



Evaluación de factores de riesgo maternos y ambientales asociados a labio y paladar hendidos durante el primer trimestre de embarazo

Norma Patricia Figueroa Fernández,* Héctor Francisco Meraz Acosta,** María Eugenia Navarro Espinoza,***
Nicolás Addiel Serafín Higuera,** Ernesto Alonso Beltrán Partida,** Mario Alberto Isiordia Espinoza*

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el riesgo de labio fisurado con o sin paladar hendido en recién nacidos según diferentes factores de riesgo maternos y ambientales durante el primer trimestre del embarazo. **Pacientes y métodos:** Se realizó un estudio de casos y controles en la Clínica 31 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la ciudad de Mexicali, Baja California, México, previa autorización del Comité Interno de Ética. Mediante una entrevista con las madres de los casos y los controles se evaluaron, a través de una encuesta, los factores de riesgo maternos y ambientales reportados previamente en la literatura. La evaluación del riesgo se realizó mediante el cálculo del Odds Ratio con intervalos de confianza del 95% y se consideró diferencia estadística cuando $p < 0.05$. **Resultados:** El riesgo de labio y paladar hendidos se incrementó entre aquellos que consumen alcohol así como entre quienes están expuestos a sustancias químicas, con diferencias estadísticas para ambos. **Conclusión:** Los resultados de este estudio sugieren que el consumo de alcohol y el contacto con agentes químicos durante el primer trimestre del embarazo aumentan el riesgo de desarrollar labio y paladar hendidos.

Palabras clave: Labio y paladar hendidos, factores de riesgo maternos, factores de riesgo ambientales, consumo de alcohol, uso de sustancias químicas.

SUMMARY

Aim: The objective of this study was to assess the risk of cleft lip with or without cleft palate in newborns according to different maternal and environmental risk factors during the first trimester of pregnancy. **Patients and methods:** A cases controls study was done in the clinic 31 of the Mexican Social Security Institute in Mexicali, Baja California, Mexico, prior authorization of the Internal Ethics Committee. A survey was applied each mother to evaluate the maternal and environmental risk factors previously reported in the literature. The risk evaluation was performed by calculating odds ratios with confidence intervals of 95% and statistical difference when $p < 0.05$. **Results:** An increased risk for development cleft lip and palate was obtained for alcohol consumption and contact with chemicals ($p < 0.05$). **Conclusion:** The results of this study suggest that alcohol consumption and contact with chemical agents during the first trimester of pregnancy increase the risk of developing cleft lip and palate.

Key words: Cleft lip and palate, maternal risk factor, environmental risk factor, alcohol consumption, use of chemicals.

* Profesor, Departamento de Cirugía Bucal y Maxilofacial.

** Profesor asociado, Departamento de Cirugía Bucal y Maxilofacial.

*** Profesor, Departamento de Morfología.

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California, México.

Correspondencia:

Dr. Mario Alberto Isiordia Espinoza

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California.

Calle Zotoluca y Chinampas s/n, Fraccionamiento Calafia, 21040, Mexicali, México.

E-mail: mario.isiordia@uabc.edu.mx o isiordia81@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/cirugiabucal>

INTRODUCCIÓN

El labio y el paladar hendidos (LPH) son los defectos craneofaciales de nacimiento más comunes en el ser humano.¹ Son deficiencias estructurales congénitas por falta de unión entre los procesos faciales embrionarios en formación. Las fisuras del paladar primario y las de la cara, que incluyen los procesos faciales, ocurren en el periodo embrionario, a partir de la sexta semana de vida intrauterina, mientras que las hendiduras del paladar secundario ocurren a partir de la octava semana de vida prenatal.² Las áreas más afectadas son el labio superior, el reborde alveolar, el paladar duro y el paladar blando. Las fisuras aisladas del labio y el paladar constituyen el resto de las variedades que se observan. Las fisuras de labio son más frecuentes en el género masculino, mientras que las fisuras aisladas del paladar son más comunes en el femenino.³ Las personas afectadas inicialmente enfrentan dificultades para alimentarse, así como en el habla y la audición, además de sufrir problemas dentales. Estas malformaciones del desarrollo pueden repararse con múltiples cirugías craneofaciales y dentales; después de las intervenciones, los pacientes con frecuencia necesitan terapia de habla y audición.^{4,5}

Estas malformaciones afectan a uno de cada 500 nacimientos en poblaciones asiáticas, a uno de 1,000 en los caucásicos, hispanos y latinos, y a uno de 2,500 en la raza negra.⁶ De acuerdo con la literatura, la incidencia de dichas malformaciones en países latinoamericanos es: hendidura del labio y paladar, uno por cada 1,300 nacimientos; hendidura del labio, uno por cada 1,000; y la fisura del paladar, uno en 2,500. El 60 a 80% de los afectados son varones, con una relación masculino:femenino de 7:3. El lado más afectado es el izquierdo, sobre todo en varones. Cuando es bilateral, se asocia a fisura palatina en el 86% y cuando es unilateral, la asociación es del 68%.² México reporta una incidencia de 1.1 a 1.39 por cada 1,000 nacidos vivos registrados. Además, ocupan el primer lugar entre todas las anomalías congénitas del macizo facial.⁷

El LPH es un grupo de trastornos causado por la interacción de múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales.⁸ El desarrollo orofacial es un proceso complejo que involucra muchos genes y vías de señalización, por lo que alteraciones en uno o más genes podrían causar labio y/o paladar hendido(s). Un estudio, realizado por Ibarra-Arce y cols. (2015) en una muestra de individuos mexicanos, demostró que la presencia de polimorfismos sobre el gen

IRF6 aumenta el riesgo de desarrollar LPH. En este estudio también se propone la hipótesis de que los factores de riesgo ambientales y étnicos podrían ser considerados como desencadenantes, interactuando con la vía IRF6.⁹ En diversos estudios se ha concluido que esta anomalía se relaciona con factores como fármacos o cualquier otra droga, consumo de alcohol, tabaquismo, edad materna, diabetes en el embarazo, abortos anteriores, aspectos genéticos y nutricionales, el uso de pesticidas en agricultura, radiación ionizante, agentes infecciosos, estrés, antecedentes familiares y la presencia de otras malformaciones craneofaciales. Algunos autores en México y otras partes del mundo también han reportado como factores de riesgo para LPH variables sociodemográficas, socioeconómicas y contaminantes.¹⁰

El propósito de este estudio fue evaluar el riesgo de labio fisurado, con o sin paladar hendido, en recién nacidos según diferentes factores de riesgos maternos y ambientales durante el primer trimestre de embarazo.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles en la Clínica 31 del Instituto Mexicano del Seguro Social, de la ciudad de Mexicali, Baja California, México, previa autorización del Comité Interno de Ética. Se calculó el tamaño de la muestra con el programa estadístico Epi Info versión 6, con los siguientes datos: Confiabilidad de 95%, potencia estadística 80%, Odds Ratio de 2.5, con una proporción esperada de 0.13 en el grupo de no enfermos, y de 40% en el grupo de enfermos, y una proporción de 1:2 de enfermos y no enfermos. Los resultados obtenidos mostraron una cantidad de 13 sujetos en el grupo de casos y de 26 individuos en el grupo de controles.

Los criterios de inclusión fueron madres de niños nacidos con labio y/o paladar hendido(s) y madres con niños sanos nacidos durante el mismo periodo de tiempo. Los criterios de exclusión fueron madres de niños con anomalías asociadas y madres en las que el periodo de gestación se haya desarrollado en otra entidad.

Siguiendo reportes previos en la literatura, se evaluaron los factores de riesgo maternos y ambientales por medio de una entrevista, aplicando encuestas a las madres de los casos y los controles. Las variables evaluadas en este estudio fueron: datos sociodemográficos, cuidados prenatales, vacunas durante el embarazo, enfermedad durante el embarazo, anticonceptivos, tabaquismo, ingesta

de alcohol, uso de drogas, uso de medicamentos durante el embarazo, familiares con antecedentes de LPH, consanguinidad, lugar de residencia próximo a un terreno agrícola, a una maquiladora o a una fábrica; uso de plaguicidas y/o fertilizantes en el hogar o jardín, y contacto con otras sustancias químicas.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Sigma Plot versión 11. La evaluación del riesgo se realizó mediante el cálculo del Odds Ratio con intervalos de confianza del 95% (IC95%). La prueba exacta de Fisher se empleó para comparar variables medidas en una escala nominal. La prueba t de Student fue usada para comparar variables numéricas entre ambos grupos. Se consideró diferencia estadística significativa cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

El nacimiento de bebés afectados se dio durante todo el año. Diciembre fue el mes con más nacimientos, con tres casos; le siguieron enero, marzo, septiembre y noviembre con dos casos, y abril y mayo con un caso ($p > 0.05$). El LPH afectó con mayor frecuencia al sexo masculino, con cuatro y cinco casos respectivamente. En el sexo femenino se presentaron dos casos de LH y 2 de PH ($p > 0.05$).

Los datos sociodemográficos, así como los factores que se consideraron producirían un aumento del riesgo en las madres para que se presentaran estas malformaciones no mostraron diferencias estadísticas (*Cuadro I*). En el caso de siete de estas variables se puede observar un riesgo aumentado, superior a 1, pero sin diferencia estadística según los IC95% y el valor de p.

En cuanto a hábitos por toxicomanías se encontró diferencia estadística para el consumo de alcohol. El uso de fármacos y el fumar tabaco presentaron un riesgo aumentado según el valor obtenido del OR, el cual estuvo por arriba de 1, pero los IC95% y el valor de p no mostraron diferencias estadísticas (*Cuadro II*). Las variables que se usaron para evaluación del riesgo por exposición a factores ambientales, como el uso de agentes químicos, presentó un riesgo aumentado obteniéndose diferencia estadística de acuerdo al valor de p únicamente, pero no con los IC95%. En el grupo de casos, una madre usó solventes orgánicos y otro individuo ácido acético, mientras que en el grupo de controles dos personas usaron alcohol industrial, dos más solventes orgánicos y una tricloroetileno. Otra variable que mostró un riesgo aumentado, según el OR, fue residir cerca de una zona industrial, la cual obtuvo un valor de OR por encima de 1 pero sin diferencia estadística (*Cuadro II*).

DISCUSIÓN

Este estudio de casos y controles demostró que el consumo de alcohol por la madre durante el primer trimestre del embarazo incrementa el riesgo de que el recién nacido padezca LPH. De la misma manera, el contacto con agentes químicos aumenta el riesgo de presentar malformaciones craneofaciales. Otros factores evaluados en este estudio también demostraron un incremento en el riesgo; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas según los valores obtenidos de los IC95% y el valor de p.

Cuadro I. Datos sociodemográficos y factores de riesgo maternos.

	Casos (n = 13)	Controles (n = 26)	OR (IC95%)	Valor de p
Cuidados prenatales	11	22	1 (0.15 a 6.33)	1
Anticonceptivos	2	5	0.76 (0.12-4.59)	1
Vacunas	3	9	0.56 (0.12 a 2.59)	0.71
Enfermedad en el embarazo	3	2	3.66 (0.52 a 24.93)	0.31
Peso del producto (media ± DE)	3.11 ± 0.61	3.31 ± 0.48	(-0.56 a 0.16)	0.27
Bajo peso/peso normal del producto	2/11	2/24	2.18 (0.27 a 17.56)	0.58
Talla del producto (media ± DE)	49.63 ± 1.56	51.53 ± 1.33	(-6.41 a 2.59)	0.38
Talla baja/normal	3/10	4/22	5.33 (0.65 a 52.31)	0.82
Edad gestacional pretérmino/normal	4/9	2/24	5.33 (0.82 a 34.33)	0.15
Edad de la madre (media ± DE)	26.54 ± 4.82	26.27 ± 4.19	(-2.76 a 3.30)	0.85
Madres mayores de 30 años	2	3	1.39 (0.20 a 9.58)	1
Edad del padre (media ± DE)	30.31 ± 8.44	28.38 ± 5.18	(-2.50 a 6.34)	0.38
Padres mayores de 30 años	5	8	1.40 (0.34 a 5.66)	0.72
Familiar malformado	2	0	-	0.10

Cuadro II. Factores de riesgo ambientales.

	Casos (n = 13)	Controles (n = 26)	OR (IC95%)	Valor de P
Fármacos	4	6	1.48 (0.33-6.57)	0.70
Tabaquismo	2	2	2.18 (0.27-17.56)	0.58
Alcoholismo	8	6	5.33 (1.26-22.56)	0.03
Residencia urbana	9	24	0.18 (0.02-1.20)	0.15
Residencia cerca de zona agrícola	2	3	1.39 (0.20-9.58)	1
Residencia cerca de zona industrial	1	7	0.22 (0.02-2.07)	0.22
Uso de fertilizantes	12	25	0.48 (0.02-8.34)	1
Uso de agentes químicos	3	0	-	0.03

El consumo materno de alcohol durante el embarazo puede afectar negativamente al feto, ocasionando una amplia gama de discapacidades físicas, alteraciones del comportamiento y problemas neurocognitivos. El patrón y la gravedad de estos efectos dependen de la dosis, el momento, la cantidad de veces y la duración de exposición al alcohol. A su vez, la vulnerabilidad al daño inducido por el alcohol varía entre los tipos de células y tejidos, así como a través del desarrollo fetal.¹¹ Los estudios en animales han demostrado que la exposición al alcohol durante la gestación altera las células de la cresta neural craneal y las células embrionarias que contribuyen al desarrollo de la cara, incluyendo labio y paladar.¹²

Una revisión sistemática y un metaanálisis realizados por Bell y cols. (2014), con el propósito de evaluar el consumo de alcohol materno en el desarrollo de LPH en pacientes, no demostró asociación alguna. Sin embargo, una limitación de este estudio, que incluso los mismos autores mencionan, es no especificar la cantidad de alcohol consumida.¹³ Es importante mencionar que el alcohol es un teratógeno reconocido.¹⁴ Un estudio reciente demostró que la combinación de variantes del gen ADH1C produce una reducción de la actividad enzimática, y el alto consumo materno de alcohol aumenta el riesgo de hendiduras orofaciales.¹⁵ Sin embargo, la influencia del alcohol puede ser confundida con otros factores de riesgo tales como la nutrición, el tabaquismo o el estrés, y que pueden estar asociados con el consumo de alcohol en algunos contextos. De la misma manera, como se mencionó en la introducción de este artículo, la etiología de estas malformaciones es multifactorial. El papel del alcohol parece aumentar el riesgo cuando se encuentran ciertos polimorfismos presentes en los individuos, como sería el caso de los genes ADH1C¹⁵ y IRF6,⁹ este último en una muestra de individuos mexicanos; por lo que considerar

únicamente la exposición al alcohol sería un gran error debido a las fuertes evidencias que se han obtenido de la influencia de estos factores mediante estudios de biología molecular.

El estrés oxidativo ha sido propuesto como un mecanismo por el cual algunos teratógenos causan defectos de nacimiento.¹⁶ Varios disolventes clorados, como tetracloruro de carbono, cloroformo, cloruro de metileno y tricloroetileno, han sido identificados como inductores de estrés oxidativo por producir especies reactivas de oxígeno.¹⁷ Estos compuestos han sido ampliamente utilizados como disolventes para los procesos industriales, como el desengrasado de metales y limpieza en seco, y para la producción de productos farmacéuticos, pesticidas, adhesivos y refrigerantes.¹⁸ Los resultados de varios estudios experimentales en modelos animales han indicado un aumento significativo en la prevalencia de malformaciones congénitas, como anencefalia, defectos musculoesqueléticos y defectos cardíacos cuando hay exposición a disolventes clorados.¹⁹⁻²³ Sin embargo, estos hallazgos no se han reproducido por otros investigadores en estudios con roedores expuestos a cloruro de metileno, cloroformo de metilo, percloroetileno y tricloroetileno.^{24,25} Estudios epidemiológicos han examinado la relación entre la exposición ocupacional materna a varios solventes clorados y malformaciones congénitas en sus hijos,²⁶⁻²⁹ observándose asociación entre estos compuestos y el labio hendido con o sin paladar hendido,²⁶ espina bífida,²⁷ defectos de las extremidades²⁸ y defectos cardíacos.²⁹ En este estudio encontramos un riesgo aumentado de LPH cuando la madre estuvo expuesta a algún tipo de sustancia química.

Es muy importante observar la tendencia de los resultados obtenidos de muchas variables evaluadas en este estudio, como por ejemplo el padecimiento de una enfermedad en el embarazo (infección), la edad de la madre, el uso de fármacos, de tabaco y la

cercanía con zonas agrícolas, las cuales mostraron un aumento del riesgo sin diferencia estadística. La mayoría de estas variables han sido reportadas como factores que aumentan el riesgo de desarrollar LPH en estudios epidemiológicos anteriores.²

Finalmente, es muy importante mencionar las limitaciones de este estudio que van en relación con su diseño. En los estudios de casos y controles la información se recoge de manera retrospectiva, por lo que depende de manera muy importante de la persona entrevistada y su capacidad para recordar las cosas. Por lo anterior, es difícil establecer una secuencia temporal, y ésta suele ser de tipo incorrecta, es decir, se tiene una enfermedad (efecto) y se va a buscar la(s) causa(s). Otro problema con este tipo de estudios es el sesgo del entrevistador, el cual puede aparecer siempre que el encuestador u observador tenga conocimiento del grupo al que pertenezca el sujeto al que está entrevistando y el objetivo del estudio.³⁰

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que el consumo de alcohol y el contacto con sustancias químicas durante el primer trimestre del embarazo aumentan el riesgo de desarrollar LPH.

BIBLIOGRAFÍA

- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012; 49: 73-91.
- Mejía-Ayala AC, Suárez-Vergara DE. Factores de riesgo materno predominantes asociados con labio leporino y paladar hendido en los recién nacidos. *Arch Inv Mat Inf*. 2012; IV: 55-62.
- Corbo Rodríguez MT, Torres Marimón EM. Labio y paladar fisurados, aspectos generales que se deben conocer en la atención primaria de salud. *Rev Cub Med Gen Integr*. 2001; 4: 379-385.
- Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ*. 2004; 328: 1405.
- Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Dis*. 2010; 16: 3-10.
- Nazer J, Ramírez MC, Cifuentes L. Evolution of prevalence rates of orofacial clefts in a maternity of a Chilean clinical hospital. *Rev Med Chil*. 2010; 138: 567-572.
- Dávalos-Rodríguez IP, Ramírez-Lizardo EJ, Mena JP, Ledezma-Rodríguez V, Omayra-Dávalos N, González-Mercado MG et al. Non-syndromic cleft lip/cleft palate and C677T methylene-tetrahydrofolate reductase variant in Mexican children. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2009; 47: 549-552.
- Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013; 163: 246-258.
- Ibarra-Arce A, García-Álvarez M, Cortés-González D, Ortiz de Zárate-Alarcón G, Laura Flores-Peña L, Sánchez-Camacho S et al. IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. *Meta Gene*. 2015; 4: 8-16.
- González-Osorio CA, Medina-Solís CE, Pontigo-Loyola AP, Casanova-Rosado JF, Escoffié-Ramírez M, Corona-Tabares MG et al. Estudio ecológico en México (2003-2009) sobre labio y/o paladar hendido y factores sociodemográficos, socioeconómicos y de contaminación asociados. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 74: 377-387.
- Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health*. 2001; 25: 175-184.
- Cartwright MM, Smith SM. Stage-dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 1454-1462.
- Bell JC, Raynes-Greenow C, Turner RM, Bower C, Nassar N, O'Leary CM. Maternal alcohol consumption during pregnancy and the risk of orofacial clefts in infants: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2014; 28: 322-332.
- West JR, Blake CA. Fetal alcohol syndrome: an assessment of the field. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; 230: 354-356.
- Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC et al. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case control study in Norway, 1996-2001. *Am J Epidemiol*. 2010; 172: 924-931.
- Hansen JM. Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006; 78: 293-307.
- Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem*. 2001; 8: 773-796.
- Huang B, Lei C, Wei C, Zeng G. Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in the environment-sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environ Int*. 2014; 71: 118-138.
- Elovaara E, Hemminki K, Vainio H. Effects of methylene chloride, trichloroethane, trichloroethylene, tetrachloroethylene and toluene on the development of chick embryos. *Toxicology*. 1979; 12: 111-119.
- Loeber CP, Hendrix MJ, Diez De Pinos S, Goldberg SJ. Trichloroethylene: a cardiac teratogen in developing chick embryos. *Pediatr Res*. 1988; 24: 740-744.
- Goldberg SJ, Dawson BV, Johnson PD, Hoyme HE, Ulreich JB. Cardiac teratogenicity of dichloroethylene in a chick model. *Pediatr Res*. 1992; 32: 23-26.
- Johnson PD, Dawson BV, Goldberg SJ. Cardiac teratogenicity of trichloroethylene metabolites. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32: 540-545.
- Johnson PD, Goldberg SJ, Mays MZ, Dawson BV. Threshold of trichloroethylene contamination in maternal drinking waters affecting fetal heart development in the rat. *Environ Health Perspect*. 2003; 111: 289-292.
- Schwetz BA, Leong KJ, Gehring PJ. The effect of maternally inhaled trichloroethylene, perchloroethylene, methyl chloroform, and methylene chloride on embryonal and fetal development in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975; 32: 84-96.
- Carney EW, Thorsrud BA, Dugard PH, Zablotsny CL. Developmental toxicity studies in Crl:CD (SD) rats following inhalation exposure to trichloroethylene and perchloroethylene. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2006; 77: 405-412.
- Chevrier C, Dananche B, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C et al. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occup Environ Med*. 2006; 63: 617-623.

27. Desrosiers TA, Lawson CC, Meyer RE, Richardson DB, Daniels JL, Waters MA et al. Maternal occupational exposure to organic solvents during early pregnancy and risks of neural tube defects and orofacial clefts. *Occup Environ Med.* 2012; 69: 493-499.
28. Cordier S, Garlantezec R, Labat L, Rouget F, Monfort C, Bonvallet N et al. Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. *Epidemiology.* 2012; 23: 806-812.
29. Gilboa SM, Desrosiers TA, Lawson C, Lupo PJ, Riehle-Colarusso TJ, Stewart PA et al. Association between maternal occupational exposure to organic solvents and congenital heart defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Occup Environ Med.* 2012; 69: 628-635.
30. Argimon-Pallás JM, Jiménez-Villa J. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica.* Tercera Edición. Madrid: Elsevier España, S. A., 2004: 76-89.