cabo en Nueva Zelanda. El Hg contenido en el pelo de mujeres que habían ingerido pescado 3 veces al día durante el embarazo, resultó muy elevado en algunos casos. A los 4 y 6 años, se compararon los hijos de estas mujeres con los de aquellas con baja exposición a Hg: los primeros presentaron un menor desarrollo mental y motor (test estandarizado *Denver Development Screening Test*) y peores puntuaciones en los test de función psicológica (escala de Wechsler WISC-R), de función motora y sensorial (escala de habilidades infantiles de Mc Carthy) y prueba de evaluación del desarrollo del lenguaje, así como una disminución de 3 puntos en el cociente intelectual^{14, 20}.

Otros estudios relacionan la concentración de Hg en sangre del cordón y el bajo peso al nacer^{21, 22}, y entre Hg en sangre de cordón y prematuridad²³.

Respecto a los niveles de Hg en niños en España, son más bajos que en adultos, pero más elevados que los de niños de otros países europeos, atribuible al consumo de pescado. Así, el proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente), encuentra una asociación de los niveles de Hg y el consumo de pescado. Sin embargo, considerando los múltiples beneficios del consumo de pescado, se hace necesario realizar más investigaciones acerca del impacto de bajas concentraciones de MeHg sobre el crecimiento fetal a fin de proporcionar unas adecuadas medidas nutricionales a los grupos de población más vulnerables.

Por todo esto, resulta fundamental proporcionar medidas nutricionales a la población, especialmente a los más vulnerables: mujeres embarazadas, madres lactantes y niños de corta edad²⁴.

1.3.- RECOMENDACIONES PARA DISMINUIR LA EXPOSICIÓN AL MeHg

En 2011, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), elaboró una serie de recomendaciones para las personas más

sensibles al MeHg: mujeres embarazadas o en periodo de lactancia y población infantil (1-3 años de edad):

- Consumo variado de pescado, por los grandes beneficios nutritivos, que aportan, limitando el consumo de las especies que más contenido de mercurio poseen: pez espada, tiburón, atún rojo y el lucio.
- Que mujeres gestantes o en periodo de lactancia y niños menores de tres años eviten su consumo de las especies anteriormente citadas.
- Que los niños de hasta 12 años limiten la cantidad semanal ingerida de pescados de esa categoría a 50 gramos²⁵.

1.4.- CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se ha realizado bajo las directrices de la norma internacional de Buenas Prácticas Clínicas (BPC), aplicable a los ensayos clínicos en los que participen seres humanos.

El cumplimiento de esta norma proporciona una garantía pública de la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos del estudio de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, garantizando, así mismo, la credibilidad de los datos.

2.- HIPÓTESIS

El consumo de pescado aumenta los niveles de Hg en sangre, especialmente cuando es mayor la ingesta de aquellas especies que acumulan mayor concentración de este tóxico.

3.- OBJETIVOS

3.1.- PRINCIPALES:

- Determinar los niveles de Hg y Se en muestras de sangre y suero de mujeres gestantes, y en sangre del cordón umbilical en el recién nacido.
- Relacionar los niveles de Hg en función del consumo de pescado.

3.2.- SECUNDARIOS:

- Evaluar los resultados obtenidos en función de las variables demográficas, antropométricas y hábitos dietéticos.
- Determinar si la concentración de mercurio varía en función del grado de información recibida y del nivel cultural.
- Evaluar los resultados perinatales en función de los niveles de Hg y Se

4.- MATERIALES Y MÉTODO

Ver Anexo D

4.1.- DISEÑO

Se trata de un estudio observacional, transversal y prospectivo.

4.2.- POBLACIÓN A ESTUDIO

Mujeres gestantes de los distritos diez y once de Carabanchel Latina de Madrid, área de cobertura del Hospital Central de la Defensa. Esta área tiene una población asignada de 131.694 personas, de las cuales 68.955 son mujeres y de ellas 31.119 en edad fértil.

4.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

4.3.1.- DE INCLUSIÓN

- Todas las mujeres sin límite de edad gestantes que hayan accedido a formar parte del estudio, firmando la hoja de consentimiento informado.

4.3.2.- DE EXCLUSIÓN

- Mujeres gestantes cuyo control gestacional no abarque todo el proceso de la gestación.
- Mujeres gestantes que no hayan accedido a formar parte del estudio.

4.4.- MUESTREO

Muestreo consecutivo no probabilístico

4.5.- TAMAÑO MUESTRAL

Al ser un estudio preliminar o piloto se seleccionan cuarenta y dos mujeres gestantes. Según los resultados obtenidos, se procederá posteriormente a determinar el tamaño muestral definitivo.

4.6.- VARIABLES DE ESTUDIO

4.6.1.- INDEPENDIENTES

1. El tiempo de seguimiento se realizará de forma trimestral. El Hg se determinará en muestras de sangre, y el Se en las muestras de suero, extraídas en los controles obstétricos protocolizados, a las 12-13, 24-26 y 32-34 semanas de embarazo.
2. Hábitos de consumo de pescado, y frecuencia de consumo del mismo. Valorando la cantidad en: una o dos veces por semana, de tres a cuatro veces semana y consumo mayor de cuatro veces semana.

4.6.2.- DEPENDIENTES

Determinación cuantitativa continua de Hg y Se en las muestras.

4.6.3.- SOCIODEMOGRÁFICAS Y/O DE CONTROL:

1. Antropométricas y demográficas: Edad, talla, peso, índice de masa corporal (IMC), nacionalidad, y región de procedencia.
2. Conocimiento de las pacientes sobre de la influencia del consumo de pescado en los niveles de Hg, y su influencia en su salud y en la de su futuro hijo.
3. Fuente de procedencia de la información que ha tenido la paciente (médico, matrona, u otros).
4. Descripción de la ingesta. Frecuencia del consumo de atún, lucio, pez espada y tiburón (pescados que más cantidad de mercurio acumulan y que limita AECOSAN en sus recomendaciones).
5. Patología gestacional materna: diabetes gestacional, hipertensión durante el embarazo y obesidad.

6. Resultados neonatales: variables en el momento del parto: peso del recién nacido, pH del cordón umbilical, Apgar y tipo de reanimación neonatal si hubiera que realizarla al recién nacido.

4.8.- PROCEDIMIENTO DE MEDIDA DE LAS VARIABLES

En el estudio han participado 42 mujeres gestantes, en su primer trimestre de embarazo. Se les administró la “hoja de información a las gestantes” (ver Anexo A), “el documento de consentimiento informado” (ver Anexo B) y finalmente se les realizó la encuesta de datos antropométricos, geográficos y de frecuencia de consumo de pescado (ver Anexo C).

Posteriormente, se han determinado los niveles de Hg y Se en las muestras objeto de estudio y en función de estos resultados se ha evaluado la necesidad de intervención informativa sobre indicaciones nutricionales de consumo de pescado.

5.- RESULTADOS

5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Del total de las pacientes encuestadas, 40 siguieron en el estudio, perdiéndose 2, por lo tanto la tasa de respuesta fue del 95,2%.

Tabla 1. Características constitucionales de las participantes

Mujeres gestantes	
Peso	62,94 ± 12,67
Altura	1,58 ± 0,07
IMC	24,83 ± 6,02

Según el IMC, el 58,33% presentaba peso normal, el 25% sobrepeso y un 16,67% eran obesas.

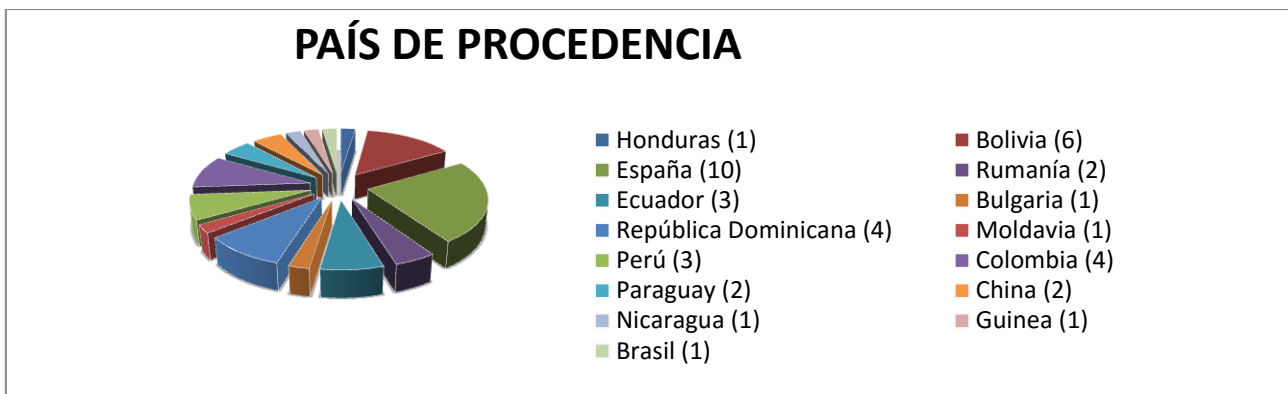


Figura 1. Población en función de su país de procedencia

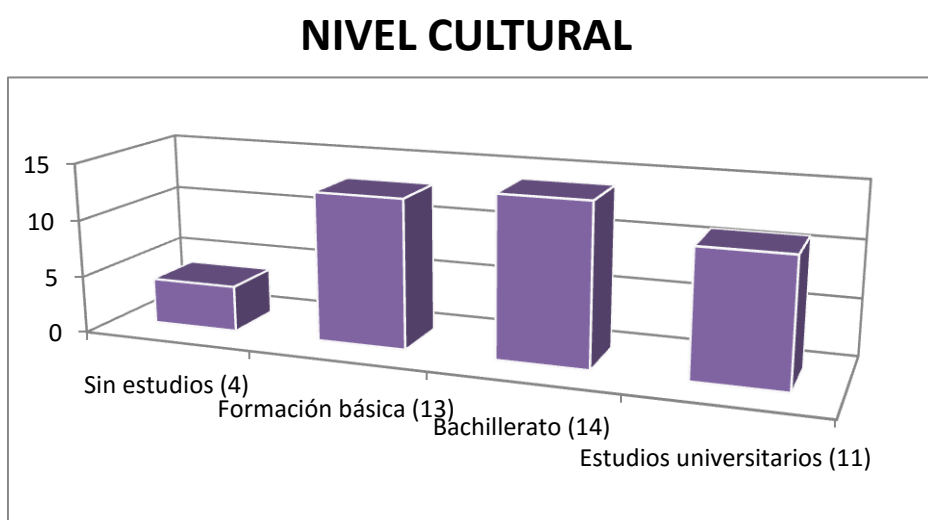


Figura 2. Población en función de su nivel de estudios.

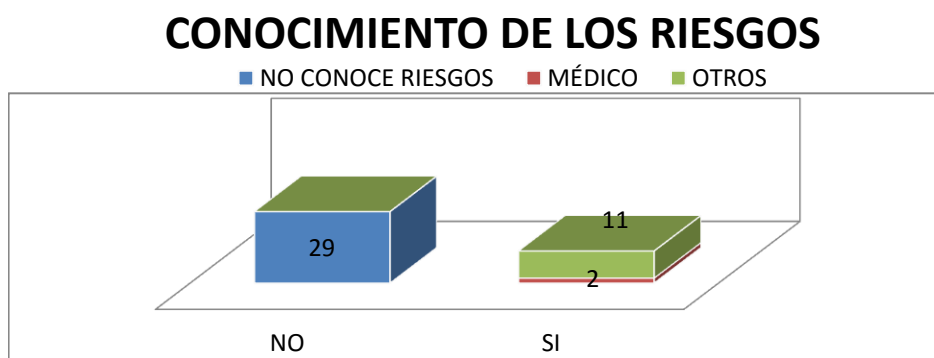


Figura 3. Conocimiento de los riesgos del consumo de pescado contaminado con Hg

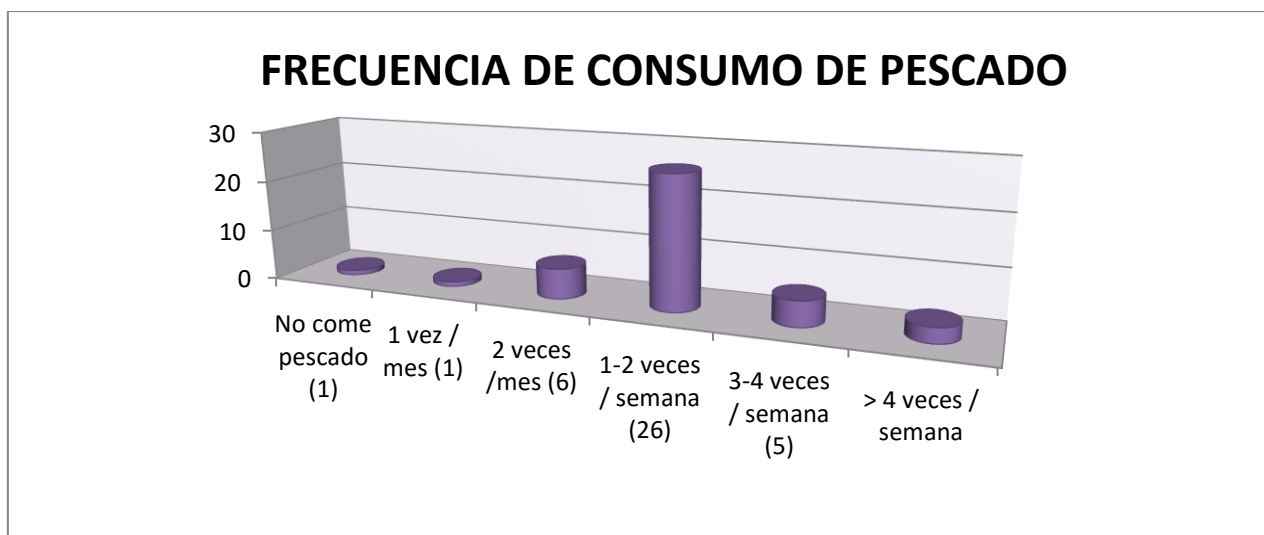


Figura 4. Frecuencia de consumo de pescado

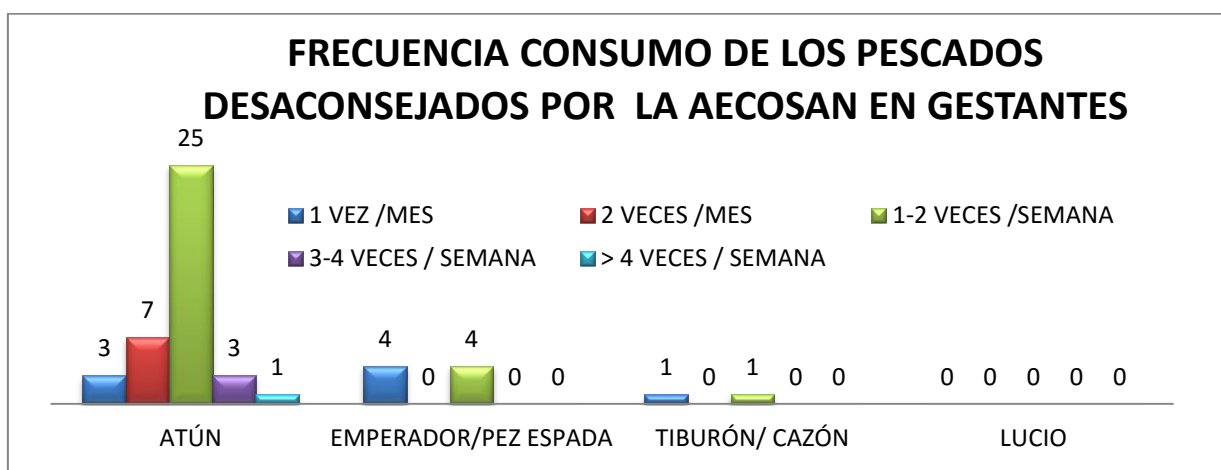


Figura 5. Frecuencia de consumo de los pescados con más contenido en Hg

Tabla 2. Resultados de las variables descriptivas del estudio

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad	69	16	45	31,04	6,47
Peso (Kg)	69	42	98	62,72	12,69
Hg ($\mu\text{g/L}$)	40	0,5	11,53	2,70	2,36
Se ($\mu\text{g/L}$)	40	39,08	85,90	61,41	11,40
COLESTEROL (mg/dL)	36	103	285	168,22	34,59
TRIGLICERIDOS (mg/dL)	36	38	162	84,90	31,73
HIERRO ($\mu\text{g/dL}$)	24	27	205	94,88	41,26
FERRITINA (ng/mL)	16	6	129	42,64	36,32
TSH ($\mu\text{U/mL}$)	35	0,08	5,9	1,93	1,41
Altura (cm)	22	148	176	157,70	6,91
N válido (según lista)	1				

Tabla 3. Resultados estadísticos de todas las variables cuantitativas

		edad	peso	Hg B	Se B	COLESTEROL	TRIGLUCERIDOS	HIERRO	FERRITINA	TSH	Altura	Años España
N	Válidos	69	69	40	40	36	36	24	16	35	22	52
	Pendientes	0	0	29	29	33	33	45	53	34	47	17
Media		31,04	62,72	2,703231	61,413750	168,2222	84,8889	94,8750	42,6438	1,9340	157,9909	9,5484
Mediana		31,00	60,00	2,121250	61,070000	163,0000	76,5000	88,0000	33,0000	1,6300	158,0000	10,0000
Desv. tp		6,488	12,686	2,3579697	11,404894	34,59324	31,72721	41,26090	36,31681	1,41341	6,90906	5,48919
Mínimo		16	42	5,000	39,0750	103,00	38,00	27,00	6,00	08	148,00	08
Máximo		45	98	11,5250	85,9000	285,00	162,00	205,00	129,00	5,90	176,00	23,00
Percentiles	2,5	18,25	43,50	5,00000	39,19500	103,0000	38,0000	27,0000	6,0000	0800	148,0000	1060
	5	19,50	46,50	5,00000	42,499750	109,8000	47,3500	31,7500	6,0000	1120	148,0000	3810
	9	21,30	49,30	5,00000	43,488000	131,6800	52,3300	48,2500	6,5300	2724	148,0700	9609
	10	22,00	50,00	5,00000	44,229000	133,5000	52,7000	50,5000	6,7000	2760	148,3000	1,0000
	15	23,00	51,50	5,00000	50,675000	142,7500	53,0000	57,2500	10,3000	4560	149,4500	2,9500
	25	26,00	54,00	6,33125	51,842500	148,7500	60,5000	65,2500	20,4750	1,0400	152,1250	4,6250
	50	31,00	60,00	2,121250	61,070000	163,0000	76,5000	88,0000	33,0000	1,6300	158,0000	10,0000
	75	36,00	69,75	3,640500	68,326250	178,7500	96,2500	125,0000	51,0000	2,7500	162,2500	14,0000
	85	38,50	76,00	5,286538	75,582500	204,9000	131,2000	134,5000	94,0500	3,3784	165,0000	16,0000
	90	40,00	82,00	5,606300	77,300000	218,2000	142,2000	157,0000	123,4000	3,5560	165,0000	16,0000
	95	41,00	91,50	7,241600	80,994000	238,2500	150,1000	196,7500	129,0000	5,6440	174,3500	18,7000
	97,5	42,75	96,00	11,418075	85,781500	285,0000	162,0000	205,0000	129,0000	5,9000	178,0000	22,0250

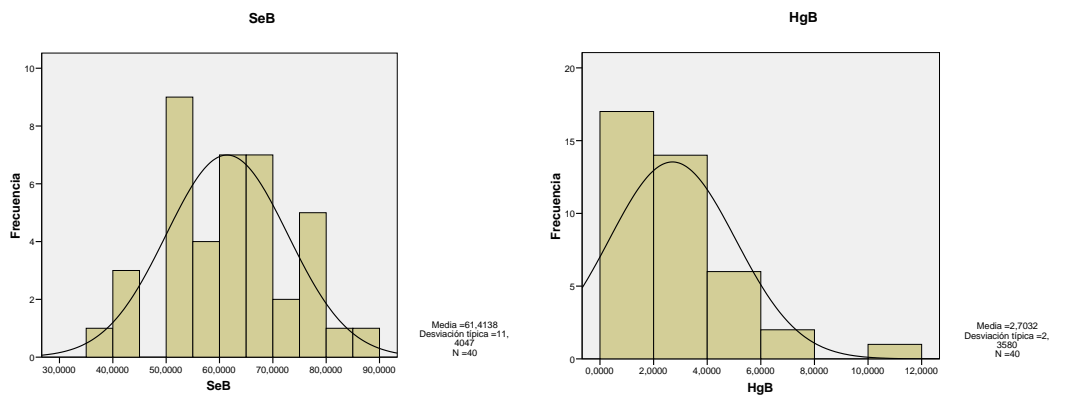
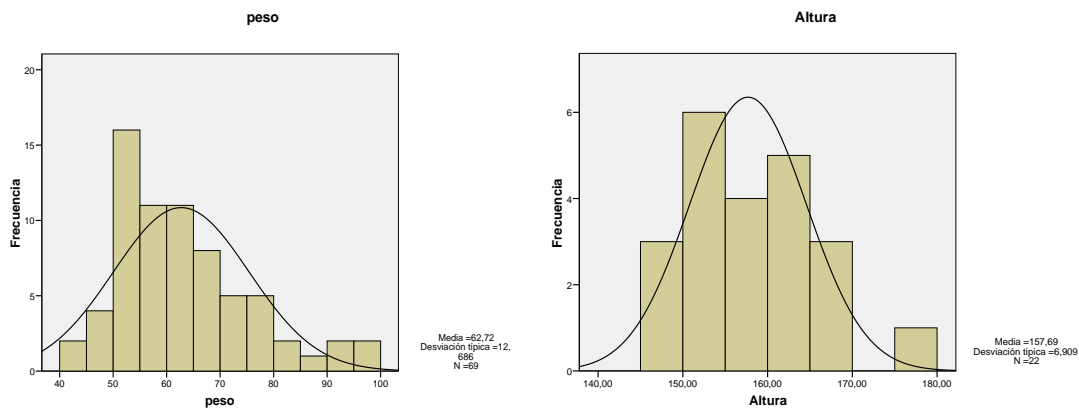


Figura 6. Histogramas de los valores de Hg y Se obtenidos



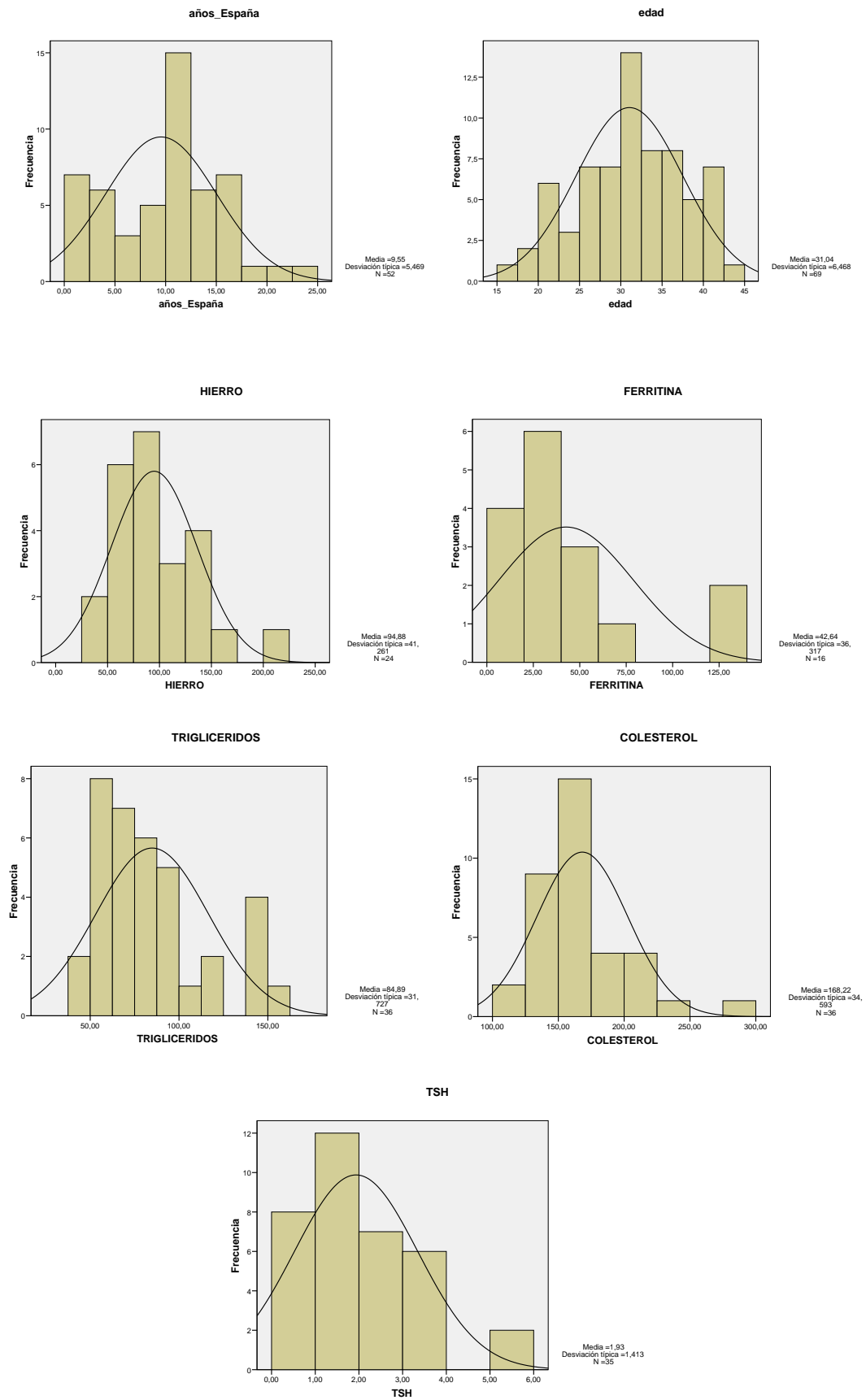


Figura 7. Histograma del resto de variables numéricas del estudio

Tabla 4. Valores estadísticos de correlación de Hg, Se, Fe y Ferritina, con la frecuencia de consumo de pescado

FRECUENCIA CONSUMO		Hg	Se	FERRITINA	HIERRO	
Poco consumo	N	Válidos	7	7	3	4
		Perdidos	5	5	9	8
	Media		0,827286	51,072857	70,6667	97
	Desv. típ.		0,4988856	11,8909482	50,52062	26,91963
	Percentiles	25	0,5	42,455	41	71,5
		50	0,6	43,55	42	96,5
		75	1,4095	60,45	129	123
Consumo moderado	N	Válidos	25	25	10	17
		Perdidos	14	14	29	22
	Media		2,79021	61,1136	41,1	94,6471
	Desv. típ.		2,0043487	9,5084015	33,89018	46,09222
	Percentiles	25	1,11725	52,035	21,25	65,5
		50	2,236	60,89	29	78
		75	3,91475	67,75	58,5	121
Consumo elevado	N	Válidos	8	8	3	3
		Perdidos	10	10	15	15
	Media		4,072875	71,4	19,7667	93,3333
	Desv. típ.		3,3615227	8,5006063	14,00583	38,50108
	Percentiles	25	2,0245	62,91	6	55
		50	3,40675	75,095	19,3	93
		75	5,064375	77,5925	34	
					132	

Tabla 5. Resultados estadísticos de Hg y Se en función con el consumo de atún

FRECUENCIA CONSUMO		Hg	Se	
Poco consumo	N	Válidos	13	13
		Perdidos	8	8
	Media		1,608385	54,04
	Desv. típ.		1,1301594	10,2440322
	Percentiles	25	0,55	43,45
		50	1,426	51,62
		75	2,2295	61,8
Consumo moderado	N	Válidos	23	23
		Perdidos	17	17
	Media		3,362511	64,045435
	Desv. típ.		2,7258631	10,5707369
	Percentiles	25	0,9935	52,85

Consumo elevado		50	2,918	62,35
		75	5,223	74,545
	N	Válidos	4	4
		Perdidos	4	4
	Media		2,470625	70,24625
	Desv. típ.		2,0207366	7,6780828
	Percentiles	25	0,87675	62,91
		50	2,042	70,5375
	75	4,493125	77,29125	

Tabla 6. Resultados estadísticos de contraste (Kruskal-Wallis) entre la frecuencia de consumo de pescado y los valores de Hg, Se, Fe y Ferritina

	Hg	Se	HIERRO	FERRITINA
Chi-cuadrado	9,491	10,377	0,076	4,643
gl	2	2	2	2
Sig. asintót.	0,009	0,006	0,963	0,098

Tabla 7. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de poco y elevado consumo de pescado

	Hg	Se
U de Mann-Whitney	5,5	5
W de Wilcoxon	33,5	33
Z	-2,63	-2,662
Sig. asintót. (bilateral)	0,009	0,008
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,006(a)	,006(a)

Tabla 8. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de consumo moderado y elevado consumo de pescado

	Hg	Se
U de Mann-Whitney	76,5	44
W de Wilcoxon	401,5	369
Z	-0,988	-2,352
Sig. asintót. (bilateral)	0,323	0,019
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,330(a)	,017(a)

Tabla 9. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de poco y moderado consumo de pescado

	Hg	Se
U de Mann-Whitney	27,5	44
W de Wilcoxon	55,5	72
Z	-2,744	-1,983
Sig. asintót. (bilateral)	0,006	0,047
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,004(a)	0,048(a)

Tabla 10. Resultados estadísticos de contraste (Kruskal-Wallis) entre la frecuencia de consumo de atún y los valores de Hg, Se

	Hg	Se
Chi-cuadrado	4,243	8,972
GI	2	2
Sig. asintót.	0,12	0,011

Tabla 21. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de poco y moderado consumo de atún

	Se
U de Mann-Whitney	74
W de Wilcoxon	165
Z	-2,487
Sig. asintót. (bilateral)	0,013
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,012(a)

Tabla 12. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de poco y elevado consumo de atún

	Se
U de Mann-Whitney	5
W de Wilcoxon	96
Z	-2,378
Sig. asintót. (bilateral)	0,017
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,015(a)

Tabla 33. Comparación de los niveles de Hg y Se en los grupos de consumo moderado y elevado consumo de atún

	Se
U de Mann-Whitney	29
W de Wilcoxon	305
Z	-1,16
Sig. asintót. (bilateral)	0,246
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,272(a)

Tabla 16. Coeficiente de correlación entre los valores de Hg y Se en la población gestante del estudio

	Hg	Se
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	0,294
	Sig. (bilateral)	0,065
	N	40

Tabla 17. Coeficiente de correlación entre los valores de Se y los valores de lípidos (colesterol y triglicéridos)

	Se	COLESTEROL	TRIGLICERIDOS		
Rho de Spearman	Se	Coeficiente de correlación	1	0,267	-0,225
		Sig. (bilateral)	.	0,132	0,209
		N	40	33	33
	COLESTEROL	Coeficiente de correlación	0,267	1	0,294
		Sig. (bilateral)	0,132	.	0,082
		N	33	36	36
	TRIGLICERIDOS	Coeficiente de correlación	-0,225	0,294	1
		Sig. (bilateral)	0,209	0,082	.
		N	33	36	36

6.- DISCUSIÓN

Nivel cultural

En referencia al nivel cultural (Figura 2) se ha obtenido que, aproximadamente un 91% de las gestantes tienen estudios. Un 31% han cursado la formación básica, un 33% bachillerato y un 26% de ellas tienen estudios universitarios.

En 2011, la AECOSAN realizó las recomendaciones para disminuir la exposición al MeHg para poblaciones sensibles (embarazadas o en periodo de lactancia y población infantil)²⁵, y a pesar de ello y de que el nivel cultural de las participantes es adecuado, un 69% de ellas afirma no conocer los riesgos que conlleva el consumo de los pescados contaminados con este tóxico, ni qué pescados son los que más concentración de MeHg contienen. De las restantes, que sí se consideran informadas, sólo el 5% afirma haberlo sido por sus médicos (Fig. 3).

Consumo de pescado

Del 98% de las pacientes que come pescado, aproximadamente el 83% lo hacen de forma semanal (Fig. 4).

De los pescados que la AECOSAN recomienda que no consuman las gestantes (atún, emperador, tiburón y lucio), el 100% de las que comen pescado ingiere atún de forma mensual, de ellas un 67% lo ingiere por lo menos una o dos veces a la semana y un 10% más de tres (Fig. 5). En lo relativo al emperador sólo el 20% lo consume durante el embarazo y de ellas, la mitad lo hacen de forma semanal. Un 5% ingiere cazón y ninguna ingiere lucio.

Niveles Hg

La media de los niveles de Hg en sangre de la población estudiada resultó ser de $2,70 \pm 2,36 \mu\text{g/L}$ (Tabla 2). Acorde con la hipótesis inicial, se puede observar que los niveles de este tóxico en sangre se ven aumentados con el consumo de pescado. Un 15 % de las gestantes tienen valores cercanos al límite establecido por la EPA ($6,4 \mu\text{g/L}$), mientras que un 5% superan este nivel. Con estos valores elevados de Hg, los fetos en desarrollo de estas gestantes podrían estar en riesgo de padecer alteraciones neurológicas^{17, 26}, que afectaría principalmente a la

memoria, lenguaje, atención, habilidades verbales y algo menos a la función visuoespacial y motora¹⁷, pudiendo incluso conllevar a un menor desarrollo del cociente intelectual.

En estudios realizados anteriormente en Michigan (EEUU), se vio una asociación entre la concentración de Hg y la prematuridad y bajo peso al nacer²³. En cuanto al impacto de MeHg a bajas concentraciones, se ha planteado la existencia de posibles efectos sobre el crecimiento fetal, y en el crecimiento los dos primeros años de vida.^{27, 28}. Dado que los estudios realizados al respecto son escasos, es necesario llevar a cabo más investigaciones para evaluar el riesgo sobre el crecimiento fetal de la exposición a MeHg a bajas dosis, teniendo en cuenta los beneficios del consumo de pescado y la evidencia de cierta susceptibilidad genética^{21, 28}.

Niveles Se

La presencia de Se puede modificar la toxicidad del Hg, dado que es un fuerte antioxidante y potencial protector de la toxicidad del MeHg. La fuente principal de este elemento traza, al igual que el MeHg, son los pescados. El Se se puede ingerir en diferentes formas químicas con diferente biodisponibilidad y actividad. En los pescados se ha descubierto que la selenoneína tiene una gran actividad anti radicales libres y es el compuesto predominante en el atún. Los niveles de Se encontrados se muestran en la Tabla 2. La concentración media ha sido de $61,41 \pm 11,40$ $\mu\text{g/L}$, valor que se encuentra dentro del intervalo normal ($50\text{-}140$ $\mu\text{g/L}$). La Fig. 6 muestra una distribución normal de estos valores aunque con tendencia baja. Otros estudios²⁹ indican similar tendencia baja en niveles de Se en la población española.

Resultados demográficos y bioquímicos

La edad de las gestantes ha sido de $31,04 \pm 6,47$ años (Tabla 2), con un intervalo comprendido entre 16 y 45 años, y con una distribución normal (Fig. 7)

Los resultados bioquímicos de las analíticas obtenidos (Tabla 2) muestran así mismo una distribución normal (Fig. 7). Los valores de colesterol (media, $168,22 \pm 34,59$ mg/dL) se encuentran comprendidos, en su mayoría, en el intervalo de normalidad (110 a 200 mg/dL), aunque aproximadamente un 20% está por

encima del valor máximo de referencia, lo cual se podría considerar normal, sabiendo que durante el embarazo estos niveles suelen elevarse.

Los niveles de los triglicéridos ($84,89 \pm 31,73$ mg/dL) de estas gestantes estaban comprendidos dentro del intervalo considerado normal (50 a 180 mg/dL).

Los valores de hierro (Fe) obtenidos de las analíticas de las gestantes nos indican que, con una media de $94,87 \pm 41,26$ mcg/dl, y siendo el intervalo de valores de referencia de 33 a 193mcg/dl, un 5% de las participantes del estudio se encuentran con valores por debajo de este intervalo, al igual que un 5% tienen un valor mayor de 193 mcg/dl.

En cuanto a los valores de ferritina (valores de referencia 13-150 ng/ml) se obtiene una media de $42,64 \pm 36,32$ ng/ml, aunque aproximadamente un 20% está por debajo del intervalo de normalidad. A pesar de que las gestantes tienen en este momento los niveles de Fe normales, casi una cuarta parte de ellas no tiene apenas depósitos de Fe, ya que las concentraciones de ferritina han sido bajas. Por tanto, cabría esperar que en un corto periodo de tiempo estas mujeres pudieran desarrollar una anemia al agotar el Fe sanguíneo.

Los resultados de la hormona tirotrópica (TSH) (valores de referencia: 0,35-4,94 μ U/ml), obtenidos mostraron una distribución normal (Fig. 7), con tendencia a valores bajos, ya que la media fue de $1,93 \pm 1,41$ μ U/ml (Tabla 2). Estos resultados no se consideran alarmantes porque en el embarazo se suele tender al hipotiroidismo. Además, en estudios realizados anteriormente³⁰ se encontró una correlación entre valores de Se bajos e hipotiroidismo, con descenso de TSH. En el presente estudio se ha obtenido la misma correlación.

Resultados estadísticos de contraste

Se han realizado análisis estadísticos de contraste, con el programa estadístico SPSS por medio del test de Kruskal-Wallis; agrupando a las gestantes en grupos de frecuencia de consumo de pescado, y relacionando las diferentes medianas (por la diversidad de los datos) obtenidas de los valores de Hg, Se, Fe y ferritina.

Los grupos de consumo resultantes son tres: poco consumo (hasta dos veces al mes), consumo moderado (de una a dos veces por semana) y elevado consumo (más de tres veces a la semana).

Se ha observado que acorde a la hipótesis inicial del estudio, sí que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de Hg de los grupos de poco consumo de pescado y los de consumo moderado (Tabla 9), y entre los valores del primer grupo y los de consumo elevado (Tabla 7). También se han observado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de Se entre el grupo de poco consumo y el de consumo elevado (Tabla 9).

Por otro lado, no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Fe y Ferritina (Tabla 6)

Este mismo tipo de análisis se ha realizado relacionando los valores de Hg y Se de las gestantes con el consumo de atún, por ser este pescado el más consumido por las gestantes (el 100% de las participantes en el estudio). No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Hg y la ingesta de atún (Tabla 10). Sin embargo sí se observan estas diferencias ($p < 0,05$) entre los niveles de Se del grupo de poco consumo de atún y el grupo de consumo moderado (Tabla 14). Este resultado sería atribuible al gran contenido de Se en este tipo de pescado.

Se realizó una correlación bivariada (coeficiente de correlación de Spearman) entre los valores de Se y de Hg (Tabla 14), obteniendo un valor de $p = 0,065$ por lo que no se ha encontrado correlación entre los valores de Hg y Se en la población gestante del estudio.

Tampoco, se ha obtenido una correlación lineal entre los valores de Se y los lípidos (colesterol y triglicéridos) de las gestantes participantes del estudio (Tabla 15).

7.- CONCLUSIONES

- Acorde a la hipótesis inicial, se observa que hay una asociación directa entre los niveles de Hg y la ingesta de pescados contaminados con dicho metal tóxico.
- Dado que un 15 % de las gestantes presentan valores de Hg altos, se considera especialmente importante que, tanto las gestantes como el resto de mujeres en edad fértil que quieran quedarse embarazadas, sepan la importancia que tiene el disminuir esos niveles, y cómo pueden hacerlo. Por lo tanto, se recomienda aumentar el número de iniciativas destinadas a reducir o prohibir el uso de mercurio, como podrían ser campañas de salud pública o páginas electrónicas de fácil acceso para todos. Así mismo, se considera importantísimo que tanto los profesionales sanitarios como todos los usuarios, pudieran conocer las concentraciones de este tóxico que presentan las diferentes especies de pescados comercializados en este país, y así podrían adecuar el consejo dietético para disminuir estos niveles al mismo tiempo que regular estas concentraciones de MeHg en sangre, sobretodo en estos grupos vulnerables, como son las gestantes, en las que se basa este estudio, además de madres lactantes y niños, cuyo correcto desarrollo es fundamental.

Este estudio se comienza con un estudio piloto en el que se han incluido a 42 mujeres gestantes, en su primer trimestre de embarazo, tras ser aprobado el 11 de Abril del 2016 por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (Inspección General de Sanidad). Se va a continuar investigando, incluyendo más gestantes, también en su primera fase de gestación, y se realizará un seguimiento trimestral a todas las participantes del estudio, de los niveles de Se y Hg, incluyendo el análisis en muestra de sangre y suero del cordón umbilical en el momento del parto.

Por lo tanto se considera que más adelante, se podrán sacar más conclusiones y aumentar el grado de fiabilidad de las mismas, por ser más representativa la muestra de pacientes.

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Mercury. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR, Atlanta, GA 1999. Disponible en URL.
2. ATSDR (U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for mercury: A National review of exposure events: 2009.
3. Megler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 2007;36(1): 3-11.
4. Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino. Fichas de consumo alimentario. Julio 2007-Junio. En URL: http://www.mapa.es/alimentación/pags/consumo/año_movil_jul07-jun08/fichas_consumo.pdf.
5. Agency of Toxic substances and Disease Registry (ATSDR). Addendum to the Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, GA 2013. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/mercury_organic_addendum.pdf
6. Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, Janle EM, Sangerre CR. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem* 2009; 112:46-50.
7. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *Am J Ind Med* 2007;50:757-64.
8. Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT)1 and LAT2. *Biochem J* 2002;367(1):239-46.
9. United States Environmental Protection Agency. EPA's Roadmap for Mercury. EPA 2006 Jul. Disponible en URL: <http://www.epa.gov/mercury/pdfs/FINAL-Mercury-Roadmap-6-29.pdf>
10. Barcelos GRM, Grotto D, de Marco KC, Valentini J, Lengert AVH, Oliveira AÁSD, et al. (2013). Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects environmentally exposed to methylmercury. *Sci Total Environ* 2013;463:319-25.

11. Basu N, Goodrich JM, Head J. Ecogenetics of mercury: From genetic polymorphism and epigenetics to risk assessment and decision-making. *Environ Toxicol Chem.* 2013.doi:10.1002/etc.2375.
12. Thurston SW, Bovet P, Myers GJ, Davidson PW, Georger LA, Shamlaye C et al. Does prenatal methylmercury exposure from fish consumption affect blood pressure in childhood?. *Neurotoxicology.*2007;28:924-30.
13. Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M, et al. Human developmental neurotoxicity of methylmercury :impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol*2008;51:201-14.
14. Choi AL, Cordier S, Weihe P, Grandjean P. Negative confounding in the evaluation of toxicity:the case of methylmercury in fish and seafood. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38:877-93.
15. Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, Keiding N, Weihe P. Underestimation of risk due to exposure misclassification. *Int J Occup Med Environ Health.* 2004;17:131-6.
16. Dorea JG. Mercury and lead during breast-feeding. *Brit J Nutr.* 2004;92:21-40.
17. Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Diez S, Vioque J, Ballester F et al. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res.*2010;110:96-104.
18. Surkan PJ, Wypij D, Trachtenberg F, Daniel DB, Barregard L, McKinlay S et al. Neuropsychological function in school-age children with low mercury exposures. *Environ Res.* 2009;109:725-33.
19. Bakir F, Rustam H, Tikriti S, Al-Damluji SF, Shiristani H. Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgrad Med J.*1980;56:1-10.
20. Kjellström T, Kennedy P, Wallis S, Steward A, Friberg L, Lind B, et al. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish: stage 2. Interviews and psychological test at age 6. *Natl Swed Environ Board Rep.* 1989;3642.
21. Lee BE, Hong YC, Park H, Ha M, Koo BS, Chang N et al. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphisms and blood mercury on birth weight. *Environ Health Persp.* 2010;118:437-43.

22. Ramón R, Ballester F, Aguinalde X, Amurrio A, Vioque J, Lacasaña M et al. fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother-infant cohort study in Spain. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1047-55.
23. Xue F, Holzman C, Rahbar MH, Trosko K, Fisher L. Maternal fish consumption, mercury levels, and risk of preterm delivery. *Environ Health Persp.* 2007;115:42-7.
24. Mackey TK, Contreras JT, Liang BA. The Minamata Convention on Mercury: Attempting to address the global controversy of dental amalgam use and mercury waste disposal. *Sci Total Environ.* 2014;472:125-29.
25. Recomendaciones de consumo de pescado (pez espada, tiburón, atún rojo y lucio) debido a la presencia de mercurio. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/rincon_consumidor/subseccion/mercurio_pescado.shtml
26. Weil M, Bressler J, Parsons P, Bolla K, Glass T, Schwartz B. Blood mercury levels and neurobehavioral function. *JAMA.* 2005;293:1875-82.
27. Kim BM, Lee BE, Hong YC, Park H, Ha M, Kim YJ et al. Mercury levels in maternal and cord blood and attained weight through the 24 months of life. *Sci Total Environ.* 2011;410:26-33.
28. Karagas MR, Choi AL, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E et al. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environ Health Persp.* 2012;120:799-806.
29. López-Bellido Garrido FJ, López Bellido L. Selenium and health; reference values and current status of Spanish population. *Nutr. Hosp.* vol.28 no.5 sep./oct. 2013.
30. Zimmermann MB, Köhrle J. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid.* 2002 Oct;12(10):867-78.

ANEXO A – HOJA DE INFORMACIÓN PARA LAS GESTANTES

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE MERCURIO EN LA POBLACIÓN EMBARAZADA

Lea detenidamente la información que a continuación le detallamos, consulte con quien crea necesario y pregunte si tiene dudas.

El Instituto de Toxicología de la Defensa y el Servicio de Ginecología de este hospital están realizando un estudio cuyo objetivo es medir y evaluar los niveles de mercurio de la población gestante. Dado que el consumo de algunos pescados pueden aumentar los niveles de mercurio, y este elemento puede ser tóxico para el embrión. A este estudio se le invita a participar, la decisión de participar no implicará ninguna diferencia con respecto a la calidad de la asistencia sanitaria que usted fuera a recibir.

Su participación en este estudio no va a suponer ningún riesgo, ni para usted, ni para su hijo. Además es libre de retirarse en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Por supuesto, estamos a su entera disposición para ampliar la información y cualquier detalle que sea de su interés relativo a este proyecto.

Los nombres de los participantes no aparecerán en ninguna información ni publicación sobre el estudio, cumpliendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de Carácter Personal. De acuerdo a esta misma ley, la paciente tendrá derecho de oposición, acceso, rectificación y cancelación del documento firmado. Se creará un fichero con la única finalidad de tratamiento de los datos para fines exclusivos del estudio. El único responsable y usuario de este fichero será el personal investigador.

En las muestras de sangre que se le extraerán durante su periodo de seguimiento gestacional, a las 12-13, 24-26 y 32 semanas de embarazo y en la de sangre del cordón umbilical en el momento del parto se le realizarán determinaciones de Mercurio y de Selenio.

Su participación en este proyecto de investigación, tendrá beneficios para usted, ya que nos permitirá obtener resultados y la posibilidad de actuar en consecuencia, en caso de que fuese necesario, a través de consejo dietético adecuado para reducir los niveles del tóxico. Asimismo, servirá para obtener información de gran utilidad para la salud pública, permitiendo establecer programas de actuación específicos.

Agradeciéndoles de antemano su imprescindible colaboración, pues sin la misma, muchas veces proveniente de personas ajenas a la medicina como usted, no sería posible alcanzar la luz en el diagnóstico y conocimiento de las enfermedades, reciba un cordial saludo.

ANEXO B – DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Conozco y entiendo el procedimiento de investigación descrito en esta hoja de información, de la cual tengo una copia.

Entiendo que puedo abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afectase a la calidad de la asistencia médica de mi embarazo.

De esta forma consiento participar en el estudio evaluación de niveles de mercurio en pacientes embarazadas, en muestras de sangre.

He tenido la oportunidad de que me expliquen todas mis dudas respecto a esta investigación.

Fecha:

Nombre y apellidos de la paciente
investigador

Nombre y apellidos del

Firma

Firma

- Persona de contacto: Begoña García Barrado
- Teléfono de contacto: 914222625

ANEXO C – ENCUESTA REALIZADA A LAS GESTANTES

- **EDAD:**
- **PESO:**
- **PAÍS DE PROCEDENCIA:**
 - PROVINCIA/REGIÓN:
 - AÑOS QUE LLEVA EN ESPAÑA:
- **NIVEL DE ESTUDIOS:**
 - SIN ESTUDIOS FORMACIÓN BÁSICA (primaria, secundaria)
 - BACHILLERATO ESTUDIOS UNIVERSITARIOS
- **¿CONOCE LOS RIESGOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE PESCADO CONTAMINADO CON MERCURIO?** Si No
- **¿LE HAN INFORMADO ANTERIORMENTE?** Si No
- **¿QUIÉN HA SIDO SU FUENTE DE INFORMACIÓN?**
 - MÉDICO MATRONA OTROS
- **¿CON CUÁNTA FRECUENCIA CONSUME PESCADO (fresco, congelado y/o enlatado) Y /O MARISCO A LA SEMANA?**
 - 0 veces/semana 1-2 veces/semana
 - 3-4 veces/semana Más de 4 veces/semana
- **¿CON QUÉ FRECUENCIA CONSUME ESTOS PESCADOS?**
 - **ATÚN/ BONITO(fresco, en lata...):**
 - 0 veces/semana 1-2 3-4 Más de 4
 - **PEZ ESPADA/ EMPERADOR/MARLÍN:**
 - 0 veces/semana 1-2 3-4 Más de 4
 - **TIBURÓN/MARRAJO/CAZÓN:**

0 veces/semana 1-2 3-4 Más de 4

○ **LUCIO:**

0 veces/semana 1-2 3-4 Más de 4

• **¿TIENE EMPASTES? ¿CUÁNTOS?** *No* *Si* (*número de empaste :.....*)

• **¿FUMA?** *No* *Si*

ANEXO D – MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS

MATERIAL Y EQUIPOS PARA MEDIR LAS VARIABLES

- La mejor matriz biológica para evaluar el MeHg es la sangre, dado que éste se concentra en los hematíes. De la concentración total de Hg, un 90% está en forma de MeHg.

Para el análisis se requieren muestras de sangre heparinizada (heparina Li) /EtilenDiaminotetraacético EDTA.

Las muestras de sangre se obtienen por venopunción, utilizando tubos de extracción de vacío, mezclándolas bien en el momento de extracción para evitar coágulos.

- También se requieren muestras de suero para analizar su contenido en Se.

4.7.1.- BASE DE DATOS DEL HOSPITAL

- Sistema Balmis

4.7.2.- ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

- Sistema Balmis

4.7.3.- EQUIPO FIMS-400

Se trata de un sistema de análisis de mercurio con inyección de flujo, que utiliza la técnica de espectrofotometría de absorción atómica y vapor frío (application of cold vapor/atomicabsortion, CVAAS), de la casa Perkin-Elmer modelo FIMS-400, que tiene un automuestreador AS-90.

El equipo utiliza una celda de longitud de onda de 260 nm y una lámpara de baja presión de mercurio como fuente de administración. Se utiliza un separador gas-líquido de politetrafluoroetileno (PTFE), con una membrana de PTFE para evitar el paso de humedad que reduciría la señal.

REACTIVOS :

- Ácido nítrico 65% (HNO_3) de grado suprapur de Merck, Damstadt, Alemania.
- Ácido clorhídrico 37% (HCl) grado para análisis, máximo 0,0000005% de HgMerck, Damstadt, Alemania.
- Ácido sulfúrico 96% (H_2SO_4) de grado suprapur de Merck, Damstadt, Alemania.
- Hidróxido sódico (NaOH) (lentejas).
- Tritón X-100: grado para análisis de Merck, Damstadt, Alemania.

Solución antiespumante de silicona: Dow Corning antifoaming 110 A de Perkin-Elmer

- Borohidruro sódico grado para análisis de Merck, Damstadt, Alemania.
- Dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) grado para análisis, máximo 0,0000005% de Hg.
- Siempre se utiliza agua de resistividad 18MS.cm obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EEUU).

SOLUCIÓN PATRÓN MADRE :

- Patrón madre de 10mg/L de Hg.

SOLUCIONES DE CALIBRACIÓN :

Disoluciones acuosas preparadas a partir de la solución madre, con 1% de solución estabilizante con unas concentraciones de mercurio de 0, 20, 50 y 100 microgramos /L.

SOLUCIONES INTERMEDIAS :

- Solución diluyente de mercurio: 1% (v/v) HNO_3 Y 2% (v/v) H_2SO_4 en agua MilliQ.
- Solución portadora HCl 10% (v/v).
- Solución de Tritón X-100 al 0,2 % (p/v).
- Solución estabilizante de mercurio (0,5 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 50% (V/V) HNO_3).
- Solución reductora de mercurio: (0,2 % (p/v), NaBH_4).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS :

Se realizará de la misma forma para Blanco, patrones y muestras.

En un tubo de polipropileno con tapón a rosca añadir en el orden siguiente:

Un (1) mL de una solución al 0,2% (p/v) de Tritón X-100 y 0,5 ml de muestra de sangre o solución de calibración. Después se añaden 0,1 ml de la solución estabilizante y se añaden 1 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se cierra el tubo y se deja digerir la muestra durante toda la noche en una estufa a 60 ± 5 °C.

Al día siguiente, sacarlo de la estufa y dejar enfriar hasta la temperatura ambiente y añadir en cada tubo 5,4 ml de solución diluyente para diluir la muestra 1/20 aproximadamente.

CONTROL DE CALIDAD :

Se realiza un análisis de las muestras por duplicado y se utilizan controles internos (SERONORM II).

Para ello se reconstituyen los controles por pesada en balanza analítica, se pesa el frasco control con el liofilizado y se tara a 0, posteriormente se va añadiendo agua MilliQ con pipeta de plástico hasta 3 g (= 3ml Seronorm). Se deja reposar veinte minutos y se homogeniza cuidadosamente sin formar espuma.

A continuación se añade al tubo de polipropileno 1ml de Tritón al 0,2%, 0,5 ml de la muestra Control, 1 ml de la solución estabilizante y por último 1 ml de ácido nítrico y 2ml de ácido sulfúrico. Se cierra el tubo y se deja digerir en estufa a 60 ± 5 °C toda la noche, de la misma forma que se hace para la muestra, patrones y blanco.

Al día siguiente, se añade 5,4 ml de solución diluyente para diluir la muestra 1/20 aproximadamente.

MATERIAL UTILIZADO :

- Matraz aforado de 1000mL, 500mL, 100mL y de 50 mL
- Micropipetas fijas de 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L y 1 mL
- Micropipetas variables 5mL

- Tubos de propileno de 50 mL para automuestreador
- Balanza analítica

4.7.4.- EQUIPO PERKIN ELMER 4110ZL (ETAAS)

Se trata de un espectrofotómetro de absorción atómica de atomización electrotérmica y corrección de fondo por efecto Zeeman, Perkin Elmer, Analyst600.

En este equipo se analizarán las muestras de sangre y de suero para determinar la concentración de selenio en ellas.

a. Procedimiento para analizar Se en muestras de sangre :

+ REACTIVOS :

- Ácido nítrico 65% (HNO_3) de grado suprapur de Merck, Damstadt, Alemania.
- Modificador de Paladio (Palladium-Modifier) para absorción atómica de la casa Merck, Damstadt, Alemania.
- Tritón X-100: grado para análisis de Merck, Damstadt, Alemania.

+ SOLUCIÓN PATRÓN MADRE :

- Patrón Madre de 1000mg/L de SE.

+ SOLUCIONES DE CALIBRACIÓN :

- Soluciones acuosas de trabajo preparadas a partir de la disolución patrón madre de Se con concentraciones de 200 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$ y de 50 $\mu\text{g/L}$ en nítrico al 1%.

+ SOLUCIONES INTERMEDIAS :

- Solución patrón de Se de 10mg/L en nítrico al 1%.
- Solución Modificador de Matriz de paladio: 1mL de Palladium-Modifier y 200 μL de reactivo tritón X-100.

+ LÍQUIDO DE LAVADO DE LAS AGUJAS DEL AUTOMUESTREADOR :

- Se utiliza agua MilliQ a la que se le añadirá reactivo Tritón al 10%.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS :

Se realizará de la misma forma para Blanco, patrones y muestras.

Se toman 100 μ L de agua MilliQ, solución patrón, control interno o muestra; y se añaden 900 μ L de solución modificador de matriz de paladio.

CONTROL DE CALIDAD :

Se realiza un análisis de las muestras por duplicado y se utilizan dos controles internos (Seronorm level I y seronorm level II). Se prepararán de la misma forma que las muestras.

MATERIAL UTILIZADO :

- Espectrofotómetro de absorción atómica de atomización electrotérmica y corrección de fondo por efecto Zeeman Perkin Elmer Aanalyst600.
- Tubo de grafito con “End-cup”
- Matraz aforado de 100mL y de 50mL
- Tubos de plástico
- Micropipetas fijas de 200 μ L, 500 μ L y 1mL.
- Pocillos de 1,2mL para automuestreador.

b. Procedimiento para analizar muestras de suero :

REACTIVOS :

- Utak Trace Elements Serum Level 1 y 2.
- ClinChek® Serum Control, lyophilized, for Trace Elements ref 8882 Serum Control, lyophil. , Level I, II 2 x 5 x 3 mL.
- Ácido nítrico 65% (HNO₃) de grado suprapur de Merck, Damstadt, Alemania.
- Modificador de Paladio (Palladium-Modifier) para absorción atómica de la casa Merck.
- Tritón X-100: grado para análisis de Merck, Damstadt, Alemania.

SOLUCIONES INTERMEDIAS :

- Solución Modificador de Matriz de paladio.

Para su realización se añade a un tubo de plástico descontaminado con capacidad para 100g, 1mL de Modificador de Paladio (Palladium-Modifier), 200 μ L de reactivo Tritón X-100 y llegar hasta 100g con agua MilliQ. Guardándolo posteriormente en nevera.

PATRONES DE CALIBRACIÓN :

Se utilizarán patrones comerciales de Utak niveles I y II.

En los pocillos de 1,2mL para automuestreador de los equipos instrumentales, tomar 100 μ L de los patrones de trabajo y añadir 900 μ L de solución modificador de matriz de paladio.

CONTROL DE CALIDAD :

Como controles Internos se utilizarán sueros comerciales de Clincheck niveles 1 y 2.

Se preparan de la misma forma que las muestras.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS :

En los pocillos de 1,2mL para el automuestreador de los equipos instrumentales, tomar 100 μ L de control interno, muestra o agua MilliQ (para la preparación del blanco) y añadir 900 μ L de solución modificador de matriz paladio.

Es importante utilizar las mismas micropipetas para la preparación de todos los patrones, controles, muestras y blanco.

MATERIAL UTILIZADO :

- Espectrofotómetro de absorción atómica de atomización electrotérmica y corrección de fondo por efecto Zeeman Perkin Elmer Analyst600.
- Tubo de grafito con "End-cup".
- Tubos de plástico.
- Micropipetas fijas de 200 μ L, 500 μ L y 1 mL.
- Pocillos de 1,2mL para automuestreador.

ANEXO E – PROCESO ESTADÍSTICO

5.1.- ESTADÍSTICA

5.1.1.- ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Como índices de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas se emplearán la media aritmética y la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartílico, dependiendo de la asunción o no, respectivamente, del supuesto de la normalidad de las mismas determinado mediante el test de Kolmogorof-Smirnov (K-S), para muestras mayores o iguales a 30, o del de ShapiroWilks (S-W), para muestras menores de 30 casos.

Para las variables categóricas se emplearán las frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

Como representaciones gráficas se usarán los diagramas de barras o de sectores, para variables categóricas; y los de barras de error o de cajas, para variables cuantitativas que asuman o no, respectivamente, el supuesto de la normalidad (K-S ó S-W).

5.1.2.- ESTADÍSTICA INFERENCIAL

La medida de asociación entre dos variables categóricas se efectuará mediante la χ^2 de Pearson, o la prueba exacta de Fisher si ambas fueran dicotómicas, en cuyo caso la valoración del efecto se realizará mediante la estimación del riesgo (RP), y su precisión con su intervalo de confianza del 95%.

Para determinar la asociación entre una variable independiente dicotómica y dependiente cuantitativa de distribución paramétrica (K-S o S-W) se empleará el test t de Student para muestras independientes o para muestras dependientes, en función de su condición de no apareada o apareada, respectivamente. En ambos casos se valorará el efecto mediante la diferencia de medias, y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95%. Si la variable dependiente vulnerara el supuesto de la normalidad (K-S o S-W) se empleará el test U de Mann Whitney, para muestras independientes; o el test de Wilcoxon para muestras apareadas. La

medida del efecto se valorará en ambos casos mediante la diferencia de las medianas.

La medida de asociación entre una variable independiente politémica y dependiente cuantitativa se estimará con el test F de Snedecor (ANOVA de una vía) o con el de Kruskal Wallis, dependiendo del carácter gaussiano o no (K-S o S-W), respectivamente, de dicha variable cuantitativa. Si los valores de la variable independiente fueran medidas repetidas en un periodo de tiempo establecido se empleará un modelo lineal para medidas repetidas o el test de Friedman, en función de la asunción o no, respectivamente, de la normalidad de las distribuciones (K-S o S-W). Las comparaciones múltiples post hoc se efectuarán mediante el test de Bonferroni, para distribuciones paramétricas con varianzas iguales, el test T3 de Dunnett para distribuciones paramétricas con varianzas desiguales; o con el test de las medianas, para distribuciones no paramétricas, previa corrección del nivel de significación estadística según el número de comparaciones.

Para determinar la relación entre dos variables cuantitativas, una dependiente y otra independiente (que también podría ser categórica), ambas de carácter gaussiano (K-S o S-W), se realizará una regresión lineal con la estimación del cuadrado de su coeficiente de regresión (r^2) y la ecuación de la recta correspondiente. Si ambas fueran independientes, la asociación se estimaría con una correlación bivariada de Pearson, si ambas asumieran el supuesto de la normalidad (K-S o S-W), o Rho de Spearman, si al menos una lo vulnerase. En ambos casos se obtendría el correspondiente coeficiente de correlación (r).

Para determinar la asociación entre una variable dependiente dicotómica y más de una independiente categórica o cuantitativa, así como variables de interacción, se empleará un modelo explicativo de regresión logística (log Rank). Dentro del mismo se valorará el efecto de cada variable a través de sus correspondientes odds ratio (OR) y la precisión mediante su intervalo de confianza del 95%.

En todos los casos, como grado de significación estadística se empleará un valor de $p < 0,05$ y la aplicación estadística será el paquete SPSS® versión 15.