

Universidad de Granada

Facultad de Medicina

Departamento de Radiología y Medicina Física



**EXPOSICIÓN INFANTIL A
CONTAMINANTES AMBIENTALES
EN GRANADA Y POSIBLES
EFECTOS EN SALUD**

CARMEN FREIRE WARDEN

TESIS DOCTORAL

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carmen Freire Warden
D.L.: GR 2307-2009
ISBN: 978-84-692-3111-1

EXPOSICIÓN INFANTIL A CONTAMINANTES AMBIENTALES EN GRANADA Y POSIBLES EFECTOS EN SALUD

D. NICOLÁS OLEA SERRANO, Catedrático y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario San Cecilio de Granada,

Dña. MARIANA FERNÁNDEZ CABRERA, Investigadora Ramón y Cajal del Departamento de Radiología y Medicina Física y del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, y

D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, Catedrático y Profesor Emérito del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

Que la Lda. Dña. **CARMEN FREIRE WARDEN** ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada “**EXPOSICIÓN INFANTIL A CONTAMINANTES AMBIENTALES EN GRANADA Y POSIBLES EFECTOS EN SALUD**”, que presenta para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Ambientales. Revisada la misma, la encuentran conforme para ser juzgada por el tribunal designado por la Universidad de Granada. Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmamos el presente certificado.

D. Nicolás Olea

Dña. Mariana Fernández

D. Vicente Pedraza

**DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**



NICOLÁS OLEA SERRANO, Catedrático de Radiología y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado por la licenciada en Ciencias Ambientales Dña. **CARMEN FREIRE WARDEN** en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada. Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmo el presente certificado.

Granada, 13 de abril de 2009

Fdo. Prof. D. Nicolás Olea Serrano

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título “**EXPOSICIÓN INFANTIL A CONTAMINANTES AMBIENTALES EN GRANADA Y POSIBLES EFECTOS EN SALUD**”, ha sido presentada por la **Lda. Carmen Freire Warden** para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Ambientales, habiendo sido dirigida por **D. Nicolás Olea Serrano**, Catedrático y Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, **Dña. Mariana Fernández Cabrera**, Investigadora del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y **D. Vicente Pedraza Muriel**, Catedrático y Profesor Emérito del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Granada, 13 de abril de 2009

Fdo. Carmen Freire Warden

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en parte gracias a los proyectos de investigación **“Infancia y Medioambiente (INMA). Exposiciones pre- y postnatales a contaminantes ambientales, dieta, crecimiento fetal y desarrollo neuro-inmuno-endocrino”** (Proyectos nº G03/176 y 05/1911) y **“Efecto de la exposición materno-infantil vía placentaria a compuestos químicos que interfieren en la actividad desyodasa sobre el desarrollo neuroconductual”** (FIS nº PI070252), financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias; al proyecto **“Evaluación de la exposición infantil a contaminantes atmosféricos en la provincia de Granada y posibles efectos en el desarrollo postnatal”** (Proyecto nº 0183/2007), financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía; y al **“Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública” CIBERESP** (nº CB/06/02/0049)

Se agradece, igualmente, la ayuda recibida de la Fundación Hospital Clínico de Granada.

La doctoranda Carmen Freire Warden ha sido becada por la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia en el Programa de postgrado para la Formación de Profesorado Universitario (FPU).

“El mundo que hasta este momento hemos creado como resultado de nuestra forma de pensar, tiene problemas que no pueden ser resueltos pensando del modo en que pensábamos cuando lo creamos”

Albert Einstein (1879-1955)

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Infancia y Medio Ambiente.....	3
2. Vulnerabilidad infantil a los contaminantes ambientales.....	10
2.1. Factores sociales, económicos y psicológicos.....	14
3. Evidencia epidemiológica.....	16
4. Estudios de cohortes.....	18
5. Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad.....	19
6. Exposición infantil a contaminantes del agua: subproductos de cloración.....	23
6.1. Evaluación de la exposición.....	26
7. Exposición infantil a contaminación atmosférica.....	27
7.1. Aire exterior.....	27
7.2. Aire interior.....	30
7.3. Contaminación atmosférica derivada del tráfico.....	34
Contaminación atmosférica urbana y efecto neurotóxico.....	36
7.4. Evaluación de la exposición.....	37
Monitorización ambiental.....	38
Modelización de la exposición.....	39
Cuestionarios.....	42
Biomarcadores.....	43
7.5. Biomarcador 1-hidroxipireno.....	44
8. Exposición infantil a contaminantes a través de la dieta.....	46
8.1. Mercurio.....	46
8.2. Metilmercurio.....	49

Exposición y efecto neurotóxico.....	49
Biomarcadores de exposición.....	53
Evaluación del riesgo.....	54
Mercurio en el Mediterráneo.....	56
9. Contaminación ambiental y neurodesarrollo infantil.....	58
9.1. Factores modificadores.....	62
9.2. Evaluación del neurodesarrollo infantil.....	63
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. Diseño del estudio.....	75
2. Área geográfica de estudio.....	75
3. Población de estudio.....	77
4. Seguimiento clínico: protocolo 4 años.....	78
4.1. Evaluación neuropsicológica.....	80
4.2. Crecimiento postnatal.....	83
4.3. Cuestionarios.....	84
Cuestionarios pediátricos.....	84
Cuestionarios psicológicos.....	85
Cuestionarios ambientales.....	87
4.4. Biomarcadores de exposición.....	88
Orina: análisis de 1-hidroxipireno.....	88
Pelo: análisis de mercurio.....	89
5. Monitorización ambiental.....	91
5.1. Subproductos de la cloración.....	91
Toma de muestras.....	91

Determinación analítica de trihalometanos.....	92
5.2. Contaminantes atmosféricos.....	93
Determinación analítica de NO ₂ y COVs.....	99
6. Modelización de la exposición a contaminación atmosférica.....	100
6.1. Variables geográficas.....	101
6.2. Análisis de proximidad.....	103
6.3. Interpolación espacial de los niveles de NO ₂	104
6.4. Modelos de regresión.....	105
6.5. Asignación de niveles de exposición.....	107
7. Otras variables de estudio.....	109
8. Análisis epidemiológico y estadístico.....	110
IV. RESULTADOS.....	115
1. Valores de trihalometanos en agua de consumo de la provincia de Granada, España.....	115
2. Niveles de contaminación atmosférica y modelización de la exposición individual a NO ₂ en niños de la cohorte INMA-Granada mediante el uso de sistemas de información geográfica (SIG) y modelos de regresión.....	125
2.1. Niveles de NO ₂ y COVs.....	127
2.2. Interpolación de los niveles de NO ₂	135
2.3. Modelos de regresión para NO ₂	140
2.4. Asignación de niveles de exposición a NO ₂	141
3. <i>Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children</i>	143
4. <i>Association of traffic-related air pollution with cognitive development in children</i>	153

5. <i>Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Southern Spain</i>	187
V. DISCUSIÓN	229
1. Valores de trihalometanos en agua de consumo de Granada.....	229
2. Niveles de contaminación atmosférica y exposición individual a NO ₂ en población infantil de Granada.....	233
3. Niveles de 1-hidroxipireno y exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos en población infantil de Granada	240
4. Exposición a contaminación atmosférica y desarrollo cognitivo en población infantil de Granada.....	246
5. Exposición a mercurio, consumo de pescado y desarrollo cognitivo en población infantil de Granada.....	252
6. Consideraciones finales.....	260
VI. CONCLUSIONES	269
VII. BIBLIOGRAFÍA	275
VIII. ANEXOS	321

LISTA DE ABREVIATURAS

1-OHP: 1-hidroxipireno

BDCM: Bromodiclorometano

BTEX: Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CFA: Cuestionario de frecuencia alimentaria

COPs: Compuestos orgánicos persistentes

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

DBCM: Dibromoclorometano

GerES: *German Environmental Survey*

GHQ: *General Mental Health Questionnaire*

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

IGC: Índice general cognitivo

IMD: Intensidad media diaria de tráfico

IQ: Coeficiente de inteligencia

LUR: *Land use regression*

MeHg: Metilmercurio

MSCA: *McCarthy Scales of Children's Abilities*

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

NRC: *National Research Council*

PCBs: Policlorobifenilos

RfD: *Reference Dose* (Dosis de referencia)

SIG: Sistemas de información geográfica

SNC: Sistema nervioso central

SPC: Subproductos de la cloración

T-Hg: Mercurio total

THM: Trihalometanos

UNEP: *United Nations Environment Programme*

USEPA: *US Environmental Protection Agency*

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Infancia y Medio Ambiente

En el transcurso del siglo XX, los fenómenos de industrialización y urbanización han originado evidentes beneficios para el ser humano, entre ellos el crecimiento económico y la mejora de la salud en muchas regiones del mundo. En la mayoría de los países industrializados, las enfermedades infecciosas que tradicionalmente habían comprometido la salud de los niños se han controlado de manera eficaz gracias a la mejora de los tratamientos de potabilización del agua y al control de la calidad de los alimentos (Suk, 2003), entre otros. La mortalidad infantil también ha descendido drásticamente. Sin embargo, al mismo tiempo, se han originado nuevos riesgos, como los asociados a la aparición de nuevas sustancias químicas exógenas al organismo humano que contaminan el medio ambiente y suponen una nueva amenaza para la salud de las personas. Así, hoy en día, aproximadamente una cuarta parte de la carga global de enfermedad puede ser atribuida a factores ambientales (Smith *et al.*, 1999; Prüss-Ustün y Corvalán, 2007) y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los niños menores de 5 años representarían más del 40% de dicha carga (*World Health Organization - WHO-*, 2002a). Además, la incidencia de patologías como el asma, el cáncer, las dificultades en el aprendizaje y las malformaciones congénitas está aumentando en la población infantil de Europa Occidental (Landrigan *et al.*, 1998; Simoni *et al.*, 2005), de forma paralela al desarrollo económico.

La salud infantil puede verse afectada por la exposición a diferentes compuestos químicos tóxicos, bien de origen natural o antropogénico, presentes en el aire, agua, suelo y en los alimentos. Anualmente se producen a nivel mundial y en grandes cantidades más de 15.000 compuestos químicos que tienen una gran capacidad de diseminación en el medio ambiente, casi todos ellos generados en los últimos 50 años (Landrigan *et al.*, 1998). Para la mayoría de estos compuestos

químicos todavía se desconoce su posible efecto tóxico en el feto y en los niños (*US Environmental Protection Agency -USEPA-*, 1998). La exposición infantil a estos compuestos químicos ha contribuido a un cambio en el patrón de las patologías pediátricas y, especialmente, al incremento en la incidencia de determinadas enfermedades crónicas. A pesar de que la mayoría de los procesos determinísticos que dan origen a estas patologías son multifactoriales, cada vez existe mayor evidencia de que están muy influidas por factores ambientales. Así, se ha demostrado que las exposiciones prenatales y postnatales a contaminantes atmosféricos, metales, compuestos orgánicos persistentes (COPs) o ruido se asocian con un desarrollo anormal de las funciones neuroconductual, inmunitaria y sexual (Bellinger, 2004; Schwartz, 2004; Niemann *et al.*, 2005). La dieta materna, la lactancia y la nutrición infantil juegan un papel relevante como fuente de exposición a contaminantes, pero también como fuente de elementos protectores para la salud (Hadders-Algra *et al.*, 2007; Koletzko *et al.*, 2008).

Desde el momento de la concepción del ser humano los contaminantes químicos del medio ambiente pueden afectar al desarrollo fetal y determinar la estructuración de los sistemas y su función. Este impacto no termina con el nacimiento, no sólo para los sistemas no estructurados al nacer, tales como el sistema neurológico, el inmunitario o el sexual, sino también para sistemas estructurados cuyo crecimiento puede verse modificado por las exposiciones ambientales, como es el caso de la función respiratoria (Ramón *et al.*, 2005). La experiencia en modelos animales o en situaciones accidentales de exposición aguda es lo suficientemente concluyente como para sugerir que el efecto es mucho más marcado si la exposición ha ocurrido en las primeras etapas del desarrollo. El rango de alteraciones del desarrollo es muy amplio, al igual que el número y variedad de exposiciones que pueden afectar al crecimiento y desarrollo físico, intelectual, emocional y social del niño. Estas alteraciones se pueden manifestar a través de retraso en el crecimiento, déficits funcionales (neuroconductuales,

inmunológicos, reproductivos) y mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas en la vida adulta como diabetes, enfermedad cardiovascular o cáncer (WHO y *European Environment Agency*, 2002).

Recientemente la Unión Europea (UE) ha puesto en marcha una estrategia para reducir las enfermedades relacionadas con factores ambientales, con especial atención a los grupos más vulnerables de la sociedad y, en particular, a la infancia (<http://europa.eu.int/comm/environment/health/straten.htm>). La nueva estrategia de medio ambiente y salud, que tiene por objeto integrar la información sobre el estado del medio ambiente, el ecosistema y la salud humana, ha señalado tres aspectos que deberían ser considerados a la hora de poner en marcha cualquier programa de vigilancia en salud ambiental: i) el efecto combinado de los factores ambientales, de diferente índole y naturaleza, ii) la transferencia de contaminantes de un sector del medioambiente a otro y iii) las exposiciones que tienen lugar a largo plazo. El objetivo global de la estrategia es reducir las enfermedades causadas por los factores medioambientales en Europa. Para lograr dicho objetivo se reconoce la necesidad de ampliar los conocimientos sobre los problemas sanitarios vinculados con la degradación del medio ambiente, con el fin de prevenir las nuevas amenazas para la salud derivadas de la contaminación ambiental. La estrategia recibe la denominación de SCALE, correspondiente al acrónimo en inglés de los cinco elementos clave en los que descansa (*Science, Children, Awareness, Legal instrument, Evaluation*). Para su primer ciclo de actuación, correspondiente al período 2004-2010, la estrategia SCALE presta especial atención a cuatro efectos sobre la salud:

- a.** Enfermedades respiratorias infantiles, el asma y las alergias.
- b.** Trastornos del desarrollo neurológico.
- c.** Cáncer infantil.
- d.** Efectos de disrupción endocrina.

Un objetivo prioritario de la estrategia europea es reforzar los sistemas de vigilancia del medioambiente y la salud desarrollando proyectos piloto centrados en agentes ambientales, como son algunos grupos de compuestos químicos, de los que se tiene una información especialmente importante, como las dioxinas, los metales pesados y los disruptores endocrinos, entre otros, e implementando programas de reducción de la exposición en casos de particular relevancia, como es el caso de los contaminantes atmosféricos, los metales pesados y los campos electromagnéticos.

El Instituto de Salud Carlos III con el Fondo de Investigación Sanitaria de la Subdirección General de Investigación Sanitaria, dependiente del Ministerio de Sanidad y Consumo, creó un conjunto de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa. La Red “Infancia y Medio Ambiente” (Red **INMA**) es una de ellas y tiene como temática específica de investigación las “Exposiciones pre- y postnatales a contaminantes ambientales, dieta, crecimiento fetal y desarrollo neuro-inmuno-endocrino”. La formación de esta Red fue impulsada por la mencionada estrategia SCALE de la UE, según las indicaciones de la OMS y en cumplimiento del Convenio de Estocolmo. La Red INMA se constituyó en 2003 para estudiar los efectos del medio ambiente y la dieta en el desarrollo fetal e infantil en diversas zonas geográficas en España (Ramón *et al.*, 2005; Ribas-Fitó *et al.*, 2006a). La Red está formada por siete cohortes, cuatro creadas *de novo* (cohortes de Valencia, Sabadell, Asturias y País Vasco) y tres preexistentes (cohortes de Ribera d’Ebre, Menorca y Granada) que están llevando a cabo el seguimiento de aproximadamente 4.000 mujeres embarazadas y sus hijos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Cohortes participantes en la Red INMA		
Población	Año de inclusión	N
<i>Cohortes antiguas</i>		
Ribera d'Ebre	1997-1999	100
Menorca	1997-1998	480
Granada	2000-2002	700 (varones)
<i>Cohortes de novo</i>		
Valencia	2003-2005	856
Sabadell	2004-2006	652
Asturias	2004-2006	500
País Vasco	2006-2007	603

La Red tiene como objetivos principales el estudio del efecto de los compuestos organoclorados y el mercurio sobre el neurodesarrollo del niño, los efectos de la contaminación atmosférica en el desarrollo fetal, las alergias y el asma, y la interacción entre los contaminantes y la dieta materna, con especial atención a nutrientes antioxidantes, ácidos grasos esenciales, ácido fólico y yodo en el desarrollo fetal e infantil.

En el año 2000 comenzó en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada el reclutamiento de una cohorte de mujeres embarazadas, con el objeto de estudiar los efectos a corto y largo plazo de la exposición perinatal a xenohormonas -contaminantes químicos con actividad hormonal- bajo los auspicios de la UE (Proyecto del 5º Programa Marco: *Environmental Reproductive Health*). Se reclutaron 700 mujeres que dieron a luz hijos varones, entre los que se ha estudiado la prevalencia de malformaciones del tracto genito-urinario (criptorquidia e hipospadias) al nacimiento, demostrándose la existencia

de una relación entre la exposición crónica de la madre a los disruptores endocrinos y la frecuencia de criptorquidia en la descendencia (Fernández *et al.*, 2007a). Esta cohorte se integró posteriormente en la Red INMA para responder a los objetivos de la misma.

La cohorte de madres e hijos INMA-Granada ha proporcionado, entre otros, información muy útil sobre la exposición materno-infantil a compuestos químicos con actividad hormonal (Jiménez *et al.*, 2006; Lopez-Espinosa *et al.*, 2007 y 2008). Los estudios que ya se han realizado han servido para poner de manifiesto la importancia de la exposición materna y las diferencias regionales existentes con otros países europeos (Campoy *et al.*, 2001; Cerrillo *et al.*, 2005). Además, la aplicación adicional de marcadores de exposición está siendo de utilidad en la caracterización de las interacciones entre compuestos químicos y el efecto hormonal resultante (Fernández *et al.*, 2007b y 2008; López-Espinosa *et al.*, 2009).

Transcurridos 4 años desde el nacimiento, entre 2005 y 2006, se realizó el primer seguimiento de la cohorte de niños INMA-Granada (véase Tabla 1.2), con el objeto de estudiar otras exposiciones ambientales, así como el posible efecto de las exposiciones pre- y postnatales en el desarrollo y crecimiento infantil.

Tabla 1.2. Seguimiento de la cohorte INMA-Granada				
GRANADA		Período postnatal		
		Nacimiento	1 año	4 años
Efectos	Crecimiento fetal			
	Desarrollo sexual	Exploración física		
	Crecimiento postnatal	Exploración física		Exploración física
	Desarrollo neurológico			Test McCarthy
	Inmunidad			
	Hormonas tiroideas	Screening TSH		
Exposiciones	NO₂ y COVs*		Medición ambiental	Cuestionario y medición ambiental
	Trihalometanos*			Cuestionario y medición ambiental
	HAPs			1-hidroxipireno en orina
	Organoclorados / DE	Placenta y sangre de cordón		
	Plomo, arsénico			
	Metilmercurio			Pelo
	Ocupación madre	Cuestionario		
	Dieta			Cuestionario

*Mediciones ambientales; TSH: hormona tirotrópica; COVs: compuestos orgánicos volátiles; HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; DE: disruptores endocrinos.

2. Vulnerabilidad infantil a los contaminantes ambientales

Cada vez es mayor la evidencia de que las experiencias y exposiciones durante la vida fetal, neonatal e infantil pueden tener efectos a largo plazo, incluso en la vida adulta. Ya en el año 1992, David Barker y colaboradores llegaron a la conclusión de que algunas enfermedades crónicas del adulto se programan biológicamente en la etapa intrauterina y principio de la lactancia.

Los hallazgos de estudios epidemiológicos y toxicológicos han puesto en evidencia que el riesgo de efectos adversos por exposiciones ambientales no sólo depende de la dosis y el potencial tóxico del contaminante, sino también de que la exposición ocurra en periodos críticos del desarrollo (Selevan *et al.*, 2000), lo que se ha llamado ventanas de susceptibilidad particular. Resultados de estudios epidemiológicos muestran que los fetos y los niños son más susceptibles al efecto tóxico de contaminantes como, por ejemplo, las partículas en suspensión, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos orgánicos volátiles (COVs), compuestos clorados, nitratos y metales (Ribas-Fitó *et al.*, 2006b; Kim *et al.*, 2008; Lederman *et al.*, 2008; Perera, 2008; Wigle *et al.*, 2008), y el humo de tabaco (Rauh *et al.*, 2004), entre otros.

Los sistemas biológicos de los niños tienen unas características únicas y diferentes en cada una de las etapas de su desarrollo (Cohen *et al.*, 2008). Desde la primera infancia hasta la pubertad se producen cambios en el tamaño, estructura y función de su organismo, haciéndolos especialmente vulnerables a los contaminantes ambientales. Pero esta susceptibilidad especial también se debe a que, durante la gestación, la infancia y la adolescencia, una gran variedad de factores sociales y psicosociales influyen en la exposición a contaminantes, así como en los efectos en salud derivados de dicha exposición. Los procesos de crecimiento y desarrollo se producen a un ritmo particularmente relevante en el caso de los sistemas nervioso, endocrino, reproductivo e inmune (Bruckner, 2000). El

crecimiento celular es especialmente rápido en la etapa embrionaria, siendo más probable que los contaminantes ambientales den origen a mutaciones y anomalías congénitas en esta etapa. Las rutas metabólicas en los niños, especialmente en los primeros meses de vida, son fisiológicamente inmaduras, con lo que la capacidad de detoxificación y excreción de compuestos químicos exógenos al organismo es inferior a aquélla en adultos. Además, los niños están proporcionalmente más expuestos que los adultos a los contaminantes ambientales: los niños beben más agua, ingieren más alimentos e inhalan más aire en relación a su peso corporal. Por otra parte, la esperanza de vida de un niño es mucho mayor que la de un adulto, lo que se traduce en más tiempo potencial para el desarrollo de enfermedades crónicas con largos periodos de latencia, tales como la leucemia o el cáncer de piel, presumiblemente iniciadas por exposiciones ambientales tempranas o determinadas por exposiciones continuadas en el tiempo (*National Academy of Sciences*, 1993; Moya *et al.*, 2004).

Todo ser humano, ya sea niño o adulto, tiene aproximadamente una carga de 300 ó más residuos químicos en su organismo. El hecho de que un compuesto químico se bioacumule se debe a la incapacidad del organismo de metabolizarlo y eliminarlo. Y a su vez, esto es debido esencialmente a que, para muchos de los contaminantes ambientales, nuestro organismo carece de enzimas capaces de “romper” su estructura molecular, de manera que tienden a acumularse en el organismo, pudiendo ser transferidos al feto o al niño a través de la placenta y la leche materna, en ocasiones en concentraciones elevadas. Para algunos contaminantes como las dioxinas y los policlorobifenilos (PCBs) se sabe que la concentración que tiene hoy en día una parte de la población es suficiente para causar efectos adversos en la descendencia (Sauer *et al.*, 1994; Jacobson y Jacobson, 1996; Vreugdenhil *et al.*, 2002). En el caso del mercurio, la exposición materna a bajas dosis durante la gestación se ha visto asociada con déficits neurológicos en la infancia (Oken *et al.*, 2005 y 2008).

El crecimiento fetal viene determinado tanto por la composición de la dieta materna como por la integridad de los procesos fisiológicos necesarios para que se produzca la transferencia de nutrientes y oxígeno al feto en desarrollo (Prada y Tsang, 1998). Estos componentes pueden verse alterados por patologías maternas (diabetes, hipertensión, etc.), por dietas deficitarias, por exposiciones a compuestos tóxicos (tabaco, alcohol, drogas, medicamentos) y por exposición a contaminantes ambientales del aire (Lacasaña *et al.*, 2003), del agua (Wright *et al.*, 2003) y de los alimentos, como los COPs (Hertz-Picciotto *et al.*, 2008). La exposición materna a contaminantes ambientales previa a la concepción también puede condicionar de manera importante la salud de la descendencia, debido a que los residuos químicos pueden acumularse en los tejidos maternos y ser movilizados durante el embarazo afectando al desarrollo del feto y el niño. La placenta en algunos casos actúa como barrera, pero en el caso de compuestos de bajo peso molecular, como el monóxido de carbono, o compuestos lipofílicos como los HAPs o los pesticidas organoclorados, la placenta no impide su transferencia al feto (López-Espinosa *et al.*, 2007 y 2008). Otros ejemplos significativos de compuestos que atraviesan la placenta y ponen en peligro la salud del feto son los componentes del humo de tabaco ambiental (Olds, 1997).

La exposición paterna también puede tener efectos adversos en la descendencia. Por ejemplo, se han encontrado asociaciones entre el hábito tabáquico paterno y la aparición de procesos mutagénicos asociados a un mayor riesgo de cáncer en los hijos varones (Ji *et al.*, 1997). También se han descrito asociaciones entre la exposición laboral del padre a diferentes compuestos químicos y mayor riesgo de aborto espontáneo, muerte fetal o malformaciones congénitas (Savitz, 1989; Brender, 1990).

Durante los primeros meses y años de vida, los órganos y tejidos del recién nacido, incluyendo sistema nervioso, inmunitario y órganos reproductivos,

continúan desarrollándose con rapidez, por lo que este delicado proceso de desarrollo puede verse fácil e irreversiblemente alterado por la exposición a contaminantes ambientales en la etapa neonatal (Perera *et al.*, 2003) o en la infancia (Berkowitz *et al.*, 2001). El periodo neonatal se caracteriza por la alta permeabilidad del tracto gastrointestinal. En este periodo, los contaminantes son incorporados principalmente por la ingesta de la leche materna o los preparados alimenticios infantiles, o a través del contacto dérmico. Así, por ejemplo, los niños alimentados con preparados comerciales consumen aproximadamente 150 ml agua/kg/día, lo que podría explicar los altos niveles de plomo en sangre debidos al consumo agua encontrados en un estudio llevado a cabo en Estados Unidos (Gittermann y Bearer, 2001).

Tras el nacimiento, el tracto respiratorio pasa a ser otra ruta potencial para la absorción de tóxicos, como el humo de tabaco ambiental. Durante los tres primeros años de vida, los niños poseen una mayor tasa de respiración y un mayor consumo de calorías por kg de peso corporal, en comparación con los adultos, debido al elevado ritmo metabólico. Esto explica que los niños sean más vulnerables a la exposición a contaminantes por inhalación e ingestión (Berlin *et al.*, 2002; Schwartz, 2004). Por ejemplo, los niños lactantes están relativamente más expuestos a PCBs y otros tóxicos liposolubles durante este periodo (Berlin *et al.*, 2002). La conducta exploratoria oral del niño, su menor estatura y el hecho de jugar cerca del suelo contribuyen también a una mayor exposición por inhalación e ingestión a contaminantes presentes en el polvo y el suelo, además de los contaminantes presentes en las capas de aire más cercanas al suelo, como algunos pesticidas volátiles. La dieta también puede ser una fuente importante de exposición a contaminantes durante los primeros años de vida. El hecho de que los niños tengan una mayor tasa de consumo de calorías por kg de masa corporal que los adultos implica que la dosis de ingesta a cualquier contaminante contenido en el alimento sea mayor. Pero, además, la dieta de un niño es cualitativamente

diferente y menos variada que la de un adulto, siendo mayor en frutas, verduras y productos lácteos, lo que influye en la ingesta relativa de compuestos contaminantes.

Una vez transcurridos los primeros años de vida, durante la edad preescolar y escolar del niño, éste explora nuevos ambientes y, en consecuencia, se expone a nuevas fuentes de contaminación. En el colegio, por ejemplo, el niño entra en contacto con nuevos contaminantes, entre ellos, contaminantes del aire interior, alérgenos y agentes infecciosos. La exposición a contaminantes en el exterior puede ser también importante dependiendo del lugar de residencia y del tiempo que el niño permanece al aire libre. El tráfico constituye un riesgo adicional y la exposición a contaminantes emitidos por los vehículos a motor puede tener lugar tanto en ambientes exteriores como en el interior de los vehículos.

2.1. Factores económicos, sociales y psicológicos

Como se ha indicado, la exposición y susceptibilidad infantil a los contaminantes ambientales varía entre las distintas etapas del desarrollo: preconcepción, etapa embrionaria, periodo fetal, periodo neonatal, tres primeros años de vida, edad preescolar y escolar, y adolescencia. Las características biológicas y psicosociales de las distintas etapas del desarrollo derivan en una serie de aspectos que deben ser bien conocidos para evaluar adecuadamente el riesgo en salud y aplicar medidas preventivas (Gitterman y Bearer, 2001).

La susceptibilidad infantil a los contaminantes ambientales está también determinada por una variedad de factores externos que, a pequeña y gran escala, influyen en la exposición fetal e infantil y, por lo tanto, pueden condicionar su salud. Uno de los factores principales es el estatus económico y social en el que el niño se desenvuelve. En todos los países, los problemas ambientales tienden a

afectar más acusadamente a las personas más desfavorecidas económica y socialmente. Así, los niños que crecen en familias con bajo nivel de ingresos o bajo nivel de estudios tienen un mayor riesgo de exposición a contaminantes como el plomo (Bernard y McGeehin, 2003), el humo de tabaco (Lund y Helgason, 2005), los alérgenos (Cohn *et al.*, 2006) o los contaminantes atmosféricos (Chaix *et al.*, 2006). La interacción de éstos y otros factores, tales como el lugar de residencia, género, origen étnico, así como la actitud y conducta de padres, profesores y familiares puede condicionar las múltiples exposiciones y riesgos a los que los niños pueden estar sometidos (Spencer, 2000). Además, habría que tener en cuenta factores como la percepción del riesgo, exposición a alcohol y a tabaco, el acceso a la información, acceso a la atención sanitaria y el papel de factores protectores como la dieta. Así, por ejemplo, la misma concentración de un determinado contaminante puede ser para un niño mucho más dañina que para otro, en función del efecto protector del ambiente doméstico durante los primeros años de vida (Walkowiak *et al.*, 2001).

El modo en que los factores sociales pueden influir sobre las exposiciones y riesgos ambientales difiere en muchos aspectos de los adultos. Hay ambientes específicos que caracterizan la vida de un niño y que representan el contexto dentro del cual los determinantes sociales y biológicos juegan su papel. Se trata, principalmente, de la familia y el colegio. Otros determinantes, a mayor escala, como el mercado y los medios de comunicación también influyen en la vida de los niños de una manera particular mediante el establecimiento de normas, información, distribución de ingresos, oportunidades de educación, lugar de residencia, consumismo, estilo de vida y, en último lugar, comportamientos relacionados con la salud y exposición a riesgos ambientales.

3. Evidencia epidemiológica

Los estudios de epidemiología ambiental que se han llevado a cabo desde la década de los 70 han demostrado la existencia de asociaciones entre exposiciones ambientales pre- y postnatales y efectos adversos en la salud durante la gestación, la infancia y la vida adulta. Los estudios toxicológicos permiten evaluar la plausibilidad biológica de las relaciones observadas, siendo el principal apoyo para el estudio de las relaciones causa-efecto en humanos, pero la investigación epidemiológica aporta muchas de las claves e hipótesis sobre las posibles causas de las patologías observadas en humanos. No obstante, en los estudios epidemiológicos que abordan estas patologías, se necesita de forma apremiante una evaluación mucho más precisa de la exposición humana, ya que el fracaso habitual cuando se trata de establecer asociaciones entre exposición y efecto es consecuencia de una deficiente valoración de la exposición.

Existe una evidencia concluyente del efecto adverso en la salud del feto y/o del niño para los siguientes contaminantes ambientales (Wigle *et al.*, 2008):

Exposición prenatal

- Metilmercurio: se ha observado retraso en el desarrollo cognitivo, motor, auditivo y visual en población expuesta a elevadas concentraciones.
- PCBs: se ha encontrado déficit cognitivo y motor por exposición a altas concentraciones.
- Humo del tabaco: produce efectos adversos al nacimiento tales como retraso del crecimiento intrauterino, parto prematuro y bajo peso al nacer.

Exposición postnatal

- Plomo: la exposición a bajas dosis puede causar déficit cognitivo y daños en el túbulo renal.

- Metilmercurio: la exposición a altas concentraciones se ha visto asociada con déficit visual.
- Dioxinas: pueden ser causa de cloracné.
- Contaminantes del aire interior, principalmente el humo de tabaco ambiental: se han asociado con desarrollo y agudización del asma, infecciones pulmonares, infecciones en el oído medio y cáncer de pulmón en la edad adulta.
- Contaminantes del aire exterior: asociados a la agudización del asma.

Para algunos de los contaminantes ambientales para los que se ha demostrado un riesgo para la salud, como el metilmercurio y los PCBs, la evidencia se apoya en estudios epidemiológicos de poblaciones altamente expuestas. Sin embargo, para otros como el plomo y el humo de tabaco, se han observado efectos adversos a niveles de exposición relativamente bajos. Por ejemplo, se han establecido relaciones dosis-respuesta entre déficit cognitivo y concentraciones de plomo en sangre inferiores a 10 $\mu\text{g/l}$, concentración actualmente considerada como “nivel de alerta” por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos (Schnaas *et al.*, 2006). Esto sugiere que para el plomo no existe una concentración umbral para el efecto neurotóxico en niños. En el caso de metilmercurio, estudios recientes señalan igualmente que no existe una concentración de exposición infantil por debajo de la cual no exista riesgo de efecto neurotóxico (Axelrad *et al.*, 2007).

Es por tanto bien conocido que la exposición prenatal o infantil a plomo, metilmercurio y PCBs produce un efecto neurotóxico más severo, en comparación con la misma exposición en adultos; sin embargo, es limitado el conocimiento acerca del papel que juegan en el desarrollo y la salud infantil las exposiciones tempranas a bajas dosis de otros contaminantes ambientales. Además, muchas de las relaciones observadas entre exposiciones ambientales a bajas concentraciones

y efectos en la salud infantil se apoyan en evidencias epidemiológicas limitadas (Wigle *et al.*, 2008). También es importante destacar la necesidad de identificar los efectos potenciales en salud, no sólo de las exposiciones a contaminantes individuales, sino también de las exposiciones a múltiples compuestos. Actualmente, son muy pocos los estudios epidemiológicos sobre la salud y el desarrollo infantil que han evaluado el efecto potencial de la interacción entre dos o más contaminantes (Mielzynska *et al.*, 2006; Bellinger, 2007; Pohl y Abadin, 2008).

Muchos estudios han evaluado el impacto de la contaminación sobre la población general, pero pocos se han centrado en el feto o el recién nacido. Además, la información utilizada habitualmente para evaluar tanto la exposición como sus efectos en salud suele obtenerse a partir de registros o datos secundarios, y pocas veces se dispone de datos individuales, especialmente mediante el uso biomarcadores. Además, a pesar del intenso trabajo desarrollado en las últimas décadas, aún existe una importante incertidumbre y controversia en cuanto a los efectos, mecanismos de acción, toxicocinética, toxicodinámica y nivel de exposición de la población infantil a contaminantes ambientales, o identificación de los niveles umbrales de efecto, entre otros aspectos. Evaluar la asociación entre las exposiciones ambientales y los trastornos del desarrollo infantil es, por tanto, un reto complejo que debe abordarse sin demora.

4. Estudios de cohortes

El diseño epidemiológico de cohortes es particularmente atractivo para su uso en estudios de salud y enfermedad en periodos prolongados de tiempo, especialmente en niños.

Clásicamente, un estudio de cohorte puede ser clasificado como prospectivo, en el cual la exposición puede haber tenido lugar antes de iniciarse el

estudio y el efecto aún no ha ocurrido; o retrospectivo, en el que tanto la exposición como el efecto ocurrieron antes del inicio del estudio. Una de las mayores ventajas de los estudios de cohortes sobre otros diseños de investigación en epidemiología es la capacidad de proporcionar una medida más adecuada de la exposición individual en los sujetos a estudio. Para ello se han utilizado diferentes procedimientos, desde el uso de cuestionarios hasta el empleo de biomarcadores de exposición. Si el estudio es prospectivo, se reducen al mínimo los sesgos en la identificación de la exposición. Además, se pueden examinar múltiples efectos, esclarecer la relación temporal entre exposición y enfermedad y determinar de manera directa la incidencia de la enfermedad o el efecto en el grupo de expuestos y no expuestos. No obstante, los estudios de cohortes también presentan inconvenientes: pueden ser costosos si hay que planificar seguimientos a largo plazo (prospectivos) o si requieren registros adecuados (retrospectivos); además, la validez de los resultados puede verse afectada por el abandono en la participación de los sujetos.

5. Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad

Según se recoge en el primer “Informe sobre Exposición de la Población General a Sustancias Químicas” elaborado por el CDC de los Estados Unidos, la monitorización de los niveles de exposición a contaminantes químicos en la población es un paso imprescindible para reforzar la investigación sobre la evaluación de los riesgos en salud. En 2004, la Comisión Europea y la OMS propusieron la conjunción de esfuerzos para construir sistemas de información que integren medioambiente y salud, incluir investigación en este campo en los programas marcos de investigación de la UE y para el desarrollo de un programa de biomonitorización de los niveles de posibles exposiciones ambientales en población de Europa. La biomonitorización en humanos no sólo es un instrumento eficaz para investigar la exposición a contaminantes ambientales y sus efectos

potenciales sobre la salud humana, sino que también se ha convertido en un elemento esencial en la estrategia de integrar salud y medioambiente. La biomonitorización integra la contribución de las distintas vías de exposición y considera las diferencias entre individuos con respecto a la captación del contaminante ambiental. Cuando la monitorización directa no es sencilla, los biomarcadores son sustitutos útiles, siempre y cuando en su elección se haya tenido en cuenta su relevancia biológica, metodológica y social.

El término **biomarcador** se usa para describir pruebas de distintos tipos (físicas, químicas, radiológicas o inmunológicas) aplicadas a individuos o muestras biológicas (sangre, orina, pelo o tejidos) con el objetivo de estimar el grado en que un individuo ha estado expuesto a un agente de interés, presenta efectos biológicos detectables, posee una mayor susceptibilidad de padecer una patología determinada o ha contraído ya una enfermedad no detectable. Se pueden distinguir 4 tipos de marcadores biológicos (Perera *et al.*, 1996):

1. Marcadores de **dosis interna**: indican los niveles de una sustancia química o de sus metabolitos en células, tejidos o fluidos corporales. Ejemplos de estos marcadores son la concentración de COPs en tejido adiposo o de mercurio en pelo. Estos marcadores tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de monitorizar, permitiendo demostrar que se ha producido una exposición y, por lo tanto, la entrada del compuesto en el organismo y, en algunos casos, la activación del mismo; pero no informan sobre la interacción con las células diana.
2. Marcadores de **dosis biológicamente efectiva**: reflejan la cantidad de una sustancia que ha interactuado con macromoléculas celulares (como por ejemplo ADN, ARN o proteínas). Ejemplos de estos marcadores es la medida de los aductos de ADN-carcinógeno y de proteínas-carcinógeno. Por ejemplo, la exposición a contaminación atmosférica, a HAPs y a

tabaco se ha asociado con la formación de aductos de ADN-HAP y con el posterior desarrollo de cáncer de pulmón.

3. Marcadores de **efectos biológicos precoces o de respuesta** como resultado de un efecto tóxico, como son las aberraciones cromosómicas o los micronúcleos. En general, estos marcadores no son específicos de determinadas exposiciones, por lo que es conveniente la obtención de información sobre otros factores de riesgo (de estilos de vida y ambientales) que pudieran ser confusores en estudios de epidemiología molecular.
4. Marcadores de **susceptibilidad genética**: esta característica puede ser consecuencia de factores genéticos heredados o adquiridos, e incluyen la presencia de mutaciones y polimorfismos en genes específicos, como por ejemplo, genes implicados en la proliferación celular, la reparación del ADN, rutas metabólicas de detoxificación y eliminación de contaminantes, entre otros.

Desde los años 90, algunos países están desarrollando programas de vigilancia o biomonitorización para conocer la exposición a contaminantes ambientales en población general utilizando para ello biomarcadores. Los programas NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) (NCHS, 2007), en Estados Unidos, y la Encuesta Ambiental Alemana (*The German Environmental Survey -GerES-*) (Seifert *et al.*, 2000) pueden considerarse ejemplos paradigmáticos de este tipo de actuaciones.

Brevemente, el programa NHANES está diseñado para recoger datos sobre el estado de salud y nutricional de la población general mayor de 6 años de los Estados Unidos de Norteamérica, incluyendo la recogida de muestras biológicas que se analizan en el CDC (NCHS, 2007). La recogida de muestras biológicas (sangre y orina) permite la obtención de datos de exposición a contaminantes

ambientales. Uno de los principales objetivos del NHANES es recabar información que pueda ser utilizada, tanto por investigadores como por profesionales sanitarios, para investigar y prevenir los riesgos que pudieran derivarse de la exposición a distintos contaminantes ambientales.

Por su parte, la Encuesta Ambiental Alemana (GerES) es un estudio poblacional a gran escala realizado principalmente en población adulta. Para niños de 6 a 14 años existen datos de la encuesta de 1990/92 y, más recientemente, de la primera encuesta centrada en población infantil (GerES IV) (Kolossa-Gehring *et al.*, 2007). El objetivo principal de este programa es analizar y documentar el grado, la distribución y los determinantes de la exposición a contaminantes ambientales en población general alemana, utilizando para ello varias herramientas: cuestionarios, entrevistas, muestras biológicas y muestreos en ambientes exteriores e interiores. Además de proporcionar información sobre la distribución y los determinantes de la exposición a contaminantes ambientales de la población infantil alemana, el GerES IV pretende valorar la influencia de la exposición ambiental sobre la salud de esta población (Kolossa-Gehring *et al.*, 2007).

Otros países también han desarrollado programas para el estudio del grado de exposición de sus poblaciones a una serie de contaminantes ambientales, utilizando diferentes tipos de muestras biológicas y de diseños. Los biomarcadores utilizados en la mayoría de ellos son los denominados de dosis interna (www.invs.sante.fr/publications/2008/biosurveillance/index.html).

6. Exposición infantil a contaminantes del agua: Subproductos de cloración

El agua de consumo puede contener una variedad de contaminantes a los que el ser humano está expuesto a través de su ingesta, pero también por absorción dérmica e inhalación. Estos contaminantes pueden proceder de vertidos municipales e industriales, escorrentía superficial (tanto urbana como rural), materiales geológicos, materiales usados en los sistemas de distribución del agua de consumo y el propio proceso de potabilización del agua. Los contaminantes del agua para los que existe evidencia epidemiológica de causar un efecto adverso en la salud humana son, principalmente, aluminio, arsénico, subproductos de la desinfección, plomo, pesticidas, COPs y radón (Calderón, 2000). Entre ellos, los subproductos de la cloración (SPC) han suscitado un creciente interés en los últimos años desde la perspectiva de la salud pública.

La desinfección del agua mediante cloración es una práctica muy habitual que puede llevar a la formación de subproductos potencialmente dañinos para la salud. Los SPC se forman como resultado de las reacciones entre la materia orgánica, los iones bromuro del agua y el cloro utilizado en el proceso de desinfección. Los SPC más importantes son los trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos, haloacetoneitrilos y cloraminas. Los THM incluyen cuatro especies: cloroformo, bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) y bromoformo. El cloroformo es el THM más frecuente; sin embargo, dependiendo del contenido en bromo del agua antes de ser tratada, la concentración de bromoformo puede superar a la de cloroformo (Westerhoff *et al.*, 2004). El resto de grupos de SPC suelen encontrarse en el agua de bebida en menores concentraciones. En las piscinas, la reacción del cloro con materia orgánica proveniente del pelo, cosméticos, saliva, piel y orina, da lugar a derivados nitrogenados como las cloraminas y dicloroacetoneitrilo (Kim *et al.*, 2002a).

La formación de los SPC depende de varios factores: la temperatura y el pH del agua, la naturaleza y concentración de la materia orgánica presente en el agua antes del tratamiento, la concentración de iones de bromo, el tipo de desinfectante y la dosis empleada, y el tiempo de residencia del agua en la red de distribución. Entre todos ellos, la concentración de materia orgánica es el factor más importante (Liang y Singer, 2003; Ates *et al.*, 2007). El pH y la temperatura son también parámetros importantes que afectan a la estabilidad de estos compuestos en el agua (Villanova *et al.*, 1997; Glezer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002b). Por su parte, una mayor concentración de iones de bromo en el agua lleva a una mayor formación de SPC bromados (Heller y Grossman, 1999; Kampioti y Stephanou, 2002). Todos estos factores determinantes varían estacionalmente, lo que hace que la calidad del agua de consumo fluctúe a lo largo del año. Muchos estudios sobre la variación estacional de THM han sugerido que su concentración tiende a ser mayor en verano, ya que el contenido en materia orgánica en el agua es mayor en esta estación (Williams *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2004). Pero otros estudios no han encontrado la misma tendencia debido, posiblemente, a la variación, también estacional, de otros factores precursores, como por ejemplo la composición de la materia orgánica y la reactividad del cloro (Ates *et al.*, 2007).

El cloro debe ser administrado en dosis suficientes para garantizar la desinfección y la reacción entre el cloro residual libre y la materia orgánica se produce a lo largo de todo el sistema de distribución, lo que explica que sea habitual encontrar mayores concentraciones de THM al final de la red de distribución (Lebel *et al.*, 1997; Rodriguez y Serodes, 2001). Las variaciones geográficas observadas en las concentraciones de SPC se deben, principalmente, al tipo de sistema de abastecimiento de origen. Así, las aguas de origen subterráneo suelen contener menores niveles de SPC en general, ya que normalmente son aguas de mejor calidad. En las aguas de origen superficial, debido al mayor contenido en materia orgánica por los aportes de los efluentes

urbanos, industriales o de la agricultura, la formación de SPC es mayor (Villanueva *et al.*, 2003).

La directiva europea de 1998 reguló los valores máximos aceptables para el total de THM y planteó que, a los 5 años de su entrada en vigor, la concentración de THM no debería ser superior a 150 µg/l, y que este límite debía fijarse en 100 µg/l a partir de 2008 (Directiva 98/83/CE). Con el Real Decreto 140/2003 se establecieron en España los criterios sanitarios del agua de consumo humano y se fijó el nivel máximo admisible para la suma de las concentraciones de THM (150 µg/l), que en 2009 ha pasado a ser 100 µg/l. En España se ha documentado la presencia de concentraciones relativamente elevadas de THM en el agua del grifo de diversas regiones (Villanueva *et al.*, 2001a y 2003). Según un informe de la Unión Europea, los niveles máximos de THM en España son los segundos más elevados en Europa, después de Portugal (Premazzi *et al.*, 1997).

En los últimos años se ha producido una acumulación de información que pone de manifiesto que la exposición a THM se asocia con un mayor riesgo de cáncer, sobre todo de vejiga, así como efectos adversos al nacimiento (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000; Villanueva *et al.*, 2001b y 2004; Wright *et al.*, 2003). De las cuatro especies de THM, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer -IARC-*) ha clasificado al cloroformo y BDCM como cancerígenos potenciales, considerando la información sobre el bromoformo y el DBCM insuficiente para atribuirles un potencial de carcinogenicidad (IARC, 1999).

Los efectos en salud más investigados como consecuencia de la exposición prenatal a THM se refieren a retraso del crecimiento (bajo peso al nacer, talla pequeña para la edad gestacional, retraso del crecimiento intrauterino) y defectos del tubo neural. También se ha evaluado la asociación con el riesgo de muerte fetal tardía, parto prematuro, aborto espontáneo, muerte neonatal y diversas

malformaciones congénitas. Por otra parte, la exposición ocupacional a cloraminas se ha asociado con casos de asma entre trabajadores de piscinas (Thicket *et al.*, 2002). A pesar que los niños son una población especialmente sensible, la evidencia del efecto potencial sobre la salud respiratoria por la asistencia a piscinas es muy limitada (Bernard *et al.*, 2003).

A pesar de que existen numerosos estudios publicados, las evidencias sobre efectos reproductivos por exposición a subproductos de la cloración no son concluyentes. Los estudios siguen metodologías heterogéneas que dificultan la comparación de resultados, algunas de ellas inadecuadas para evaluar la exposición y para demostrar una asociación con efectos en la salud. La limitación más importante de los estudios de exposición infantil a SPC es la mala clasificación de la exposición. Es necesario, por tanto, realizar nuevos trabajos que empleen metodologías y sistemas de evaluación de la exposición apropiados para definir adecuadamente los riesgos y proporcionar datos relevantes sobre relaciones dosis-respuesta (Villanueva *et al.*, 2006).

6.1. Evaluación de la exposición

Para evaluar la exposición a THM en un estudio epidemiológico es prioritario conocer las concentraciones de los contaminantes en el agua de bebida, bien mediante su medición en lugares públicos del área de estudio o bien en la vivienda de los sujetos participantes.

Los cuestionarios de uso y consumo de agua, por su parte, permiten estimar la ingesta media diaria de estos contaminantes. Mediante estos cuestionarios se recoge información acerca del tipo de agua de bebida y la empleada para cocinar, duración de baños y asistencia a piscinas. Con los datos de exposición que se obtienen de la medición ambiental y de los cuestionarios es posible construir modelos para evaluar la exposición durante períodos específicos,

como por ejemplo el embarazo. La información individual se combina con la información ambiental para generar índices de exposición a cada THM a través de la ingestión, ducha, baño y asistencia a piscinas. Si se combinan estos índices de exposición específicos se puede crear un índice combinado de exposición al total de THM (Villanueva *et al.*, 2006).

7. Exposición infantil a contaminación atmosférica

Un informe realizado con objeto de proporcionar información de base para el desarrollo del Plan de Acción sobre Medio Ambiente y Salud Infantil en Europa (Valent *et al.*, 2004) reveló que, entre el 1,8 y el 6,4% de las muertes en niños de 0 a 4 años en Europa son debidas a contaminación atmosférica en ambiente exterior y un 3,6% a la contaminación atmosférica en ambiente interior. Aunque el impacto es mayor en los países de Europa Oriental, el efecto de los riesgos ambientales en la salud de los niños es detectable en todos los países europeos. Al mismo tiempo, dicho trabajo señalaba la necesidad de obtener información adecuada sobre niveles y condiciones de exposición.

7.1. Aire exterior

La contaminación atmosférica engloba una variedad de contaminantes a los que los niños pueden estar expuestos en concentraciones y mezclas diferentes dependiendo, mayormente, de la distancia a fuentes industriales y a zonas de tráfico intenso. La evaluación de la calidad del aire se basa en cuatro contaminantes principales: partículas en suspensión, monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y dióxido de azufre (SO₂), que son monitorizados de manera rutinaria por la mayoría de estaciones fijas de control y vigilancia establecidas en España. Estos contaminantes provienen principalmente de fuentes de emisión tales como los vehículos con motor de combustión, las calefacciones

de edificios y algunos procesos industriales. Los COVs, como el benceno y los HAPs, también son contaminantes atmosféricos de interés (WHO, 2002b).

Entre las partículas en suspensión del aire se incluyen aquellas originadas por la combustión de materia orgánica y el polvo procedente de la descomposición mecánica de la materia sólida, constituyendo una mezcla de partículas sólidas y líquidas que varían en tamaño y composición. El tamaño es el principal determinante de la capacidad de penetración de las partículas y, por tanto, de su potencialidad para causar daño en el aparato respiratorio. También es importante su contenido en agentes tóxicos, como los HAPs o determinados metales. En cuanto al tamaño, cabe destacar las partículas con un diámetro aerodinámico inferior a 10 μm (partículas torácicas ó PM_{10}) o inferior a 2,5 μm (partículas respirables o $\text{PM}_{2,5}$). Estas partículas finas son producidas por las emisiones de los vehículos, permanecen suspendidas durante largos periodos de tiempo y son las que se inhalan y penetran en el sistema respiratorio con mayor facilidad, causando daño en los pulmones. Las enfermedades respiratorias, tanto agudas como crónicas, se han visto claramente asociadas en niños y adultos con periodos de concentraciones elevadas de estos contaminantes (Samet *et al.*, 2000).

Los COVs pueden ser emitidos por una gran variedad de fuentes industriales. El benceno en particular procede de la combustión de hidrocarburos. En las zonas urbanas, las principales fuentes de contaminantes atmosféricos son aquellas que utilizan combustibles fósiles, esto es, el tráfico rodado y las calefacciones domésticas, seguidos de la incineración y las emisiones de los vertederos de residuos. La calidad del aire en estas zonas ha empeorado en las últimas décadas debido al aumento de la población, del tráfico, la industrialización y el consumo de energía. Algunos de estos contaminantes se encuentran en áreas urbanas en concentraciones por encima de los valores límite establecidos por la

OMS (Mayer, 1999). El ozono, producido por la reacción entre COVs y NO₂, es también un contaminante atmosférico muy perjudicial para la salud.

En el estudio de la exposición a contaminación atmosférica es importante conocer el patrón de variación espacial y temporal de los distintos contaminantes. Las reacciones químicas que se producen en la atmósfera y los procesos de dispersión y dilución contribuyen a que su concentración varíe en el tiempo y en el espacio, ya que estos procesos están muy influidos por las condiciones meteorológicas, principalmente dirección y velocidad del viento, estabilidad atmosférica, humedad y temperatura del aire. Así, por ejemplo, contaminantes relacionados con el tráfico, como el NO₂ y los COVs, suelen alcanzar una concentración máxima en los meses de invierno y mínima durante el verano (Mayer, 1999; Parra *et al.*, 2006).

La variabilidad temporal normalmente se da en distintos intervalos de tiempo (anual, semanal y diario). La variabilidad espacial o geográfica también puede producirse a distinta escala, regional o local, según las propiedades de los contaminantes y el tipo de fuente que los emite. Esta variabilidad es especialmente importante en el caso de contaminantes que se emiten a nivel del suelo, como los generados por el tráfico, y es muy marcada, por tanto, en ciudades y zonas urbanas (Mayer y Haustein, 1994). El nivel de contaminación también varía de unos núcleos urbanos a otros dependiendo de las concentraciones de fondo, los tipos de fuentes de emisión y las condiciones meteorológicas (Kuttler, 1996). También, las características topográficas y la estructura urbanística condicionan de manera importante la concentración de los contaminantes del aire.

La mayoría de los contaminantes atmosféricos producen daño agudo en el sistema respiratorio, pero también efectos crónicos, principalmente respiratorios y cardiovasculares, como consecuencia de exposiciones a largo plazo (Pope *et al.*, 2002; Brunekreef, 2007; Götschi *et al.*, 2008). Particularmente, en los últimos

años ha crecido la preocupación por la posible influencia de las exposiciones a contaminantes atmosféricos durante la gestación y los primeros meses y años de vida, a concentraciones que podrían ser alcanzadas hoy en día en muchas viviendas y ciudades, ya que podrían afectar negativamente al desarrollo de los niños. Así, numerosos estudios epidemiológicos ponen en evidencia la asociación entre la exposición pre- y postnatal a contaminantes del aire interior y exterior con efectos adversos en el desarrollo y la salud de los niños, tales como efectos reproductivos e incremento del riesgo de mortalidad infantil (Glinianaia *et al.*, 2004; Maisonet *et al.*, 2004; Lacasaña *et al.*, 2005; Sràm *et al.*, 2005), enfermedades respiratorias (Schwartz, 2004; Bateson y Schwartz, 2008) y cáncer infantil (Knox, 2005; Raaschou-Nielsen y Reynolds, 2006). La mortalidad intrauterina, perinatal o neonatal es uno de los efectos más estudiados (Bobak y León, 1999). Se ha observado también, aunque la evidencia es todavía escasa, alteraciones de la tasa de crecimiento postnatal (Jedrychowski *et al.*, 2002) y retrasos en el desarrollo neurológico (Suglia *et al.*, 2008). Además, la exposición a contaminantes atmosféricos en la infancia puede dar lugar a una reducción de la función pulmonar y en consecuencia a un aumento del riesgo de enfermedades respiratorias crónicas, y mayor susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares en la edad adulta (Shea, 2003). Igualmente, algunos estudios han señalado una asociación entre daños genéticos producidos *in utero* (en forma de aductos de ADN o aberraciones cromosómicas) y exposición prenatal a contaminación atmosférica (Perera *et al.*, 2005b).

7.2. Aire interior

La exposición infantil a contaminantes del aire en ambiente interior, principalmente viviendas y colegios, puede verse potenciada debido a que en muchos casos se trata de ambientes cerrados y con una escasa ventilación. El nivel de desarrollo social y económico está estrechamente relacionado con la

contaminación del aire interior de las viviendas, que se origina principalmente por la utilización de combustibles fósiles para la obtención de energía de uso doméstico (cocina, calefacción), el humo de tabaco y la contaminación atmosférica procedente del exterior. Los principales contaminantes del aire interior son NO₂, CO, partículas y humo de tabaco. Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición crónica a NO₂ debida al uso de cocinas de gas supone un factor de riesgo de enfermedad respiratoria frente al uso de cocinas eléctricas (Basu y Samet, 1999).

En los países desarrollados, la energía requerida para cocinar, calentar el agua y para la calefacción se obtiene, además de la electricidad, a partir del uso de combustibles fósiles como el butano, gas natural, gasoil y propano. En comparación con los combustibles fósiles sólidos, los combustibles gaseosos normalmente generan menor cantidad de contaminantes (Zhang y Smith, 2003). El uso de electrodomésticos con este tipo de combustible puede también contribuir a la emisión de CO y NO₂ debido, principalmente, a un uso y una ventilación inadecuados (Basu y Samet, 1999); pero también de partículas finas, COVs como benceno y 1,3-butadieno, e HAPs. A pesar de que la contaminación en ambiente interior por el uso de combustibles es menos importante en los países industrializados que en los países en vías de desarrollo, existen otras fuentes de exposición a contaminantes en las viviendas modernas relacionadas con los nuevos materiales utilizados en la construcción de los edificios (p. ej., asbestos), presentes en los muebles (p.ej., barnices), en pinturas (p.ej., disolventes) y en adhesivos, y en los productos utilizados cotidianamente en el ámbito doméstico (p.ej., insecticidas, ambientadores, productos de limpieza). Una escasa ventilación, sumada a la presencia de numerosas sustancias químicas sintéticas, dan lugar a una concentración habitualmente elevada de COVs (p.ej., benceno, tolueno, formaldehído) y compuestos orgánicos semivolátiles (p. ej., ftalatos, pesticidas) en las viviendas.

La contaminación del aire en el interior de las viviendas puede ser diferente según se trate de áreas rurales o urbanas debido a posibles diferencias económicas y estilos de vida. Los niños en edad preescolar que habitan en áreas urbanas pasan la mayor parte de su tiempo en el interior de las viviendas y el colegio (McCormack, 2007), lo que significa que la principal exposición a los contaminantes del aire puede venir del interior de los edificios, más que de la exposición a contaminantes del aire exterior. Además, para muchos de los contaminantes las concentraciones en interior superan a las encontradas en el aire exterior.

La contaminación del aire interior se ha visto asociada con una gran variedad de efectos adversos en la salud de la población infantil. Se ha demostrado que este tipo de contaminación está asociada con una disminución de la función pulmonar, con el incremento de la incidencia de asma, alergias, efectos adversos al nacimiento y cáncer (Windham *et al.*, 1999; Venners *et al.*, 2001; Lewtas, 2007; Hansel *et al.*, 2008). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual la exposición a contaminantes del aire afecta a la salud, se sabe por ejemplo que las partículas finas causan inflamación de las vías aéreas y los pulmones, y alteran la respuesta del sistema inmune (Schlesinger *et al.*, 2006).

Dada la prevalencia del tabaquismo en la sociedad actual, la exposición pasiva al humo de tabaco es uno de los principales riesgos para la salud infantil asociados a los ambientes interiores. El tabaco es una fuente de contaminantes como el CO, NO₂, HAPs, benceno, partículas y metales. La exposición de niños en edad preescolares al humo de tabaco en el interior de sus viviendas es una causa importante de enfermedad infantil (Zhang y Smith, 2003). Un gran número de estudios ponen en evidencia que la exposición pasiva al humo de tabaco incrementa el riesgo de muerte súbita, de infección en el tracto respiratorio, de asma y sibilancias, y de otitis durante la infancia (Anderson y Cook, 1997; Cook y

Strachan, 1999; DiFranza *et al.*, 2004). Además, esta exposición temprana se ha visto asociada con un aumento de la concentración de aductos de proteínas (Tang *et al.*, 1999), lo que puede ser considerado como un factor potencial de riesgo de desarrollar cáncer en etapas posteriores de la vida (Bartsch y Hictanen, 1996; Perera *et al.*, 1997).

Los HAPs son un grupo de compuestos orgánicos que se caracterizan por tener una gran estabilidad química, baja volatilidad y baja solubilidad en agua. Se forman durante la combustión incompleta de la materia orgánica y se encuentran extensamente distribuidos en el medio ambiente, normalmente en mezclas complejas. Diferentes agencias de protección ambiental como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), la IARC y la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry -ATSDR-*) han catalogado estos compuestos como tóxicos, mutagénicos y cancerígenos en humanos (Castaño-Vinyals *et al.*, 2004) y han evaluado en repetidas ocasiones el daño en salud asociado con la exposición a estos compuestos. Las principales fuentes de exposición a HAPs en la población infantil son el humo de tabaco, los alimentos, el agua y la contaminación atmosférica en ambientes exteriores e interiores (Jongeneelen, 1997). La presencia de HAPs en el aire interior puede deberse al consumo de tabaco, a la combustión incompleta de la madera en las chimeneas y del combustible usado en las calefacciones domésticas, y a la influencia de la contaminación exterior por el tráfico y las industrias.

Los fetos y los niños son más susceptibles al efecto tóxico de los HAPs que los adultos (Perera *et al.*, 2005a). La exposición prenatal se ha asociado con retraso del crecimiento intrauterino, bajo peso y talla al nacer, perímetro cefálico pequeño (Perera *et al.*, 2003; Sràm *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2006 y 2008) y problemas respiratorios en el primer año de vida (Jedrychowski *et*

al., 2005), así como incremento del riesgo de cáncer infantil (Tang *et al.*, 2001). Además, se ha observado una asociación entre exposición prenatal a HAPs, defectos al nacimiento y retraso en el desarrollo cognitivo en este grupo de la población (Jedrychowski *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2008).

7.3. Contaminación atmosférica derivada del tráfico

Las emisiones de los vehículos con motor de combustión se componen de una mezcla compleja de contaminantes que incluye subproductos de la combustión de la gasolina, el gasoil y los aceites lubricantes, y polvo procedente del asfalto. El tráfico rodado es la principal fuente de emisión de NO₂, CO, partículas y COVs en las áreas urbanas y próximas a carreteras. Varios estudios han encontrado una correlación positiva entre concentración de NO₂ y la densidad de tráfico en calles o carreteras próximas y una relación negativa con la distancia a carreteras principales (Roorda-Knape *et al.*, 1999; Pleijel *et al.*, 2004). En las zonas urbanas, la contaminación por tráfico en las calles más transitadas puede suponer entre el 80 y el 90% de los niveles de contaminación. Por tanto, el riesgo para la salud por exposición a contaminación atmosférica es especialmente importante en las ciudades grandes (Kinney *et al.*, 2000; Perera *et al.*, 2002), siendo necesaria una adecuada caracterización de la variabilidad espacial y temporal de este tipo de contaminantes en estas zonas. Evaluar la exposición humana a contaminantes del tráfico en estudios de salud ha sido un área prioritaria de investigación en los últimos años (Brunekreef y Holgate, 2002). En Europa, se ha estimado que las emisiones del tráfico rodado contribuyen en más de un 50% a la concentración de partículas finas del aire (Kunzli *et al.*, 2000). Sin embargo, pocos estudios han investigado los efectos específicos de la contaminación del tráfico en la salud humana, y menos aún en la población infantil.

La exposición a contaminantes atmosféricos emitidos por los vehículos de gasolina y gasoil se ha asociado con una variedad de efectos en la salud de los

niños como, por ejemplo, aumento de la mortalidad infantil, bajo peso al nacer, déficit en la función pulmonar, afecciones respiratorias y cardiovasculares, alteraciones del desarrollo neurocognitivo y cáncer (Perera *et al.*, 2006a y 2008; Bell, 2007). En particular, los óxidos de nitrógeno (NOx), que son generados durante el proceso de combustión en los vehículos mediante la oxidación a altas temperaturas del nitrógeno atmosférico (WHO, 1997), sufren reacciones atmosféricas complejas que dan lugar a contaminantes secundarios, como el NO₂, que afectan negativamente a la salud humana. La exposición a NO₂ se ha visto relacionada con efectos adversos al nacimiento y problemas respiratorios en niños (Ha *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2003; Gauderman *et al.*, 2004; Jerrett *et al.*, 2008; Mortimer *et al.*, 2008).

Las emisiones de los vehículos también contribuyen en gran medida a la presencia de HAPs en el aire de las zonas urbanas. Se han observado concentraciones mínimas de HAPs en horas de poco tráfico y concentraciones altas en horas de tráfico intenso (Levy *et al.*, 2001). Los HAPs pueden estar presentes en el aire en estado gaseoso pero también, dependiendo de su presión de vapor y de la temperatura ambiente, pueden ser adsorbidos por las partículas finas, pudiendo representar el componente tóxico más importante de las partículas. Las emisiones de los vehículos diesel son de especial interés ya que generan entre 30 y 100 veces más partículas que los vehículos de gasolina. En Europa y Estados Unidos, el tráfico urbano contribuye entre un 46% y un 90% al total de HAPs del aire exterior (Nielsen, 1996; Dunbar *et al.*, 2001). En las ciudades, las fuentes principales de emisión de HAPs son las calefacciones domésticas y el tráfico rodado, y se ha observado que las concentraciones atmosféricas en invierno son habitualmente mayores que en verano (Motykiewicz *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 2002). Los estudios sobre la exposición humana a HAPs son todavía escasos, aunque es creciente la evidencia de su efecto perjudicial en la salud de los niños

(Perera, 2008), principalmente efectos adversos al nacimiento, asma y cáncer (Millar *et al.*, 2004; Bocskay *et al.*, 2005; Sràm *et al.*, 2005).

Contaminación atmosférica urbana y efecto neurotóxico

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que las partículas del aire asociadas al tráfico constituyen un riesgo para la salud (Pope *et al.*, 2002). Varios estudios en animales han observado también que las partículas inhaladas pueden ser translocadas desde el sistema respiratorio hasta el sistema nervioso central (Oberdorster *et al.*, 2004). Así, un estudio confirmó que las partículas ultrafinas pueden llegar al cerebro, no sólo a través de la circulación sanguínea, sino también por translocación directa desde el nervio olfativo (Elder *et al.*, 2006). A partir de aquí surge la incertidumbre del posible efecto neurotóxico de la exposición a contaminación atmosférica, todavía escasamente estudiado (Suglia *et al.*, 2008).

Los pocos trabajos que han estudiado este posible efecto se han basado en lesiones patológicas comunes en las enfermedades neurodegenerativas, y que están relacionadas con procesos inflamatorios y estrés oxidativo (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2002, 2004 y 2008b; Campbell *et al.*, 2005). Estos mismos procesos se han visto relacionados, por ejemplo, con la exposición a bajas dosis de determinados metales pesados y alteración de la función cognitiva (Lanphear *et al.*, 2005). Sin embargo, hay un gran vacío de información en cuanto al impacto que la exposición crónica a contaminación atmosférica puede tener sobre el desarrollo cognitivo y los procesos neurodegenerativos en niños sanos que no presentan otros riesgos relacionados con alteraciones del sistema nervioso.

Es necesario, por tanto, realizar nuevos estudios que investiguen la asociación entre la contaminación atmosférica relacionada con las partículas del

aire (como las generadas por el tráfico) y el desarrollo cognitivo, especialmente en los primeros años de vida.

7.4. Evaluación de la exposición

La medición de la exposición a la contaminación atmosférica es un elemento clave en la mejora de la estimación del posible riesgo para la salud humana, pero es una tarea especialmente compleja, principalmente porque requiere la integración de múltiples disciplinas y por la falta de sistemas adecuados de información y vigilancia que permitan valorar la magnitud y gravedad de los riesgos asociados a dicha exposición. Por ejemplo, los estudios epidemiológicos sobre los efectos en salud de los contaminantes atmosféricos emitidos por el tráfico, han utilizado tradicionalmente mediciones indirectas de la exposición (Duhme *et al.*, 1996; Ciccone *et al.*, 1998), tales como el tipo de calle y la densidad de tráfico en la zona de residencia, o la distancia de la vivienda a calles de tráfico intenso. La percepción de la contaminación y el ruido generados por el tráfico son medidas indirectas que también se han usado para valorar la exposición (Klaeboe *et al.*, 2000; Oglesby *et al.*, 2000). Todos estos indicadores subjetivos o indirectos son relativamente fáciles de obtener mediante el uso de cuestionarios, no requieren monitorización ambiental de los contaminantes y pueden ser utilizados fácilmente en estudios poblacionales a gran escala. Sin embargo, la validez y fiabilidad de este tipo de medidas están siendo cada vez más cuestionadas, ya que pueden dar lugar a estimaciones erróneas de la exposición y a resultados contradictorios (Nicolai *et al.*, 2003).

Otra medida indirecta utilizada habitualmente para estimar el nivel de exposición de la población a contaminantes del aire es el empleo de los datos provenientes de las estaciones fijas de monitorización y vigilancia de la calidad del aire (Villeneuve *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2009). La simple asignación de dicha medida puede ser, sin embargo, poco representativa de las diferencias en las

exposiciones personales de los participantes en un estudio a lo largo del tiempo. Los pocos estudios de cohortes existentes que analizan, por ejemplo, la relación de la contaminación atmosférica con la mortalidad o con el desarrollo fetal han utilizado datos procedentes de estaciones captadoras situadas en zonas más o menos representativas como medida de la exposición a contaminación atmosférica (Hoek *et al.*, 2002; Wilhelm *et al.*, 2003; Jerrett *et al.*, 2005b; Parker *et al.*, 2005).

Los estudios más recientes han incorporado mediciones objetivas de la exposición a la contaminación del tráfico en los lugares de residencia, como son la intensidad de tráfico y densidad de calles en el entorno de la vivienda, o la distancia de la vivienda a una calle con tráfico intenso, determinadas mediante el uso de Sistemas de Información Geográfica (SIG), interpolación de las concentraciones determinadas por las redes oficiales de control de la calidad del aire, datos de la monitorización ambiental, modelos de dispersión (Oosterlee *et al.*, 1994; Bellander *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2003; Nicolai *et al.*, 2003) y, por último, el uso de modelos de regresión (*Land use regression*) (Briggs *et al.*, 1997 y 2000).

En los últimos años, varios estudios de cohortes han llevado a cabo la estimación de la exposición en mujeres embarazadas y niños mediante mediciones personales, y en el interior y exterior de sus viviendas (Perera *et al.*, 2003; Tonne *et al.*, 2004; Jedrychowski *et al.*, 2006b). La medición de la exposición personal aporta una información mucho más detallada, pero tiene el inconveniente de ser más costosa.

Monitorización ambiental

En la actualidad, uno de los métodos más empleados en epidemiología ambiental para la monitorización de la contaminación atmosférica es el uso de captadores de difusión pasiva, que tienen la gran ventaja de ser económicos,

fáciles de usar e idóneos para la evaluación de la calidad del aire, a escala tanto regional como local. Los captadores pasivos permiten obtener una aproximación cuantitativa a la exposición total o promedio a contaminantes del aire durante el periodo de muestreo. El muestreo puede llevarse a cabo por absorción química o por adsorción física del contaminante gaseoso de interés. Una buena aproximación para evaluar la contaminación del aire y el riesgo para la salud es el uso combinado de este tipo de captadores y de estaciones fijas de medición continua, de manera que sea posible conocer la distribución espacial y temporal de la concentración de los contaminantes de interés. Entre los numerosos contaminantes emitidos por los vehículos, el NO₂ es uno de los más fáciles de medir, y puede ser muestreado usando captadores pasivos como, por ejemplo, los modelos *radiello* o los *ogawa* (Liard *et al.*, 1999).

Modelización de la exposición

La concentración de NO₂ es considerada como un buen indicador de los niveles de contaminación atmosférica generada por el tráfico (Krämer *et al.*, 2000; Niewenhuisen, 2000). Su medición ha permitido conocer que la exposición a contaminantes del tráfico es mayor en las proximidades de vías principales, disminuyendo con la distancia a las mismas (Gilbert *et al.*, 2002). Además, se ha observado que para el NO₂ y otros contaminantes asociados al tráfico, como las partículas finas, la variabilidad intraurbana es mayor que la variación entre ciudades (Briggs *et al.*, 2000). Pero este tipo de contaminación también depende del grado de urbanización, siendo mayor en áreas urbanas con alta densidad de tráfico y en zonas cercanas a carreteras principales (Rijnders *et al.*, 2001). Por tanto, la modelización de la exposición a contaminantes atmosféricos emitidos por fuentes móviles en zonas urbanas requiere de información detallada que describa la actividad del tráfico en el área de estudio.

Recientemente se han desarrollado diferentes métodos para la modelización de la exposición utilizando los datos de monitores ambientales y aplicando técnicas de análisis espacial. Dado el carácter geográfico de la contaminación atmosférica, la utilización de SIG ha supuesto un gran avance en la valoración individual de la exposición. Los SIG son una herramienta muy valiosa, ya que facilitan el tratamiento e integración de información de carácter espacial, la obtención de mapas en soporte digital y el desarrollo de modelos de exposición que combinan datos ambientales, poblacionales y administrativos (densidad de población, red de carreteras y fuentes puntuales de contaminación, entre otros) (Jensen, 1998). Así, por ejemplo, se ha observado que los niveles de NO₂ medidos con captadores pasivos están muy correlacionados con los niveles estimados a partir de SIG que utilizan información de la red de carreteras, de densidad de tráfico, usos del suelo y altitud (Briggs *et al.*, 1997 y 2000).

En los últimos años se han empleado varias técnicas diferentes para mapificar la contaminación atmosférica a diferentes escalas geográficas como, por ejemplo, el método de interpolación *kriging*, usado mayormente a una escala regional (Bell, 2006; Liao *et al.*, 2006). El *kriging* es una técnica geoestadística que permite estimar la concentración de un contaminante en puntos no muestreados. La ventaja de esta técnica es que proporciona una medida del grado de incertidumbre, en forma de error de la estimación en la localización no muestreada. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes cuando se usa a escala intraurbana, debido a la gran variabilidad de la concentración de los contaminantes en distancias muy pequeñas. Las superficies de contaminación en las zonas urbanas son muy complejas, con lo que esta técnica de interpolación requiere una red muy densa de puntos de muestreo ya que, de lo contrario, las superficies que se obtienen “suavizan” demasiado la variabilidad de las concentraciones. No obstante, es una técnica adecuada para estimar las concentraciones a largo plazo en zonas residenciales o de fondo, donde la

variación espacial es mucho más suave en comparación con zonas urbanas o próximas a focos de emisión de contaminación atmosférica (p. ej. carreteras) (Briggs, 2005).

También se han utilizado en los últimos años modelos de dispersión, que tienen la ventaja de poder contemplar la variabilidad espacial y temporal, sin la necesidad de muestreos adicionales, pero el inconveniente de requerir una gran cantidad de datos (Briggs *et al.*, 1997; Jerrett *et al.*, 2005a).

El desarrollo de la técnica *land use regression* (LUR) ha supuesto uno de los mayores avances en la evaluación de la exposición a la contaminación atmosférica derivada del tráfico (Briggs *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 2007) y en la actualidad es una técnica prometedora para la predicción de la exposición individual en estudios epidemiológicos poblacionales (Jerrett *et al.*, 2007; Aguilera *et al.*, 2008). Esta técnica permite caracterizar, con un alto nivel de resolución, la variabilidad espacial de los contaminantes atmosféricos, principalmente en zonas urbanas. El método LUR utiliza datos geográficos, datos de tráfico y datos de mediciones ambientales en diferentes localizaciones para construir modelos de regresión. A partir de estos modelos, se pueden predecir las concentraciones de los contaminantes en lugares no muestreados para los que se dispone de la información geográfica y de tráfico utilizada (Jerrett *et al.*, 2005a).

Los modelos LUR se han usado con éxito en Europa y Norteamérica para modelizar la variabilidad intraurbana de NO₂ (Briggs *et al.*, 1997; Hochadel *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006; Sahsuvaroglu *et al.*, 2006) y para evaluar las diferencias en el patrón espacial de otros contaminantes atmosféricos (Henderson *et al.*, 2007). Así, un estudio estimó las concentraciones de NO₂ en tres ciudades europeas usando datos de densidad de tráfico, distancia a una autovía, tipo de calle, uso del suelo y altitud, con un valor de R² entre 79% y 87% (Briggs *et al.*, 1997). La variabilidad espacial de la concentración de partículas finas también se

ha evaluado con esta técnica en áreas de mayor extensión (Brauer *et al.*, 2003; Hochadel *et al.*, 2006), ya que se trata de un contaminante con una dispersión de carácter más regional. Así, se han estimado las concentraciones de partículas en tres zonas de Europa usando datos de la intensidad de tráfico, distancia a carreteras, configuración de la red de carreteras, tipo de calle y densidad de población, con un valor de R^2 entre 50% y 73% (Brauer *et al.*, 2003).

Una vez obtenidos los modelos de regresión, es posible asignar niveles de contaminación en localizaciones previamente georreferenciadas, como el lugar de residencia (Jerrett *et al.*, 2007). En conclusión, esta técnica permite conocer mejor la influencia del tráfico en los niveles de contaminación atmosférica y captar la variabilidad espacial a pequeña escala, y es muy útil para predecir la exposición individual en estudios de salud (Levy *et al.*, 2003).

Cuestionarios

Los cuestionarios ambientales ofrecen una oportunidad de mejorar la medida de la exposición personal a los contaminantes atmosféricos, tanto en ambiente exterior como en el interior de la vivienda. Mediante el uso de cuestionarios debidamente validados es posible obtener información respecto al lugar de residencia del niño, localización del colegio, lugar de trabajo de los padres, características de la vivienda y su entorno, posibles fuentes de exposición, uso de medios de transporte y patrón tiempo-actividad del niño. Igualmente, permiten recoger información sobre exposición pasiva al humo de tabaco, tipo de calefacción y cocina, ventilación, número de personas que habitan en la casa, utilización de productos químicos, de limpieza, insecticidas, ambientadores, etc. (Espulgues *et al.*, 2007).

Para el caso concreto de la exposición pasiva al humo del tabaco, es extendido el uso de cuestionarios estandarizados que recogen información sobre el

hábito de consumo. No obstante, con los datos recogidos mediante cuestionarios se suele infravalorar la frecuencia real de consumo, por lo que el uso adicional de biomarcadores proporcionará una estimación más precisa de la exposición (Puig *et al.*, 2008).

Biomarcadores

Los biomarcadores de exposición ofrecen la oportunidad de evaluar específicamente la exposición total a contaminantes que se incorporan al individuo a través de diferentes rutas, ya que proporcionan información sobre la dosis interna real. En el caso de determinados contaminantes del aire como los HAPs, además de la inhalación, la absorción dérmica y la ingestión son también posibles vías de exposición durante el embarazo y la infancia.

Existen diferentes tipos de biomarcadores de exposición a contaminantes del aire. Los biomarcadores basados en los aductos de ADN-HAP (Perera *et al.*, 2004) y en algunos metabolitos de HAPs y del humo de tabaco, excretados en orina durante el embarazo y los primeros años de vida, son los más utilizados en la biomonitorización de la exposición infantil a contaminación atmosférica (Gilliland *et al.*, 2005). Los aductos de ADN-HAP pueden interpretarse como una medida precoz del efecto cancerígeno de los HAPs. En cuanto a la exposición pasiva al humo de tabaco, el biomarcador más empleado es la medida de los niveles de cotinina, un metabolito de la nicotina, principalmente en muestras de orina (Cook *et al.*, 1994; Puig *et al.*, 2008). La concentración de nicotina también puede determinarse en pelo, con la ventaja de proporcionar una estimación de la exposición al humo de tabaco durante los 2-3 meses previos a la medición (Jaakkola y Jaakkola, 1997). Existen otros biomarcadores de exposición a contaminantes del aire como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno en distintas muestras biológicas. Por ejemplo, la exposición a benceno o a tolueno puede evaluarse mediante la determinación en orina de la concentración del ácido S-

fenilmercaptúrico o del ácido S-p-toluilmercaptúrico, respectivamente (Angerer *et al.*, 1998; Fustinoni *et al.*, 2005). Sin embargo, la validez de estos biomarcadores - usados principalmente para evaluar la exposición laboral- como indicadores de la exposición ambiental a bajas dosis todavía no se ha demostrado.

7.5. Biomarcador 1-hidroxipireno

Como ya se ha señalado anteriormente, los HAPs pueden encontrarse en el aire exterior e interior, en agua y alimentos contaminados y en el suelo. La exposición de los niños a HAPs se produce mayormente por inhalación de humo de tabaco, de las emisiones del tráfico, de hornos de leña y chimeneas, de calefacciones domésticas y por el consumo de alimentos a la parrilla y ahumados (IARC, 1987; Lewtas, 1994). Los HAPs están formados por mezclas complejas de compuestos, siendo el pireno uno de los que se encuentra en la mayoría de ellas y en mayor cantidad. En el organismo, el pireno es metabolizado principalmente vía citocromo P450 y excretado en la orina como 1-hidroxipireno (1-OHP) (Jacob y Seidel, 2002). El 1-OHP, principal metabolito del pireno, está considerado como un buen indicador de la exposición al total de HAPs (Jacob y Seidel, 2002; Viau, 2002). La vida media de 1-OHP es de aproximadamente 10 horas (Brzezniński *et al.*, 1997), por lo que la concentración de 1-OHP en orina representa la exposición a corto plazo a HAPs (Jongeneelen, 1994).

Diversos estudios han demostrado la validez de la medida de 1-OHP como biomarcador de exposición laboral a HAPs (Hansen *et al.*, 2008), aunque los estudios sobre exposición ambiental son mucho más escasos en comparación con los estudios realizados en trabajadores expuestos. La exposición infantil se ha estudiado en diversos países, con la dieta como principal factor determinante de la concentración de 1-OHP (Chuang *et al.*, 1999; Vyskocil *et al.*, 2000; Fiala *et al.*, 2001). Otros estudios han encontrado que el tráfico y el humo de tabaco ambiental también son factores importantes (Kanohe *et al.*, 1993; Siwinska *et al.*, 1998;

Hansen *et al.*, 2005). Así, Hansen y colaboradores (2005) encontraron mayores niveles de 1-OHP en niños daneses que vivían en zonas urbanas, en comparación con niños de zonas rurales. Van Wijnen y colaboradores (1996) determinaron también el nivel de 1-OHP en niños daneses que residían en zonas con diferentes niveles de contaminación procedente del tráfico, y únicamente las fuentes interiores de HAPs resultaron estar asociadas positivamente con los niveles de 1-OHP. Esto les permitió concluir que las posibles diferencias en los niveles de HAPs en el aire ambiente que rodeaba a los niños eran demasiado pequeñas en comparación con las dosis absorbidas a través de la dieta. Siwinska *et al.* (1998) encontraron que los niveles de 1-OHP en niños de Polonia estaban influidos principalmente por la exposición a humo de tabaco. En un estudio llevado a cabo en la República Checa también se atribuyó la variabilidad de los niveles de 1-OHP a la exposición pasiva al humo de tabaco (Fiala *et al.*, 2001). En cambio, en otro estudio con niños de Montreal, Canadá (Vyskocil *et al.*, 2000), no se observó relación entre las dosis de pireno absorbidas por ingestión o inhalación y las concentraciones de 1-OHP en orina.

Por tanto, la limitación del uso del metabolito 1-OHP como indicador de la exposición a contaminación atmosférica radica en que la ingestión de alimentos contaminados o la inhalación de humo de tabaco pueden ser también rutas importantes de exposición a HAPs.

8. Exposición infantil a contaminantes a través de la dieta

8.1. Mercurio

El mercurio (Hg) es un elemento que se encuentra presente de manera natural en el medio ambiente (ATSDR, 1999). No obstante, la contaminación por mercurio se ha extendido a causa del gran número de actividades antropogénicas, tanto agrícolas como industriales. Desde antaño, se ha extraído mercurio a partir del cinabrio (sulfuro de Hg), mineral compuesto en un 85% por mercurio y usado en muchos procesos y productos (Clarkson, 1997). Durante años, se ha empleado en la elaboración de medicamentos y productos farmacéuticos, como componente de fungicidas y en amalgamas dentales (WHO, 1990 y 1991; Clarkson, 1997), también en termómetros, barómetros, baterías, lámparas e interruptores eléctricos (ATSDR, 1999) y como conservante en determinadas vacunas (Clarkson, 2002). Desde el comienzo de la revolución industrial, el mercurio se ha utilizado principalmente en industrias cloroalcalinas, como catalizador en la electrolisis del cloruro de sodio. En la actualidad, también se generan grandes cantidades de mercurio como resultado de su uso para la extracción de minerales como el oro (Hylander y Meili, 2003), en procesos de combustión y vertidos industriales (ATSDR, 1999).

Las principales fuentes antropogénicas de mercurio son (*United Nations Environment Programme* [UNEP], 2002):

Movilización de impurezas de mercurio:

- Producción de energía y calor por combustión de carbón.
- Producción de energía a partir de combustibles fósiles distintos del carbón.
- Producción de cemento.
- Minería y otras actividades metalúrgicas que comprenden la extracción y elaboración de materiales minerales vírgenes y reciclados, por ejemplo, la

producción de hierro y acero, ferromanganeso, zinc y oro.

Extracción y uso intencionado del mercurio:

- Minería del mercurio.
- Minería del oro y la plata en pequeña escala (proceso de amalgamación).
- Producción cloroalcalina.
- Uso de lámparas fluorescentes y baterías.
- Amalgamas dentales y vacunas.
- Fabricación de productos que contienen mercurio, por ejemplo, termómetros, manómetros e interruptores eléctricos.

Tratamiento de residuos:

- Incineración de residuos municipales, sanitarios y peligrosos.
- Vertederos de residuos.

Existen distintas formas de mercurio: Hg inorgánico elemental o metálico (Hg^0), compuestos inorgánicos de mercurio (Hg^+ , Hg^{2+}) y compuestos orgánicos, como metilmercurio -MeHg- y etilmercurio (*National Research Council -NRC-*, 2000b). En la atmósfera el Hg elemental se transforma en Hg inorgánico, soluble, que con la lluvia vuelve a ser depositado en la superficie. Una vez depositado, parte del mercurio es nuevamente reducido a Hg elemental y reemitido a la atmósfera (WHO, 1990; ATSDR, 1999). En el suelo y en los sedimentos acuáticos, el mercurio inorgánico puede ser metilado por microorganismos y transformado en MeHg. En esta forma, el mercurio tiene la capacidad de acumularse en la cadena trófica de los sistemas acuáticos (Figura 1). Las principales fuentes de exposición humana a estas tres formas de mercurio son (Counter y Buchanan, 2004):

- Hg^0 , amalgamas dentales.
- Hg^+ , Hg^{2+} , alimentos y algunos cosméticos.
- MeHg, pescado y marisco.

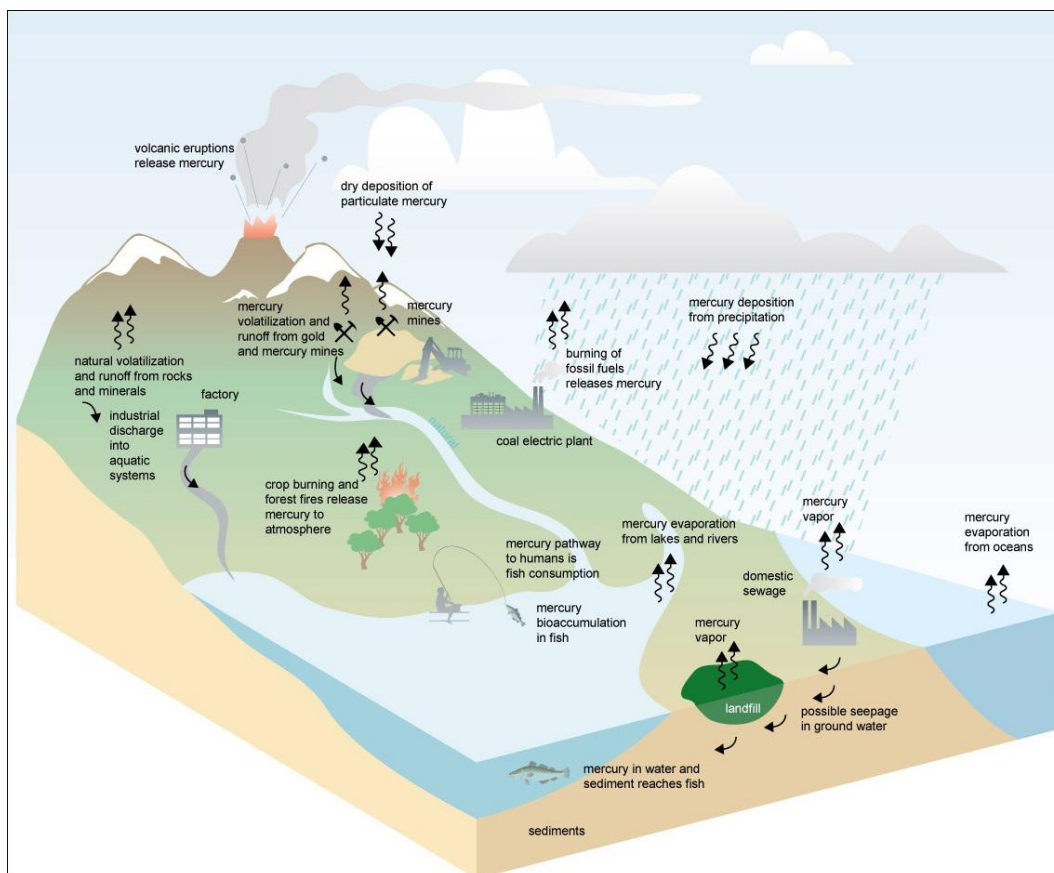


Figura 1.1. Esquema conceptual del ciclo del mercurio en la naturaleza

La contaminación por Hg es un problema mundial (UNEP, 2002). En muchos países, se han llevado a cabo acciones para reducir su uso y emisión (UNEP, 2002; *Comission of the European Communities*, 2005). El último informe del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) asegura que, a pesar de su toxicidad, los usos de este metal en el mundo no se han reducido y su comercio se ha estabilizado en unas 3.500 toneladas anuales (UNEP, 2002). Por su parte, la Comisión Europea aprobaba en 2005 la estrategia

comunitaria sobre el mercurio (*Comission of the European Communities, 2005*) y en la actualidad se discute el Reglamento comunitario relativo a la prohibición de su exportación y de su almacenamiento seguro. En España, los responsables del Ministerio de Medio Ambiente presentaban durante el Consejo de Administración del PNUMA en Nairobi (Kenia), en febrero de 2007, su política de reducción de mercurio (www.mma.es/secciones/medioscomunicacion/prensa/notas_pre/2007/02/PNUMANairobiMercurioook.pdf)

8.2. Metilmercurio

Exposición y efecto neurotóxico

El MeHg se forma, como antes se apuntaba, por la actividad microbiana que tiene lugar en medios acuáticos, donde se bioacumula y biomagnifica a través de la cadena trófica, alcanzando su mayor concentración en peces de especies predatoras y de gran tamaño (por ejemplo, el atún) y en mamíferos marinos (Sanfeliu *et al.*, 2003). La mayor parte del mercurio total en los peces se encuentra en forma de MeHg (cerca del 100% en los peces adultos), de forma que la principal fuente de exposición a mercurio en la población general es la ingesta de pescado contaminado con MeHg (USEPA, 2001).

El MeHg es un compuesto tóxico para el sistema nervioso central (SNC), tanto en el feto como en el adulto, aunque el SNC en desarrollo es más vulnerable (WHO, 1990). El cerebro es el principal órgano diana del MeHg y su toxicidad en este sistema en desarrollo es selectiva y única (NRC, 2000b). Cuando este compuesto es ingerido con los alimentos se absorbe y distribuye por todo el organismo, mayormente en el cerebro, donde alcanza una concentración de hasta 5 veces mayor que en sangre. El MeHg también se acumula en el pelo, matriz que se ha usado de manera extendida para estimar la exposición, tanto reciente como pasada. Además, el MeHg atraviesa fácilmente la barrera placentaria, alcanzando

mayores concentraciones en la sangre de cordón umbilical que en la sangre materna (Vahter *et al.*, 2000). Aunque se sabe que el riesgo de exposición *in utero* a MeHg es mayor que a través de la lactancia, la leche materna también contiene mercurio (parte en forma de MeHg) y, por lo tanto, constituye una posible fuente de exposición postnatal (Grandjean *et al.*, 1994; Björnberg *et al.*, 2005).

En los años 50 tuvo lugar en Japón un episodio de intoxicación masiva por MeHg debido al consumo de pescado altamente contaminado, tras la emisión industrial de MeHg en la Bahía de Minamata (Tsubaki y Irukayama, 1977). A comienzo de la década de los 70, también se produjo otro episodio similar en Irak, después de que se utilizara MeHg como fungicida para semillas y éstas fueran empleadas en la preparación de harina para fabricar pan (Myers, 2000). Sin embargo, en la actualidad hay evidencia suficiente como para reconocer que, aún a bajas dosis, la exposición a MeHg a través del consumo de pescado contaminado merece especial atención desde el punto de vista de sus efectos en salud, especialmente, en la salud infantil. Después de la intoxicación ocurrida en Minamata, se comprobó que la exposición prenatal a MeHg produce daño en el cerebro (WHO, 1990; Harada, 1995). Los niños que presentaron parálisis cerebral aguda estuvieron expuestos a altas dosis de MeHg durante el embarazo, debido al consumo materno de pescado altamente contaminado. También se observaron efectos neurotóxicos en los niños iraquíes expuestos *in utero* a MeHg (Amin-Zaki *et al.*, 1974).

Hace más de una década se llevaron a cabo dos estudios epidemiológicos en poblaciones de las Islas Faroe e Islas Seychelles, expuestas de manera crónica a MeHg por ser comunidades con un alto consumo de pescado. En el estudio de las Islas Faroe se observó una asociación entre la exposición prenatal a MeHg y retraso en el desarrollo neurocognitivo evaluado a los 7 años de edad, especialmente en las funciones de lenguaje, atención y memoria, y en menor

grado, en las áreas motora y espacio-visual (Grandjean *et al.*, 1997); pero no se observó ningún efecto adverso asociado a MeHg en el estudio de las Islas Seychelles (Davidson *et al.*, 1998). Análisis más recientes en ambas poblaciones han llegado a las mismas conclusiones que entonces (Myers *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2004b). Así, en las Faroe, se encontró una asociación positiva entre la exposición *in utero* a MeHg y menor potencial auditivo en niños de 14 años, y también en las funciones motora, verbal y de memoria (Murata *et al.*, 2004b).

En Nueva Zelanda también se encontraron efectos adversos en el neurodesarrollo como resultado de la exposición prenatal a MeHg. Un estudio analizó a un grupo de niños cuyas madres habían consumido, durante el embarazo, pescado al menos 3 veces a la semana (Kjellstrom *et al.*, 1989). A la edad de 4 años se observó una mayor prevalencia de desviaciones cognitivas entre los niños más expuestos a MeHg (esto es, concentración de mercurio en pelo de la madre superior a 6 µg/g). A los 6 años, se encontró una asociación entre concentraciones en el pelo de la madre en el rango 13-15 µg/g y una menor puntuación en el coeficiente de inteligencia (IQ), en el área verbal, área espacio-visual y en la función motora gruesa (Crumpt *et al.*, 1998).

Otros estudios transversales realizados con niños de Brasil e Islas Madeira también mostraron asociaciones significativas entre la exposición postnatal a mercurio y disfunciones neuropsicológicas (Grandjean *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 1999). En cambio, otros estudios en Brasil y en La Guayana Francesa no encontraron ningún efecto negativo de la exposición infantil a mercurio (Cordier *et al.*, 2002; Tavares *et al.*, 2005).

Los resultados aparentemente contradictorios de los estudios de las Islas Seychelles por un lado, y de las Faroe y Nueva Zelanda por otro, podrían deberse a la variabilidad en las escalas neuropsicológicas utilizadas, el tipo de biomarcador de exposición empleado, la edad de los niños evaluados, el tipo de

exposición a MeHg (aguda *versus* crónica), medición de la exposición conjunta a otros contaminantes como los PCBs, el método estadístico usado para analizar los datos, la susceptibilidad genética de la población de estudio, entre otros factores ambientales o relacionados con la dieta (NRC, 2000b).

Por otra parte, más recientemente, varios trabajos llevados a cabo en Norteamérica y Europa han encontrado un efecto beneficioso del consumo de pescado durante la gestación en poblaciones que no consumen pescado con mucha frecuencia (Daniels *et al.*, 2004; Oken *et al.*, 2005 y 2008; Hibbeln, 2007; Lederman *et al.*, 2008). Así, Oken y colaboradores (2005) describieron una asociación positiva entre el desarrollo cognitivo infantil evaluado a los 6 meses (particularmente en el área de memoria) y el consumo materno de pescado en el embarazo, y negativa con el contenido de mercurio en pelo de la madre. El consumo de pescado se encontró fuertemente asociado con la concentración de mercurio en sangre de la madre durante la gestación (Oken *et al.*, 2008). Un mayor consumo de pescado se relacionó en un mejor rendimiento cognitivo de los niños a los 3 años de edad, mientras que una mayor exposición prenatal a mercurio se relacionó con un peor rendimiento, y esta asociación fue mayor después de incluir en el modelo ambas variables. En una cohorte de niños de Polonia, se estudió el efecto de exposición prenatal a mercurio en el desarrollo cognitivo y psicomotor al año de vida. En este país en el que el consumo de pescado es relativamente bajo, se encontró que la exposición a mercurio se asociaba con la frecuencia de consumo de pescado, así como con un mayor riesgo de retraso en el neurodesarrollo (Jedrychowski *et al.*, 2006a).

También se ha indicado que el balance entre el efecto negativo de los contaminantes del pescado, como MeHg y PCBs, y el efecto beneficioso de sus nutrientes difiere de unas poblaciones a otras (Rice, 2008). La cantidad de pescado que consume una población determinada y los niveles medios de

nutrientes de dicha población parecen determinantes a la hora de estudiar los efectos en el neurodesarrollo, y se ha sugerido que esto podría contribuir a explicar los distintos resultados de los estudios epidemiológicos sobre los efectos del MeHg en el neurodesarrollo infantil (Rice, 2008).

Biomarcadores de exposición

Los biomarcadores más empleados para determinar la exposición individual a MeHg son la medida directa de la concentración de mercurio en pelo y en sangre. La concentración de mercurio total en pelo es un buen reflejo de la concentración de MeHg que circula en la sangre (IPCS, 1990; Cernichiari *et al.*, 1995). La relación entre la concentración en pelo y en sangre (expresadas como g Hg/g y g Hg/ml, respectivamente) es de aproximadamente 250:1 (WHO, 1990). Desde un punto de vista toxicológico, la concentración en sangre es un buen indicador de la dosis absorbida y de la cantidad de mercurio disponible en el cuerpo. El MeHg tiene gran afinidad por la hemoglobina fetal, lo que resulta en una mayor concentración de mercurio en la sangre de cordón que en sangre de la madre (Stern y Smith, 2003).

Cuando se comparan las concentraciones determinadas en pelo y en sangre, hay que tener en cuenta determinados factores temporales. El MeHg se incorpora al folículo piloso durante la formación del pelo, pero tiene que transcurrir aproximadamente un mes para que pueda detectarse MeHg en una muestra de pelo próximo al cuero cabelludo (Suzuki, 1988). Dependiendo de la longitud de la muestra de pelo, la concentración de mercurio reflejará una exposición más o menos reciente. La vida media del MeHg en el organismo es de aproximadamente 1,5-2 meses (Swartout y Rice, 2000), con lo que el mercurio cuantificado en muestras de pelo próximo al cuero cabelludo reflejaría exposiciones más parecidas a los niveles medidos en sangre (Grandjean *et al.*, 2003). Algunos estudios de cohortes prospectivos sobre los efectos neurotóxicos

del MeHg han usado ambos biomarcadores (Steuerwald *et al.*, 2000). Pero el pelo es un medio particularmente apropiado para la biomonitorización de la exposición humana a mercurio porque refleja la exposición a mercurio orgánico y, por tanto, la exposición a través de la dieta (McDowell *et al.*, 2004). Además, la concentración de MeHg y mercurio total en pelo están linealmente relacionadas (Pellizzari *et al.*, 1999), y el MeHg contribuye en un 70-80% a la concentración de mercurio total (Cernichiari *et al.*, 1995).

Evaluación del riesgo

A partir de los resultados de los estudios de las Islas Faroe, las Islas Seychelles y Nueva Zelanda (Grandjean *et al.*, 1997; Crumpton *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2003), el *National Research Council* (NRC) y la Agencia de protección ambiental (USEPA) de los Estados Unidos establecieron como dosis de referencia (*Reference Dose -RfD-*) para MeHg una ingesta media diaria de 0,1 $\mu\text{g}/\text{día}$ por kg de peso corporal (NRC, 2000b). Este valor de RfD resulta de aplicar un factor de incertidumbre de 10 al límite inferior del intervalo de confianza 95% para el cual se ha observado disfunción neurológica (retrasos en el desarrollo de la atención, memoria verbal y lenguaje) en niños expuestos *in utero* a MeHg, y correspondería con una concentración de 5,8 $\mu\text{g}/\text{l}$ en sangre de cordón umbilical y 1,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ en pelo materno (CDC, 2004). Sin embargo, la concentración mínima de MeHg que puede afectar al desarrollo neurológico todavía se desconoce. La mayoría de estudios en humanos se centran en poblaciones que consumen grandes cantidades de pescado con un alto contenido en MeHg. Los resultados de éstos y otros estudios realizados hasta el momento todavía no son concluyentes.

En las últimas décadas, y en base al papel de los distintos componentes del pescado en la dieta, se ha promocionado de manera importante su consumo. Los beneficios nutricionales del pescado se deben principalmente a su contenido en proteínas y vitaminas, así como al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados

omega-3 en el pescado azul (o graso) (Cohen *et al.*, 2005). Algunos de estos nutrientes se han asociado con un efecto protector frente a determinadas enfermedades (Kris-Etherton *et al.*, 2002) y con un mejor desarrollo neurológico en niños (Daniels *et al.*, 2004; Innis, 2007). En 1985 la OMS ya señalaba la importancia de evaluar en grupos vulnerables los riesgos para la salud derivados de la exposición a contaminantes químicos a través de la dieta (WHO, 1985).

Las directrices sobre las concentraciones máximas de mercurio en pescado y las recomendaciones sobre el consumo de pescado varían en los distintos países de la UE. En 2001, investigadores europeos evaluaron los riesgos de la exposición a mercurio en Europa y presentaron su opinión al respecto en el denominado “*Position Paper on Mercury*” (Pirrone *et al.*, 2001). En cuanto a MeHg recomendaron que la dosis de referencia de la USEPA se aplicara también en Europa. Por lo tanto, se estimó que la RfD de 0,1 µg/kg de peso corporal por día es válida para Europa (UNEP, 2002). Dado que el consumo de pescado tiene efectos beneficiosos, el objetivo a largo plazo no es eliminar el pescado de la dieta materna durante el embarazo, sino reducir el consumo de especies con concentraciones elevadas de MeHg (Ramón *et al.*, 2008). El documento “*Compilation of toxicological and environmental data on chemicals – mercury and its derivatives*” (INERIS, 2000), presentado por Francia, ofrece una visión de conjunto sobre algunos valores toxicológicos de referencia de diversos países. Algunos Estados miembros tienen límites más bajos que los que exige la directiva europea para el contenido de mercurio en el pescado (0,5 µg/kg para todas las especies de pescado excepto las predadoras y 1 µg/kg para las predadoras, como pez espada y atún) (Directiva 2001/22/CE). Además, países como Dinamarca, Finlandia, Suecia y el Reino Unido, han formulado recomendaciones particulares para grupos vulnerables de la población, esto es, mujeres embarazadas o en edad fértil, mujeres lactantes y niños, a fin de evitar o reducir el consumo de pescado en los casos en que se aplique los límites de la UE. Así, por ejemplo, en Reino

Unido, la *Food Standards Agency* recomendó en 2002 que las mujeres embarazadas, los recién nacidos y los niños no consumieran determinadas especies de pescado, por ejemplo pez espada. Pero en general, se aconseja el consumo de pescado durante dichos periodos de vulnerabilidad pero limitado a no más de una vez por semana (UNEP, 2002).

La relación dosis-respuesta de exposición a bajas concentraciones de MeHg y los factores que determinan la susceptibilidad a sus efectos todavía no son bien conocidos. Debido al interés y preocupación pública que ha suscitado el MeHg desde la perspectiva de la salud, es necesario realizar más estudios que ayuden a la evaluación del riesgo para el neurodesarrollo infantil asociado a este contaminante.

Mercurio en el Mediterráneo

Los sedimentos del mar Mediterráneo contienen cantidades anómalas de depósitos de cinabrio, lo que explicaría que los organismos marinos que habitan en este medio acumulen mayores cantidades de mercurio que las mismas especies que habitan en el Atlántico y otros océanos (Baldi *et al.*, 1978). Esta tendencia se confirmó a partir de un estudio realizado en el atún del Mediterráneo y otras especies que, cuando son adultas, migran del Atlántico al Mediterráneo para desovar (Bernhard, 1988). Según este estudio, las especies autóctonas del Mediterráneo tenían niveles de mercurio entre 3 y 4 veces superiores a las encontradas en las especies provenientes del Atlántico. Pero este proceso de bioacumulación, tan evidente en el atún del Mediterráneo, también se observó en especies de niveles tróficos inferiores, como la anchoa, la sardina y la caballa (Baldi *et al.*, 1978). Estas diferencias observadas en los niveles de mercurio entre especies mediterráneas y atlánticas se ha puesto en evidencia en repetidas ocasiones con organismos de la misma especie, con una alimentación similar, o pertenecientes al mismo nivel trófico (Renzoni *et al.*, 1998).

En poblaciones de zonas costeras del Mediterráneo, la ingesta frecuente de pescado con concentraciones elevadas de MeHg se ha asociado con un riesgo de efecto tóxico, especialmente en mujeres gestantes (Renzoni *et al.*, 1998; Ramón *et al.*, 2008). Ramón y colaboradores (2008) encontraron niveles medios elevados de mercurio en sangre de cordón de una muestra de 255 mujeres de la cohorte INMA de Valencia, superando el 75% de los recién nacidos el nivel de referencia de 5,8 µg/l, concentración por encima de la cual la USEPA considera que hay un incremento del riesgo de retraso en el neurodesarrollo (NRC, 2002b; CDC, 2004). La ingesta de pescado, principalmente de pescado azul grande, se vio asociada con mayores niveles de mercurio.

En España, el consumo de pescado es relativamente elevado. Un trabajo llevado a cabo en población adulta de los 10 países europeos participantes en el estudio sobre cáncer y nutrición EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), informaba que España, junto con Grecia, es el país con un mayor consumo de pescado, siendo las variedades de pescado blanco las más consumidas, además de ser el país en el que se consume una mayor variedad de especies de pescado y marisco (Welch *et al.*, 2002). Una de las regiones españolas estudiadas ha sido Granada, en la que se describió que el consumo de pescado blanco en mujeres suponía el 50% de entre todos los tipos de pescado, 32% el pescado azul y 18% el marisco.

Por último, son varios los estudios que han descrito la exposición infantil a mercurio en nuestro país, principalmente en poblaciones del Noreste de la península y en la isla de Menorca (Batista *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 2005; Torrente *et al.*, 2005; Montuori *et al.*, 2006; Díez *et al.*, 2009). En estos trabajos se muestran niveles de mercurio en pelo superiores a los descritos en niños de Alemania y Estados Unidos (Pesch *et al.*, 2002; McDowell *et al.*, 2004) y claramente asociados con la frecuencia de consumo de pescado.

Estos antecedentes sugieren la necesidad de explorar esta fuente de exposición en todo el territorio español, y sus posibles efectos en el desarrollo neurológico, especialmente en grupos población vulnerable, como las mujeres gestantes y los niños.

9. Contaminación ambiental y neurodesarrollo infantil

La OMS, en la declaración de Bangkok en marzo del 2002, declaraba la prioridad de investigar de forma multicéntrica los efectos en el neurodesarrollo de la exposición a dosis bajas de contaminantes ambientales desde la etapa de la gestación hasta la adolescencia (WHO, 2002). Como ya se introdujo al comienzo de esta memoria, más recientemente, la UE ha puesto en marcha el programa denominado SCALE para reducir las enfermedades relacionadas con factores ambientales, con especial atención a la infancia, siendo uno de los focos de atención de esta estrategia la prevención de los trastornos del desarrollo neurológico (<http://www.environmentandhealth.org/index.php>).

Como ya se ha señalado anteriormente, los sistemas corporales más vulnerables en los recién nacidos y los niños parecen ser los sistemas endocrino, reproductivo, inmune y nervioso. El desarrollo del sistema nervioso requiere una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales que dirigen la maduración cerebral y modulan el neurodesarrollo infantil (Trask y Kosofsky, 2000). Este sistema es único, ya que consta de diferentes áreas responsables de campos funcionales específicos (p. ej., control motor, función sensorial, e inteligencia). Estas áreas se desarrollan de forma secuencial, pero, a su vez, interdependiente, de tal manera que cualquier interferencia en alguna de las fases o procesos de su maduración puede afectar a etapas posteriores del desarrollo (Mendola *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 2007). Además, el proceso de la maduración neurológica es prolongado, lo que amplía el período de vulnerabilidad biológica, que comienza en el primer mes tras la concepción y continúa durante la gestación,

la infancia y la adolescencia. Los distintos tipos de células cerebrales presentan, asimismo, períodos específicos de vulnerabilidad con sensibilidad diferente a los agentes ambientales. Las primeras neuronas, formadas durante el primer trimestre de embarazo, se desarrollan y se diferencian, al mismo tiempo que inician la fase de migración neuronal. Las células de la glía proliferan durante el segundo trimestre de la vida fetal, cubriendo las neuronas con mielina protectora para una mejor transferencia de las señales nerviosas. La sinaptogénesis sigue estableciendo la conectividad de la estructura neuronal durante los 2 primeros años de vida, y la mielinización continúa hasta la adolescencia, aunque el 80% del peso del cerebro adulto se alcanza a los 6 años de edad (Grandjean y White, 2002; Rebagliato *et al.*, 2007).

El SNC tiene una capacidad limitada para reparar daños estructurales con lo que, si algún agente destruye células del cerebro en desarrollo o si fallan las conexiones entre las células nerviosas en un periodo crítico del mismo, existe mayor riesgo de que el daño sea permanente e irreversible (Rice y Barone, 2000). Determinados contaminantes ambientales pueden actuar como teratógenos del neurodesarrollo, es decir, son capaces de alterar el desarrollo cerebral y su función. Estos teratógenos pueden afectar la estructura y la función del cerebro fetal e infantil sin producir ningún cambio o disfunción externa evidente (Hussain *et al.*, 2007). Parte de la dificultad para identificar qué contaminantes ambientales actúan como teratógenos del neurodesarrollo, reside en que los efectos de exposiciones tempranas pueden no ser evidentes en el momento del nacimiento o a lo largo de la primera infancia, sino manifestarse más tardíamente a medida que el niño madura.

Datos recientes confirman un incremento en la UE de los trastornos del neurodesarrollo en la infancia, tales como dificultades de aprendizaje, trastornos de déficit de atención e hiperactividad, dislexia, autismo, trastornos emocionales y

de conducta, entre otros (UE, 2009). Por otra parte, en Estados Unidos se ha estimado que entre un 3 y un 8% de los niños presentan trastornos del neurodesarrollo (Schettler, 2001). Este aumento en la incidencia de trastornos del neurodesarrollo en los países occidentales podría deberse en parte a cambios en los criterios diagnósticos, a una mayor conciencia y aceptación de estos problemas y/o a que se hayan producido mejoras en los sistemas de declaración y registro de estas anomalías (Rebagliato *et al.*, 2007), pero no se descarta el aumento real de la afectación neurológica.

Los factores genéticos, ambientales y sociales, sometidos entre sí a interacciones complejas, determinan el desarrollo cognitivo y conductual de los niños, pero ninguno de estos factores de manera aislada puede explicar el aumento de las alteraciones neurológicas en la infancia. El factor hereditario contribuye aproximadamente en un 50% a la variabilidad en los rasgos cognitivos, conductuales y de personalidad de los individuos (Plomin *et al.*, 1994) y el otro 50% de la variabilidad vendría determinada por factores ambientales. Un comité de expertos del NRC de Estados Unidos (NRC, 2000a) concluyó que el 3% de los trastornos del neurodesarrollo podrían ser el resultado directo de exposiciones a contaminantes ambientales, y hasta un 25% más se producirían por la interacción entre factores ambientales y susceptibilidad genética individual. Así, en los últimos años ha crecido el interés acerca de los efectos de la exposición temprana a neurotóxicos ambientales sobre el desarrollo cognitivo, conductual y motor en la infancia, contaminantes a los que los niños pueden estar expuestos, principalmente, a través de la madre (*in utero*), la lactancia y la dieta.

Las primeras investigaciones sobre el efecto teratogénico y alteraciones en la conducta por agentes tóxicos se basan en la exposición prenatal a alcohol (Streissguth *et al.*, 1981) y la exposición postnatal a plomo (Dietrich *et al.*, 1993; Bellinger *et al.*, 1992). Estudios más recientes sobre exposición infantil a plomo

han puesto en evidencia que existe un riesgo de alteraciones en el neurodesarrollo como consecuencia de exposiciones a dosis sustancialmente más bajas de lo sospechado (Lanphear *et al.*, 2000). También se ha investigado extensamente acerca de los efectos neurológicos de la exposición prenatal a PCBs (Jacobson y Jacobson, 1996; Ribas-Fitó *et al.*, 2001), a MeHg (Castoldi *et al.*, 2008) y más recientemente a HAPs (Perera *et al.*, 2005a, 2006a y 2007) y humo de tabaco (Perera *et al.*, 2005a y 2007; Herrmann *et al.*, 2008). En menor medida, se ha estudiado el efecto neurotóxico en niños de la exposición a determinados pesticidas como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Ribas-Fitó *et al.*, 2006b), a metales pesados como el manganeso (Crinella *et al.*, 1998) y a contaminantes atmosféricos (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008a; Suglia *et al.*, 2008). Por ejemplo, es bien conocido que la exposición fetal e infantil a plomo, alcohol o nicotina produce trastornos en el desarrollo neuropsicológico (Nulman *et al.*, 1998). El consumo de tabaco materno puede ser causa de un menor coeficiente de inteligencia (IQ) y de déficit en el aprendizaje y la atención del niño (Eskenazi y Castorina, 1999). La exposición a plomo en los primeros años de vida origina también disminución del IQ, de la capacidad de aprendizaje y atención, y contribuye al aumento de la hiperactividad, impulsividad y agresividad (Needleman *et al.*, 1996; Rice, 1998).

En España, datos recientemente publicados en dos estudios de las cohortes INMA de Ribera d'Ebre y Menorca, muestran una asociación inversa entre los niveles de plaguicidas organoclorados (DDT y hexaclorobenceno) en sangre de cordón y la valoración del desarrollo neuroconductual realizada al año y a los 4 años de edad (Ribas-Fitó *et al.*, 2003, 2006b y 2007). En la cohorte INMA-Granada, se ha encontrado también una asociación entre la exposición prenatal a otro pesticida organoclorado (mirex) y retraso en el neurodesarrollo a los 4 años de edad (Puertas *et al.*, 2009).

La exposición a contaminantes ambientales durante la vida fetal puede causar daño cerebral a dosis bastante más bajas que las observadas en los adultos. Pero se estima que no existe información sobre la toxicidad para el neurodesarrollo en aproximadamente el 80% de las sustancias químicas sintéticas que se liberan cada año en grandes cantidades al medio ambiente (Grandjean y Landrigan, 2006). El estudio de la vulnerabilidad del desarrollo neurológico infantil supone un reto, y la estimación de valores o dosis de referencia es una tarea necesaria (Schettler, 2001). Sin embargo, las diferentes áreas del neurodesarrollo estudiadas, los efectos no específicos dependientes de múltiples factores, la falta de información sobre la exposición, la variedad de factores influyentes o confusores y los largos periodos de latencia entre la exposición y el efecto, hacen que sea difícil alcanzar conclusiones definitivas en los estudios epidemiológicos.

9.1. Factores modificadores

Los estudios acerca del efecto en el neurodesarrollo infantil por la exposición a distintos contaminantes requieren de la evaluación de un gran número de factores confusores que pueden influir en el desarrollo cognitivo de los niños. El efecto neurotóxico de los contaminantes ambientales puede verse influido, además de por la susceptibilidad genética individual, por i) factores prenatales como, por ejemplo, el crecimiento fetal o la edad gestacional al nacimiento, ii) las condiciones maternas durante el embarazo, que incluyen el estado nutricional, consumo de tabaco, alcohol, drogas o medicamentos y exposición a estrés psicosocial, y iii) los factores sociales y familiares, como el estado socioeconómico y el apoyo social con el que cuenta la familia, el nivel educativo e intelectual de los padres, el vínculo afectivo que se establece con ellos y la presencia de un entorno favorable capaz de aportar la estimulación, y la atención sanitaria a la embarazada y al niño (Trask, 2000).

La dieta materna durante la gestación y la lactancia y la del niño durante la primera infancia constituye uno de los mecanismos fundamentales a través del cual el medio ambiente puede afectar el neurodesarrollo fetal e infantil desde una doble vertiente: ingesta de alimentos y agua como portadores de contaminantes ambientales; y dieta como vehículo de nutrientes necesarios para un neurodesarrollo adecuado (aporte de ácidos grasos esenciales, ácido fólico o yodo) o de nutrientes antioxidantes, protectores frente a los contaminantes ambientales (Rebagliato *et al.*, 2007). Contaminantes neurotóxicos como MeHg, PCBs y algunos COPs se ingieren principalmente a través del consumo de alimentos grasos. Es importante, pues, evaluar cómo interaccionan los distintos nutrientes con los neurotóxicos contenidos en la dieta y los posibles efectos beneficiosos de dichos nutrientes.

9.2. Evaluación del neurodesarrollo infantil

En los estudios sobre exposición infantil a neurotóxicos, la evaluación e interpretación de los posibles efectos adversos en el neurodesarrollo es una tarea compleja, especialmente en el caso de que los efectos sean subclínicos, es decir, no evidentes si no se utilizan métodos de evaluación específicos. Además, los efectos adversos en el neurodesarrollo habitualmente consisten en desviaciones de la conducta o del comportamiento que son relativamente frecuentes o “normales”. Las alteraciones del neurodesarrollo están influidas por muchos factores, biológicos, psicológicos y sociales, por lo que es difícil identificar el grado de variabilidad en la conducta que es atribuible a la exposición a un determinado neurotóxico.

El fin principal de la evaluación neuropsicológica en la infancia consiste en constatar el posible cambio producido en la conducta y en el desarrollo como resultado de una alteración del SNC (Manga y Fournier, 1997). Dependiendo del estado de desarrollo concreto del cerebro en el momento de la exposición al

agente contaminante, se podrá conocer la naturaleza de los posibles cambios producidos en el comportamiento y las habilidades del niño. La evaluación neuropsicológica infantil es diferente a la que se realiza en los adultos por diferentes razones, entre ellas, la dificultad de detectar los efectos del daño cerebral en un organismo en desarrollo y porque es más probable que el daño cerebral de los niños sea más generalizado, mientras que en los adultos las lesiones son más localizadas. Además, resulta más complejo detectar efectos subclínicos en niños que en adultos, ya que es más difícil establecer en aquéllos el rendimiento esperado para las distintas áreas del neurodesarrollo. Así, por ejemplo, pueden presentarse dificultades en el aprendizaje, sin que haya una alteración nerviosa conocida.

La disfunción cerebral puede dar origen, directa o indirectamente, a manifestaciones psicopatológicas en el niño. Los trastornos de la conducta asociados con dificultades específicas del aprendizaje, o con déficit de atención (p. ej., dislexia o trastorno de déficit de atención e hiperactividad) son ejemplos de manifestaciones indirectas de una disfunción cerebral. Estos trastornos pueden llevar a una alteración de la conducta por inatención y actitud apática, o incluso de negativismo desafiante (Manga y Fournier, 1997).

También hay que reconocer la necesidad de tipificar el modo y el grado en que el daño cerebral afectará al futuro desarrollo y capacidad de aprendizaje del niño. Las manifestaciones del daño neurológico en la adolescencia pueden incluir déficit en el coeficiente de inteligencia, alteraciones en la conducta, así como menor memoria a corto plazo y dificultades para leer.

Las áreas más importantes a la hora de evaluar el neurodesarrollo en niños son aquéllas en las que un déficit resulta clínicamente significativo e interpretable, lo que ocurre cuando la alteración es muy selectiva o bien cuando hay otros trastornos relacionados. Se trata de saber qué capacidades se hallan afectadas de

forma más selectiva en cada área o qué síntomas pueden darse por alteración de algún factor común subyacente. Las áreas que se consideran indispensables en la evaluación neuropsicológica infantil son las siguientes:

1. **Motricidad:** Destreza manual, lateralidad (orientación derecha-izquierda), praxias buco-faciales, control verbal de la motricidad, entre otras.
2. **Percepción:** Visual, auditiva y táctil.
3. **Lenguaje:** Capacidades receptivas y expresivas para el habla. Aspectos psicoeducativos o capacidad académicas en lectura, escritura y en aritmética.
4. **Memoria:** Verbal y no verbal, a corto y largo plazo.
5. **Cognición general:** Capacidad intelectual general, capacidad de atención.

En las últimas décadas se ha llevado a cabo una investigación extensa y una estandarización de instrumentos para la evaluación neuropsicológica en niños, de manera que se ha logrado un mayor acercamiento a los aspectos del funcionamiento cerebral infantil. Ante la creciente convicción de que los primeros años de vida son críticos en su desarrollo, los psicólogos evalúan a los niños en edades cada vez más tempranas. Las escalas utilizadas en la evaluación del neurodesarrollo infantil se construyen partiendo de la premisa de que una habilidad se haya o no se haya adquirido a determinada edad. Éstas se pueden clasificar en tres grupos: i) mentales, que valoran funciones como el lenguaje, las habilidades cognitivas, la percepción y la memoria, ii) de motricidad, que evalúan las funciones motora gruesa y motora fina y iii) de conducta, para valorar el comportamiento y el nivel de actividad. Las distintas escalas utilizadas evalúan de una manera u otra alguna de estas áreas. En la Tabla 1.3 se recogen algunas de las más empleadas.

Tabla 1.3. Escalas estandarizadas de neurodesarrollo para niños

Test	Edad	Evaluación
Mentales		
Test Fagan de memoria de reconocimiento visual (FTVRM)	3-12 meses	Memoria a corto plazo; Inteligencia infantil
Escalas Bayley de desarrollo infantil (MDI)	<2,5 años	Habilidades cognitivas
Stanford-Binet (SB)	2,5-6 años	Inteligencia general
Batería de Evaluación de Kaufman para niños (KBIT)	2,5-12,5	Habilidades cognitivas
Escalas McCarthy de habilidades en niños (MSCA)	2,5-8,5	Habilidades cognitivas
Escala de Inteligencia Wechsler para niños (WISC)	>6 años	Inteligencia general
Escalas de Desarrollo Reynell (RDS)	-	Desarrollo del lenguaje
Motricidad		
Examen Neurológico infantil (Hempel)	1-2,5 años	Habilidades motoras
Escalas Bayley de desarrollo infantil (PDI)	<2,5 años	Habilidades motoras
Conducta		
Escala Rutter de conducta infantil (RCBS-A)	0-12 años	Problemas de conducta; Hiperactividad
Escala de actividad Werry-Weiss-Peters (WWPAS)	3-11 años	Nivel de actividad

Uno de los instrumentos más utilizados es el test McCarthy (MSCA) (*McCarthy Scales of Children's Abilities*) (McCarthy, 1972). El objetivo principal de la autora, Dorotea McCarthy, fue diseñar un instrumento unitario que facilitara la necesidad de evaluar el nivel intelectual general y sus “puntos fuertes y débiles” en las variables aptitudinales más importantes. En la sección de Material y Métodos se describen las características particulares y el contenido este test.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis y justificación

La relación existente entre la exposición a contaminantes químicos ambientales durante periodos de especial susceptibilidad, como el periodo pre- y postnatal, y la aparición de patologías en los primeros años de vida, constituye un problema complejo y de difícil enjuiciamiento. En primer lugar, porque la exposición infantil a contaminantes ambientales ocurre a través de múltiples vías, incluyendo la exposición a través de la madre y a través del agua, los alimentos, el aire, el contacto con el suelo o el uso de productos de uso cotidiano. Además, en algunos casos, la vía de exposición puede no ser evidente -exposición inadvertida- y es difícil encontrar poblaciones libres de exposición. Las propiedades mismas de cada uno de los contaminantes ambientales, así como las características individuales -edad, sexo, entorno, alimentación, entre otros- determinan la magnitud y las consecuencias de la exposición. La evaluación del riesgo de exposición a contaminantes ambientales define el ámbito del conocimiento científico en el que se enmarca la investigación propuesta.

En segundo lugar, el establecimiento de una relación de causalidad entre exposición y efecto en salud se ha visto dificultado, a pesar de haberse demostrado la exposición humana, debido a que se han explorado casi exclusivamente patologías complejas, de causa multifactorial y con prolongados tiempos de latencia, en las cuales la exposición a contaminantes ambientales es un factor más, no exclusivo ni excluyente, en la etiología de la enfermedad.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han permitido establecer un protocolo de evaluación de la exposición a contaminantes químicos del medio ambiente, especialmente disruptores endocrinos, que ha sido de utilidad en el estudio de enfermedades de base hormonal, como el cáncer de mama o algunas malformaciones congénitas (criptorquidia e hipospadias). Mediante la

cuantificación química de algunos residuos es posible conocer el nivel de exposición, identificar los compuestos químicos más frecuentes a los que está expuesta la población de estudio, incluidos los factores que la han condicionado, y establecer un procedimiento de seguimiento de las fuentes de exposición.

El presente estudio se enmarca dentro de los objetivos planteados en el proyecto de investigación “*Exposiciones pre- y postnatales a contaminantes ambientales, dieta, crecimiento fetal y desarrollo neuro-inmuno-endocrino*” (Red Infancia y Medio Ambiente), financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Proyectos nº G03/176 y 05/1911), y el proyecto de investigación “*Evaluación de la exposición infantil a contaminantes atmosféricos en la provincia de Granada y posibles efectos en el desarrollo postnatal*” (Proyecto nº 0183/2007) financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Ambos son llevados a cabo por un grupo multidisciplinar de clínicos, investigadores básicos y epidemiólogos de distintas instituciones. La consecución de los objetivos del proyecto pretende contribuir a la determinación del grado de exposición de población infantil a una serie de contaminantes ambientales y al esclarecimiento de algunos de los efectos en salud a los que estas exposiciones podrían dar lugar. El estudio que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de la cohorte INMA-Granada.

2. Objetivos

El objeto del presente trabajo es investigar la exposición infantil a contaminantes ambientales a través del agua, el agua y la dieta, y valorar sus efectos sobre el desarrollo del niño.

Para lograr este objetivo general se han planteado los objetivos específicos siguientes:

1. Describir los niveles de trihalometanos en agua de consumo del área geográfica de referencia de la cohorte INMA-Granada, mediante la

determinación de las concentraciones de cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo en el agua de consumo suministrada por los principales sistemas que abastecen a los municipios de residencia de la cohorte, y evaluar la influencia de determinados factores en dichas concentraciones.

2. Investigar los niveles de NO_2 y compuestos orgánicos volátiles medidos con captadores pasivos en un conjunto de puntos del área de estudio, y estimar la exposición a NO_2 en cualquier punto del área para obtener una aproximación a la exposición individual a contaminación atmosférica exterior en una submuestra de población infantil de la cohorte INMA-Granada.
3. Cuantificar los niveles de 1-hidroxipireno en orina a los 4 años de edad en una submuestra de población infantil de la cohorte INMA-Granada y examinar su asociación con factores relacionados con la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos.
4. Evaluar la relación entre la exposición individual a contaminación atmosférica derivada del tráfico (NO_2) y el desarrollo cognitivo evaluado a los 4 años de edad en una submuestra de la cohorte INMA-Granada.
5. Describir la exposición infantil a mercurio mediante la determinación de su contenido en pelo y evaluar el efecto combinado de esta exposición y el consumo de pescado sobre el desarrollo cognitivo evaluado a los 4 años de edad en una submuestra de la cohorte INMA-Granada.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos, se ha realizado un estudio epidemiológico **observacional** de **cohorte** de **base poblacional**, desde el nacimiento del niño hasta los 4 años de edad.

2. Ámbito geográfico de estudio

El área de estudio definida se ubica en la provincia de Granada (sureste peninsular) e incluye 54 municipios, con una población total aproximada de 500.000 habitantes y una extensión de 4.000 km² (Figura 3.1). La zona de estudio corresponde al ámbito geográfico del área de atención primaria del Distrito Metropolitano de Granada y parte del área sanitaria del Distrito Granada (zona sur de la capital), cuyo hospital de referencia es el Hospital Universitario San Cecilio (HUSC). El área cubre las comarcas de Valle de Lecrín, Vega Este y Oeste, Loja, Alhama y Montefrío, extendiéndose por el sector oeste y sur de la provincia de Granada (Figura 3.2).

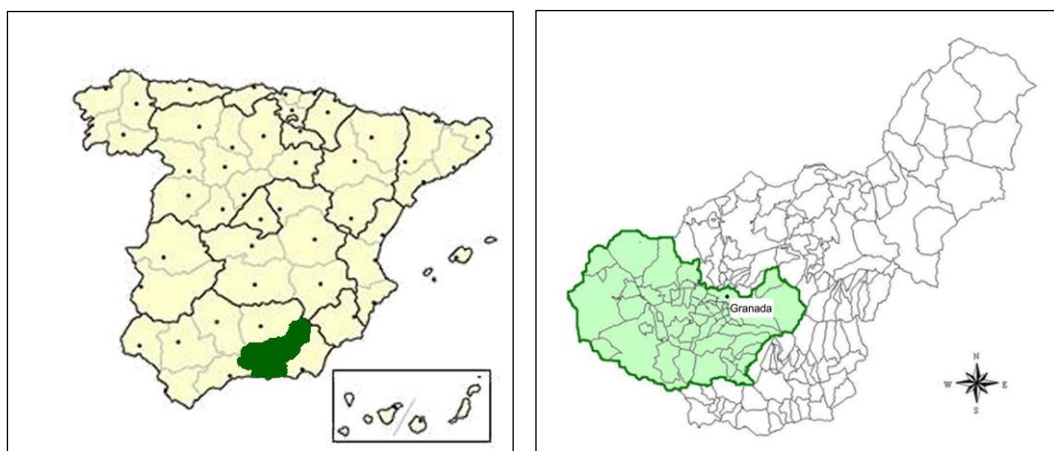


Figura 3.1. Ámbito geográfico de estudio

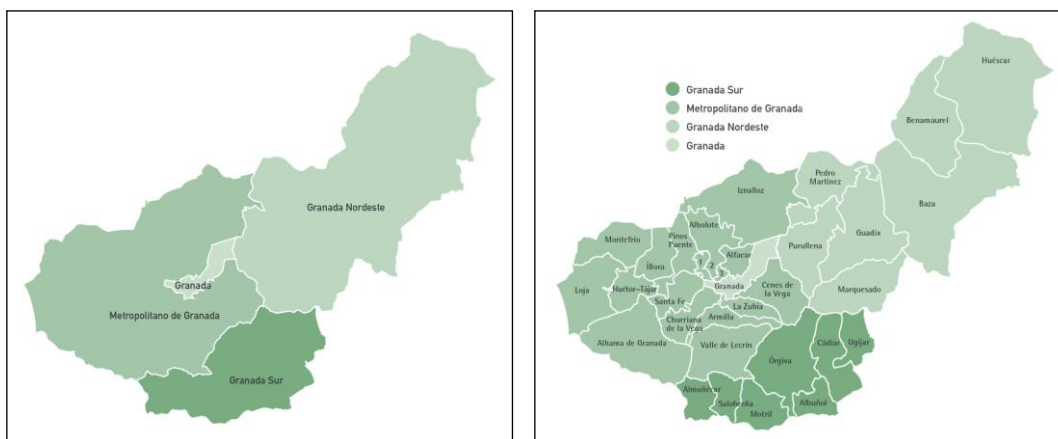


Figura 3.2. Distritos Sanitarios de la provincia de Granada

En el área de estudio se incluyen poblaciones de diferentes características sociodemográficas, que van desde la ciudad de Granada hasta pequeños núcleos rurales alejados de la capital. Así, para el análisis de los datos se establecieron tres zonas con características sociodemográficas, ambientales y de usos del suelo bien diferenciadas (Figura 3.3).

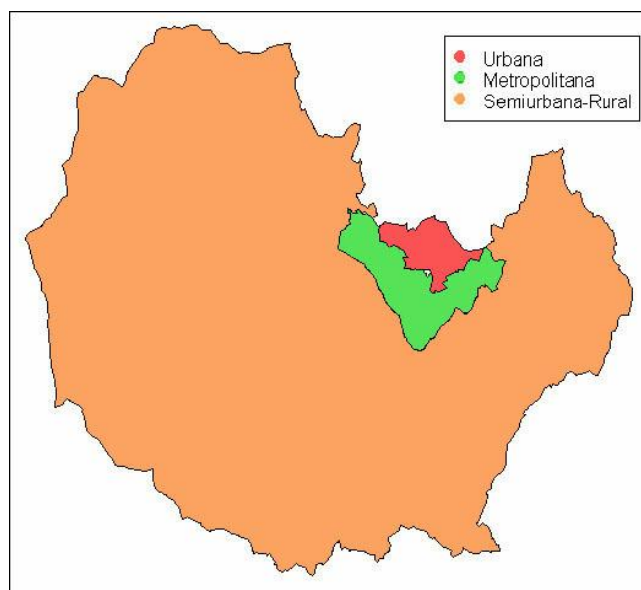


Figura 3.3. Clasificación de zonas dentro del área de estudio.

Estas zonas son las siguientes:

- a. **Urbana:** ciudad de Granada, con 236.000 habitantes.
- b. **Metropolitana:** incluye municipios con más de 20.000 habitantes situados en el “cinturón” que rodea a la capital. Las zonas urbana y metropolitana están dedicadas básicamente a actividades del sector servicios y en ellas se concentra una mayor densidad de población y de tráfico.
- c. **Semiurbana-rural:** incluye municipios con menos de 20.000 habitantes (algunos de ellos con menos de 1.000 habitantes), dedicados básicamente a la actividad agrícola y forestal.

3. Población de estudio

Entre octubre del año 2000 y agosto del 2002 se constituyó en el HUSC la cohorte poblacional INMA-Granada. Durante este periodo, las madres fueron reclutadas cuando acudían al Hospital a dar a luz, quedando la cohorte finalmente formada por un total de 700 parejas de madres y sus hijos varones recién nacidos. La intervención del Servicio de Obstetricia y Ginecología y de la Unidad de Partorio del HUSC fue decisiva en el éxito del reclutamiento. De la población inicialmente incluida en la cohorte se seleccionó al azar, 4 años después del nacimiento, uno de cada tres sujetos participantes, con objeto de llevar a cabo el seguimiento clínico a esa edad según lo establecido en el protocolo establecido en el estudio INMA (Ramón *et al.*, 2005) (véase Tabla 3.1). Este seguimiento tuvo lugar en el periodo de tiempo comprendido entre septiembre de 2005 y septiembre de 2006. El tamaño final de la población incluida en el estudio de la presente Tesis Doctoral fue de **220** sujetos, correspondiente a la submuestra de **varones sanos** que participó en el seguimiento a los 4 años de edad.

Los criterios de inclusión de sujetos en la cohorte en el momento del nacimiento fueron los siguientes (López-Espinosa, 2006):

1. Consentimiento informado (véase Anexo 1.1): los padres del niño fueron

informados de los objetivos y procedimientos del estudio al solicitar su participación. La colaboración en el estudio significaba responder al cuestionario epidemiológico, consentir la utilización de la información necesaria de su historia clínica y acceder a la toma de muestras biológicas (placenta, sangre de cordón umbilical, leche materna, etc.).

2. Disponibilidad del cuestionario realizado a la madre.
3. Disponibilidad del examen físico del niño.
4. Disponibilidad de las muestras biológicas, descartándose aquellos individuos que, por razones ajenas a la voluntad del investigador o al personal clínico, no se pudo obtener la muestra biológica para su procesamiento o bien hubo pérdida de las mismas, por fallos puntuales en el proceso de transporte, identificación y almacenamiento.

Los criterios de inclusión de sujetos a los 4 años de edad en cada uno de los estudios particulares de esta Tesis Doctoral, se contemplan en la sección de Resultados, en función de los objetivos concretos planteados en cada uno de ellos.

4. Seguimiento clínico: protocolo 4 años.

Entre septiembre de 2005 y septiembre de 2006 se contactó telefónicamente, y mediante una carta enviada a los domicilios por correo postal (Anexo 2), con una submuestra (33%) de las familias participantes en el estudio INMA-Granada, invitándoles a acudir al HUSC para realizar el seguimiento de sus hijos a los 4 años de edad. Los padres fueron citados con sus hijos en la Unidad de Atención Temprana y Estimulación Precoz del Servicio de Pediatría del HUSC, de lunes a viernes, y generalmente por la tarde. La visita se planificó para que no tuviera una duración superior a los 90 minutos y en ella participó personal debidamente entrenado (psicólogos, pediatras, encuestadores) para llevar a cabo la recogida de información mediante cuestionarios, exploración física, evaluación neuropsicológica y recogida de muestras biológicas (Tabla 3.1).

En la llamada telefónica y de nuevo al comienzo de la visita, los padres fueron informados de los objetivos específicos del seguimiento y del examen que se iba a realizar a sus hijos, firmando una nueva hoja de consentimiento informado (Anexo 1.2). También ellos fueron entrevistados para obtener información acerca de su estado civil actual (con pareja/sin pareja estable), nº de embarazos posteriores, cambio de domicilio, situación laboral de la madre y el padre, y tipo de empleo.

Tabla 3.1. Seguimiento de la cohorte INMA-Granada			
	Nacimiento (2000/2002)	1 año (2002/2003)	4 años (2005/2006)
Muestras biológicas y biomarcadores	n=700 varones sanos <ul style="list-style-type: none"> • Placenta: DE • Sangre cordón: DE • Leche materna: DE 		n=220 niños (≈33%) Orina: 1-OHP (n=174) Pelo: mercurio (n=112)
Cuestionarios	Cuestionario "Salud Reproductiva" Variables: <ul style="list-style-type: none"> • Sociodemográficas. • Antropometría madre • Historia clínica. • Historia reproductiva. • Estilo de vida: tabaco, alcohol, etc. 		Cuestionarios: <ul style="list-style-type: none"> • Ambiental. • Uso y consumo de agua. • Frecuencia alimentaria. • Estado general salud niño • Psicológicos: Atención y conducta, Competencia social (niño), Salud mental y Vínculo afectivo (padres).
Exploraciones/ Tests	Características recién nacido: <ul style="list-style-type: none"> • Antropometría • Desarrollo sexual 		Características niño: <ul style="list-style-type: none"> • Antropometría. • Neurodesarrollo: test McCarthy (n=210)
Mediciones ambientales		Contaminación atmosférica: <u>Campaña piloto</u> <u>captadores pasivos:</u> NO ₂ y COVs (76 puntos) <ul style="list-style-type: none"> • Noviembre 2003 	Contaminación atmosférica: <u>Campañas captadores:</u> NO ₂ y COVs (76 puntos) <ul style="list-style-type: none"> • Noviembre 2005 • Septiembre 2006 Agua de consumo: <u>Campañas muestreo:</u> THM (41 puntos). <ul style="list-style-type: none"> • Marzo 2006 • Septiembre 2006

4.1. Evaluación neuropsicológica

En la visita programada para el seguimiento a los 4 años se llevó a cabo la evaluación de las habilidades cognitivas y psicomotoras de los niños mediante las Escalas McCarthy de Aptitudes y Psicomotricidad (MSCA) (McCarthy, 1972), en la Unidad de Atención Temprana y Estimulación Precoz del HUSC de Granada.

El test de McCarthy es apto para la evaluación neuropsicológica de niños de entre 2,5 y 8,5 años de edad. A través de una amplia serie de tareas de carácter lúdico se evalúan aspectos cognitivos y psicomotores del desarrollo del niño. El test está integrado por 18 pruebas que dan lugar a 6 escalas, que son las siguientes:

- 1) **Verbal:** se obtiene a partir de las pruebas de memoria pictórica, vocabulario, memoria verbal y fluidez verbal y con ella se evalúa la aptitud del niño para expresarse verbalmente, así como la madurez de sus conceptos verbales.
- 2) **Perceptivo-manipulativa:** se obtiene a partir de las pruebas de construcción con cubos, rompecabezas, secuencia de golpeo, orientación derecha-izquierda, copia de dibujos, dibujo de un niño y formación de conceptos y evalúa la capacidad de razonamiento mediante la manipulación de materiales. Además, se ponen en ejercicio aptitudes como la imitación, la clasificación lógica y la organización visual en diferentes tareas espaciales, perceptivo-visuales y conceptuales.
- 3) **Numérica:** se obtiene a partir de las pruebas de cálculo, memoria numérica y recuento y distribución, y con ella se evalúa la facilidad del niño para los números y su comprensión de términos cuantitativos.
- 4) **Memoria:** se obtiene a partir de la memoria pictórica, secuencia de golpeo, memoria verbal y memoria numérica, y evalúa la memoria de materias o contenidos de pequeña amplitud, tanto de estímulos visuales como auditivos.

- 5) **Motricidad:** se obtiene a partir de la coordinación de brazos, coordinación de piernas, acción imitativa y dibujo de un niño, y evalúa la coordinación del niño en la ejecución de diferentes tareas motoras finas y no finas.
- 6) **General cognitiva:** integrada por las escalas verbal, perceptivo-manipulativa y numérica.

A partir de la escala general cognitiva, el MSCA permite obtener un **Índice General Cognitivo** (IGC), que se correlaciona con el coeficiente intelectual de la Escala Wechsler para niños en edad preescolar y primaria (WPPSI) y con el test de inteligencia Stanford-Binet para niños (Jacobson *et al.*, 1990). El IGC se obtuvo mediante la estandarización de las puntuaciones para una media de 100 y una desviación típica de 15. Para el resto de escalas del test, también se estandarizaron las puntuaciones, con una media de 50 y una desviación típica de 10. El IGC permite evaluar los procesos mentales generales del niño mostrando su nivel intelectual en relación con el de otros niños de su misma edad cronológica.

Una vez realizadas las evaluaciones, las escalas del test MSCA fueron reagrupadas para la obtención de nuevas puntuaciones relacionadas con áreas directamente implicadas en determinadas funciones neuropsicológicas. Se crearon así nuevos “constructos” con el fin de detectar posibles efectos más específicos que con las puntuaciones directas del test. Las nuevas sub-áreas fueron:

- 1) **Memoria de trabajo:** se refiere a las habilidades cognitivas relacionadas con el almacenamiento temporal y el tratamiento de la información necesaria para llevar a cabo tareas cognitivas tales como el lenguaje, el razonamiento y la comprensión.
- 2) **Memoria a corto plazo:** se refiere al número de ítems, normalmente palabras o números, que el niño puede retener y enumerar.
- 3) **Memoria verbal:** se refiere a la capacidad de reconocimiento, retención y repetición de palabras.

- 4) **Función ejecutiva** (para la información visual y verbal): se refiere a aquellas habilidades cognitivas que permiten la anticipación y el establecimiento de metas, la formación de planes y programas, el inicio de las actividades y operaciones mentales, la autorregulación de las tareas y la habilidad de llevarlas a cabo de manera eficiente.
- 5) **Función motora gruesa**: se refiere a las habilidades motoras relacionadas con el equilibrio, la coordinación y el control postural (mantenerse en pie, levantarse, caminar, etc.)
- 6) **Función motora fina**: se refiere a las habilidades motoras relacionadas con la coordinación de los movimientos de los músculos pequeños, como el movimiento de los dedos, normalmente en coordinación con el movimiento de los ojos.

De este modo se obtuvo un total de 12 variables neuropsicológicas: 6 puntuaciones estandarizadas (o índices) y 6 funciones (o constructos).

Dos psicólogos debidamente entrenados realizaron el test al conjunto de los 220 niños citados, aunque la evaluación se completó para 210 (95,5%). El test no se pudo finalizar para 10 de ellos por razones de apatía, rechazo o cansancio. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las características de la población de estudio, entre los niños que completaron el test y los que no lo completaron. Se intentó, en lo posible, que el examen se realizase sin la presencia de los padres o parientes próximos y, en las pocas ocasiones en que no pudo lograrse, el pariente permaneció en un segundo plano. El tiempo de aplicación del test MSCA fue de aproximadamente 50-60 minutos para cada niño.

Se llevó a cabo un protocolo de control de calidad riguroso para evitar la variabilidad inter-observador, incluyendo entrenamientos inter-evaluador y un test de “repetibilidad”. La finalidad de este control de calidad era minimizar las posibles diferencias entre los distintos observadores. Para que el control de

calidad fuese efectivo, el psicólogo coordinador dentro de la Red INMA (especialista en la administración de este test en particular) llevó a cabo la formación, el entrenamiento, la coordinación y los controles de los psicólogos evaluadores en cada una de las cohortes que administraron el test MSCA, incluida la cohorte de Granada.

4.2. Crecimiento postnatal

Durante la visita al HUSC se realizó también un examen pediátrico que incluía la somatometría completa del niño, con objeto de evaluar su crecimiento. El pediatra recogió todos los datos antropométricos en una plantilla diseñada *ad hoc* (Anexo 3). Las variables antropométricas recogidas que se han utilizado en este trabajo son:

- **Talla:** representa la medida antropométrica (cm) que refleja el crecimiento longitudinal. Esta variable se midió en bipedestación, sin calzado, en una báscula con estadímetro, en posición de pie, desde el borde inferior de los talones hasta el borde superior de la cabeza. La talla se ve generalmente afectada por eventos sub-agudos y crónicos, solamente después de haberse afectado el peso corporal.
- **Peso:** el peso corporal es una variable antropométrica (kg) que representa nutrición, aunque existen otras medidas con las que se valora nutrición de una manera más precisa, como el Índice de Masa Corporal (IMC) o Índice de Quetelet. Esta variable se tomó en una báscula calibrada, en bipedestación sin calzado, con ropa interior y bata hospitalaria. El peso corporal es básico en el control de la salud de los niños y es indispensable para calcular el IMC.

4.3. Cuestionarios

Cuestionarios pediátricos

Además de la exploración física, los padres del niño contestaron a dos cuestionarios mediante entrevista personal con el pediatra:

- General (Historia clínica y alimentación): recoge información sobre las visitas pediátricas, infecciones, alergias, enfermedades u otro tipo de incidencias médicas durante los 4 primeros años de vida del niño. También se recogió información del tipo de lactancia (pecho/parcial/artificial) y duración (semanas/meses), consumo de otros líquidos durante la lactancia y edad (meses) de introducción de alimentos complementarios (fruta, verduras, carne, pescado, huevos, etc.) (Anexo 4).
- Cuestionario de frecuencia alimentaria del niño a los 4 años de edad (Anexo 5).

Con el fin de evaluar la ingesta dietética diaria del niño a la edad de 4 años, el pediatra administró a los padres un cuestionario semi-cuantitativo de frecuencia alimentaria (CFA). Este CFA es una versión adaptada a población infantil del cuestionario *Harvard* (Willet, 1985), validado previamente para población adulta española (Vioque y González, 1991; Vioque, 2006). El cuestionario está compuesto de 95 ítems de alimentos que pretenden recoger el promedio de la frecuencia de ingesta de los grupos de alimentos más comunes en los niños durante los últimos 12 meses, y tiene 9 respuestas posibles, desde “nunca ó menos de 1 vez al mes” hasta “6 ó más veces al día”. Para el caso particular del consumo de pescado y marisco, el cuestionario incluye las preguntas que se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valoración de la ingesta de pescado a los 4 años mediante CFA

Ítems	Cantidad preguntada	Variedades
Pescado frito o rebozado variado	1 plato mediano o ración	-
Pescado hervido o plancha blanco	1 plato o ración	Merluza, lenguado, dorada
Pescado hervido o plancha azul	1 plato o ración	Atún, pez espada, bonito, boquerón, salmón
Pescado en conserva	1 lata pequeña de 50 g	Atún, bonito, sardina, caballa
Bivalvos	1 ración o lata pequeña de 50 g	Almejas, mejillones, berberechos
Cefalópodos	1 ración pequeña de 50 g	Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo
Marisco	1 ración pequeña de 50 g	Gambas, cangrejo, langostino, langosta

Así, para valorar el consumo de pescado -necesario en el estudio de exposición a mercurio- se calculó, a partir de estas 7 preguntas, la ingesta de cada grupo de pescado y el consumo medio diario en gramos para cada niño. Posteriormente, se obtuvo el consumo total de pescado, en gramos, mediante la suma de las ingestas calculadas para cada uno de los 7 ítems, y para la suma del consumo total de los 4 tipos de pescado (frito, blanco, azul y en conserva). No obstante, en los análisis posteriores sólo se utilizaron las variables relacionadas con los 4 ítems de pescado propiamente dicho, ya que la frecuencia de consumo de bivalvos, cefalópodos y marisco fue muy baja en estos niños.

Cuestionarios psicológicos

Al mismo tiempo que los niños eran evaluados mediante el test MSCA, los padres contestaron a 3 cuestionarios psicológicos administrados por personal entrenado, con el fin de valorar la posible influencia de determinados factores psicológicos en el rendimiento cognitivo de los niños. Con este mismo fin, se enviaron 2 cuestionarios a los profesores para recoger información relacionada

con la actividad, la atención y la conducta social del niño en el colegio, que fueron auto-cumplimentados y devueltos al HUSC. Los cuestionarios fueron los siguientes:

- Cuestionario de Salud Mental de la madre y del padre (2 cuestionarios) (Anexo 6).
- Cuestionario de Vínculo Afectivo de la madre hacia el niño y del padre hacia el niño (2 cuestionarios) (Anexo 7).
- Cuestionario sobre diagnóstico del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) del niño según el DSM-IV (un cuestionario para los padres y otro para el profesor).
- Escalas California sobre Competencia Social del Niño en edad preescolar, que evalúa su conducta social (un cuestionario para el profesor).

Para el trabajo de esta Tesis Doctoral se utilizaron únicamente los datos de Salud Mental y Vínculo Afectivo de los padres, como posibles variables confusoras del desarrollo cognitivo a los 4 años (Jacobson y Jacobson, 2005). Los resultados de los cuestionarios de TDAH y Competencia Social están siendo estudiados como nuevas variables neuroconductuales del niño (variables respuesta o de efecto) posiblemente afectadas por la exposición a contaminantes ambientales.

El cuestionario de Salud Mental (*General Mental Health Questionnaire – GHQ-*) está diseñado para identificar, particularmente en el ámbito de la atención primaria, estrés psicológico y cambios a corto plazo en la salud mental (Goldberg y Williams, 1988). El GHQ se ha usado extensamente en muchos estudios para identificar factores de estrés psicológico, ansiedad, falta de habilidades sociales y síntomas psicósomáticos. En este estudio, se utilizó la versión de 12 ítems, que es la más utilizada en la práctica clínica y en estudios epidemiológicos. Esta versión proporciona una puntuación adimensional que oscila entre 0 y 36 puntos. Una

mayor puntuación indica una peor salud mental.

El cuestionario de Vínculo Afectivo materno y paterno (*Parent-to-Infant Attachment*) se compone de 19 ítems y evalúa el grado de apego emocional de la madre y del padre hacia el niño, la ausencia de hostilidad y el placer de la interacción con el niño (Condon y Corkindale, 1998). La puntuación del cuestionario oscila entre 19 y 45 puntos. Una puntuación más alta es indicativa de un mayor sentimiento afectivo de la madre/padre hacia el niño.

Cuestionarios ambientales

Para la recogida de datos sobre exposición ambiental se utilizaron dos cuestionarios administrados por entrevista personal: un cuestionario **Ambiental** y otro sobre **Uso y Consumo de agua**. Estos dos cuestionarios fueron diseñados *ad hoc* y validados por los investigadores de la Red INMA.

- **Ambiental:** orientado principalmente a recoger información sobre la exposición a contaminantes atmosféricos, tanto en el interior de la vivienda del niño como en sus alrededores. Así, se obtuvo información respecto a la localización de la casa (tipo de calle, distancia a zonas de tráfico), las posibles fuentes en el exterior (molestias por ruidos y olores, percepción de la intensidad de tráfico) y variables relevantes en cuanto a la exposición en el interior de la vivienda: cocina (eléctrica/gas), extractor (sí/no), calentador de agua (eléctrico/gas) calefacción (ninguna/eléctrica /gas/chimenea), aire acondicionado (sí/no), ventilación, número de personas viviendo en ella, número de fumadores, frecuencia de consumo de tabaco en la vivienda (nº cigarros al día), entre otras (véase Anexo 8).
- **Cuestionario de uso y consumo de agua:** con este cuestionario se recogió información sobre el uso y consumo de agua del niño (4 años) y, de manera retrospectiva, de la madre durante el embarazo. Se obtuvo información sobre el origen, frecuencia y tipo (grifo/embotellada) de agua

utilizada para bebida y para cocinar, asistencia a piscinas (frecuencia y duración), baños y duchas (frecuencia y duración) (Anexo 9).

4.4. Muestras biológicas

En la visita programada para el seguimiento de los niños se recogieron distintas muestras biológicas para determinar mediante cuantificación directa los analitos de interés.

Orina: análisis de 1-hidroxipireno

Se recogieron muestras de orina (≈ 30 ml) de 174 de los 220 niños evaluados a los 4 años (79%). Las muestras se mantuvieron congeladas en botes de polipropileno a -20 °C en el Laboratorio de Investigaciones Médicas del HUSC, hasta su envío al Laboratorio del Departamento de Salud Pública de Bilbao (País Vasco) para el análisis de 1-hidroxipireno (1-OHP), metabolito utilizado como indicador de la exposición individual a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Para la determinación de 1-OHP, las muestras se descongelaron, atemperaron y homogeneizaron. A una alícuota de 10 ml de orina se adicionaron 10 ml de tampón acético-acetato 0,2 M (pH 5) y 100 μ l de enzima β glucuronidasa arilsulfatasa. La mezcla se dejó en una estufa a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente, el 1-OHP se extrajo mediante extracción sólido-líquido con acetonitrilo/agua (90:10), utilizando cartuchos RP-18 (Merck) previamente acondicionados. El extracto se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisolvió en 1 ml de acetonitrilo para su análisis. El método de cuantificación empleado fue cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de ultravioleta/fluorescencia (242 y 388 nm), y columna HPLC RP-18. El límite de cuantificación (LC) fue de 0,03 ng/ml orina. A las muestras de orina con una concentración $<LC$ se asignó un valor igual a la mitad del LC.

La concentración de 1-OHP, expresada en ng/ml de orina, se determinó por interpolación del área del pico del compuesto en la recta de calibrado.

Para tener en cuenta el distinto volumen de orina de cada individuo, las concentraciones de 1-OHP fueron corregidas por la concentración de creatinina de cada muestra, expresándose finalmente las concentraciones de 1-OHP en $\mu\text{mol/mol}$ creatinina ($=\text{nmol/l}$ de orina / creatinina (g/l) x 8,84). La concentración de creatinina se determinó por el método Jaffé, en un autoanalizador Hitachi 911, y se expresó en mg/dl (factor de conversión= 88,4).

Los criterios de calidad del método empleado incluían: i) análisis de blancos de la misma matriz, ii) marcado de blancos con concentraciones conocidas de 1-OHP, incluyendo concentraciones próximas al límite de detección y cuantificación, iii) análisis de duplicados y iv) recuperación de concentraciones conocidas.

Pelo: análisis de mercurio

Se tomó una muestra de pelo del niño, cortando de la región occipital la máxima cantidad posible, obteniendo como mínimo 10 mg de muestra. El pelo se recogió en bolsas cerradas de plástico con ranura impermeable (*zip-lock*). Las muestras se guardaron y conservaron a temperatura ambiente en el Laboratorio de Investigaciones Médicas del HUSC hasta su envío al laboratorio receptor, en este caso, el Departamento de Química Ambiental del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales (IIQA) del CSIC en Barcelona, donde se realizó el análisis de mercurio total (T-Hg). Se determinó la concentración de T-Hg en 112 muestras de pelo (51%). Con el fin de conocer la contribución de metilmercurio (MeHg) al contenido de T-Hg en pelo, se determinó la concentración de MeHg en la submuestra de 32 niños (15%) con los niveles más altos de T-Hg.

El análisis de T-Hg se llevó a cabo mediante combustión directa usando un analizador tipo AMA-254 (*Advanced Mercury Analyzer*) de Leco Corp. (Altec,

Praga, República Checa), siguiendo una metodología previamente descrita por Díez y colaboradores (2007). Las muestras de pelo se pesaron previamente en una balanza de precisión. El análisis estaba basado en combustión catalítica de la muestra, desorción térmica y detección por espectrometría de absorción atómica. El procedimiento analítico fue validado mediante el análisis de Materiales de Referencia Certificada (*Certified Reference Material* -CRM-) de pelo humano. Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) fueron de 0,0027 $\mu\text{g/g}$ T-Hg y 0,009 $\mu\text{g/g}$ T-Hg, respectivamente.

Para el análisis de MeHg las muestras de pelo se sometían a una digestión previa en caliente (100 °C) con una solución de ácido nítrico (350 μl). Una alícuota de 25 μl de esta solución se transfería a un tubo que contenía tampón acetato y 40 μl de dipentiléter (14 ng/g), como estándar interno. La muestra se derivatizaba con una solución al 1% de NaBEt_4 y se extraía mediante micro-extracción en fase sólida. Finalmente, se empleó un sistema cromatográfico formado por un cromatógrafo de gases (modelo Carlo Elba FTV 4130, Milán, Italia), equipado con un espectrómetro de fluorescencia atómica por vapor (modelo CVAFS, Tekran Model 2500, Toronto, Canadá), siguiendo una metodología previamente descrita (Díez y Bayona, 2002; Montuori *et al.*, 2004; Díez *et al.*, 2009). La fluorescencia tenía lugar a una longitud de onda de 253,5 nm. Se empleó una columna de sílice de 15 m \times 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de grosor. El LD fue de 0,04 $\mu\text{g/g}$ MeHg y el LC de 0,08 $\mu\text{g/g}$ MeHg.

5. Monitorización ambiental

5.1. Subproductos de la cloración

El agua suministrada en el área de estudio procede de varios sistemas de abastecimiento. Los sistemas principales son los conocidos como Quéntar-Canales, Vegas del Genil y Los Bermejales, de origen superficial, y Cúllar Vega-Las Gabias, Mancomunidad Río Monachil, Ogíjares y Loja, de origen subterráneo, que abastecen en total a 460.000 habitantes, en su mayoría población urbana, y son gestionados por cuatro empresas diferentes. El resto de abastecimientos corresponde a núcleos semiurbanos y rurales con menos de 10.000 habitantes, donde la gestión del tratamiento y suministro del agua la realizan los ayuntamientos.

Para evaluar la variabilidad estacional de trihalometanos (THM) se realizaron dos campañas de recogida de agua potable, una en invierno (marzo) y otra en verano (septiembre) de 2006, midiendo dos veces en cada punto. La selección de los puntos muestreados se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: 1) municipios con mayor número de niños incluidos en la cohorte, 2) núcleos del área de estudio con mayor población y 3) principales sistemas de abastecimiento de agua de la zona. De esta forma se seleccionaron 41 puntos de muestreo distribuidos en 31 municipios y 25 sistemas de abastecimiento, 7 superficiales y 18 subterráneos.

Toma de muestras

Se recogió agua fría del grifo, en locales y en fuentes públicas, en 2 viales de vidrio de 40 ml con tapón de rosca y sello de teflón, dejando correr el agua durante 1 minuto y evitando la formación de burbujas y/o cámara de aire entre el agua recogida y el tapón del envase. Los viales contenían 5 mg de tiosulfato sódico para evitar una reacción posterior entre el cloro libre y la materia orgánica residual. Durante la recogida, se determinó la temperatura y el pH de cada

muestra. Todas las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C durante el almacenamiento y transporte al laboratorio de análisis (Laboratorio de Química Ambiental del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales -IIQA- del CSIC, en Barcelona). Se siguieron las instrucciones del protocolo establecido por el laboratorio para minimizar la pérdida de THM por volatilización, de manera que las determinaciones analíticas se realizaran siempre antes de transcurridos 14 días tras la recogida

Determinación analítica de trihalometanos

El análisis de cloroformo, bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) y bromoformo se realizó siguiendo un procedimiento previamente optimizado (Amaral, 1994), que consiste en un sistema de purga y trampa seguido de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se introdujeron 180 g de un material absorbente (Ténax TA: polímero de p-2,6-difenilo óxido de fenileno) en cartuchos de acero y se acondicionó por primera vez con un flujo de He de 100 ml/min, a temperaturas sucesivas de 250, 300, 325 y 350 °C en periodos de 30 min. Los lavados posteriores se hicieron a 325 °C durante 10 min. Se utilizaron patrones externos para la cuantificación de los niveles de THM en concentraciones de 0,1 hasta 10 ppm (mg/l). A continuación, se inyectaron 5 ml de muestra de agua al mecanismo de purga y trampa con una jeringa. Una corriente de He de 40 ml/min atravesó la muestra durante 11 min. Durante este tiempo los compuestos volátiles fueron arrastrados de la muestra de agua al material absorbente, donde quedaban retenidos. Transcurridos los 11 min se sacó el cartucho y se cerró herméticamente. Para muestras posteriores se lavó el contenedor de la muestra con agua de cromatografía varias veces. Cuando los compuestos volátiles quedaron retenidos, se procedió a la desorción térmica automatizada (ATD 400 Perkin Elmer),

acoplada a un cromatógrafo de gases con detector de captura electrónica. La columna cromatográfica era de sílice fundida (DB-624) con un diámetro de 0,53 mm y 75 cm de longitud. La fase móvil era He con un flujo de 8 ml/min. La temperatura del detector fue de 290 °C. El gas complementario del detector era nitrógeno con un flujo de 34 ml/min. El gradiente de temperatura de la columna cromatográfica fue: 40 °C (5 min), 40-160 °C (5 °C/min), 160 °C (1 min), 160-210 °C (10 °C/min) y 210 °C (5 min). La cuantificación de las concentraciones de THM en las muestras se realizó interpolando las áreas de los picos correspondientes a los cuatro compuestos a través de la recta de calibrado obtenida con las soluciones patrón. El LD fue de 0,08 µg/l para cloroformo; 0,05 µg/l para BDCM y DBCM; y 0,1 µg/l para bromoformo. Cuando la concentración <LD se asignó un valor igual a la mitad del LD.

Para validar la técnica analítica utilizada se tomaron muestras por duplicado en las distintas áreas de estudio de la Red INMA. Las mismas muestras se analizaron en el laboratorio del CSIC de Barcelona y en otro laboratorio de referencia siguiendo la metodología descrita anteriormente, y se realizó la comparación de los resultados.

5.2. Contaminantes atmosféricos

Para realizar una evaluación de la calidad del aire en zonas geográficas amplias se utiliza, como aproximación metodológica, la técnica de *Grid* (o de rejilla). Esta técnica consiste en definir en el mapa de la zona a estudio una malla rectangular de celdas regulares, que puede tener un tamaño diferente según el grado de interés que presente cada sub-zona (densidad de población, grado de industrialización, etc.), y ubicar en cada nodo de la celda un captador pasivo.

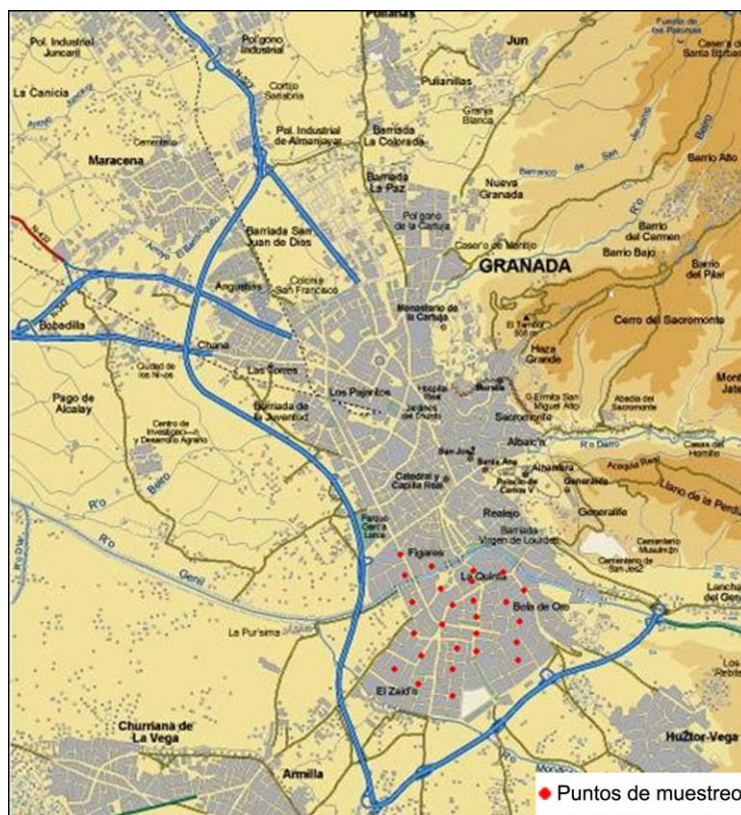


Figura 3.4. Enrejado para el muestreo de NO_2 y COVs en el área urbana

Como se indicó con anterioridad, en el área de estudio se establecieron tres zonas diferenciadas: zona urbana, metropolitana y semiurbana-rural. En la zona urbana (distrito Zaidín) se diseñó un enrejado de nodos con una separación regular de 300 m (Figura 3.4).

El distrito urbano de referencia es particularmente importante debido a la alta densidad de tráfico y la actividad comercial. Los captadores se ubicaron en localizaciones cercanas a calles de tráfico medio-alto. En lo que respecta al área metropolitana y semiurbana-rural, por razones geográficas y de distribución de la población, los captadores se ubicaron según una distribución irregular, con una separación variable que viene dada por la situación de los núcleos de población donde residen los niños, colocando un captador por municipio. En total, se seleccionaron 76 puntos de muestreo para representar el gradiente de exposición

de la población de estudio y la variabilidad espacial de las concentraciones atmosféricas de los contaminantes de interés (Tabla 3.3; Figuras 3.4 y 3.5).

En cada uno de puntos seleccionados se registraron los niveles ambientales de NO₂ y compuestos orgánicos volátiles (COVs) (benceno, tolueno, etilbenceno, *orto*-xileno y *meta+para*-xileno) en aire exterior, mediante captadores de difusión pasiva tipo Radiello® (Centro de Investigaciones Ambientales, Fundación S. Maugeri, Padova, Italia), colocados en farolas de alumbrado público o balcones de edificios. Estos captadores pasivos de simetría radial fueron cedidos por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid (Área de Contaminación Atmosférica). Con el fin de conocer la distribución estacional de los contaminantes atmosféricos se programaron tres campañas de muestreo de 7 días de duración cada una. El muestreo se llevó a cabo de manera simultánea en los 76 puntos de muestreo, para evitar la influencia de las variaciones temporales.

La distribución de los puntos de muestreo fue la siguiente (Figura 3.5):

- **Zona urbana (U):** 26 puntos (separación de 300 m) (Figura 3.4).
- **Zona metropolitana (M):** 16 puntos, separación variable (1 captador por municipio, situando los captadores en el casco urbano).
- **Zona semiurbana-rural (SR):** 34 puntos, separación variable (1 captador por municipio, situando los captadores en el casco urbano).

Las coordenadas geográficas de los puntos se obtuvieron mediante GPS. La medición de NO₂ y COVs con captadores pasivos se realizó en las siguientes campañas de muestreo:

- **Piloto:** del 26 de noviembre al 3 de diciembre de 2003.
- **Noviembre:** del 8 al 15 de noviembre de 2005.
- **Septiembre:** del 6 al 13 de septiembre de 2006.

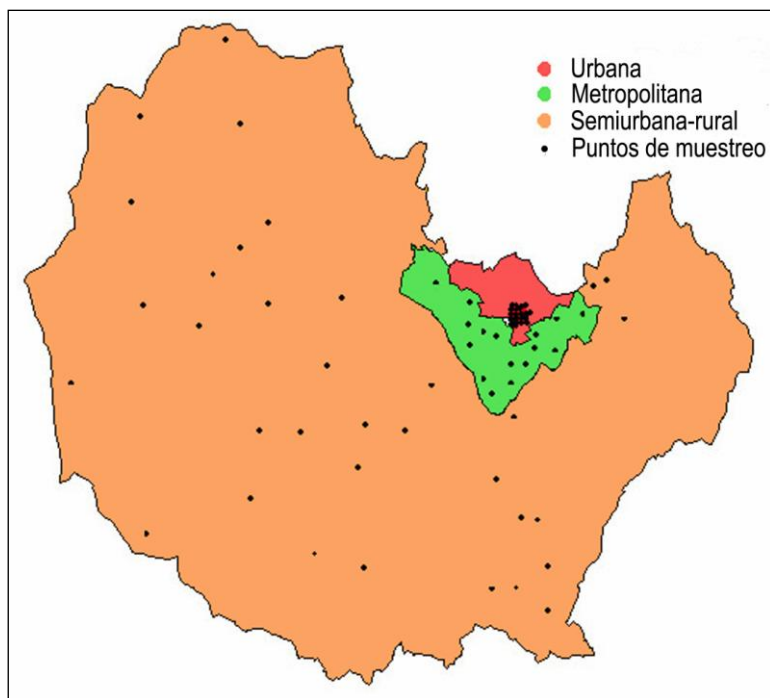


Figura 3.5. Puntos de muestreo de NO_2 y COVs en el área de estudio

La precisión de los niveles registrados con los captadores pasivos se estimó, en cada campaña, mediante el uso de duplicados, los cuales se colocaron junto a los captadores en varios puntos de muestreo. Con los resultados se calculó la variabilidad de la concentración del contaminante muestreada por los captadores.

Para minimizar el efecto del viento, de la lluvia y de las altas insolaciones, los captadores se colocaron protegidos dentro de una caja de plástico de sólo tres lados que fueron fijadas por medio de unas bridas a una farola, balcón, etc.

Los criterios seguidos para la colocación de los captadores fueron los siguientes:

1. Los captadores se colocaron entre 2 y 3 m sobre el nivel del suelo.
2. Se situaron de manera que no estuviesen cerca de fuentes puntuales de emisión de los contaminantes de interés, para no medir concentraciones que no fuesen representativas. Se evitaron zonas como cruces y rotondas con una elevada densidad de tráfico, así como semáforos, gasolineras, paradas de autobuses y taxis.
3. En las calles, se situaron en las aceras próximas a una de las filas de los edificios que las delimitaran, lo más cerca posible del borde exterior de las mismas, respetando un mínimo de medio metro de la línea de edificio.
4. En las proximidades de las calles con circulación de tráfico intenso, los captadores se colocaron en parques públicos o largas avenidas bien ventiladas. En ausencia de éstas se ubicaron en calles secundarias perpendiculares, a unos 50 m de distancia de la vía principal.
5. En caso de que existiera cerca algún tipo de obstáculo que pudiera producir apantallamiento, el captador se situó, al menos, a una distancia del obstáculo de dos veces la altura del mismo.
6. Se evitó la colocación en otras zonas en las que existiera posibilidad de estancamiento de las masas de aire, donde existirían concentraciones elevadas de NO₂.
7. Los árboles proporcionan superficies de absorción para el NO₂ y obstruyen el flujo de viento. Para reducir esta posible interferencia, los captadores se situaron a una distancia de ≥ 10 m de los árboles.
8. Se procuró ubicar los captadores en zonas despejadas.

Tabla 3.3. Municipios de muestreo de NO₂ y COVs con captadores pasivos

Área Atención Primaria	Municipio	Código (Zona)	Área Atención Primaria	Municipio	Código (Zona)
Granada	Granada	GR (U)	Churriana de la Vega	Agrón	GUA (SR)
	Alhama de Granada	GAA (SR)		Churriana	GUU (M)
	Arenas del Rey	GAR (SR)		Cúllar Vega	GUC (M)
Alhama de Granada	Cacín	GAC (SR)		Escúzar	GUE (SR)
	Jayena	GAJ (SR)		Las Gabias	GUL (M)
	Sta. Cruz del Comercio	GAS (SR)		La Malahá	GUM (SR)
	Zafarraya	GAZ (SR)		Vega del Genil	GUV (M)
Armillá	Alhendín	GMM (M)		Ventas de Huelma	GUH (SR)
	Armillá	GVA (M)		Huétor Tájar	GHH (SR)
	Dílar	GVD (M)		Moraleda de Zafayona	GHM (SR)
	Otura	GVL (M)	Salar	GHS (SR)	
Cenes de la Vega	Cenes de la Vega	GCC (M)	Villanueva de Mesías	GHV (SR)	
	Dúdar	GCD (SR)	Cájar	GZC (M)	
	Güéjar Sierra	GCG (SR)	Gójar	GZG (M)	
	Pinos Genil	GCP (SR)	Huétor Vega	GZH (M)	
Montefrío	Quéntar	GCQ (SR)	La Zubia	Monachil	GZM (M)
	Algarinejo	GMA (SR)		Ogíjares	GZO (M)
	Montefrío	GMM (SR)		La Zubia	GZZ (M)
	Albuñuelas	GVA (SR)		Castillo de Tajarja	GSC (SR)
Valle de Lecrín	Dúrcal	GVD (SR)	Santa Fe	Peñuelas	GSP (SR)
	Lecrín	GVL (SR)		Santa Fe	GSS (SR)
	Padul	GVP (SR)		Fuentes Camacho	GLF (SR)
	El Pinar	GVE (SR)	Loja	Loja	GLL (SR)
El Valle	GVV (SR)	Torre Agricampo		GLT (SR)	
Villamena	GVI (SR)	Zagra		GLZ (SR)	
Íllora	Tocón	GTO (SR)			

U: zona urbana; M: zona metropolitana; SR: zona semiurbana-rural

Determinación analítica de NO₂ y COVs

Los captadores pasivos son dispositivos capaces de tomar muestras de gases o vapores de la atmósfera por el proceso físico de difusión gaseosa (Ley de Fick), a través de una capa estática de aire o un material poroso y/o permeación a través de una membrana, pero sin implicar el movimiento activo del aire a través del dispositivo. La determinación analítica de NO₂ y COVs se realizó en el Centro Nacional de Sanidad Ambiental del ISCIII (Majadahonda, Madrid).

Los captadores utilizados para la determinación de la concentración de NO₂ adsorben el gas mediante difusión molecular en un cartucho impregnado en trietanolamina (TEA) en solución etanólica. La concentración del gas se determinó mediante espectrofotometría. Después de la exposición, el NO₂ se extrajo mediante la adición de 6,5 ml de agua Milli-Q y por agitación en baño de ultrasonido con agua durante 30 min. Se tomaron 100 µl de la disolución extraída de las muestras y se añadieron 3 ml del reactivo mixto compuesto por sulfanilamida, ácido fosfórico y agua Milli-Q. Se agitó y se esperó un tiempo de 30 min. El producto resultante se determinó por espectrofotometría a 540 nm, frente a patrones de nitrito sódico, obteniéndose las concentraciones del ión nitrito utilizando el método Griess-Saltzman, con sulfanilamida y bicloruro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEDA). Conocido el volumen de disolución en que se extrajo, la velocidad de difusión y el tiempo de muestreo, se obtuvo la concentración en µg/m³ de aire. El LD de NO₂ fue de 1 µg/m³. En los puntos en que la concentración <LD se asignó un valor igual a la mitad del LD.

Para la determinación de COVs, se utilizaron cartuchos rellenos de carbón grafitizado, donde quedaban retenidos los distintos compuestos. Con posterioridad se desorbieron térmicamente y se analizaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), en las siguientes condiciones:

Desorción:

- Tiempo de desorción: 10 min.
- Temperatura: 320 °C,
- Caudal de desorción: 72 cm³/min.
- Temperatura de trampa: -30 °C a 30 °C.
- Tiempo de inyección: 5 min.
- *Split outlet*: 41,5 cm³/min.

Cromatografía de gases:

- Columna DB-624: 0,32 mm x 30 m.
- Gas conductor: Helio a 1,8 cm³/min.
- Temperatura programada: inicial a 45 °C (2 min); 4 °C/min hasta 150 °C (10 min).

La concentración de cada COV en la muestra se determinó a partir de una recta de calibrado y, conociendo el tiempo de muestreo y la velocidad de difusión, se obtuvo la concentración en µg/m³. El LD fue de 0,01µg/m³ para benceno, tolueno y o-xileno; 0,02 µg/m³ para etilbenceno y 0,03 µg/m³ para m+p-xileno. En los puntos en que la concentración <LD se asignó un valor igual a la mitad del LD.

6. Modelización de la exposición a contaminación atmosférica

La modelización y asignación de los niveles individuales de exposición a NO₂ se realizó mediante técnicas geoestadísticas de interpolación o suavizado (*kriging*) y modelos *Land use regression* (LUR), siguiendo metodologías previamente descritas por investigadores de la Red INMA (Aguilera *et al.*, 2008; Íñiguez *et al.*, 2009).

Los COVs tienen una mayor capacidad de dispersión que el NO₂ (Kume *et al.*, 2008) y, por tanto, es más complejo estudiar el patrón espacial de este grupo

contaminantes atmosféricos. Por este motivo, no se realizó la modelización de los niveles de los COVs medidos.

6.1. Variables geográficas

Se obtuvo información de variables geográficas a partir de sistemas de información geográfica (SIG) de distintas fuentes. Las variables geográficas fueron tratadas utilizando el programa ArcGIS 9.1 (ESRI, Redlands, California) y fueron clasificadas en tres categorías: a) usos del suelo, b) topografía (altimetría de los puntos de muestreo), c) densidad de población y d) carreteras y calles (tipo, longitud de los distintos tipos e intensidad de tráfico).

a) Los datos sobre usos del suelo se obtuvieron del proyecto CORINE-Land Cover-2000 (*European Environmental Agency, Copenhagen*). Este proyecto cuenta con una base de datos de vegetación y ocupación del suelo (en celdas de 100 m) en toda Europa para el año 2000. Como el área de estudio en Granada es eminentemente agrícola y forestal, se tuvieron en cuenta sólo algunas de las categorías CORINE de usos del suelo, las cuales fueron re-agrupadas y simplificadas en las categorías que se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Usos del suelo		
Usos del suelo	Captadores (N)	%
Zonas urbanas	28	37
Áreas agrícolas y forestales	46	61
Urbanizaciones	1	1
Zonas industriales	1	1

b) Los datos topográficos del área de estudio se obtuvieron a partir del Mapa Topográfico de Andalucía 1:100.000, de la Consejería de Obras Públicas y Transportes (COPUT) de la Junta de Andalucía (COPUT, 2005) (Figura 3.6).

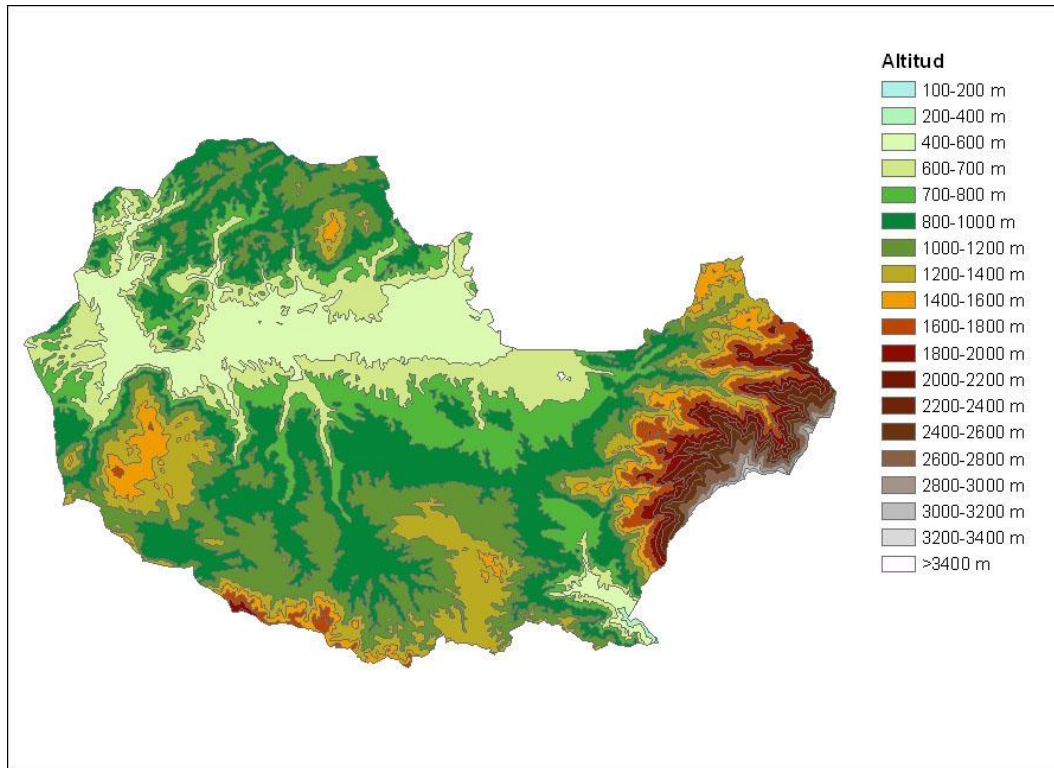


Figura 3.6. Mapa topográfico del área de estudio

c) Los datos de densidad de población se obtuvieron a partir de los registros del Instituto de Estadística de Andalucía (IEA) de la Consejería de Economía y Hacienda de la Junta de Andalucía, desagregados a nivel municipal.

c) La información de tráfico se obtuvo a partir de distintos registros públicos. Debido a la falta de información exhaustiva de densidad de tráfico en las calles de Granada, éstas fueron clasificadas en tres tipos de calle, en función de la intensidad media diaria (IMD) de tráfico aforada en distintos puntos de la ciudad en el periodo 2006-2007: i) intensidad alta, ii) intensidad media e iii) intensidad

baja. Los datos de tráfico fueron facilitados por el Ayuntamiento de Granada, Área de Movilidad y Comercio. En cuanto a las carreteras incluidas en el área de estudio, se obtuvo la información de IMD en los principales tramos y se pudo georreferenciar las principales carreteras a partir de los registros de la Dirección General de Tráfico, el Ministerio de Fomento, la Consejería de Obras Públicas y Transportes de la Junta de Andalucía y la Diputación Provincial de Granada (Figura 3.7).

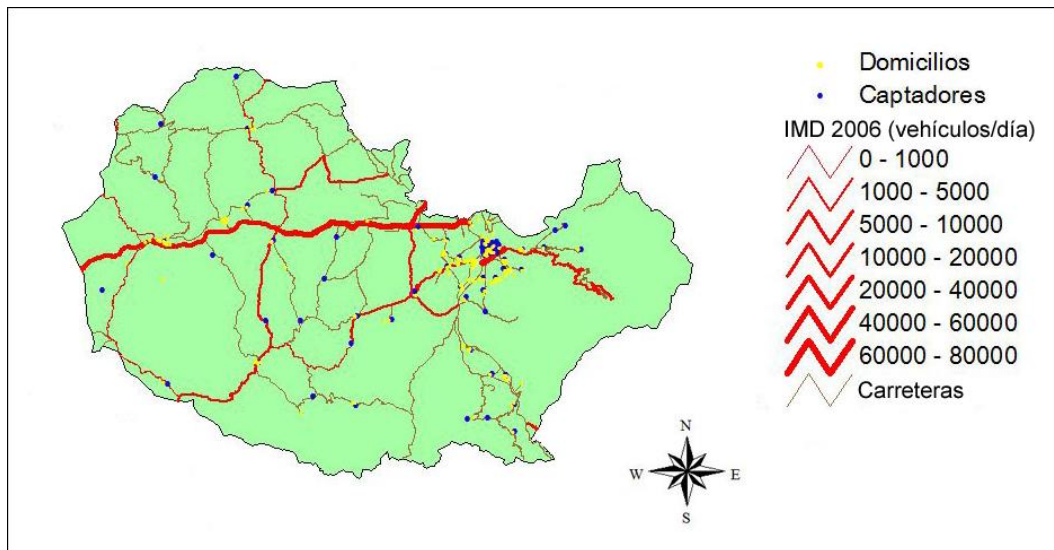


Figura 3.7. Mapa de carreteras del área de estudio

6.2. Análisis de proximidad

Para algunas de las variables geográficas, se calculó su valor dentro de círculos concéntricos (o *buffers*) centrados en los puntos de muestreo con captadores, como posibles variables predictivas. En el área no urbana (metropolitana y semiurbana-rural) se calculó la longitud de tramos de carretera y el porcentaje de superficie (hectáreas) de los distintos usos del suelo (urbano, residencial, industrial y agrícola) en círculos concéntricos de radios de 500, 1.000, 1.500, 2.000 y 3.000 m, alrededor de cada punto de muestreo. En el área urbana, se calculó el porcentaje de superficie de usos del suelo en círculos concéntricos

más pequeños, de 100, 200, 300, 400 y 500 m. El tamaño de los *buffers* fue seleccionado en base a las características del área de estudio y a estudios previos que utilizan una metodología similar (Briggs *et al.*, 1997; Aguilera *et al.*, 2008).

6.3. Interpolación espacial de los niveles de NO₂

Para obtener una medida basal de la exposición individual a NO₂, se realizó la interpolación de los datos obtenidos en cada una de las campañas de muestreo. Se aplicó como interpolador el “*Kriging* Universal”. El *kriging* es un método de suavización espacial que permite la predicción en una localización a partir del promedio ponderado de los niveles registrados en sus “vecinos”. Los pesos de esta ponderación se basan en la variabilidad espacial del fenómeno a estudio, que previamente ha de modelizarse (Cressie, 1993). Este método tiene la ventaja de proporcionar el mejor estimador lineal no sesgado de la superficie de contaminación y presenta la capacidad de incorporar tendencias en la superficie (“suavizado” de las concentraciones). A partir de esta técnica, se obtuvieron mapas de la distribución espacial de NO₂ en el área de estudio mediante el programa ArcView 8.1 (ESRI, Redlands, California).

La predicción del *kriging* en un punto coincide por definición con el valor registrado, de modo que para poder valorar la capacidad predictiva del método se realizó una validación cruzada usando los propios datos. Para ello se construyó una variable de predicción en los puntos de muestreo, excluyendo de la muestra, en cada caso, el punto a predecir y se comparó la predicción obtenida del *kriging* con: a) el nivel de NO₂ registrado por el captador más próximo b) el promedio de los niveles registrados por los captadores situados en un *buffer* centrado en el punto de predicción y c) el promedio de los niveles de los captadores situados en un *buffer* ponderando por el inverso de la distancia al punto de predicción (*inverse distance weighting*). El radio del *buffer* utilizado en la validación cruzada fue de 700 m y 14 km para zona urbana y para zona no urbana, respectivamente, de

manera que todos los puntos de muestreo tuvieran al menos un “vecino”. El parámetro empleado para valorar la capacidad predictiva del *kriging* fue el error relativo (ER), que es la diferencia entre el valor de NO₂ medido (real) y el valor de NO₂ estimado (predicho), dividido por el valor medido en cada punto (p) de muestreo.

$$ER(p) = 100 \cdot \frac{|NO_2(p) \text{ real} - NO_2(p) \text{ predicho}|}{NO_2(p) \text{ real}}$$

Los resultados de la suavización por *kriging* se combinaron con el resto de variables geográficas (altimetría, usos del suelo, tráfico y densidad de población) para mejorar la predicción de los niveles de NO₂. Una vez construido el modelo de regresión resultante de combinar las variables explicativas que fueron significativas, se asignó a cada niño participante en el estudio un nuevo valor de exposición.

6.4. Modelos de regresión

La exposición a contaminación atmosférica se modelizó por separado para zona urbana y no urbana, mediante análisis de regresión lineal multivariante, analizando la asociación entre los niveles de contaminación medidos y las variables geográficas, incluida la predicción del *kriging*, como posibles variables predictoras. En estos modelos se utilizó como variable dependiente el valor medio de las concentraciones de NO₂ registradas en el periodo 2005/2006, coincidiendo con el seguimiento de los niños a los 4 años de edad. Debido a que los datos de concentraciones de NO₂ no seguían una distribución normal, se usaron los valores de los logaritmos (ln) de las concentraciones. Así, los modelos *land use regression* se construyeron de la siguiente forma:

$$\ln(NO_2) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_i x_i + \varepsilon$$

siendo β_i los coeficientes de la regresión lineal, x_i las variables geográficas predictoras y ε el error de la predicción.

Primero, se llevó a cabo un análisis univariante para evaluar la relación de la variable dependiente con cada una de las variables independientes, es decir, usos del suelo, altitud, densidad de población, carreteras, intensidad de tráfico y *kriging*. Como algunas de las variables geográficas se calcularon en *buffers* de diferente tamaño alrededor de los puntos de muestreo, se seleccionó para cada una de ellas aquel radio para el que se obtuvo el mayor valor de R^2 . Una vez identificadas las asociaciones univariantes significativas, se construyó, mediante análisis de regresión multivariante, el modelo para el que se obtuvo el mayor valor ajustado de R^2 . Las variables retenidas en el modelo eran significativas al 95% y tenían una baja colinealidad con el resto de variables independientes (*Variance Inflation Factor*, $VIF < 10,0$).

Por último, se realizó validación cruzada para evaluar la precisión de los modelos de exposición, eliminando el dato de contaminación registrado en cada punto de muestreo y prediciendo con el modelo en dicho punto (este proceso se repitió en todas las localizaciones). El error de la predicción (*Root Mean Squared Error* -RMSE-) se calculó como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de las diferencias entre las concentraciones medidas en cada punto y las estimadas con el modelo en cada punto sin tener en cuenta el mismo punto (Brauer *et al.*, 2003).

$$RMSE = \sqrt{\sum (p_{\text{real}} - p_{\text{predicho}})^2}$$

Conociendo las coordenadas geográficas de los domicilios de los niños, fue posible predecir el nivel de contaminación atmosférica exterior (NO_2) en las ubicaciones de las viviendas ($n=220$), y asignar a cada niño un valor aproximado de exposición residencial.

El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y STATA 9.0 (Stata Corp., USA), y el análisis especial de los datos usando el programa ArcGIS 9.1.

6.5. Asignación de los niveles de exposición

Las direcciones de los domicilios de los participantes en el estudio fueron proporcionadas por los padres en la entrevista realizada en la visita de los 4 años y transformadas en coordenadas geográficas de forma semiautomática mediante el uso de dos programas comerciales de geocodificación (MapStore y Route 66). La asignación de valores exposición se basó en la predicción del nivel NO₂ exterior en el domicilio de cada niño, según el modelo para el promedio de las campañas de 2005 y 2006 (sin tener en cuenta la campaña piloto).

Fue posible georreferenciar los domicilios de los 220 niños participantes (Figuras 3.8 y 3.9). Las zonas de residencia de los niños se clasificaron en 4 categorías: urbana, metropolitana, semiurbana (núcleos de 10.000-20.000 habitantes) y rural (< 10.000 habitantes) (Tabla 3.5; Figura 3.8).

Tabla 3.5. Distribución de la población de estudio por zonas		
Zona	Frecuencia	%
Urbana	35	16
Metropolitana	107	49
Semiurbana	44	20
Rural	34	15
Total	220	100

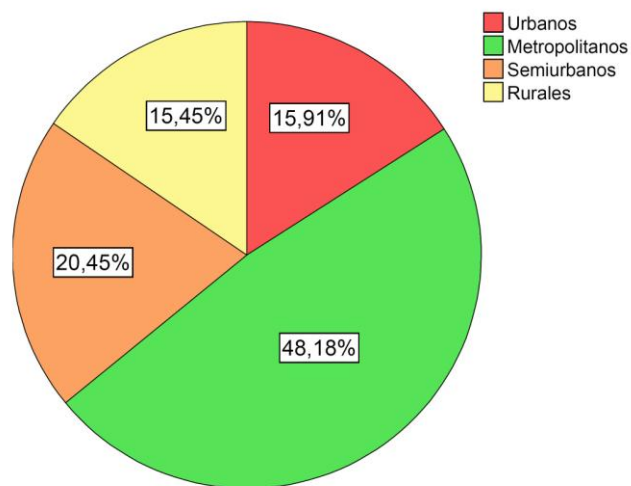


Figura 3.8. Distribución por zonas de los domicilios de los niños incluidos en el estudio

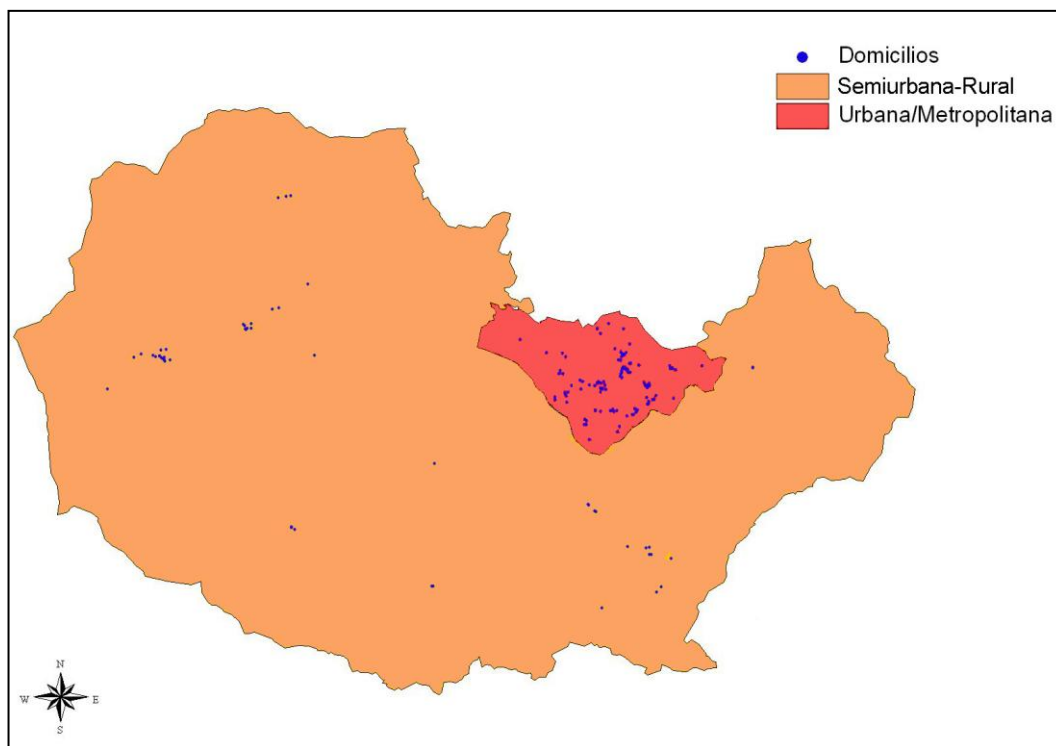


Figura 3.9. Georreferenciación de los domicilios de los niños incluidos en el estudio

7. Otras variables de estudio

Para la realización del presente estudio también se contó con la información recogida en el momento de la hospitalización de la madre para el parto, que tuvo lugar 4 años atrás en el HUSC. Esta información consiste en:

- Cuestionario epidemiológico llevado a cabo por un encuestador entrenado tras el parto. Una vez informados de los objetivos del estudio y tras su ingreso en el HUSC para dar a luz, las madres firmaron una hoja de consentimiento informado donde confirmaban su participación en el estudio y accedían a responder, durante su estancia en el centro a una entrevista personal estructurada. La encuesta epidemiológica aportó información sobre características antropométricas, sociodemográficas, reproductivas, dieta y hábitos de vida en el momento del nacimiento.
- Historia clínica del niño y de la madre, que aportó información sobre el tipo de parto y las características antropométricas de los recién nacidos.
- Examen físico del niño al nacer, que aportó información sobre su estado de salud.

Las variables utilizadas en esta Tesis Doctoral han sido las siguientes:

Variables del niño

- Peso al nacimiento: esta variable se trató como continua y agrupada en las categorías <2.500 g y ≥ 2.500 g.
- Talla al nacer: esta variable se trató como continua y agrupada en las categorías <49 cm y ≥ 49 cm, en función del valor de la mediana en la población de la cohorte inicial.
- Edad gestacional: se establecieron las categorías <37 y ≥ 37 semanas.
- Tipo de parto: variable agrupada en las categorías parto espontáneo, por cesárea e instrumental.

Variables de la madre

- Edad de la madre en el parto: esta variable se trató como continua y agrupada en las categorías <32 y ≥ 32 años, en función del valor de la mediana en la población de la cohorte inicial.
- Área de residencia durante el embarazo: clasificada como urbana, metropolitana, semiurbana y rural.
- Escolaridad de la madre: variable con las categorías sin estudios o estudios primarios/estudios medios o formación profesional/ diplomatura o estudios superiores.
- Estatus laboral: con las categorías empleada/sin empleo.
- Paridad: número de embarazos previos a término (nº hermanos mayores del niño: ninguno, 1 y >2).
- Consumo de tabaco durante el embarazo: con las categorías no fuma/fuma (al menos, 1 cigarro/día en el tercer trimestre de embarazo).

Variables del padre

- Escolaridad del padre: variable con las categorías sin estudios o estudios primarios/estudios medios o formación profesional/diplomatura o estudios superiores.

8. Análisis epidemiológico y estadístico

Se realizó el análisis epidemiológico de la cohorte a partir de la información obtenida por medio de las mediciones ambientales, los cuestionarios, el examen físico, la evaluación neuropsicológica y el análisis de biomarcadores. El diseño del estudio para alcanzar cada objetivo de esta Tesis Doctoral fue:

- Análisis descriptivo de los niveles de trihalometanos en agua de consumo y factores determinantes relacionados.
- Análisis descriptivo de los niveles de los contaminantes atmosféricos

estudiados (NO_2 y compuestos orgánicos volátiles) y análisis espacial de la exposición a NO_2 .

- Análisis transversal de la cohorte a los 4 años de edad para el estudio de i) los niveles de 1-hidroxipireno y los factores relacionados con la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos, ii) la exposición a contaminación atmosférica (NO_2) y los efectos en el desarrollo cognitivo y iii) la exposición a mercurio, el consumo de pescado y los efectos en el desarrollo cognitivo.

En el análisis descriptivo de los niveles de contaminación atmosférica (NO_2 y COVs) (apartado 2 de la sección de Resultados) se utilizaron parámetros estadísticos como la mediana, media, desviación estándar, percentiles (10 y 90), valor mínimo y máximo. Se examinó la normalidad de la distribución de las concentraciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Debido a que las distribuciones no se ajustaban a la normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis y Mann-Whitney) para evaluar las diferencias entre las campañas de muestreo y los tipos de zonas, y la prueba de Spearman para estudiar el grado de correlación entre los contaminantes medidos.

El tratamiento estadístico de los datos en cada estudio particular se recoge de manera detallada en cada uno de los artículos (apartados 1 y 3-5 de la sección de Resultados). En todos los pruebas realizadas se consideró la significación estadística para $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,05$ (**), y tendencia a la significación estadística para $p \leq 0,1$ (*). Se utilizaron los programas estadísticos SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y STATA versión 9.0.

IV. RESULTADOS

1.

*Valores de trihalometanos en agua de consumo
de la provincia de Granada, España*

Valores de trihalometanos en agua de consumo de la provincia de Granada, España

Carmen Freire^a / Ramón Soler^a / Mariana F. Fernández^a / Cristina M. Villanueva^{b,c} / Joan O. Grimalt^c / Nicolás Olea^a

^aLaboratorio de Investigaciones Médicas, Hospital Universitario San Cecilio. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Universidad de Granada, Granada, España; ^bCentre de Recerca en Epidemiologia Ambiental (CREAL)-Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, España; ^cConsejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, Barcelona, España.

(Trihalomethane levels in drinking water in the province of Granada [Spain])

Resumen

Objetivos: La cloración del agua da lugar a la formación de subproductos potencialmente dañinos para la salud, entre ellos los trihalometanos, que se han hallado elevados en algunas zonas de España. En este estudio se investigan los valores de trihalometanos en el agua de consumo suministrada por varios sistemas de abastecimiento de la provincia de Granada, en el área de actuación de la cohorte madres-hijos de la Red INMA (Infancia y Medio Ambiente).

Métodos: Se analizaron 82 muestras de agua de consumo en dos campañas de muestreo en invierno y verano de 2006. Se determinó la concentración de cloroformo, bromodichlorometano, dibromoclorometano y bromoformo, siguiendo un procedimiento optimizado basado en cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Resultados: El rango de concentración de trihalometanos totales se situó entre 0,14 y 18,75 µg/l en la campaña de invierno y entre 0,01 y 31,87 µg/l en la de verano. El compuesto mayoritario fue cloroformo. La concentración media de trihalometanos en agua de origen superficial y subterráneo fue de 10,13 y 1,41 µg/l, respectivamente.

Conclusiones: Los valores de trihalometanos encontrados son muy inferiores a la concentración máxima admisible (100 µg/l) establecida por la Unión Europea para estos compuestos. Estos valores varían significativamente según el origen del agua, con mayores concentraciones en áreas urbana y semiurbana, donde el agua es mayoritariamente de origen superficial. La presencia de trihalometanos en la zona es menor a la descrita en otras regiones españolas.

Palabras clave: Exposición ambiental. Suministro de agua. Subproductos de la desinfección. Trihalometanos.

Abstract

Objectives: Drinking water chlorination generates potentially harmful by-products, such as trihalomethanes. Trihalomethane levels are high in some parts of Spain. The aim of the present study was to investigate trihalomethane concentrations in drinking water from distinct water supplies in the province of Granada, within the framework of the Childhood and Environment (INMA) study.

Methods: Eighty-two tap water samples were collected in two campaigns during the winter and summer of 2006. An optimized procedure based on gas chromatography and mass spectrometry was used to determine concentrations of chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane, and bromoform in the samples.

Results: Total trihalomethane concentrations ranged from 0.14 to 18.75 µg/l in winter samples and from 0.01 to 31.87 µg/l in summer samples. The most abundant compound was chloroform. Mean trihalomethane concentrations were 10.13 in surface waters and 1.41 µg/l in ground waters.

Conclusions: The trihalomethane levels found were considerably below the maximum permitted level of 100 µg/l in the European Union. The values obtained varied widely according to the type of water source: the highest concentrations were found in urban and sub-urban areas, where the water is largely of surface origin. The presence of trihalomethanes was lower than that reported in other Spanish regions.

Key words: Environmental exposure. Water supply. Disinfection by-products. Trihalomethanes.

Correspondencia: Nicolás Olea.
Laboratorio de Investigaciones Médicas.
Hospital Universitario San Cecilio.
Universidad de Granada. 18071 Granada. España.
Correo electrónico: nolea@ugr.es

Recibido: 9 de julio de 2007.

Aceptado: 12 de noviembre de 2007.

Introducción

El cloro añadido como tratamiento de potabilización al agua destinada al consumo puede reaccionar con la materia orgánica presente en el agua, dando lugar a la formación de subproductos de la cloración con propiedades químicas y toxicológicas particulares. Los trihalometanos (THM), junto con los ácidos

haloacéticos, son los subproductos más prevalentes en el agua de consumo. Los principales THM son cloroformo, bromodichlorometano (BDCM), dibromodichlorometano (DBCM) y bromoformo. La especiación y concentración final de los THM formados depende de varias circunstancias, entre ellas la concentración de materia orgánica e iones bromuro presentes en el agua, el tipo de desinfectante utilizado y la dosis aplicada, el tiempo de residencia en la red de distribución, la temperatura y el pH del agua durante el tratamiento¹. Por tanto, cabe esperar variaciones geográficas y estacionales en los valores de THM presentes en el agua potable.

La presencia de THM en el agua de consumo público ha suscitado en los últimos años un creciente interés desde la perspectiva de la salud pública. Desde que fueron detectados por primera vez en el agua a comienzos de la década de los setenta, numerosos estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una posible relación entre la exposición a subproductos de la cloración y efectos perjudiciales sobre la salud humana, como un mayor riesgo de cáncer de vejiga y colorrectal²⁻⁶ y problemas respiratorios^{7,8}. Más recientemente también se ha asociado esta exposición con efectos reproductivos adversos, tales como aborto espontáneo, bajo peso al nacer y malformaciones congénitas^{9,10}.

La preocupación emergente sobre los riesgos para la salud asociados a los THM ha promovido que muchos países industrializados establezcan valores máximos para estos contaminantes en el agua de consumo humano. Así, por ejemplo, una Directiva Europea de 1998 regula los valores máximos aceptables de THM totales y plantea que, a los 5 años de su entrada en vigor, la concentración de THM no debería ser superior a 150 µg/l, y que este límite debe fijarse en 100 µg/l a los 10 años^{11,12}. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud ha establecido concentraciones máximas de referencia para las cuatro especies de THM más frecuentes, cloroformo, BDCM, DBCM y bromoformo (300, 60, 100 y 100 µg/l, respectivamente), y aunque no se ha definido para el total de THM se recomienda que los valores de THM en el agua de bebida se mantengan tan bajos como sea posible, siempre y cuando se asegure una desinfección eficaz¹³.

En 1997, un informe de la Unión Europea señalaba que los valores máximos de THM en Europa se encontraban en Portugal y España¹⁴. A pesar del tiempo transcurrido y de que algunos estudios, centrados en su mayoría en poblaciones de la vertiente mediterránea¹⁵⁻¹⁷, han descrito THM en agua del grifo, la información concerniente a los valores de estos compuestos en nuestro país es todavía escasa.

La desinfección del agua mediante cloración es adecuada para la eliminación de agentes infecciosos causantes de enfermedades, pero la generación de THM y otros subproductos tóxicos de la cloración supone un

riesgo para la salud. A este respecto, el proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA), estudio de cohortes que investiga la influencia de los principales contaminantes del aire, el agua y los alimentos sobre el crecimiento y el desarrollo durante los primeros años de vida¹⁸, constituye un escenario particularmente apropiado para evaluar el riesgo de efectos adversos en la salud infantil por exposición a THM. En el marco de este proyecto se pretende describir los valores de subproductos de la cloración en el agua de las distintas zonas españolas de estudio, utilizando los THM como marcadores de la mezcla¹⁹. La cohorte andaluza de la Red INMA está distribuida en una extensa área de la provincia de Granada, con 50 municipios y más de 500.000 habitantes. El objetivo del presente trabajo es describir la concentración de THM en el agua de consumo suministrada por los principales sistemas que abastecen a los municipios de referencia de la cohorte granadina.

Métodos

Área de estudio

La cohorte de niños establecida en Granada dentro de la Red INMA está constituida por 700 varones nacidos en el Hospital Universitario San Cecilio entre octubre de 2000 y junio de 2002. La cohorte se distribuye en un área que comprende la zona sur de la capital y 50 municipios de la provincia, lo que supone 40 sistemas de abastecimiento y una población total aproximada de 530.000 habitantes. La zona de estudio coincide con el área de referencia sanitaria del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y abarca las comarcas de Granada, Valle de Lecrín, Loja y Alhama (fig. 1), con una extensión superficial aproximada de 3.700 km². El agua suministrada en la zona procede de varios sistemas principales, los conocidos como Quén-tar-Canales, Vegas del Genil y Los Bermejales, de origen superficial, y Cúllar Vega-Las Gabias, Mancomunidad Río Monachil, Ogíjares y Loja, de origen subterráneo. Éstos abastecen en total a 460.000 habitantes, en su mayoría población urbana, y son gestionados por cuatro empresas diferentes. El resto de abastecimientos corresponde a núcleos semiurbanos y rurales con menos de 10.000 habitantes, donde la gestión del tratamiento y suministro del agua la realizan los ayuntamientos.

Información sobre el origen, el tratamiento y la calidad del agua potable

El Servicio de Sanidad Ambiental de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía proporcionó la in-

Figura 1. Mapa de situación de la zona de estudio.



formación necesaria sobre los distintos sistemas de abastecimiento de la zona y su origen, además de realizar el contacto con las empresas y ayuntamientos implicados en la gestión del agua en el área de estudio. Previamente a la elección de los puntos de muestreo, se envió a las empresas y ayuntamientos una encuesta sobre el origen, el tratamiento y la calidad del agua potable. Estas encuestas fueron diseñadas *ad hoc* dentro de los protocolos establecidos por la Red INMA. En ellas se recoge información básica acerca del tratamiento, el suministro y la calidad del agua potable. El 70% de las encuestas enviadas a ayuntamientos y empresas municipales fueron cumplimentadas y devueltas.

Muestreo

En Granada, donde el clima es mediterráneo continental, la variación de las condiciones climáticas durante el año puede suponer una diferencia importante en la temperatura superficial del agua entre verano e invierno. Por ello, para evaluar la variabilidad estacional de THM se realizaron dos campañas de recogida de agua potable, en invierno (7 y 8 de marzo) y verano (5 y 6 de septiembre) de 2006, midiendo dos veces en cada punto. La selección de los puntos muestreados se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: a) municipios con mayor número de niños incluidos en la cohorte INMA; b) núcleos del área de estudio con mayor población, y c) principales sistemas de abastecimiento de agua de la zona. De esta forma, se seleccionaron 41 puntos de muestreo distribuidos en 31 municipios, y 25 sistemas de abastecimiento (7 superficiales y 18 subterráneos).

Se recogió agua fría del grifo en locales y en fuentes públicas, dejando correr el agua durante 1 min, evi-

tando la formación de burbujas y cámara de aire entre el agua y el tapón, en 2 viales de vidrio de 40 ml con tapón de rosca y sello de teflón. Los viales contenían 5 mg de tiosulfato sódico para evitar la posterior reacción entre el cloro libre y la materia orgánica residual. Durante la recogida, se determinó la temperatura y el pH de cada muestra. Todas las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C durante el almacenamiento y el transporte al laboratorio de análisis. Se siguieron las instrucciones del protocolo establecido por el laboratorio responsable de los análisis para minimizar la pérdida de THM, de manera que las determinaciones analíticas se realizaran siempre antes de transcurridos 14 días tras la recogida, en el Laboratorio de Química Ambiental del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales (IIQA) del CSIC, en Barcelona.

Análisis experimental

Se analizaron cloroformo, BDCM, DBCM y bromoformo, siguiendo un procedimiento previamente optimizado²⁰, que consiste en una purga y trampa seguida de una cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. La determinación de los parámetros de temperatura y pH se realizó con un medidor impermeable (Modelo H1 98127-H1 98128, Hanna Instruments, Estados Unidos).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 14.0. Debido a que las concentraciones de los compuestos analizados no seguían una distri-

bución normal, se emplearon pruebas no paramétricas para evaluar la variación estacional y de THM según el origen del agua (test de Wilcoxon y prueba de Mann-Whitney, respectivamente), y el test de Spearman para la correlación entre compuestos. El nivel de significación estadística se estableció en un valor de $p < 0,05$.

Resultados

En todas las muestras de agua colectadas se detectaron concentraciones cuantificables de, al menos, uno de los THM analizados, y en todos los puntos la concentración fue baja ($< 32 \mu\text{g/l}$), tanto en invierno como en verano. La concentración media de THM totales fue de $5,64 \mu\text{g/l}$ (desviación estándar de $6,99 \mu\text{g/l}$), alcanzando una concentración máxima de $31,87 \mu\text{g/l}$ y mínima de $0,01 \mu\text{g/l}$, ambas en septiembre. El cloroformo fue el compuesto mayoritario, ya que constituía como promedio un 43% de la concentración de THM totales. Le siguieron BDCM en un 27%, DBCM en un 21% y, por último, bromoformo, representando un 6% del total.

En la tabla 1 se recogen las concentraciones de THM según la campaña de muestreo. La temperatura media del agua recogida en invierno fue de $13,1 \text{ }^\circ\text{C}$, y en verano de $23,6 \text{ }^\circ\text{C}$. La concentración media de THM totales fue similar en ambos períodos, mientras que la máxima alcanzada en verano casi duplicó a la máxima observada en la campaña de invierno. La presencia de las especies cloradas también fue mayor en septiembre que en marzo. Las concentraciones media y máxima de cloroformo en verano llegaron a doblar a las de invierno. Sin embargo, la concentración de los compuestos bromados disminuyó ligeramente en verano.

En un 30% de las muestras la concentración de THM superó los $10 \mu\text{g/l}$, y en un 58% la concentración estuvo por debajo de $5 \mu\text{g/l}$. Los mayores valores se encontraron en municipios abastecidos por el embalse de Los Bermejales (concentración media de $23,25 \mu\text{g/l}$), en el sector oeste de la Vega granadina. Le siguen en concentración las muestras recogidas en la ciudad de Granada y en algunos puntos del área metropolitana, procedentes de los sistemas Quéntar-Canales, Cúllar Vega-Las Gabias, Río Monachil y Ogijares. Las concentraciones más bajas se obtuvieron en el municipio de Loja. En el área rural («Otros») se encontró una concentración media de $2,34 \mu\text{g/l}$ (fig. 2).

Las muestras de agua de origen subterráneo fueron las que presentaron menores valores de THM. La concentración media de THM en el agua de origen superficial fue de $10,13 \mu\text{g/l}$, mientras que en el agua de origen subterráneo fue de $1,41 \mu\text{g/l}$ (fig. 3). En cuanto a la temperatura del agua, no se encontraron diferencias significativas según el origen. Respecto a los distintos compuestos, encontramos que el cloroformo es

Tabla 1. Concentración de trihalometanos ($\mu\text{g/l}$) en las campañas de muestreo

	Invierno (n = 41)	Verano (n = 41)	p
Cloroformo (CHCl_3)			
Media (DE)	1,93 (2,57)	3,27 (5,24)	$< 0,001$
Mediana	0,39	0,39	
Mínimo	0,02	$< \text{LD}$	
Máximo	10,92	21,57	
Bromodichlorometano (CHCl_2Br)			
Media (DE)	1,44 (1,72)	1,68 (2,33)	0,001
Mediana	0,24	0,14	
Mínimo	0,01	$< \text{LD}$	
Máximo	5,23	7,36	
Dibromoclorometano (CHBr_2Cl)			
Media (DE)	1,32 (1,54)	0,95 (1,03)	0,001
Mediana	0,52	0,37	
Mínimo	$< \text{LD}$	$< \text{LD}$	
Máximo	6,76	3,06	
Bromoformo (CHBr_3)			
Media (DE)	0,38 (0,35)	0,34 (0,34)	0,045
Mediana	0,34	0,23	
Mínimo	$< \text{LD}$	$< \text{LD}$	
Máximo	1,36	1,33	
Total trihalometanos			
Media (DE)	5,08 (5,48)	6,25 (8,35)	$< 0,001$
Mediana	1,48	1,40	
Mínimo	0,14	0,01	
Máximo	18,75	31,87	
Temperatura media ($^\circ\text{C}$)	13,10	23,60	

DE: desviación estándar; LD: límite de detección.

el THM que presenta mayor concentración, especialmente en el agua de origen superficial. La concentración de cloroformo fue significativamente superior a la suma de la concentración de las especies bromadas ($p < 0,01$; coeficiente de Spearman = $0,717$). En el agua de origen subterráneo se encontró una mayor proporción de especies bromadas (26% de bromoformo) que en las superficiales.

Discusión

La concentración máxima de THM observada en el área de estudio es inferior a la tercera parte del valor máximo admisible de $100 \mu\text{g/l}$ establecido por la Unión Europea para la suma de estos compuestos. Además, los valores medios encontrados son inferiores a los descritos en otras regiones españolas del norte de la pe-

Figura 2. Concentración de trihalometanos en los principales sistemas de abastecimiento de la zona de estudio.

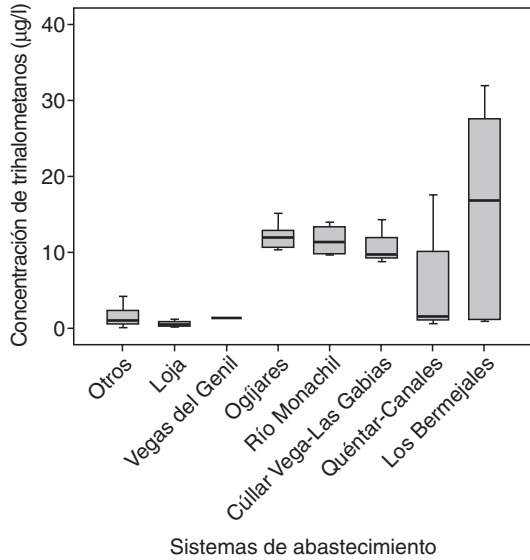
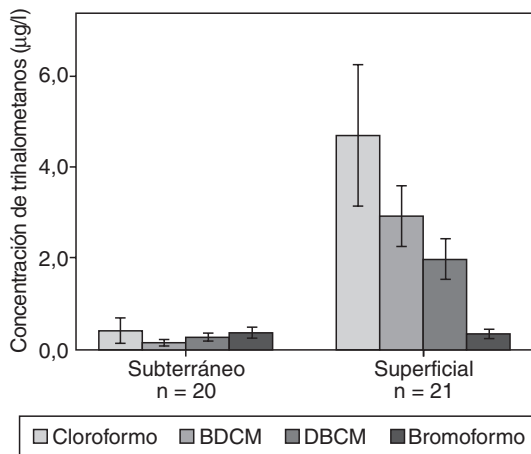


Figura 3. Concentración de trihalometanos según el origen del agua.



BDCM: bromodichlorometano; DBCM: dibromodichlorometano.

nínsula y de la vertiente mediterránea, como Asturias (concentración media de 22,25 µg/l), Alicante (85,93 µg/l) y Barcelona (63,64 µg/l), referidos por Villanueva et al^{16,17} en 1999, y Navarra (44 µg/l)²¹, así como en otros países europeos²²⁻²⁴. Esto hace pensar que el contenido de THM en los puntos estudiados podría estar directamente relacionado con la calidad del agua antes de su tratamiento, tratándose probablemente de sistemas de abastecimiento con escasa contaminación orgánica. La discrepancia entre nuestros resultados y

los publicados en la misma área de estudio por Espigares et al²⁵ en 2003 es aún mayor, aunque las diferencias metodológicas dificultan la comparación.

Es interesante señalar que, independientemente de los valores de THM totales descritos, los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los publicados en la mayoría de los estudios que analizan THM en agua de consumo cuando se comparan las distribuciones proporcionales de los distintos compuestos^{15,23,26,27}. El hecho de que predominen las especies cloradas y que la concentración de bromoformo sea muy baja es, según se ha referido en otros estudios, una característica común en las aguas tratadas con cloro y con bajos valores de bromuros en origen^{26,28}, debido posiblemente a que las fuentes que abastecen a la zona estudiada provienen principalmente de sistemas de agua superficial en las que el contenido en bromo es generalmente bajo.

La variación estacional de la concentración de THM fue estadísticamente significativa, aunque menor que la observada en estudios recientemente publicados en Europa (España y Grecia entre ellos) y Estados Unidos, en los que la concentración media de THM en la estación más cálida dobla, al menos, la concentración en la estación fría^{22,29,30}. La diferencia de concentración máxima alcanzada en cada campaña (31,87 frente a 18,75 µg/l) refleja dicha variación estacional, y es coherente con lo publicado en otros estudios de zonas de clima templado, en los que las concentraciones más altas de THM se observaron en verano y otoño, y las más bajas en invierno y primavera^{27,29,31}. En verano, el incremento de temperatura y la disminución del caudal contribuyen a aumentar la concentración de materia orgánica presente en el agua, lo que supone un incremento de los precursores de los THM³². En climas templados, como el de nuestra región, es de esperar que las mayores concentraciones se den en verano.

Las concentraciones más altas de THM se observaron en suministros de agua de origen superficial en la zona de abastecimiento de Los Bermejales, en la que, además, la actividad agrícola podría suponer un mayor aporte de materia orgánica. Igualmente, las mayores concentraciones encontradas en el agua que procede del embalse Quéntar-Canales, principal fuente de abastecimiento de la capital y la comarca de la Vega, sugieren de nuevo que el origen del agua es un factor importante en la formación de THM, coincidiendo con lo publicado por otros autores^{9,23,33}. Así, en la zona rural (municipios de Alhama y Valle de Lecrín, entre otros), donde el 60% de las muestras de agua proceden de sistemas subterráneos, se observaron valores de THM significativamente más bajos que en la zona urbana (concentración media de 2,34 y 9,96 µg/l, respectivamente). El hecho de que el agua de origen subterráneo esté en origen más protegida de las fuentes de contaminación y de los aportes naturales de materia orgánica, se reflejaría en una menor formación de

THM²⁹. La mayor presencia de las especies bromadas en el agua subterránea puede explicarse por la mayor concentración de iones de bromo en ella, lo que favorece que durante la cloración del agua se formen mayoritariamente bromoformo y DBCM, frente a cloroformo y BDCM en las superficiales³¹.

Una de las limitaciones principales de este estudio es la falta de datos reglamentarios en algunas áreas, especialmente en los municipios pequeños que cuentan con abastecimientos autónomos, debido a que no todas las encuestas enviadas fueron devueltas, lo que dificulta la evaluación de los resultados obtenidos en estas zonas. Además, no hemos medido parámetros determinantes de la formación de THM, como el contenido en materia orgánica, la turbidez, los iones bromuro, etc., que nos ayudarían a entender mejor la presencia de THM en los distintos abastecimientos.

La selección de los puntos de muestreo se hizo con el propósito de describir los valores ambientales de THM en el agua potable de los municipios de referencia INMA-Granada. A pesar de no haber muestreado en todos ellos, los datos obtenidos pueden considerarse representativos de los principales sistemas que abastecen tanto a la población de la cohorte como a la población de la zona de estudio, ya que el agua analizada procede de 25 sistemas diferentes que abastecen a un 90% de la población del área y a la casi totalidad de municipios de residencia de nuestra cohorte. Un muestreo realizado con mayor frecuencia (p. ej., cada mes), que incluyera puntos de todos los municipios y abastecimientos de la zona, evitaría incertidumbres en cuanto a la posible variabilidad temporal y geográfica de los valores de THM, lo que aumentaría la potencia de un estudio descriptivo como el que se presenta.

Dada la ausencia de trabajos similares relevantes en nuestra región, este estudio permite obtener una aproximación a la presencia de THM en el agua de consumo en el área de Granada. Los valores descritos son inferiores a los encontrados en otras regiones españolas, especialmente en zonas rurales y, en todos los casos, compatibles con las directrices europeas.

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos de investigación subvencionados por la Comisión Europea (Environmental Reproductive Health-QLK4-1999-01422), el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Red de Infancia y Medio Ambiente, INMA-G03/176) y la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (SAS-202/04).

Los autores agradecen la colaboración prestada por Francisco Javier Vílchez y Rafael Acuña, del Servicio de Sanidad Ambiental de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, para la elaboración de este trabajo. Agradecemos la ayuda técnica de Esther Marco en el laboratorio del CSIC.

Bibliografía

- Sérodes JB, Rodríguez MJ, Li H, Bouchard C. Occurrence of THMs and HAAs in experimental chlorinated waters of the Quebec City area (Canada). *Chemosphere*. 2003;51:253-63.
- Cantor KP. Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control*. 1997;8:292-308.
- Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, Jaakkola JJ, King WD, Lynch CF, et al. Disinfection by-products and bladder cancer: a pooled analysis. *Epidemiology*. 2004;15:357-67.
- Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardón A, et al. Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming in pools. *Am J Epidemiol*. 2007;165:148-56.
- Cantor KP, Lynch CF, Hildesheim ME, Dosemeci M, Lubin J, Alavanja J, et al. Drinking water source and chlorination by-products I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology*. 1998;9:21-8.
- McGeehin MA, Reif JS, Becher JC, Mangione EJ. Case-control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *Am J Epidemiol*. 1993;138:492-501.
- Thickett KM, McCoach JS, Gerber JM, Sadhra S, Burge PS. Occupational asthma caused by chloramines in indoor swimming-pool air. *Eur Respir J*. 2002;19:827-32.
- Bernard A, Carbonnelle S, Michel O, Hiquet S, De Burbure C, Buchet JP, et al. Lung hyperpermeability and asthma prevalence in schoolchildren: unexpected associations with the attendance at indoor chlorinated swimming pools. *Occup Environ Med*. 2003;60:385-94.
- Keegan T, Whitaker H, Nieuwenhuijsen M, Toledano MB, Elliott P, Fawell J, et al. Use of routinely collected data on trihalomethane in drinking water for epidemiological purposes. *Occup Environ Med*. 2001;58:447-52.
- Nieuwenhuijsen MJ, Toledano MB, Eaton NE, Farell J, Elliott P. Chlorination disinfection by products in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occup Environ Med*. 2000;57:73-85.
- Directiva de la Comunidad Europea relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. N.º 98/83/CE, 3 de noviembre de 1998.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE n.º 45, de 21 febrero de 2003.
- Guidelines for drinking-water quality. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2006. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html
- Premazzi G, Cardoso C, Conio O, Palumbo F, Ziglio G, Borgioli A, et al. Exposure of the European population to trihalomethanes (THMs) in drinking water. Luxemburgo: European Commission; 1997.
- Calderón J, Capell C, Centrich F, Artazcoz L, González-Cabré M, Villalbí JR. Subproductos halogenados de la cloración en el agua de consumo público. *Gac Sanit*. 2002;16:241-3.
- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Haloacetic acids and trihalomethanes in finished drinking waters from heterogeneous sources. *Water Res*. 2003;37:953-8.
- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. *Gac Sanit*. 2001;15:48-53.
- Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, Grimalt J, Marco A, Olea N, et al. Child health and the environment: the INMA Spanish Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2006;20:403-10.
- Villanueva CM, Grimalt J, Ballester F, Ibarlucea J, Sala M, Tardón A, et al. Medida de contaminantes del agua y uso del agua durante el embarazo en un estudio de cohortes en España. *Gac Sanit*. 2006;20 Supl 3:1-9.

20. Amaral OC. Análisis y comportamiento de compuestos orgánicos halogenados volátiles en agua, aire y sedimentos de zonas rurales, urbanas e industriales [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 1994.
21. Fraile P, Pérez JA, Sáiz I, Izu M, González E, Rodrigo JL. Residuos de contaminantes orgánicos de diferentes orígenes en Navarra. *An Sist Sanit Navar*. 2005;28:247-56.
22. Golfinopoulos SK. The occurrence of trihalomethanes in the drinking water in Greece. *Chemosphere*. 2000;41:1761-7.
23. Nissinen TK, Miettinen IT, Martikainen PJ, Vartiainen T. Disinfection by-products in Finnish drinking waters. *Chemosphere*. 2002;48:9-20.
24. Attias L, Contu A, Loizzo A, Massiglia M, Valente P, Zapponi GA. Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans. *Sci Total Environ*. 1995;171:61-8.
25. Espigares M, Lardelli P, Ortega P. Evaluating trihalomethane content in drinking water on the basis of common monitoring parameters: regression models. *J Environ Health*. 2003;66:9-13.
26. Sarmiento A, Rojas M, Medina E, Olivet C, Casanova J, et al. Investigación de trihalometanos en agua potable del Estado Carabobo, Venezuela. *Gac Sanit*. 2003;17:137-43.
27. Whitaker H, Nieuwenhuijsen MJ, Best N, Fawell J, Gowers A, Elliot P. Description of trihalomethanes levels in three UK water supplies. *J Exp Anal Environ Epidemiol*. 2003;13:17-23.
28. LeBel GL, Williams DT. Differences in chloroform levels from drinking water samples analysed using various sampling and analytical techniques. *Int J Environ Anal Chem*. 1995;60:213-20.
29. García-Villanova RJ, García C, Gómez JA, García MP, Ardanuy R. Formation, evolution and modeling of trihalomethanes in the drinking water of a town (II): in the distribution system. *Water Res*. 1997;31:1405-13.
30. Rodríguez MJ, Sérodes JB, Levallois P. Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system. *Water Res*. 2004;38:4367-82.
31. Chen WJ, Weisel CP. Halogenated DBP concentrations in a distribution system. *J Am Water Works Assoc*. 1998;90:151-63.
32. Nikolaou AD, Golfinopoulos SK, Lekkas TD, Kostopoulou MN. DBP levels in chlorinated drinking water: effect of humic substances. *Environ Monit Assess*. 2004;93:301-19.
33. Golfinopoulos SK, Kostopoulou MN, Lekkas TD. THM formation in the high bromide water supply of Athens. *J Environ Sci Health*. 1996;31:67-81.

2.

Niveles de contaminación atmosférica y modelización de la exposición individual a NO₂ en niños de la cohorte INMA-Granada mediante el uso de sistemas de información geográfica (SIG) y modelos de regresión

NIVELES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y MODELIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN INDIVIDUAL A NO₂ EN NIÑOS DE LA COHORTE INMA-GRANADA MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA (SIG) Y MODELOS DE REGRESIÓN

2.1. Niveles de NO₂ y COVs

Los resultados de las mediciones de NO₂ con captadores pasivos se encuentran descritos en la Tabla 4.1. Ninguno de los valores registrados estuvo por debajo del límite de detección (LD=1 µg/m³), exceptuando dos de los puntos de muestreo de la zona semiurbana-rural en la campaña de septiembre 2006 (97% >LD). En general, se obtuvieron niveles más bajos en la campaña de septiembre 2006 y más altos en la campaña de noviembre 2003 (campaña piloto). Atendiendo al tipo de zona, se encontró un gradiente positivo de la zona semiurbana-rural a la zona urbana en todas las campañas.

Tabla 4.1. Concentración de NO ₂ (µg/m ³) según campaña y tipo de zona							
Campaña	Zona	Estadísticos descriptivos					
		N	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
Noviembre 2003	U	26	54,0	51,8	17,6	27	116
	M	16	36,1	35,0	13,2	11	60
	SR	34	14,0	20,8	7,9	2	40
	Total	76 (100%)	27,5	32,0	20,6	2	116
Noviembre 2005	U	24	31,0	30,9	8,4	17	58
	M	16	24,5	27,7	12,1	10	57
	SR	29	13,5	14,8	6,4	6	37
	Total	69 (91%)	22,0	23,5	11,4	6	58
Septiembre 2006	U	24	26,5	27,5	11,0	12	60
	M	13	18,0	20,0	10,5	10	52
	SR	28	6,0	7,5	6,2	1	19
	Total	65 (86%)	18,0	17,4	12,8	1	60

U: Urbana; M: Metropolitana; SR: Semiurbana-rural.
 N: número de muestras analizadas (no perdidas ni invalidadas); DE: desviación estándar.

Los valores de la mediana y percentiles 10 y 90 (P10, P90) de la concentración de NO_2 registrada en las tres campañas fueron de 38 (26, 47), 26 (15, 43) y 12 (7, 21) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para la zona urbana, metropolitana y semiurbana-rural, respectivamente. Las diferencias de concentraciones entre campañas y zonas fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$).

En la Figura 4.1 se muestran los diagramas de caja que representan la distribución de las concentraciones de NO_2 por tipo de zona, en cada campaña de muestreo.

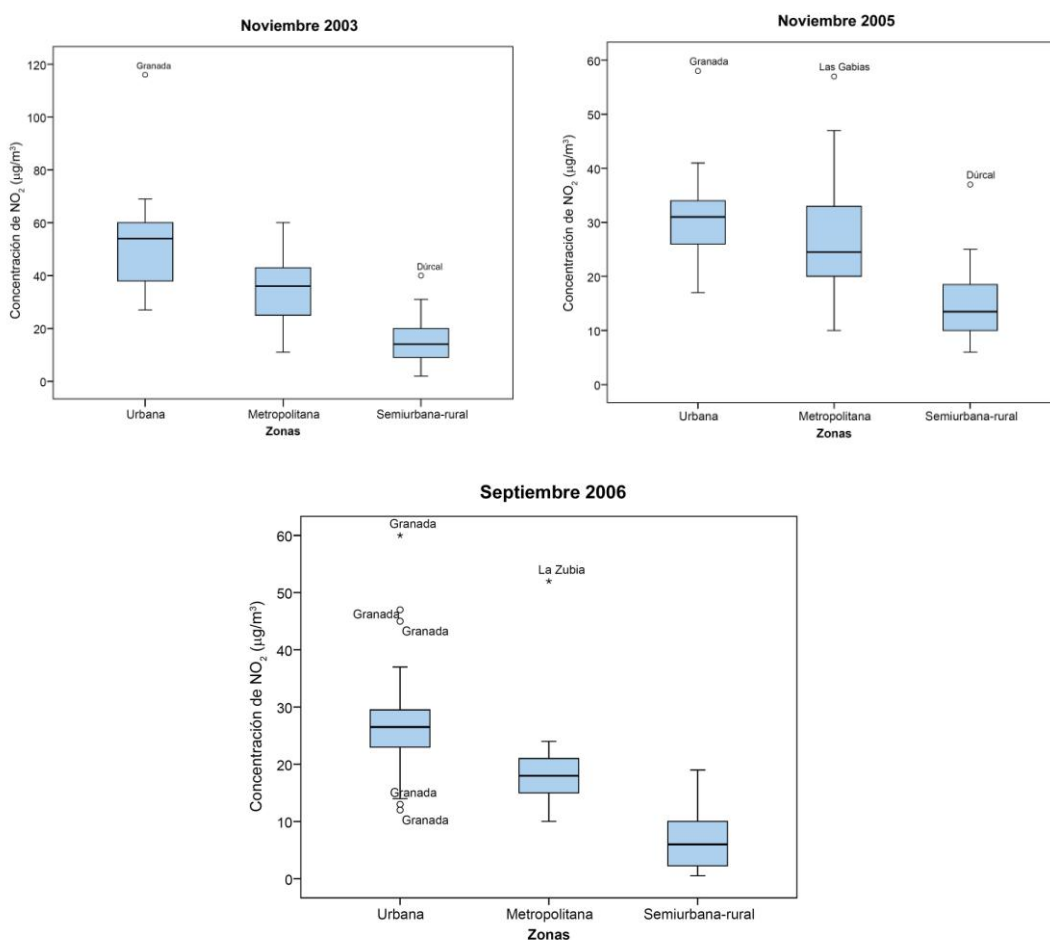


Figura 4.1. Distribución de la concentración de NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) según el tipo de zona

En la Figura 4.2 se muestra la distribución por cuartiles de las concentraciones de NO₂ registradas en el área de estudio para los tres periodos de muestreo.

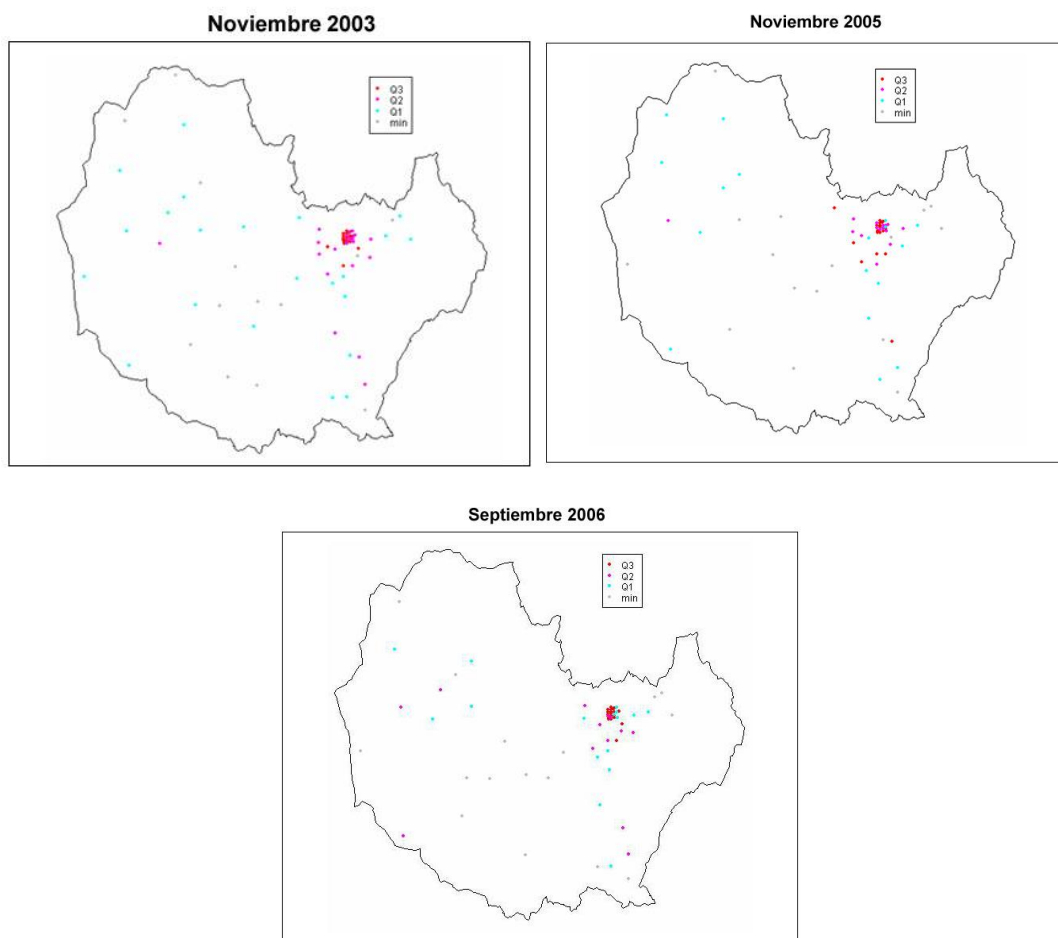


Figura 4.2. Distribución por cuartiles (Q) de las concentraciones de NO₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

Se observa que en los tres periodos de muestreo la concentración de NO₂ siguió el mismo patrón espacial.

En la Tabla 4.2 se recoge la concentración promedio anual de NO₂ para el periodo 2005/2006, sin tener en cuenta los datos de la campaña piloto. La Figura

4.3 muestra la distribución de la concentración promedio anual de NO₂ por tipo de zona, observándose la misma tendencia espacial.

Tabla 4.2. Concentración de NO ₂ (μg/m ³) en el periodo 2005/2006*						
Zona	N (%)	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
Urbana	24 (92%)	28,5	29,6	9,5	16,0	59,0
Metropolitana	13 (81%)	20,0	22,5	9,4	12,5	49,5
Semiurbana-rural	28 (82%)	10,4	11,3	6,1	3,2	28,0
Total	65 (86%)	18,0	20,7	11,5	3,2	59,0

*Concentraciones promedio de las campañas de noviembre 2005 y septiembre 2006.
N: número de muestras analizadas (no perdidas ni invalidadas); DE: desviación estándar.

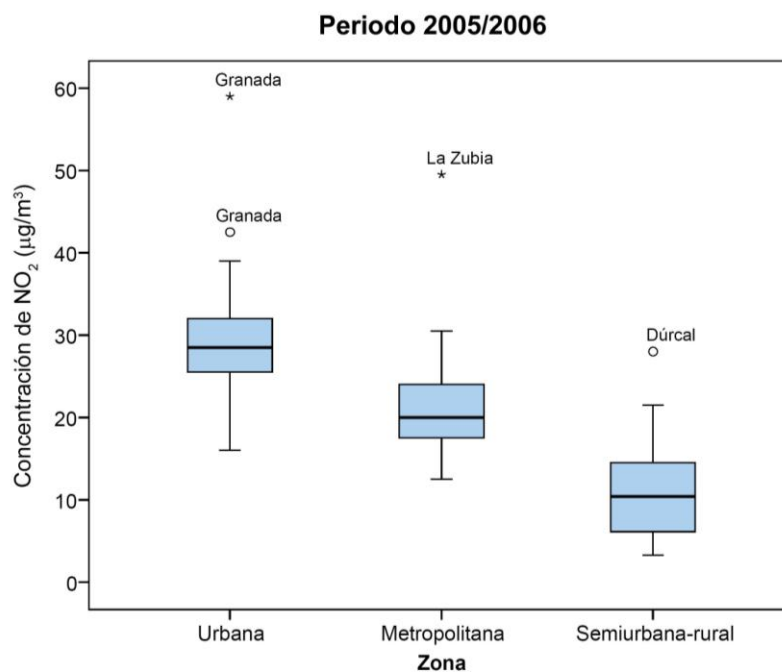


Figura 4.3. Distribución de la concentración promedio de NO₂ (μg/m³) en el periodo 2005/2006 según el tipo de zona

En cuanto a los compuestos orgánicos volátiles (COVs), todos los valores registrados superaron el LD correspondiente. Las concentraciones medias de

RESULTADOS

benceno registradas en las campañas de 2003, 2005 y 2006 fueron de 1,8; 2,9 y 0,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p \leq 0,001$), respectivamente; para tolueno, 11,4; 11,0 y 5,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p \leq 0,001$); para etilbenceno, 2,1; 2,6 y 1,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p \leq 0,001$); para m+p-xileno 5,6; 8,2 y 4,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p \leq 0,001$) y para o-xileno 1,6; 3,1 y 1,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p = 0,529$). En la Tabla 4.3 se muestran las concentraciones globales de COVs (promedio de las tres campañas) según el tipo de zona. Se observaron las mayores concentraciones para tolueno y m+p-xileno, y las menores concentraciones para benceno.

Tabla 4.3. Concentración de COVs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) según el tipo de zona*							
Zona	COVs	Estadísticos descriptivos					
		N (%)	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
Urbana	Benceno	20 (77%)	2,3	2,8	1,2	1,6	5,6
	Tolueno		11,4	15,7	9,2	7,3	34,8
	Etilbenceno		2,6	3,2	1,7	1,7	7,4
	o-xileno		2,3	3,6	2,3	1,7	9,0
	m+p-xileno		7,0	10,6	6,3	4,7	22,4
Metropolitana	Benceno	13 (81%)	1,4	1,5	0,5	0,9	2,6
	Tolueno		7,4	8,0	2,4	5,0	13,1
	Etilbenceno		1,7	1,7	0,5	1,1	3,1
	o-xileno		1,5	1,6	3,5	1,1	2,2
	m+p-xileno		4,5	4,7	1,5	2,3	7,5
Semiurbana-rural	Benceno	29 (85%)	1,3	1,3	0,4	0,6	2,0
	Tolueno		6,7	6,4	1,9	2,3	9,5
	Etilbenceno		1,5	1,4	0,4	0,7	2,2
	o-xileno		4,0	4,1	1,1	2,2	6,3
	m+p-xileno		1,6	1,6	0,3	0,9	2,3
Total	Benceno	62 (82%)	1,6	1,9	1,0	0,6	5,6
	Tolueno		7,8	9,9	6,9	2,3	34,8
	Etilbenceno		1,7	2,1	1,3	0,7	7,4
	o-xileno		1,7	2,2	1,6	1,0	9,0
	m+p-xileno		4,9	6,5	4,7	2,2	22,4

*Concentraciones promedio de las tres campañas de muestreo.
N: número de muestras analizadas (no perdidas ni invalidadas); DE: desviación estándar.

Se observaron también mayores concentraciones de COVs en la zona urbana y menores concentraciones en la zona semiurbana-rural, aunque las diferencias fueron menos marcadas que para NO_2 . No obstante, las diferencias entre las tres zonas fueron significativas para todos los COVs ($p=0,006$ para benceno; $p\leq 0,001$ para tolueno, etilbenceno y m+p-xileno y $p=0,011$ para o-xileno) (Figura 4.4).

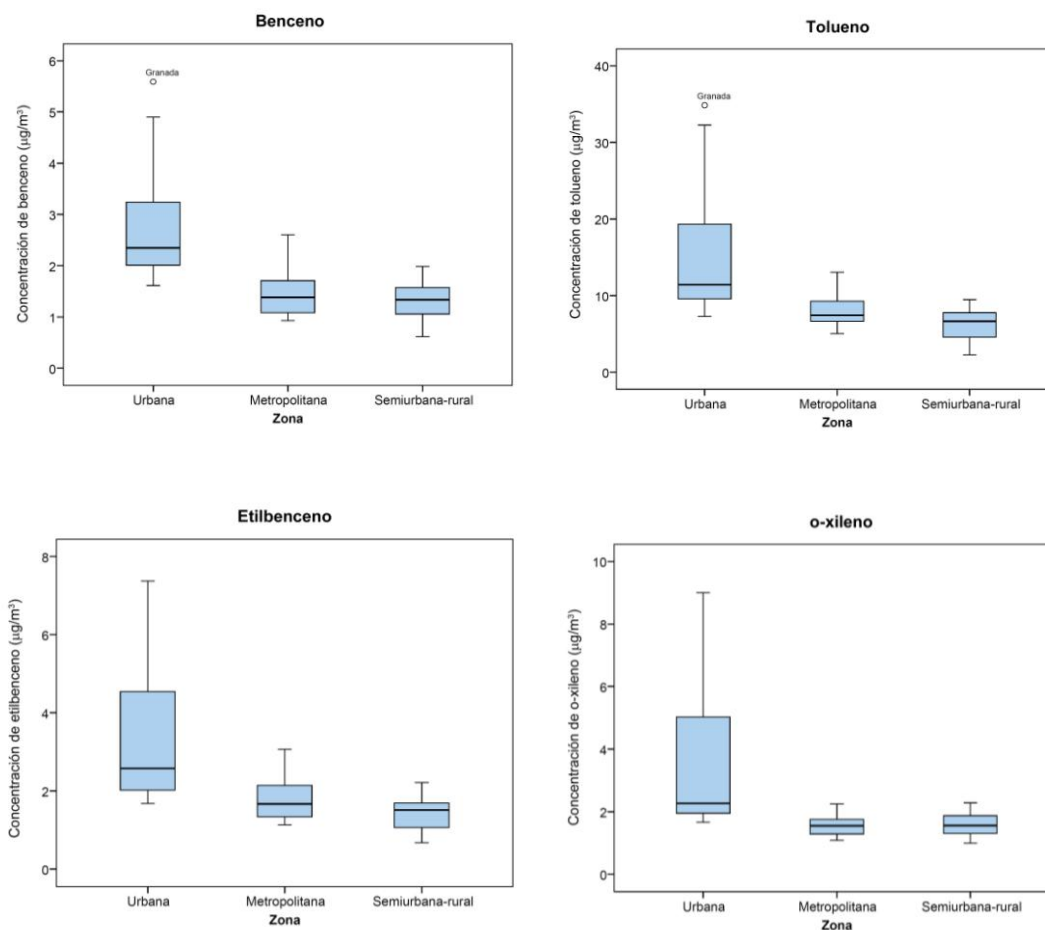


Figura 4.4. Distribución de las concentraciones promedio de COVs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) según el tipo de zona

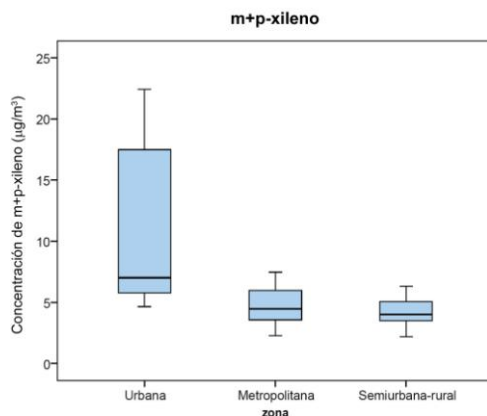


Figura 4.4. (Continuación)

En la Tabla 4.4 se recoge la concentración promedio anual de la suma de COVs (BTEX) en el periodo 2005/2006, atendiendo al tipo de zona. En la Figura 4.5 se muestra la distribución de BTEX por tipo de zona, observándose la misma tendencia espacial que se encontró para NO₂.

Tabla 4.4. Concentración promedio de BTEX (μm^3) en el periodo 2005/2006*						
Zona	N (%)	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
Urbana	21 (81%)	38,5	58,6	41,4	23,6	168,1
Metropolitana	15 (94%)	14,7	16,2	9,2	3,0	33,8
Semiurbana-rural	24 (71%)	8,1	8,9	5,2	3,1	25,5
Total	60 (79%)	16,5	28,1	33,6	3,0	168,1

*Concentraciones promedio de BTEX de las campañas de noviembre 2005 y septiembre 2006. BTEX: suma de benceno, tolueno, etilbenceno, o-xileno y m+p-xileno. N: número de muestras analizadas (no perdidas ni invalidadas); DE: desviación estándar.

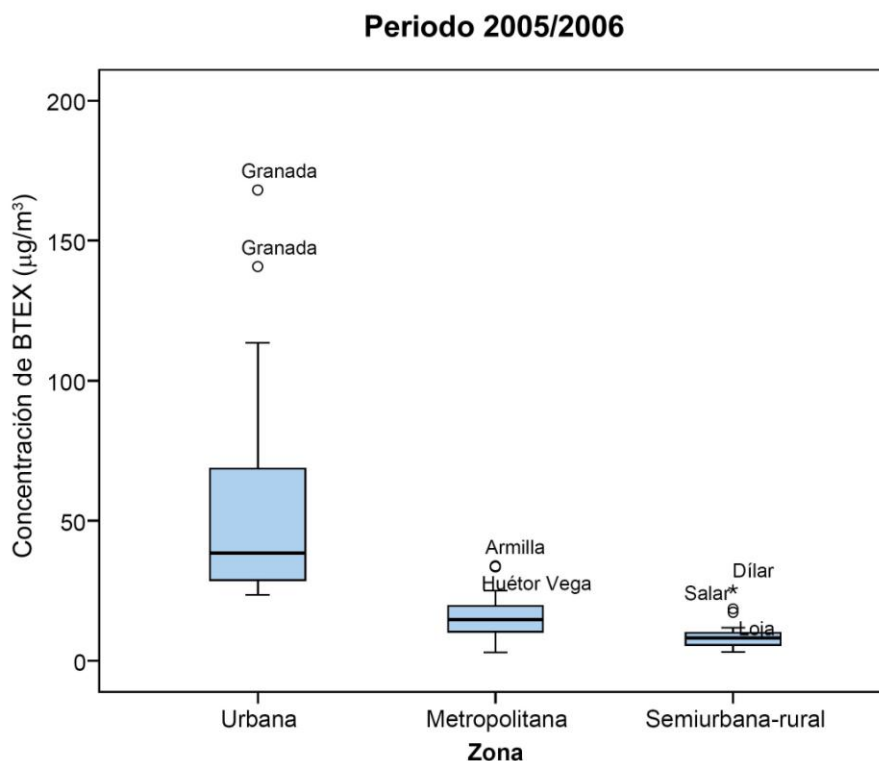


Figura 4.5. Distribución de la concentración promedio de BTEX ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) en el periodo 2005/2006 según el tipo de zona

La concentración de BTEX en el periodo 2005/2006 fue significativamente más elevada en la zona urbana ($p \leq 0,001$); la diferencia entre las zonas metropolitana y semiurbana-rural fue menos significativa ($p = 0,04$).

En el periodo 2005/2006, las correlaciones entre las concentraciones de los cinco COVs (basada en las concentraciones promedio para cada punto de muestreo) fueron muy altas ($r > 0,89$). Las correlaciones entre NO_2 y los COVs también fueron altas ($r > 0,75$), particularmente entre NO_2 y tolueno ($r = 0,80$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Coeficientes de correlación de Spearman entre NO₂ y COVs en 2005/2006

Compuesto	NO ₂	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	o-xileno	m+p-xileno	BTEX
NO ₂	1						
Benceno	0,78***	1					
Tolueno	0,80***	0,95***	1				
Etilbenceno	0,79***	0,97***	0,97***	1			
o-xileno	0,78***	0,96***	0,94***	0,96***	1		
m+p-xileno	0,75***	0,93***	0,89***	0,92***	0,94***	1	
BTEX	0,79***	0,95***	0,93***	0,93***	0,96***	0,91***	1

BTEX: suma de benceno, tolueno, etilbenceno, o-xileno y m+p-xileno.

***p≤0,001

Por campaña, las correlaciones entre NO₂ y BTEX (suma de COVs) fueron menores a las anteriormente descritas. Fueron significativas en los muestreos de 2005 ($r=0,65$; $p\leq 0,001$) y 2006 ($r=0,62$; $p\leq 0,001$), pero no en la campaña de 2003 ($r=-0,22$; $p=0,06$). Los coeficientes de correlación para NO₂, entre campañas, fueron altos ($r>0,75$). Así, entre 2005 y 2006 el coeficiente de correlación fue de $r=0,86$ ($p\leq 0,001$). Para BTEX, la correlación sólo fue significativa entre noviembre 2005 y septiembre 2006 ($r=0,52$; $p\leq 0,05$).

2.2. Interpolación de los niveles de NO₂

Los mapas de concentración de NO₂ obtenidos mediante el suavizado por *kriging* mostraron un gradiente de disminución progresiva de la zona urbana a la semiurbana-rural (Figura 4.6). En todas las campañas, el modelo elegido para la zona urbana fue el de predicción constante o “efecto pepita puro”. En los mapas de predicción de NO₂ se observa la variabilidad espacial y temporal de los niveles de contaminación descritos anteriormente.

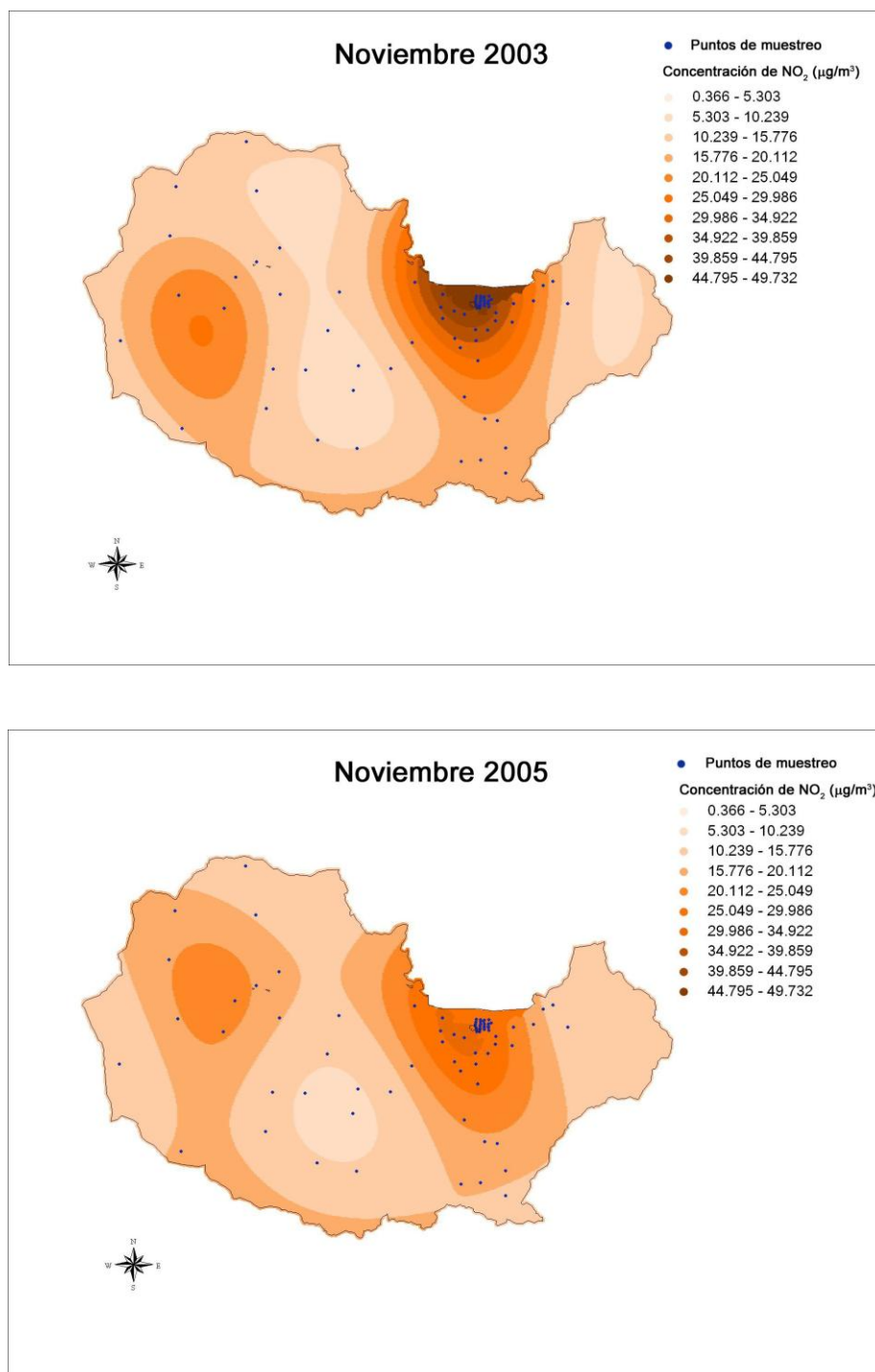


Figura 4.6. Mapas de predicción de las concentraciones de NO₂ (µg/m³) mediante *kriging*

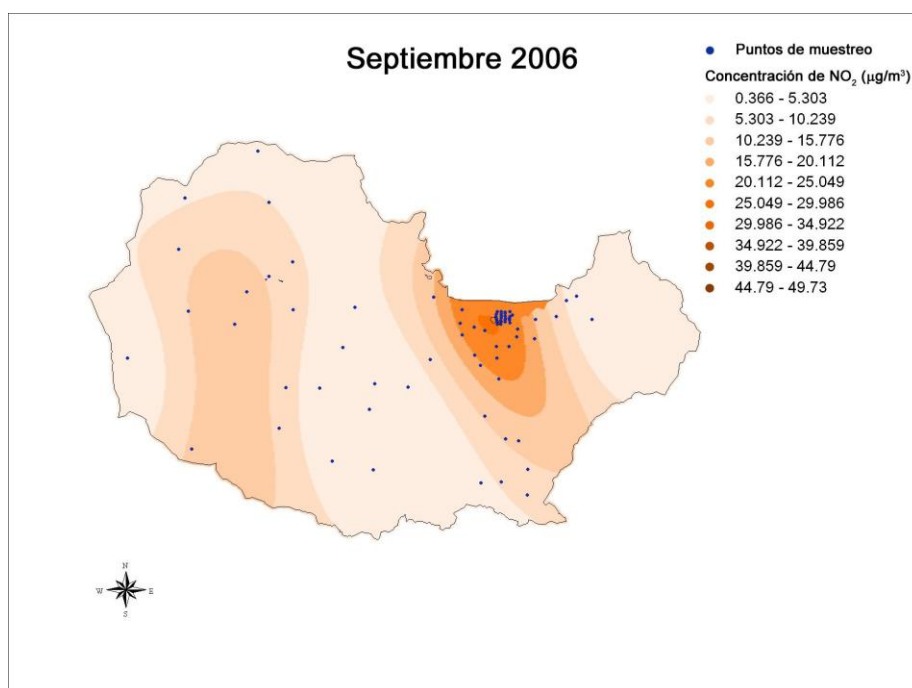


Figura 4.6. (Continuación)

La predicción por *kriging* mostró un $R^2=0,53$ ($p \leq 0,001$). La validación cruzada global (para todas las campañas y las zonas) mostró que la predicción obtenida a partir de esta técnica de interpolación resultó mejor que la obtenida a partir del captador más próximo, de la media de los captadores más próximos y de la media de los captadores más próximos ponderada por el inverso de la distancia (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Precisión de la predicción global de NO ₂ por <i>kriging</i> *						
ER (%)	N	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
<i>Kriging</i>	65	23,21	34,07	38,15	0,32	188,81
Próximo	65	29,67	42,99	52,35	0,00	316,67
Media próximos	65	29,79	47,23	56,96	0,76	316,67
Inverso distancia	65	27,76	45,88	54,42	0,10	316,67

*Validación cruzada para la predicción global de todas las campañas y zonas.
ER: error relativo; DE: desviación estándar.

Así, para la estimación del *kriging* se obtuvo un error relativo de la predicción del 34% (media del error porcentual). El error de la estimación por el captador más próximo fue de 43%, para la media de los captadores más próximos fue de 47% y para la estimación mediante la media ponderada por el inverso de la distancia el error fue de 46%. Estos resultados fueron homogéneos en los distintos periodos de muestreo y en las distintas zonas, incluso en la zona rural, ya que en todas ellas se obtuvo para el *kriging* el menor error relativo (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Precisión de la predicción de NO ₂ por <i>kriging</i> por tipo de zona*					
Zona	ER (%)	N	Mediana	Media	DE
Urbana	<i>Kriging</i>	24	15,58	20,14	16,79
	Próximo		17,63	24,28	20,02
	Media próximos		23,49	25,34	17,50
	Inverso distancia		22,35	24,54	18,09
Metropolitana	<i>Kriging</i>	16	34,71	41,41	41,84
	Próximo		40,73	57,92	47,39
	Media próximos		32,84	41,74	44,34
	Inverso distancia		38,55	43,26	44,65
Semiurbana-rural	<i>Kriging</i>	28	20,59	45,55	50,99
	Próximo		30,08	37,59	20,64
	Media próximos		34,41	34,14	12,53
	Inverso distancia		32,56	35,27	12,69

*Validación cruzada para la predicción global de las tres campañas.
ER: error relativo.

Como primera aproximación a la exposición individual a NO₂, se asignó a cada niño un valor de NO₂ combinando los mapas de predicción (*kriging*) con las coordenadas resultantes de georreferenciar sus domicilios particulares (n=220). En la Figura 4.7 se muestra la distribución de los niveles asignados en cada periodo de muestreo.

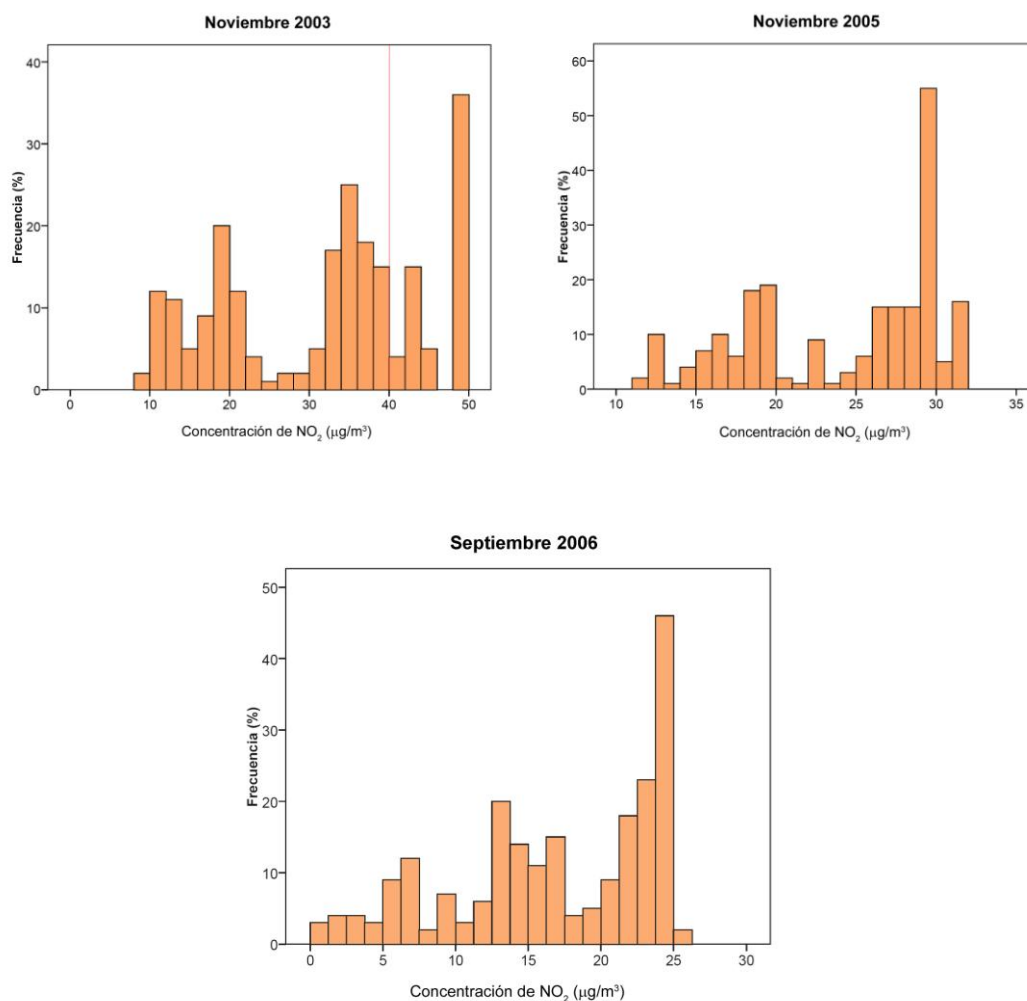


Figura 4.7. Distribución de la predicción por *kriging* de los niveles de NO₂ en los niños de la cohorte INMA-Granada (n=220)

Los valores de la mediana de las estimaciones de NO₂ y percentiles (P10; P90) fueron de 31,1 (10,7; 46,1); 26,8 (15,6; 30,3) y 17,3 (5,3; 23,9) µg/m³ para las tres campañas de muestreo, respectivamente. En la campaña de noviembre 2003, un 28% de los valores estimados de exposición a NO₂ superó los 40 µg/m³, valor límite establecido por la UE para la protección de la salud humana (Directiva 1999/30/CE). El promedio de la predicción en el periodo 2005/2006

fue de 23,2 (10,3; 26,5) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y atendiendo al tipo de zona fue de 28,6 (constante) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la zona urbana; 24,4 (19,3; 27,9) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la zona metropolitana y 12,8 (9,3; 16,3) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la zona semiurbana-rural. En estas dos campañas (2005 y 2006), ningún valor superó los 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

2.3. Modelos de regresión para NO_2

Se construyeron modelos de regresión *land use regression* (LUR) utilizando como variable dependiente el promedio de las mediciones de NO_2 en el periodo 2005/2006. El mejor modelo en la zona urbana incluía dos variables predictivas: tipo de calle (de intensidad de tráfico alta, media o baja) y porcentaje de uso del suelo residencial en un *buffer* de radio 200 m alrededor del punto de muestro. En la zona no urbana (zonas metropolitana y semiurbana-rural) el mejor modelo incluía la predicción del *kriging* y la longitud de tramos de carretera en un *buffer* de 1.500 m (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Modelos de regresión para NO_2 *						
Zona	Variables	β	p	R^2	VIF	RMSE
Urbana	Constante	3,19	-	0,45	1,52	3,04
	Int. tráfico medio [†]	0,13	0,090			
	Int. tráfico alto [†]	0,36	0,004			
	% uso_res(200)	-0,01	0,022			
No urbana	Constante	1,17	-	0,75	2,30	1,72
	<i>Kriging</i>	0,08	<0,001			
	Road_length(1500)	0,04	0,062			

*Modelos con $\ln(\text{NO}_2)$ como variable dependiente.
VIF: *Variance Inflation Factor*; RMSE: *Root Mean Squared Error*
[†]Categoría de referencia: calles de intensidad de tráfico baja
% uso_res(200): porcentaje de uso del suelo residencial en un *buffer* de 200 m
Road_length(1500): longitud de tramos de carretera en un *buffer* de 1.500 m

La variable más explicativa en la zona no urbana fue la predicción promedio (2005/2006) del *kriging*, y en la zona urbana fue la intensidad de tráfico en la calle más cercana. Los modelos presentaron bondades de ajuste de 0,75 y 0,45, respectivamente, mejorando la predicción del *kriging* en el caso de la zona no urbana ($R^2=0,53$). No se detectaron problemas de colinealidad ($VIF<10$) en los modelos. El valor de la raíz del error cuadrático medio (RMSE) fue pequeño. La autocorrelación espacial residual resultó despreciable en los modelos.

2.4. Asignación de niveles de exposición a NO₂

Con los modelos obtenidos, se asignó a cada niño un valor estimado de exposición a NO₂ a los 4 años. En la Tabla 4.9 se presentan los valores de la media, mediana, mínimo y máximo de las concentraciones de NO₂ para el total de niños, según la zona de residencia (distinguiendo entre zona semiurbana y zona rural). Las estimaciones fueron significativamente diferentes entre todas las zonas ($p\leq 0,001$). Ninguno de los valores de exposición asignados superó los 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En la Figura 4.8 y 4.9 se muestra la distribución por zonas de los valores asignados.

Tabla 4.9. Asignación de niveles de NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) en los niños de la cohorte						
Zona residencia	N	Mediana	Media	DE	Mín.	Máx.
Urbana	35	32,53	29,85	5,29	16,84	34,71
Metropolitana	107	23,79	24,57	5,86	11,66	36,09
Semiurbana	44	14,36	14,23	3,25	7,26	22,98
Rural	34	8,15	9,09	4,77	5,15	31,39
Total	220	22,37	21,92	8,75	5,15	35,23

N: número de niños; DE: desviación estándar.

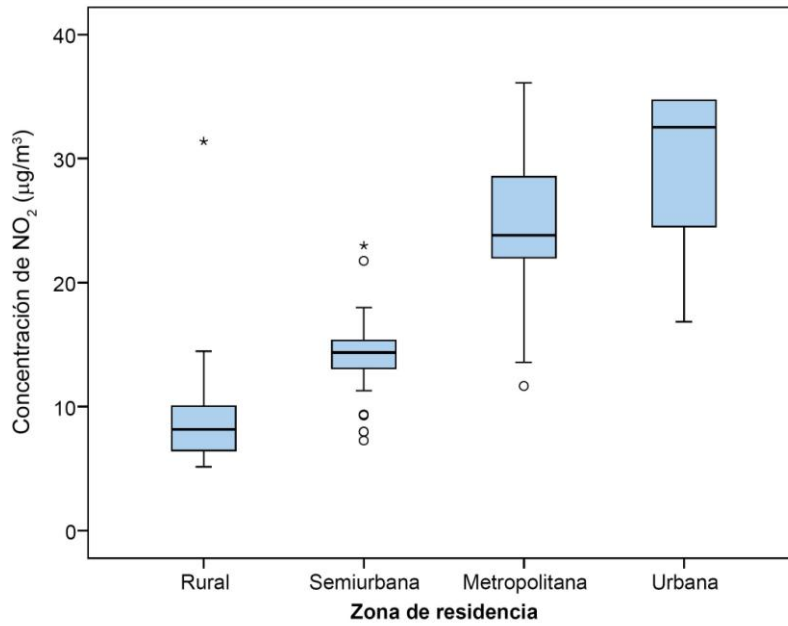


Figura 4.8. Distribución por zonas de los niveles de NO₂ asignados a los niños de la cohorte INMA-Granada (n=220).

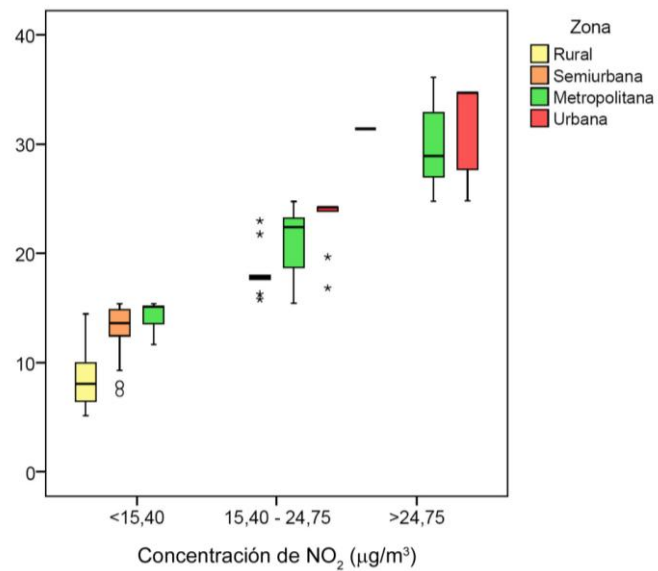


Figura 4.9. Distribución por zonas de los niveles de NO₂ en terciles asignados a los niños de la cohorte INMA-Granada (n=220)

3.

*Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in
4-year-old Spanish children*

(Niveles de 1-hidroxipireno en orina y exposición a HAPs en
población infantil española de 4 años de edad)

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children

C. Freire^{a,*}, A. Abril^b, M.F. Fernández^a, R. Ramos^a, M. Estarlich^c, A. Manrique^d,
A. Aguirre^e, J. Ibarluzea^f, N. Olea^a

^aLaboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^bDepartment of Paediatrics, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^cValencian School of Health Studies (EVES), Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, 46017 Valencia, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^dPublic Health Laboratory, 48010 Bilbao, Basque Country, Spain

^eNational Center for Environmental Health, Carlos III Health Institute, 20220 Majadahonda, Madrid, Spain

^fDepartment of Public Health of Guipuzkoa, 20013, San Sebastian, Basque Country, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

ARTICLE DATA

Article history:

Received 10 July 2008

Received in revised form

29 October 2008

Accepted 31 October 2008

Available online 17 December 2008

Keywords:

Biomonitoring

PAH

1-Hydroxypyrene

Children

Environmental exposure

ABSTRACT

Aims: Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), among the main compounds present in polluted urban air, is of concern for children's health. Childhood exposure to PAH was assessed by urinary monitoring of 1-hydroxypyrene (1-OHP), a pyrene metabolite, investigating its association with exposure to air pollution and other factors related to PAH in air.

Methods: A group of 174 4-year-old children were recruited and a questionnaire on their indoor and outdoor residential environment was completed by parents. At the same time, environmental measurements of traffic-related air pollution (NO₂) were carried out. A urine sample was collected from each child in order to analyze 1-OHP using HPLC with fluorescence detection, correcting for creatinine concentrations. Non-parametric tests and regression analyses were used to identify environmental factors that influence 1-OHP excretion.

Results: Mean urinary 1-OHP concentration was 0.061 μmol/mol creatinine, ranging from 0.004 to 0.314 μmol/mol. Non-parametric tests and regression analysis showed positive and significant associations ($P \leq 0.05$) between 1-OHP and predicted residential exposure to NO₂ (which was based on outdoor environmental measurements and geo-statistical analysis), self-reported residential vehicle traffic, passive smoking and cooking appliance. 1-OHP levels tended to be higher among children living in urban areas (0.062 μmol/mol vs. 0.058 μmol/mol for children living in rural areas) but differences were not significant ($P = 0.20$).

Conclusion: In Southern Spain, concentrations of urinary 1-OHP were in the lower range of those generally reported for children living in non-polluted areas in Western Europe and the USA. Traffic-related air pollution, passive smoking and cooking appliance influenced urinary 1-OHP level in the children, which should be prevented due to the health consequences of the inadvertent exposure to PAH during development.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 242864; fax: +34 958 249953.

E-mail address: cfreire@ugr.es (C. Freire).

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are released into the environment as a complex mixture of compounds during incomplete combustion of organic matter (IARC, 2003). PAH are found in multiple environmental media, including indoor and ambient air, soil, water and food. The main sources of human exposure to PAH are occupation, passive and active

smoking, food and water and air pollution (Jongeneelen, 1997). Pollution of air by PAH is mainly due to fuel-combustion emissions from motor vehicle (e.g., diesel and gasoline vehicles), heating and power sources (e.g., including coal, oil and biomass) and indoor sources, such as cooking, residential heating and tobacco smoke (IARC, 1989, 2004; Straif et al., 2006; Lewtas, 2007). Thus, exposure of the general population to PAH from inhalation of ambient air varies according to the degree of urbanisation and industrialisation and the level of

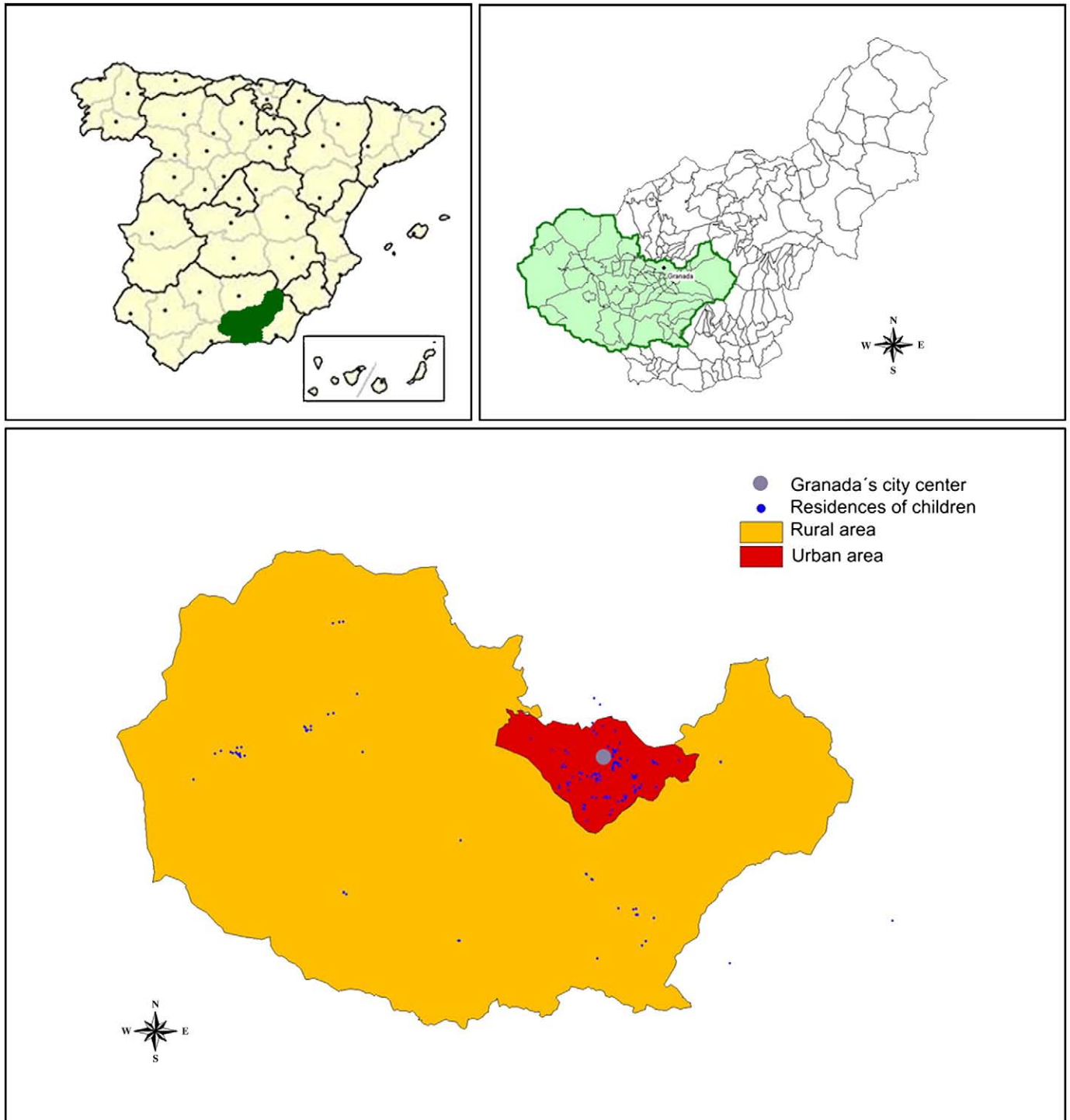


Fig. 1 – Study area and residences of children.

traffic, and it is influenced by the home environment and life style factors (Hansen et al., 2005, 2008).

PAH are human health hazards and a number of them are known carcinogenic compounds (IARC, 1983). It is well known that children are at particular risk for health effects of air pollutants since their respiratory and immune systems are not fully developed, they inhale relatively more air per kilogram of body weight than adults and they generally spend more time outdoors (Schwartz, 2004). Exposure to PAH from air pollution has been associated with increased risk of adverse health effects in children, such as asthma and cancer, though the extent to which this excess risk can be attributed to exposure to PAH remains unclear (Crosignani et al., 2004; Kim et al., 2005; Knox, 2005).

Pyrene is one of the most produced PAH in emissions from the combustion of petrol and diesel, the main source of PAH in urban environments (Castaño-Vinyals et al., 2004). Urinary 1-OHP, a major metabolite of pyrene, is considered an appropriate surrogate biomarker for total PAH-exposure of human populations (Levin, 1995; Jongeneelen, 1997; Siwinska et al., 1998) and is reported to reflect levels of PAH exposure from different sources such as ambient air, food and indoor air (Gilbert and Viau, 1997; Vyskocil et al., 1997, 2000). It has been suggested that urinary 1-OHP reflects exposure to PAH even at low air pollution levels (Castaño-Vinyals et al., 2004), and it is increasingly being used to biomonitor human exposure to air pollution (Hansen et al., 2008). In addition, the human biomonitoring of environmental exposures to PAH is considered a priority in the European Environmental and Health Program (Casteleyn et al., 2007).

Although more information is becoming available on urinary 1-OHP concentrations among the general population, levels in children are less well known. Epidemiological studies on childhood exposure to PAH over the past decade have shown a wide range of 1-OHP levels (Siwinska et al., 1998, 1999; Vyskocil et al., 2000; Fiala et al., 2001; Grainger et al., 2005), which were associated with local sources of outdoor exposure, diet, smokers at home and cooking with wood/coal (van Wijnen et al., 1996; Siwinska et al., 1999; Fiala et al., 2001; Mucha et al., 2006; Kollosa-Gehring et al., 2007). In urban areas with heavy traffic, motor vehicle emissions have been suggested as an important source of childhood exposure to PAH that, consequently, significantly affects 1-OHP excretion (Mielzynska et al., 2006; Ruchirawat et al., 2007; Tuntawiroon et al., 2007). Thus, in a study of 3–13 year-old Dutch children, 1-OHP concentrations in those living in urban residences were significantly higher than those in children living in rural areas (Hansen et al., 2005). Therefore, it is crucial to take into consideration the area of residence when studying 1-OHP levels in children.

The present study was carried out as part of the “Environment and Childhood Research Network” (INMA network), a population-based cohort study in different regions of Spain that focuses on prenatal environmental exposures in relation to growth, development and health from early foetal life until childhood (Ribas-Fitó et al., 2006). The cohort established in Granada province (South-

ern Spain) consists of 700 boys born at the San Cecilio University Hospital between October 2000 and June 2002 (Lopez-Espinosa et al., 2007). One of the objectives of the INMA study was to assess prenatal and postnatal exposure to air pollution via environmental measurements, questionnaires, geographical information systems (GIS) and the monitoring of urinary 1-OHP during pregnancy and infancy (Esplugues et al., 2007). With this background, the objectives of the present study were to determinate urinary 1-OHP concentrations in children living in Granada province and to evaluate their association with exposure to air pollution and other factors related to PAH in air.

2. Material and methods

2.1. Study area

The study was conducted in an area that covers the health district of the San Cecilio University Hospital, with a total population of 512,000 inhabitants and an extension of approximately 4000 km². This area includes part of the city of Granada (236,000 inhabitants) and 50 towns and villages. Two areas were differentiated: a) an urban area, corresponding to the central districts of the city of Granada and the metropolitan area around the city, with high population and high traffic densities (main roads with mean daily frequency about 20,000–40,000 vehicles), and b) a rural area, with lower traffic density (below 5000 vehicles/day), where the population resides mainly in small villages and the main activities are agriculture and forestry (Fig. 1).

2.2. Study population

From October 2000 to July 2002, mother–son pairs registered at the San Cecilio University Hospital of Granada were recruited, in order to investigate chronic exposure to environmental chemicals (Fernandez et al., 2007). The inclusion and exclusion criteria were published elsewhere (Lopez-Espinosa et al., 2007). The INMA study protocol included the medical follow-up of the children at the age of 4 years, as well as questionnaires and biological sample collection. Between April 2005 and June 2006, 1 out of 3 mothers was randomly contacted by phone and they agreed to complete a questionnaire on residential and home environment. A total of 220 children were contacted. Urine samples were collected and analysed for 1-OHP from 174 children, 118 living in the urban area and 56 in the rural area. Written informed consent was obtained from parents of children before the study, which was approved by the Ethics Committee of San Cecilio University Hospital.

2.3. Questionnaires

Parents completed a structured questionnaire on possible sources of children’s exposure to air pollution and PAH, which included information on smoking habits, perception of residential traffic density and gas combustion-related sources in the house such as heating, water heating and cooking appliances.

2.4. Environmental measures

The INMA air pollution-study protocol included an estimate of individual air pollution exposure based on outdoor nitrogen dioxide (NO₂) measurements, following the methodology published by Esplugues et al. (2007). NO₂, like PAH, is generated by combustion of organic material and is a typical urban air pollutant that has been used as an indicator of vehicle emissions (Krämer et al., 2000; Hochadel et al., 2006). Sampling was done in two 7-day periods, one in winter and the other in summer. In brief, ambient air NO₂ was monitored in 76 locations throughout the study area using Radiello® passive samplers (Environmental Research Center, S. Maugeri Foundation, Padova, Italy) and concentrations were determined at the “Centro Nacional de Sanidad Ambiental” of the “Instituto de Salud Carlos III” in Madrid, Spain. NO₂ was adsorbed onto a cartridge coated with triethanolamine, desorbed with a sulphanilamide reactive and then quantified by spectrophotometry 537 nm. Children addresses were

geocoded and then, using a methodology based on spatial interpolation methods (*kriging* technique) (Jerrett et al., 2005), the NO₂ residential level was estimated for each child and used as a proxy of individual exposure to traffic-related air pollution.

2.5. Urinary 1-OHP measurements

Urine samples (30 ml) were collected in the afternoon during the working week at the Hospital and stored in three 10 ml polypropylene containers at –20 °C until analysis. Samples were analysed for 1-OHP in the Laboratory of the Department of Public Health at Bilbao, Basque Country (Spain). Analytical procedure has been published elsewhere (Llop et al., 2008). In brief, 10 ml of acetic-acetate buffer 0.2 M and 100 µl of β glucuronidase arylsulfatase enzyme were added to 10 ml of urine, which was then mixed and placed in a stove at 37 °C during 18 h. 1-OHP was extracted after hydrolyzation of the urine by solid-liquid extraction using RP-18 cartridges. The

Table 1 – Descriptive analysis of 1-OHP concentrations (µmol/mol)

	All children			Exposed to ETS at home			Not exposed to ETS at home		
	N (%)	Mean±SD	P	N (%)	Mean±SD	P	N (%)	Mean±SD	P
Exposure to ETS									
Not exposed to ETS	93 (53.4)	0.052±0.050	0.17	–	–	–	–	–	–
Exposed to ETS	81 (46.6)	0.063±0.055							
Smoking habit (cigarettes/day)									
Not exposed to ETS	93 (53.4)	0.060±0.055	0.25	–	–	–	–	–	–
1–10	52 (29.9)	0.063±0.055							
11–20	19 (10.9)	0.076±0.044							
>20	10 (5.7)	0.052±0.021							
Sampling season									
Spring	64 (36.8)	0.058±0.057	0.14	26 (32.1)	0.056±0.060	0.24	38 (40.9)	0.063±0.063	0.32
Summer	16 (9.2)	0.087±0.077		9 (11.1)	0.103±0.092		7 (7.5)	0.061±0.053	
Autumn	42 (24.1)	0.053±0.035		27 (33.3)	0.060±0.037		15 (16.1)	0.038±0.028	
Winter	52 (29.9)	0.065±0.042		19 (23.5)	0.071±0.044		33 (35.5)	0.063±0.046	
Area of residence									
Rural	56 (32.2)	0.054±0.055	0.20	30 (37.0)	0.063±0.061	0.26	26 (31.2)	0.053±0.059	0.23
Urban	118 (67.8)	0.060±0.040		51 (63.0)	0.068±0.053		67 (68.8)	0.060±0.046	
Predicted exposure to NO ₂ (µg/m ³)									
<22.50	81 (46.6)	0.055±0.051	0.04	38 (46.9)	0.060±0.052	0.17	43 (48.4)	0.049±0.053	0.07
≥22.50	93 (53.4)	0.067±0.050		43 (53.1)	0.074±0.059		50 (51.6)	0.064±0.047	
Self-reported traffic-density									
Very low frequency	13 (4.6)	0.046±0.034	0.20	6 (7.4)	0.040±0.025	0.43	7 (7.5)	0.046±0.046	0.008
Low frequency	63 (33.9)	0.049±0.022		28 (9.9)	0.042±0.025		35 (37.6)	0.054±0.057	
Medium frequency	25 (12.1)	0.051±0.038		12 (14.8)	0.070±0.062		13 (14.0)	0.058±0.015	
High frequency	21 (8.0)	0.079±0.044		8 (9.9)	0.068±0.045		13 (14.0)	0.083±0.021	
Very high frequency	52 (27.0)	0.084±0.057		27 (33.3)	0.074±0.062		25 (26.9)	0.091±0.038	
Cooking appliance									
Electric	91 (45.4)	0.056±0.046	0.09	40 (49.4)	0.057±0.044	0.05	51 (54.8)	0.056±0.048	0.89
Gas	83 (40.2)	0.069±0.059		41 (50.6)	0.076±0.064		42 (45.2)	0.059±0.053	
Water heater									
Electric	53 (23.0)	0.052±0.033	0.37	17 (21.0)	0.048±0.025	0.15	36 (38.7)	0.055±0.038	0.67
Gas	121 (62.6)	0.066±0.058		64 (79.0)	0.071±0.060		57 (61.3)	0.059±0.055	
Domestic heating									
None	22 (12.6)	0.061±0.041	0.95	13 (16.0)	0.063±0.044	0.97	9 (9.7)	0.057±0.040	0.99
Electric	61 (35.0)	0.069±0.069		32 (39.5)	0.075±0.075		29 (31.2)	0.062±0.061	
Gas	76 (43.5)	0.051±0.036		26 (32.0)	0.055±0.029		50 (53.8)	0.049±0.037	
Open fire	15 (8.7)	0.053±0.029		10 (12.3)	0.058±0.028		5 (5.4)	0.047±0.031	

1-OHP: 1-hydroxypyrene; ETS: Environmental tobacco smoke; SD: Standard deviation.

P: P-value in Mann-Whitney or Kruskal Wallis test.

Significant associations in bold ($P \leq 0.05$).

solvents used in the extraction were acetonitrile and water. Eluates were evaporated to dryness in a stream of N₂ and re-dissolved in acetonitrile for analysis by high resolution liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection, using an RP-18 column and UV fluorescent spectrophotometer (excitation and emission wavelengths of 242 nm and 388 nm, respectively). 1-OHP concentrations (ng/ml) were corrected by the creatinine concentration in each urine sample and expressed in $\mu\text{mol/mol}$ creatinine. The quantification limit (LOQ) for 1-OHP was 0.030 ng 1-OHP/ml urine. For samples with 1-OHP \leq LOQ, a value of half the LOQ was taken.

2.6. Statistical analysis

A descriptive analysis of 1-OHP levels was performed in terms of the covariates considered in the study: urine sampling season (spring/summer/autumn/winter), residential area (rural/urban), smoking habit of parents at home (both “not exposed/exposed” and “number of cigarettes smoked daily at home”), residential traffic density perceived by parents (very low frequency/low frequency/medium frequency/high frequency/very high frequency), cooking (electric/gas), water heating (electric/gas) and domestic heating (none/electric/gas/open fire) appliances and predicted residential exposure to NO₂. Because 1-OHP and predicted NO₂ levels had an abnormal distribution, non-parametric tests were used to test the differences among groups. The significance level was set at 95% ($P \leq 0.05$).

Spearman test was used to evaluate the correlation between 1-OHP level and smoking habit of parents (number of cigarettes smoked daily at home), as continuous variable. Exposure to environmental tobacco smoke (ETS) was evaluated with two different categorical variables: children not living/living with smokers (“not exposed”/“exposed”) and number of cigarettes smoked by parents at home (0; 1–10; 11–20; and >20 cigarettes per day). Predicted residential exposure to NO₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) was divided into two groups (categorical variable), finding a higher adjusted R² for its association with 1-OHP than when it was treated as a continuous variable. A cut-off point of 22.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ was established based on the change in the slope of the relationship between 1-OHP concentration and predicted NO₂ in the localized weight regression (LOESS; Hastie and Tibshirani, 1990).

Multivariate linear regression was used to examine the association between 1-OHP values and potential explanatory

variables. 1-OHP concentration was treated as continuous variable on a log-transformed scale. All covariates associated with the outcomes at a P -value ≤ 0.20 in univariate analysis were introduced in the models. Following a backward procedure, variables with P -value > 0.10 were sequentially excluded from the model. F test for the change in R² in linear regression was used to check the exclusion (or not) of covariates step by step. Statistical analysis was performed using SPSS software package, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago).

3. Results

Mean age (\pm standard deviation [SD]) of the children participating in this study was 4.3 years (± 0.2). Concentration of 1-OHP was above the LOQ in 78.8% of urine samples. Mean (\pm SD) of unadjusted and adjusted 1-OHP concentrations were 0.070 ng/ml urine (± 0.070 ng/ml) and 0.061 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine (± 0.051 $\mu\text{mol/mol}$), respectively. Concentration of 1-OHP ranged from 0.004 to 0.314 $\mu\text{mol/mol}$ (0.015–0.553 ng/ml). In urban and rural areas, 43 and 54% of the children, respectively, were exposed to ETS, i.e., a total of 81 out of 174 children were living with smokers. Mean (\pm SD) predicted residential exposure to NO₂ was 20.96 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (± 5.94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and significantly different between children living in urban and rural areas (mean 24.45 vs. 13.42 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; $P < 0.001$).

Table 1 shows the distribution of urinary 1-OHP levels as a function of the covariates considered in the study. First, considering all children together, urinary 1-OHP levels tended to be higher among children exposed to ETS (mean 0.063 $\mu\text{mol/mol}$ vs. 0.052 $\mu\text{mol/mol}$), although differences did not reach statistical significance ($P = 0.17$). Moreover, when smoking was analysed in terms of number of cigarettes smoked daily at home (continuous), a positive but weak correlation was found between smoking at home and 1-OHP excreted by the children ($r = 0.133$; $P = 0.108$). Second, urinary 1-OHP concentrations of children living in urban areas were higher compared to rural children, however differences were not significant ($P = 0.20$). Third, a significant difference ($P = 0.04$) was found in 1-OHP urine concentration as a function of predicted residential exposure to NO₂, so that children exposed to residential NO₂ ≥ 22.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ showed higher 1-OHP concentrations compared with children below this level. Fourth, a close-to-significant difference ($P = 0.09$) was found between children living in a house with gas cooking appliance and those in a house with electric cooking appliance.

In order to explore more deeply the effect of ETS exposure on urinary 1-OHP levels, we performed a stratified analysis of 1-OHP urinary levels and potential explanatory variables. Among the children living with non-smokers, there were no differences in 1-OHP levels between urban and rural children ($P = 0.23$). Close-to-significant and significant differences were found for predicted NO₂ levels ($P = 0.07$), and self-reported traffic density ($P = 0.008$), respectively, so that children exposed to residential NO₂ ≥ 22.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ or living near streets with continuous traffic showed higher 1-OHP levels. In contrast, urinary 1-OHP levels of the children living with smokers were only significantly affected by cooking appliance ($P = 0.05$).

In univariate regression analysis, variables associated with 1-OHP at a P -value ≤ 0.20 were: predicted residential exposure

Table 2 – Regression analysis between 1-hydroxypyrene levels and factors of exposure to PAH

	β coefficient*	95% CI	P
Predicted NO ₂	0.401	0.12 to 0.68	0.006
Exposure to ETS	0.264	–0.02 to 0.55	0.07
Cooking appliance	0.235	–0.04 to 0.52	0.10

CI: Confidence intervals.

Children exposed to < 22.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ NO₂, not exposed to ETS at home, and living in a house with electric cooking appliance as reference category.

* Coefficients correspond to 1-OHP on log-transformed scale as dependent variable.

to NO_2 ($P=0.02$), self-reported residential traffic ($P=0.05$), smoking habit ($P=0.07$) cooking appliance ($P=0.10$), exposure to ETS ($P=0.11$), and area of residence ($P=0.13$). In multivariate analysis, the variables included in the model were: predicted NO_2 ($P=0.006$), exposure to ETS ($P=0.07$) and cooking appliance ($P=0.10$). Table 2 shows regression coefficients and 95% confidence intervals.

4. Discussion

This study detected an association between urinary excretion of 1-OHP and traffic-related air pollution estimated by outdoor NO_2 measurements, suggesting that motor vehicle emissions play an important role in the exposure to PAH of children in Granada. Accordingly, parents' perception of traffic density was also associated with 1-OHP levels but did not influence 1-OHP when considered together with exposure to NO_2 , suggesting that NO_2 is better marker of traffic-related air pollution than is traffic perception. Concentrations of 1-OHP were slightly lower in the children living in a rural setting, characterised by a low density of traffic. This is consistent with previous findings by Hansen et al. (2005) in Denmark and Chuang et al. (1999) in the USA of a possible association between PAH from traffic-related air pollution and childhood exposure. In our study area, vehicle emissions appear to be the main source of PAH in ambient air because the area is mostly devoted to agriculture practices and services (Lopez-Espinosa et al., 2007) and contains little industrial activity.

In the framework of the INMA study, 1-OHP levels have been reported in pregnant women from Valencia, Eastern Spain (Llop et al., 2008), and they were also associated with outdoor NO_2 levels. A few studies have also reported 1-OHP

urinary levels in workers occupationally exposed to PAH in Spain (Domingo et al., 2001; Schuhmacher et al., 2002; Mari et al., 2007). However, to our best knowledge, this is the first Spanish study to evaluate childhood exposure to environmental PAH by this approach. The urinary 1-OHP levels in these Southern Spanish children were in the lower range of those reported for young European and North American children who do not live in industrial areas and are exposed to low air pollution levels (Chuang et al., 1999; Vyskocil et al., 2000; Cirillo et al., 2006; Huang et al., 2006), and much lower than findings in Eastern Europe and Asian countries with high levels of industrial activity and vehicle traffic (Siwinska et al., 1998; Mielzynska et al., 2006; Mucha et al., 2006) (Fig. 2). Finally, the urinary 1-OHP levels found in 95% of the present children were below the reference value of $0.30 \mu\text{g/g}$ ($0.155 \mu\text{mol/mol}$) established by the German Environmental Survey (GerES III and IV) for children aged 3–14 years who are not exposed to ETS (Wilhelm et al., 2008).

Besides outdoor pollution due to traffic, indoor activities appeared to affect the children's exposure to PAH as reflected in their urinary excretion of 1-OHP. We found some association between urinary 1-OHP in children and indoor air pollution due to ETS, confirming previous reports (Siwinska et al., 1999; Kollosa-Gehring et al., 2007). As suggested by Rogger et al. (1993), the present data also support an association between the use of a gas cooking appliance and higher PAH exposure. The above-cited German survey indicated that ETS is an important predictor of urinary 1-OHP levels in children and found residential setting to be of minor importance (Becker et al., 2006; Kollosa-Gehring et al., 2007). However, in Thailand, 1-OHP levels were shown to be higher in rural versus urban residents due to the use of wood/coal to cook and heat water in rural areas (Chetinyanukornkul et al.,

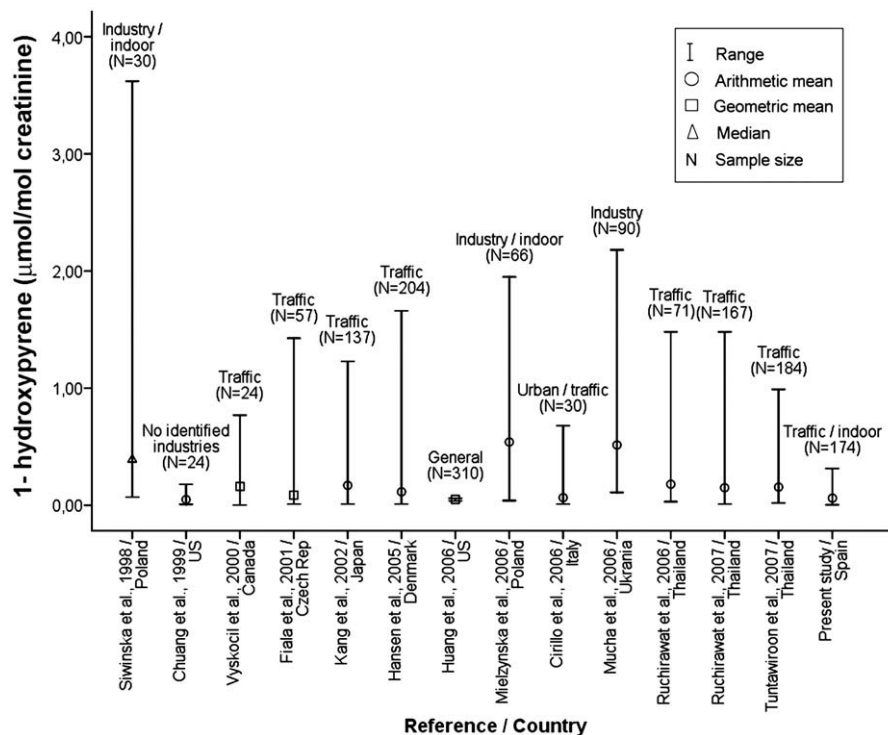


Fig. 2 – Review of reported children's 1-OHP concentrations.

2006), underlining the need to take into consideration the geographic area of studies.

There most important limitation in this study of chronic exposure to air pollution is that 1-OHP reflects short-term exposure and may be less reliable as an indicator of prolonged exposure to PAH. Because of the absence of direct environmental data on PAH concentrations, exposure was indirectly assessed by using predicted NO₂ concentrations at children's residences and analysing factors proposed to be related to PAH sources. Another important study limitation is that dietary exposure was not evaluated. Several studies have found that diet is the most significant contributor (about 90%) to PAH intake in children (Vyskocil et al., 1997, 2000; Fiala et al., 2001) and, consequently, to their 1-OHP levels. However, others have indicated that traffic density, industry or other sources of ambient air pollution play a major role in exposure assessment to PAH in children (Kanoh et al., 1993; Chuang et al., 1999; Hansen et al., 2005; Mucha et al., 2006). In the present study, 1-OHP levels were associated with pollution from traffic in the urban area, passive smoking and cooking with gas, suggesting that the contribution of air pollution to PAH intake in these children may not be negligible. Nevertheless, the possible influence of diet on 1-OHP in the study sample may have contributed to the absence of stronger associations with air pollution.

Account should also be taken of children's exposure to PAH through ingestion of contaminated soil, especially in young children playing outside near heavy traffic or industrial sources (Tang et al., 2006). In the present study, lower levels of traffic-related air pollution in the rural area may lead to lower AH deposition in soil and a lesser intake of PAH by this route in the rural versus urban children.

According to our findings, indoor sources and traffic-related air pollution may influence 1-OHP excretion, which has been proposed as a good marker of exposure to PAH and air pollution. Urinary 1-OHP levels were associated with predicted residential exposure to NO₂ and with traffic density in children living with non-smokers, suggesting that ETS exposure should be considered a confounding factor in this type of exposure.

Given the ubiquitous presence of PAH in the environment and their effects on children's development, wide research efforts are warranted into the biomonitoring of exposure to low environmental levels of PAH during vulnerable periods, e.g., pregnancy and childhood, and its possible association with adverse health effects.

Acknowledgement

We thank Richard Davies for editorial assistance. This research was supported by grants from the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (SAS-0183/2007), Spanish Ministry of Health (FIS-07/0252) and the EU Commission (CONTAMED FP7-ENV-212502).

REFERENCES

- Becker K, Conrad A, Kirsch N, Kollasa-Gehring M, Schulz C, Seiwert M. GerES IV: time trends in exposure of German children to PAHs, cotinine, PCP, and heavy metals. ISEA 2006, Paris, France, Abstract Book; 2006. p. 44. 2–6 September.
- Castaño-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 2004;61:e12.
- Casteleyn L, van Tongelen B, Reis F, Polcher A, Joas R. Human biomonitoring: towards more integrated approaches in Europe. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:199–200.
- Chetinyanukornkul T, Toriba A, Kameda T, Tang N, Hayakawa K. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem* 2006;386(3):712–8.
- Chuang JC, Callahan PJ, Lyu CW, Wilson NK. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1999;9:85–98.
- Cirillo T, Montuori P, Mainardi P, Russo I, Triassi M, Amodio-Cocchieri R. Multipathway polycyclic aromatic hydrocarbon and pyrene exposure among children living in Campania (Italy). *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2006;41:2089–107.
- Crosignani P, Tittarelli A, Borgini A, Codazzi T, Rovelli A, Porro E. Childhood leukemia and road traffic: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 2004;108:596–9.
- Domingo JL, Schuhmacher M, Agramunt MC, Müller L, Neugebauer F. Levels of metals and organic substances in blood and urine of workers at a new hazardous waste incinerator. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:263–9.
- Espulgues A, Fernández-Patier R, Aguilera I, Íñiguez C, García S, Aguirre A. Exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo y desarrollo prenatal y neonatal: protocolo de investigación en el proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente). *Gac Sanit* 2007;21:162–71.
- Fernandez MF, Olmos B, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, et al. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2007;115:8–14.
- Fiala Z, Vyskocil A, Krajak V, Viau C, Ettlerova E, Bukac J. Environmental exposure of small children to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:411–20.
- Gilbert NL, Viau C. Biological monitoring of environmental exposure to PAH in the vicinity of a Soderberg aluminium reduction plant. *Occup Environ Med* 1997;54:619–21.
- Grainger J, Huang W, Li Z, Edwards S, Walcott C, Smith C. Polycyclic aromatic hydrocarbon reference range levels in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites. *Polycycl Aromat Compd* 2005;25:47–65.
- Hansen AM, Raaschou-Nielsen O, Knudsen LE. Urinary 1-hydroxypyrene in children living in city and rural residences in Denmark. *Sci Total Environ* 2005;347:98–105.
- Hansen AM, Mathiesen L, Pedersen M, Knudsen LE. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies—a review. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:471–503.
- Hastie TL, Tisbhirani RJ. Generalized additive models. London: Chapman and Hall; 1990.
- Hochadel M, Heinrich J, Gehring U, Morgenstern V, Kuhlbusch T, Link E. Predicting long-term average concentrations of traffic-related air pollutants using GIS-based information. *Atmos Environ* 2006;40:542–53.
- Huang W, Caudill SP, Grainger J, Needham LL, Patterson Jr DG. Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on US reference range values. *Toxicol Lett* 2006;163:10–9.
- IARC. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, chemical, environmental and experimental data. IARC monographs on

- the evaluation of the carcinogenicity risk of chemical to humans, vol. 32. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1983.
- IARC. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC monographs on the evaluations of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 46. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1989.
- IARC. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their effects on human health. International Agency for Research on Cancer; 2003.
- IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the evaluations of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 83. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2004.
- Jerrett M, Arain A, Kanaroglou P, Beckerman B, Potoglou D, Sahuvaroglu T. A review and evaluation of intraurban air pollution exposure models. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005;15:185–204.
- Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ* 1997;199:141–9.
- Kanoh T, Fukuda M, Onozuka H, Kinouchi T, Ohnishi Y. Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in environment. *Environ Res* 1993;62:230–41.
- Kim JH, Kim JK, Son BK, Oh JE, Lim DH, Lee KH. Effects of air pollutants on childhood asthma. *Yonsei Med J* 2005;46:239–44.
- Knox EG. Oil combustion and childhood cancers. *J Epidemiol Community Health* 2005;59:755–60.
- Kollosa-Gehring M, Becker K, Conrad A, Lüdecke A, Riedel S, Seiwert M. German Environmental Survey for Children (GerES IV): first results. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:535–40.
- Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 2000;11:64–70.
- Levin JO. First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in man—summary and conclusions. *Sci Total Environ* 1995;163:164–8.
- Lewtas J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res* 2007;636:95–133.
- Llop S, Ballester F, Estarlich M, Ibarluzea, Manrique A, Rebagliato M, et al. Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and life style factors in pregnant women. *Sci Total Environ* 2008;407:97–104.
- Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, Salvatierra M, Olea-Serrano F, Olea N. Biomonitoring of environmental estrogens in human tissues. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:429–32.
- Mari M, Borrajo MA, Schuhmacher M, Domingo JL. Monitoring PCDD/Fs and other organic substances in workers of a hazardous waste incinerator: a case study. *Chemosphere* 2007;67:574–81.
- Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L, Szyfter K, Knudsen LE, Merlo DF. The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis* 2006;21:295–304.
- Mucha AP, Hryhorczuk D, Serdyuk A, Nakonechny J, Zvinchuk A, Erdal S. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in 3-year-old Ukrainian children. *Environ Health Perspect* 2006;114:603–9.
- Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, Grimalt J, Marco A, Olea N. Child health and the environment: the INMA Spanish study. *Paediatr perinat epidemiol* 2006;20:403–10.
- Rogger WF, Hildemann LM, Mazuerk MA, Cass GR, Simoneit BRT. Sources of fine organic aerosol. 5. Natural gas home appliances. *Environ Sci Technol* 1993;27:2736–44.
- Ruchirawat M, Settachan D, Navasumrit P, Tuntawiroon J, Autrup H. Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicol Lett* 2007;168:200–9.
- Schuhmacher M, Domingo JL, Agramunt MC, Bocio A, Müller L. Biological monitoring of metals and organic substances in hazardous-waste incineration workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:500–6.
- Schwartz J. Air pollution and children's health. *Paediatrics* 2004;113:1037–43.
- Siwinska E, Mielzynska D, Smolik E, Bubak A, Kwapulinski J. Evaluation of intra and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Total Environ* 1998;217:175–83.
- Siwinska E, Mielzynska D, Bubak A, Smolik E. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. *Mutat Res* 1999;445:147–53.
- Straif K, Bann R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V, et al. Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying. *Lancet Oncol* 2006;7:977–8.
- Tang XY, Tang L, Zhu YG, Xing BS, Duan J, Zheng MH. Assessment of the bioaccessibility to polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an in vitro test. *Environ Pollut* 2006;140(2):279–85.
- Tuntawiroon J, Mahidol C, Navasumrit P, Autrup H, Ruchirawat M. Increased health risk in Bangkok children exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons from traffic-related sources. *Carcinogenesis* 2007;28:816–22.
- van Wijnen JH, Slob R, Liedekerken-Jongmans G, van de Weerd RH, Woudenberg F. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among Dutch children. *Environ Health Perspect* 1996;104:530–4.
- Vyskocil A, Fiala Z, Fialova D, Krajak V, Viau C. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum Exp Toxicol* 1997;16:589–95.
- Vyskocil A, Fiala Z, Chenier W, Krajak L, Ettlerova E, Bukac J. Assessment of multipathway exposure of small children to PAH. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000;8:111–8.
- Wilhelm M, Hardt J, Schulz C, Angerer J. New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1- and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: basis for validation of human biomonitoring data and environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:447–53.

4.

*Association of traffic-related air pollution with
cognitive development in children*

(Asociación de la exposición a contaminación atmosférica procedente del
tráfico con el desarrollo cognitivo infantil)

Accepted: April 2009, Journal of Epidemiology and Community Health

**ASSOCIATION OF TRAFFIC-RELATED AIR POLLUTION WITH
COGNITIVE DEVELOPMENT IN CHILDREN**

Carmen Freire¹, Rosa Ramos¹, Raquel Puertas¹, Maria-Jose Lopez-Espinosa^{1,2},
Jordi Julvez³, Inmaculada Aguilera³, Francisco Cruz⁴, Mariana-Fatima
Fernández¹, Jordi Sunyer^{3,5}, Nicolas Olea¹.

¹Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital,
University of Granada, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP),
18071 Granada, Spain.

²Center for Research on Public Health (CSISP), Conselleria de Sanitat,
Generalitat Valenciana, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP),
46020 Valencia, Spain.

³Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Municipal
Institute of Medical Research (IMIM-Hospital del Mar), CIBER de Epidemiología
y Salud Pública (CIBERESP), 08003 Barcelona, Spain.

⁴Department of Personality, Evaluation and Psychological Treatment, School of
Psychology, University of Granada, 18011 Granada, Spain.

⁵Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08003 Barcelona, Spain.

Corresponding author: Carmen Freire, Laboratory of Medical Investigations,
San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

Telephone: +34 958 242864; Fax: +34 958 249953; E-mail: cfreire@ugr.es

Keywords: traffic-related air pollution; cognitive development; children; land use regression.

HEADERS

	Page
Abstract	4
Introduction	5
Methods	6
<i>Study population</i>	6
<i>Study area</i>	7
<i>NO₂ exposure</i>	7
<i>Neuropsychological assessment</i>	9
<i>Covariates</i>	10
<i>Statistical analysis</i>	11
Results	12
Discussion	14
“What this paper adds” box	18
Acknowledgments	19
Licence statement	19
References	20
Table legends	26
Tables	27

ABSTRACT

Background: Air pollution from traffic has been associated with cardiorespiratory diseases in children and adults, but there is little information on its potential neurotoxic effects. This study aimed to investigate the association between exposure to NO₂, as a marker of traffic-related air pollution, and cognitive development in children.

Methods: A population-based birth cohort from Southern Spain was followed up from the age of 4 yrs for one year. Complete data for analyses were gathered on 210 children living in urban and rural areas. NO₂ exposure was predicted by means of land use regression models. A standardized version of the McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA) was used to assess children's motor and cognitive abilities. Multivariate analyses were performed to evaluate the relation between exposure to NO₂ and MSCA outcomes, adjusting for potential confounders.

Results: A negative effect of NO₂ was found across all MSCA sub-scales, despite low predicted NO₂ exposure levels (5-36 µg/m³). Children exposed to higher NO₂ (>24.75 µg/m³) showed a decrease of 4.19 points in the general cognitive score and decreases of 6.71, 7.37 and 8.61 points in quantitative, working memory and gross motor areas, respectively. However, except for gross motor function, associations were not statistically significant.

Conclusion: Although results were not statistically significant, the associations found between exposure to NO₂ and cognitive functions suggest that traffic-related air pollution may have an adverse effect on neurodevelopment, especially early in life, even at low exposure levels.

INTRODUCTION

Air pollution is associated with a number of short- and long-term adverse respiratory and cardiovascular health effects.[1, 2] These effects have largely been related to exposure to fine and ultrafine particles,[3] whose main source in urban air is transportation emissions. Epidemiological studies have repeatedly found a positive correlation between particulate air pollution levels and increased morbidity and mortality rates in children and adults.[3, 4] Exposure to traffic-related air pollution early in life has been associated with increased risk of infant mortality, adverse reproductive outcomes, cancer, development of atopy and asthma and other adverse respiratory effects.[5]

Animal studies have shown that inhaled particles can be translocated from the respiratory system directly to the central nervous system, evidencing that the brain is a target for airborne particulate matter.[6, 7] In children and adults residing in large urban areas, exposure to severe air pollution has been associated with pathologic lesions in brain tissues,[8, 9] and children are at special risk since childhood is a crucial period of brain development. Nevertheless, only two studies have examined the relation between chronic exposure to traffic-related air pollution and infant cognitive development. Thus, Calderón-Garcidueñas et al.[10] reported that children with no known risk factors for cognitive disorders from a polluted urban environment (Mexico City) exhibited significant deficits in a combination of cognition tasks. A prospective birth cohort study by Suglia et al.[11] in Boston (USA) reported a relationship between exposure to black carbon

(major component of particles from traffic) and reduced neurocognitive functioning in urban 8 to 11-yr-old children. Given these findings and the scarce information on the neurotoxic effect of air pollution in humans, there is a need to further investigate the possible association between air pollution and neurodevelopmental disorders.

The aim of this study was to investigate the association of exposure to NO₂, as a surrogate for traffic-related air pollution, with cognitive development at the age of 4 yrs in a birth cohort in Southern Spain, controlling for socio-demographic, physical and psychological determinants of this outcome.

METHODS

Study population

The study sample was drawn from a cohort established in Granada province (Southern Spain)[12] as part of the INMA (Environment and Childhood) study, a population-based cohort study in Spain that focuses on prenatal environmental exposures in relation to growth, development and health from early foetal life until childhood.[13] From October 2000 to August 2002, 700 eligible mother-son pairs registered at the San Cecilio University Hospital of Granada were recruited. The inclusion and exclusion criteria were published elsewhere.[14] In the INMA study protocol, the medical follow-up of the children at the age of 4 yrs included a neuropsychological evaluation. Briefly, between September 2005 and September 2006, 1 out of 3 mothers (n=250) were randomly contacted by

phone and invited to participate in the neurocognitive testing of the children. A total of 220 (88%) boys were evaluated over this 1-year period. Complete outcome data, information on exposure and other variables were available for a subset of 210 subjects. Written informed consent was obtained from parents of children before the study, which was approved by the Ethics Committee of the San Cecilio University Hospital.

Study area

The study area was the health district of San Cecilio University Hospital of Granada, which has a total population of 512,000 inhabitants, a surface area of 4,000 km², and includes the city of Granada (236,000 inhabitants, 87.8 km² and altitude of 740 m) and 50 towns and villages. The children's residence was classified by dividing the study area into four sub-areas: a) urban area, corresponding to the central districts of the city, with high population and traffic densities, b) metropolitan area, towns within the ring road surrounding Granada, c) sub-urban area, towns and villages with more than 10,000 inhabitants and d) rural area, where population resides mainly in small villages (<5,000 inhabitants). For modelling purposes, study sub-areas were collapsed into two categories: urban area (sub-area "a") and non-urban area (sub-areas "b-d").

NO₂ exposure

Home outdoor NO₂ levels were estimated as a proxy of individual exposure to traffic-related air pollution. Following a GIS-based methodology previously applied in the INMA study by Aguilera et al.[15], a land use regression

(LUR) model[16] was built using NO₂ measurements from 76 sampling locations. Twenty-six monitoring sites were located in the city (urban area) and 50 in each town centre in the non-urban area.

Sampling was done in two 7-day periods (November 2005 and September 2006) during the same year as the evaluation of the children. Ambient NO₂ was monitored using Radiello® passive samplers (Environmental Research Centre, S. Maugeri Foundation, Padova, Italy), and concentrations were determined at the “Centro Nacional de Sanidad Ambiental” of the “Instituto de Salud Carlos III” (Madrid, Spain). The average of the two sampling periods represented annual mean NO₂ levels.[17] Mean NO₂ concentration at the measurement sites was 20.75 µg/m³ (range, 3.25-59 µg/m³).

LUR technique was used to predict home outdoor concentration of NO₂ at children’s home addresses (n=220), using the mean annual NO₂ level at each sampling site as dependent variable. Two different models were obtained for the urban and non-urban areas (data not shown). Four categories of geographic data were collected: land use (urban, residential, industrial or agricultural), altitude of sampling site, road type (major, secondary or minor/residential roads) and length, and population density. Predictors included in the urban model were road type at a given location and percentage of residential land cover within a 200-m buffer zone around a given site. In the LUR model for the non-urban area, universal *kriging* technique was first used to obtain a smoothed surface for global trend of NO₂ concentration, and the predictors were the *kriging*-estimated value at a given

location and road length within a 1,500-m buffer zone. The adjusted R^2 value was 0.45 for the urban area and 0.75 for the non-urban area. A cross-validated R^2 of 0.64 was found between the mean annual NO_2 measurement for the whole study area and the corresponding predictions obtained from fitting the model to the data. Children's home addresses at the age of 4 yrs were geocoded and assigned a NO_2 estimate using the corresponding LUR model (urban or non-urban). The predicted annual mean NO_2 concentration at the addresses of the 210 children was $20.88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (range, $5.15\text{-}36.09 \mu\text{g}/\text{m}^3$). There were no differences between children with complete cognitive measures ($n=210$) and those without ($n=10$).

Neuropsychological assessment

Cognitive and motor abilities were assessed by means of a standardized Spanish adaptation of the McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA),[18] which gives standardized test scores for five domains (quantitative, verbal, memory, perceptual-performance and motor). A general cognitive score, which estimates global intellectual function, was calculated by combining the verbal, perceptual-performance and quantitative scores. A higher score indicates a better performance. Two neuropsychologists were trained to administer and interpret the MSCA, which was carried out at the Paediatrics Department of our hospital. A strict protocol was applied to avoid inter-observer variability.[19] At the same time as the children were evaluated, the parents completed a self-reported questionnaire on parent-to-infant attachment and another on mental health, considered as effect modifiers on infant mental developmental.[20] The parent-to-

infant attachment questionnaire consists of 19 items that assess the emotional bond of affection experienced by the parent towards the infant.[21] The General Mental Health Questionnaire (GHQ) is designed to identify psychological distress and short-term changes in mental health in community and primary care settings and the 12-item version was used.[22] Staff involved in the neuropsychological testing were blinded to the degree of the child's exposure to air pollution.

In accordance with previous INMA studies,[19, 23] MSCA items were reorganized into sub-scales for tasks highly associated with specific neurocognitive functions as follows: verbal memory (MSCA items 3 and 7II), working memory (MSCA items 5 and 14II), memory span or short-term memory (MSCA items 6, 7I and 14I), gross motor (MSCA items 9, 10 and 11), fine motor (MSCA items 12 and 13) and executive (MSCA items 2, 5, 6, 14II, 15, 17 and 18) functions.

Covariates

Information on the characteristics of the study population was obtained by means of standardized questionnaires administered by trained interviewers at enrolment (after delivery) and at the 4-yr follow-up visit. Socio-demographic covariates in the present analysis included place of residence, maternal and paternal education, maternal occupational status, parity, duration of breastfeeding, type of delivery, marital status, smoking during pregnancy and age of mothers and children. Information on birth weight and length and gestational age (physical covariates) was gathered by the paediatricians responsible for recruitment.

Parents' mental health scale scores and parent-to-infant attachment scale scores were used as psychological covariates (Table 1).

Statistical analysis

Except for working memory function, neurodevelopment scores followed a normal distribution and were treated as continuous variables. Working memory was transformed into a normally distributed variable by applying the formula $1/(x)^3$, inversely transforming the outcome coefficients after the multivariate models were fitted. Neurodevelopmental outcomes were standardized to a mean of 100 points with a standard deviation of 15 to homogenize all scales. Predicted NO₂ for the 210 children did not follow a normal distribution and was categorized into three groups according to tertile values (≤ 15.40 , $>15.40-24.75$, >24.75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Linear regression analysis was used to examine maternal, paternal and child variables in relation to NO₂ exposure levels.

Multivariate regression analyses were used to estimate the effect of NO₂ exposure on cognitive functions. Separate models were run to control for possible confounding factors. A "crude" model was obtained for the general cognitive score after adjusting for the children's age, the psychologist, and the school term in which the test was administered. Then, the influence of physical variables and *in utero* exposure to tobacco was assessed. A fully-adjusted model was obtained by adjusting for these variables and socio-demographic and psychological variables. Covariates were included in the model if their inclusion modified the estimate of NO₂ effect on neurodevelopment by $\geq 10\%$, regardless of their

statistical significance. The same models were constructed for all psychological scores. Potential interaction between levels of exposure and parental education was assessed and retained in the model if it modified the NO₂ effect on cognitive development by $\geq 10\%$. SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and STATA version 9.0 software packages were used for the analyses.

RESULTS

Table 1 lists the characteristics of the study population as a function of predicted exposure to NO₂ during the study period. A higher predicted NO₂ exposure level was found in urban (29.71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) *versus* non-urban (9.17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) children ($p \leq 0.001$). In bivariate analysis, covariates associated ($p \leq 0.10$) with exposure to NO₂ were: place of residence at age 4 ($p \leq 0.001$, coefficient $\beta = 4.74$, 15.54 and 20.61 for sub-urban, metropolitan and urban areas, respectively), birth weight ($p = 0.06$, $\beta = 0.002$), maternal education ($p = 0.02$, $\beta = -5.15$ for “only primary school”; $p = 0.03$, $\beta = -3.60$ for “secondary school”), paternal education ($p \leq 0.001$, $\beta = -8.78$ for “only primary school”; $p = 0.02$, $\beta = -3.69$ for “secondary school”), maternal occupation ($p = 0.006$, $\beta = 3.28$), maternal marital status ($p = 0.09$, $\beta = 7.31$), and paternal mental health score ($p = 0.08$, $\beta = 0.01$).

Table 2 shows MSCA cognitive measures as a function of NO₂ exposure. Bivariate analysis showed that exposure to NO₂ $> 24.75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ was significantly associated with general cognitive ($p = 0.05$, $\beta = 4.94$) and perceptual-performance scores ($p = 0.04$, $\beta = 5.22$), taking as reference the group of children exposed to NO₂

<15.40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. When NO_2 was treated as a continuous variable, associations were found for general cognitive ($p=0.02$, $\beta=0.27$), perceptual-performance ($p=0.01$, $\beta=0.29$) and motor areas ($p=0.05$, $\beta=0.44$).

Table 3 shows crude and adjusted effects of NO_2 exposure on the general cognitive score. In the crude model, a positive association was found with exposure to $\text{NO}_2 >24.75 \mu\text{g}/\text{m}^3$. A similar tendency and strength of association were shown when adjusting for birth weight and length, gestational age and smoking during pregnancy. Importantly, a negative effect of NO_2 was seen after adjustment for these variables and socio-demographic and psychological characteristics, although associations were not statistically significant. Exposure to higher $\text{NO}_2 (>24.75 \mu\text{g}/\text{m}^3)$ had a negative effect on the general cognitive score (-4.19 points). A lower effect was seen for children exposed to NO_2 in the range 15.40-24.75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (-1.07 points). The interaction between exposure level and parental education did not attenuate the effect of exposure on cognitive scores.

Fully-adjusted models for the remaining cognitive outcomes are shown in Table 4. Predicted exposure to NO_2 was negatively associated with all MSCA areas except for fine motor skills. The magnitude of the effect was stronger for gross motor function, working memory and quantitative skills. Exposure to NO_2 in the range 15.40-24.75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and exposure higher than 24.75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ were related to decreases of -8.30 ($p=0.08$) and -8.61 points ($p=0.10$) in gross motor function, respectively.

DISCUSSION

Predicted exposure to ambient NO₂ was negatively associated with cognitive development of 4-yr-olds in the cross-sectional fully-adjusted analysis of this cohort study. Although results were not statistically significant, the associations found suggest that traffic-related air pollution may have a detrimental effect on neurodevelopment. The study area has little industrial activity, and vehicle traffic appears to be the main source of air pollution, chiefly in the city and towns near main roads. Predicted outdoor NO₂ at child's home locations was used as a marker of exposure to air pollution, which was associated with decreases across all cognitive functions after adjustment for confounding variables. Association was stronger for gross motor function, especially in children with higher exposure to NO₂ (upper tertile). The association found with gross motor function may be explained by the earlier development of the brain regions involved in motor performance (e.g., coordination, balance, posture control) compared with those involved in learning, memory and language.[24] Hence, deficits in gross motor skills may be detectable before other deficits in cognitive function.[25] Psychological follow-up of these children is currently under way to test this proposition.

Unlike the investigation by Suglia et al.,[11] the present study was conducted in two well-differentiated sub-areas (urban/rural). The small number of subjects from each area and the relatively low exposure levels may have limited the potential of the study and contributed to the absence of stronger associations

with reductions in cognitive scores. Compared with ambient NO₂ and predicted exposure levels described in other Spanish urban areas,[15, 26] Granada is not a highly air polluted area, and none of the predicted NO₂ concentrations (5-36 µg/m³) exceeded the annual mean limit value of 40 µg/m³ set by the European Commission for human health protection.[27] Another limitation is the potential misclassification of exposure, since children's exposure was based on estimated concentrations at their home location and commuting patterns were not considered, which could lead to a bias in the exposure measurement. Nevertheless, NO₂ exposure assignment was based on extensive field measurements, and individual exposure levels were predicted by the LUR technique, considered a valuable approach for estimating spatial patterns of traffic-related pollution[16] and increasingly used for exposure assessment.[28, 29] Moreover, as indicated by time-activity studies,[30] children spend most of their time at home and near home, and residential indoor concentrations of NO₂ of outdoor origin are highly correlated with outdoor concentrations.[31] Data in the present study did not allow us to control for pollutants that may be found indoors, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental tobacco smoke (ETS), which could also affect children's neurodevelopment.[32]

Despite the study limitations, our findings are in agreement with the only two studies[10, 11] that previously examined the impact of air pollution on children's cognition. Suglia et al.[11] found that exposure to black carbon predicted a 3-point decrease in the Kaufman Brief Intelligence Test intelligence

quotient and 4-point decrease in the Wide Range Assessment of Memory and Learning Test general index. They also estimated exposure to black carbon by using LUR modelling. In the other study, Calderón-Garcidueñas et al.[10] reported a negative impact of air pollution on fluid cognition, memory and executive functions on the Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised. The results of these studies are comparable to our findings, despite being carried out in larger urban areas with higher air pollution levels. Thus, in the present study, exposure to higher air pollution was associated with 4-point decrease in the MSCA general cognitive score. The instruments used in the previous and present studies have been described as reliable and well-standardized child tests that facilitate comparisons among them.[33]

Strengths of this study include its inclusion of inner-city and rural settings, allowing comparisons between children with different exposures. Moreover, account was taken of physical and socio-demographic factors signalled as potential confounders in previous studies.[34] Thus, we controlled for socioeconomic status (inferred from home address, educational level and maternal occupation status) and for parental attachment and distress. Very few studies on exposure to environmental neurotoxicants and cognitive development in children have measured parental psychological characteristics, such as maternal intelligence or mental health.[34, 35]

Besides the well-documented association between brain damage and particulate air pollution, cognitive impairment has also been related to exposure

to other urban airborne pollutants with neurodevelopmental toxicity, such as PAHs[35, 36] or manganese,[37] as well as to traffic noise.[38] Hence, it is biologically plausible to assume that air pollution can adversely affect brain development in children exposed to contaminants that are commonly present in urban areas (e.g., particles, PAHs).[35] This hypothesis is supported by the recent finding of an association between lung function and cognition,[39] indicating that both outcomes may operate under common regulatory processes and share vulnerability to environmental factors. Although NO₂ appears unlikely to represent the causal agent at ambient concentrations, it is an appropriate marker for traffic pollution, which correlates well with numerous other components of automobile emissions.[40]

Given the increasing reports on the neurotoxic effects of particulate air pollution, it is important not only to understand the potential mechanisms underlying these effects but also to investigate whether air pollution can affect the developing brain and adversely affect cognition. The present results suggest that air pollution associated with vehicular traffic may have a negative effect on infant cognitive development, even at low exposure levels, supporting demands for the implementation of preventive measures.

“WHAT THIS PAPER ADDS” BOX

What is already known?

- Air pollution from traffic has been associated with cardiorespiratory diseases in children, but there is little information to date on its potential neurotoxic effects.
- Only two studies have shown an association between traffic pollution and cognition in children.
- Given the ubiquitous presence of traffic-related air pollution, there is a need to further investigate whether air pollution can affect the developing brain and impair children’s cognitive development.

What this paper adds?

- This is one of the few available studies evaluating the association between air pollution and cognitive development in children.
- This study suggests that exposure to higher NO₂ may have a negative effect on cognition, especially early in life, even at low exposure levels.
- Epidemiological studies on the effects of urban air pollution on children’s development should consider potential neurological damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Richard Davies for editorial assistance. The results would not have been achieved without the selfless collaboration of the study participants and of staff at the Paediatric Department of San Cecilio University Hospital and at the Environmental Health Department of the Granada Metropolitan Health District.

LICENCE STATEMENT

“The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Journal of Epidemiology and Community Health and any other BMJ PGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://jech.bmj.com/ifora/licence.pdf>)”

REFERENCES

1. Götschi T, Heinrich J, Sunyer J, *et al.* Long-term effects of ambient air pollution on lung function: a review. *Epidemiology* 2008;19:690-701.
2. Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:719-26.
3. Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132-41.
4. Heinrich J, Slama R. Fine particles, a major threat to children. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:617-22.
5. Schwartz J. Air pollution and children's health. *Pediatrics* 2004;113:1037-43.
6. Kleinman MT, Araujo JA, Nel A, *et al.* Inhaled ultrafine particulate matter affects CNS inflammatory processes and may act via MAP kinase signaling pathways. *Toxicol Lett* 2008;178:127-30.
7. Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, *et al.* Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol* 2006;3:13. Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, *et al.* Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* 2004;32:650-8.
8. Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, *et al.* Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered

- innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol* 2008b;36:289-310.
9. Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Ontiveros E, *et al.* Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition* 2008a;68:117-27.
 10. Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, *et al.* Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 2008a;167:280-6.
 11. Freire C, Abril A, Fernandez MF, *et al.* Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children. *Sci Total Environ* 2009;407:1562-9.
 12. Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, *et al.* Child health and the environment: the INMA Spanish study. *Paediatric Perinatal Epidemiol* 2006;20:403-10.
 13. Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, *et al.* Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta* 2007;28:631-8.
 14. Aguilera I, Sunyer J, Fernández-Patier R, *et al.* Estimation of outdoor NO_x, NO₂, and BTEX exposure in a cohort of pregnant women using land use regression modeling. *Environ Sci Technol* 2008;42:815-21.
 15. Briggs DJ, de Hoogh C, Gulliver J, *et al.* A regression-based method for mapping traffic-related air pollution: application and testing in four

- contrasting urban environments. *Sci Total Environ* 2000;253:151-67.
16. Lebet E, Briggs D, van Reeuwijk H, *et al.* Small area variations in ambient NO₂ concentrations in four European areas. *Atmos Environ* 2000;34:177-85.
 17. McCarthy D. Manual for the McCarthy Scales of Children's Abilities. New York, NY: Psychological Corporation, 1972. (Spanish adaptation: Madrid, Spain. TEA Ediciones, S.A., 1996).
 18. Julvez J, Ribas-Fitó N, Torrent M, *et al.* Maternal smoking habits and cognitive development of children at age 4 years in a population-based birth cohort. *Int J Epidemiol* 2007;36:825-32.
 19. Jacobson JL, Jacobson SW. Methodological issues in research on developmental exposure to neurotoxic agents. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:395-406.
 20. Condon JT, Corkindale CJ. The assessment of parent-to-infant attachment: development of a self-report questionnaire instrument. *J Reproductive and Infant Psychology* 1998;16:57-76.
 21. Goldberg D, Williams P. A user's guide to the General Health Questionnaire. Windsor, 1988. UK: NFER-Nelson.
 22. Ribas-Fitó N, Torrent M, Carrizo D, *et al.* In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *Am J Epidemiol* 2006;164:955-62.
 23. Hughes D, Bryan J. The assessment of cognitive performance in children:

- Considerations for detecting nutritional influences. *Nutr Rev* 2003;61:413-22.
24. Hadders-Algra M. The neuromotor examination of the preschool child and its prognostic significance. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2005;11:180-8.
25. Ballester F, Iñiguez C, Estarlich M, *et al.* Residential outdoor NO₂ levels during pregnancy and birth weight and length in the INMA cohort in Valencia, Spain. ISEE-ISEA 2008, Pasadena, USA, 12-16 October 2008. Abstract Book, p. 652.
26. EC. Council Directive 1999/30/EC of 22 April 1999 relating to limit values for sulphur dioxide, nitrogen dioxide and oxides of nitrogen, particulate matter and lead in ambient air. Brussels, Belgium.1999.
27. Henderson SB, Beckerman B, Jerrett M, *et al.* Application of land use regression to estimate long-term concentrations of traffic related nitrogen oxides and fine particulate matter. *Environ Sci Technol* 2007;41:2422-8.
28. Brauer M, Hoek G, van Vliet P, *et al.* Estimating long-term average particulate air pollution concentrations: application of traffic indicators and geographic information systems. *Epidemiology* 2003;14:228-39.
29. Liu L-J, Box M, Kalman D, *et al.* Exposure assessment of particulate matter for susceptible populations in Seattle. *Environ Health Perspect* 2003;111:909-18.
30. Levy JI, Lee K, Spengler JD, *et al.* Impact of residential nitrogen dioxide exposure on personal exposure: an international study. *J Air & Waste*

- Manage Assoc* 1998;48:553-60.
31. Herrmann M, King K, Weitzman M. Prenatal tobacco smoke and postnatal secondhand smoke exposure and child neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:184-90.
 32. Ribas-Fitó N, Sala M, Kogevinas M, *et al.* Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review. *J Epidemiol Community Health* 2001;55:537-46.
 33. Mink PJ, Goodman M, Barraj LM, *et al.* Evaluation of uncontrolled confounding in studies of environmental exposures and neurobehavioral testing in children. *Epidemiology* 2004;15:385-93.
 34. Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, *et al.* Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ Health Perspect* 2006;114:1287-92.
 35. Jedrychowski W, Whyatt RM, Camann DE, *et al.* Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *Int J Occup Med Environ Health* 2003;16:21-9.
 36. Zoni S, Albin E, Lucchini R. Neuropsychological testing for the assessment of manganese neurotoxicity: a review and a proposal. *Am J Ind Med* 2007;50:812-30.
 37. Stansfeld SA, Berglund B, Clark C, *et al.* Aircraft and road traffic noise

- and children's cognition and health: a cross-national study. *Lancet* 2005;365:1942-9.
38. Suglia SF, Wright RO, Schwartz J, *et al.* Association between lung function and cognition among children in a prospective birth cohort study. *Psychosom Med* 2008b;70:356-62.
39. Beckerman BS, Jerrett M, Brook JR, *et al.* Correlation of nitrogen dioxide to other traffic pollutants near a major expressway. *Atmos Environ* 2008;42:275-90.

TABLE LEGENDS

Table 1. Characteristics of study population by exposure to NO₂ in the cohort INMA-Granada, 2000-2006.

Table 2. McCarthy Scale scores by exposure to NO₂ (n=210) in the cohort INMA-Granada, 2000-2006.

Table 3. Adjusted effects of exposure to NO₂ (µg/m³) on child's general cognitive score of McCarthy Scales at 4 years of age (Granada, n=210).

Table 4. Fully-adjusted associations of the different cognitive sub-areas of McCarthy Scales with exposure to NO₂ (µg/m³) for the INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 1. Characteristics of study population by exposure to NO₂ in the cohort

INMA-Granada, 2000-2006.

(Sample size at age 4 years, n)	Exposure to NO ₂ (µg/m ³)			
	<15.40 (68)	15.40-24.75 (70)	>24.75 (72)	All (210)
Covariates from birth to 4th year				
Place of residence at age 4 (%)				
Rural (R)	45.6	0.0	1.4	15.2
Sub-urban	50.0	12.9	0.0	20.5***
Metropolitan	4.4	74.3	63.9	48.1***
Urban	0.0	12.9	34.7	16.2***
CHILD				
Birth weight (kg) (mean)	3.3	3.2	3.4	3.3*
Birth length (cm) (mean)	50.6	50.8	50.8	50.7
Gestational age (weeks) (mean)	39.3	39.0	39.4	39.2
School term at evaluation (%)				
3 rd year, 3 rd term (R)	32.4	34.3	33.3	33.3
4 th year, 1 st term	26.5	28.6	26.4	27.1
4 th year, 2 nd term	30.9	27.1	29.2	29.0
4 th year, 3 rd term	10.3	10.0	11.1	10.5
Age at evaluation (months) (mean)	51.2	51.5	51.2	51.3
MOTHER				
Educational level (%)				
University (R)	8.8	11.4	22.2	14.3
Secondary school	73.5	67.1	65.3	68.6**
Only primary school	17.6	21.4	12.5	17.1**
Occupation status (%)				
Unemployed (R)	64.7	50.0	37.5	50.5
Employed	35.3	50.0	62.5	49.5**
Parity at child's birth (%)				
0 (R)	47.1	50.0	45.8	47.6
1	35.3	37.1	43.1	38.6
2 or more	17.6	12.9	11.1	13.8
Breastfeeding (%)				
≥ 28 weeks (R)	2.9	2.9	6.9	4.3
16-27.9 weeks	33.8	28.6	37.5	33.3
2-15.9 weeks	33.8	44.3	34.7	37.6
<2 weeks	29.5	10.0	12.5	13.8

Table 1 (continued)

(Sample size at age 4 years, n)	Exposure to NO ₂ (µg/m ³)			
	<15.40 (68)	15.40-24.75 (70)	>24.75 (72)	All (210)
Covariates from birth to 4th year				
Type of delivery (%)				
Vaginal (R)	77.9	72.9	73.6	74.8
Caesarean	11.8	17.1	16.7	15.2
With forceps or other	10.3	10.0	9.7	10.0
Marital status at child age of 4 yrs (%)				
With a stable partner (R)	98.5	100.0	95.8	98.1
Without a stable partner	1.5	0.0	4.2	1.9*
Smoking during pregnancy (%)				
No (R)	80.9	71.4	79.2	77.1
Yes	19.1	28.6	20.8	22.9
Mental health (mean score)†	10.8	11.9	11.3	11.4
Mother-to-infant attachment (mean score)‡	74.4	74.6	73.9	74.3
Age at child's birth (years)	31.7	31.6	32.7	32.0
FATHER				
Educational level (%)				
University (R)	10.3	14.3	23.6	16.2
Secondary school	50.0	65.7	61.1	59.0**
Only primary school	39.7	20.0	11.1	22.9***
Mental health (mean score)†	9.6	10.4	11.2	10.2*
Father-to-infant attachment (mean score)‡	74.4	75.2	73.1	74.5

(R) Reference category

Smoking during pregnancy: at least one cigarette/day in the third trimester.

†Mean score for the General Mental Health scale; a higher score indicates greater psychological distress.

‡Mean score for the Parent-to-infant attachment scale; a higher score indicates a closer bond of affection.

*p-value≤0.10; **p-value≤0.05; ***p-value≤0.001

Table 2. McCarthy Scale scores by exposure to NO₂ (n=210) in the cohort INMA-Granada, 2000-2006.

McCarthy scores (median)†	Exposure to NO ₂ (µg/m ³)			
	<15.40	15.40-24.75	>24.75	All
General cognitive	97.9	100.1	102.4**	100.5**
Perceptual-performance	98.4	100.9	102.2**	100.1**
Verbal	99.9	101.8	103.8	101.8
Memory	96.9	101.2	102.2	101.2
Quantitative	95.3	99.0	102.7	99.0
Motor	101.8	101.8	101.8	101.8**

** p-value ≤ 0.05, in comparison to NO₂ < 15.40 µg/m³

† The mean score for the McCarthy scales is 100, with a standard deviation of 15. A higher score indicates a better performance.

Table 3. Adjusted effects of exposure to NO₂ (µg/m³) on child’s general cognitive score of McCarthy Scales at 4 years of age (Granada, n=210)[§]

General cognitive model	Exposure to NO ₂ (µg/m ³)					
	15.40 - 24.75			> 24.75		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Crude analysis †	3.32	-1.52, 8.15	0.18	4.25	-0.55, 9.05	0.08
Adjusted for BW + BL + GA + smoking during pregnancy	3.25	-1.59, 8.09	0.19	3.63	-1.13, 8.40	0.13
Fully-adjusted model ‡	-1.07	-9.99, 7.85	0.81	-4.19	-14.02, 5.64	0.40

[§]Each row is a different multivariate model taking as reference group “children exposed to <15.40 µg/m³ NO₂”

CI: confidence interval.

†Adjusted for child’s age (months) and school term and evaluator (psychologist).

BW: birth weight (<2,500 g); BL: birth length (<49 cm); GA: gestational age (<37 weeks); smoking during pregnancy: at least one cigarette/day in the third trimester.

‡Adjusted for BW, BL, GA, smoking during pregnancy, place of residence (rural/sub-urban/metropolitan/urban), maternal and paternal educational level, maternal occupational status at child age of 4, maternal marital status, mother’s parity at childbirth (no. of older siblings), breastfeeding (weeks), mother-to-infant attachment score and maternal mental health score.

Table 4. Fully-adjusted associations of the different cognitive sub-areas of McCarthy Scales with exposure to NO₂ (µg/m³) for the INMA-Granada cohort, 2000-2006[§]

Psychological outcomes [†]	Exposure to NO ₂ (µg/m ³)					
	15.40 – 24.75			> 24.75		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Perceptual-performance	0.45	-9.17; 10.06	0.93	-2.17	-12.76; 8.41	0.69
Verbal	-0.25	-9.53; 9.03	0.96	-3.09	-13.31; 7.13	0.55
Quantitative	-4.16	-14.33; 6.02	0.42	-6.71	-17.91; 4.49	0.24
Memory	-2.28	-11.95; 7.38	0.64	-5.52	-16.18; 5.13	0.31
Motor	-3.36	-13.04; 6.31	0.49	-5.30	-15.96; 5.36	0.33
Executive function	-1.93	-10.99; 7.13	0.67	-4.93	-14.90; 5.05	0.33
Memory span	-0.10	-9.61; 9.41	0.98	-3.46	-13.93; 7.01	0.51
Verbal memory	-0.36	-10.61; 9.90	0.95	-2.71	-14.02; 8.59	0.64
Working memory	-5.72	-16.26; 4.83	0.29	-7.37	-18.98; 4.24	0.21
Gross motor	-8.30	-17.69; 1.09	0.08	-8.61	-18.96; 1.74	0.10
Fine motor	3.28	-6.83; 13.40	0.52	0.91	-10.22; 12.05	0.87

[§]Each row is a different fully-adjusted model taking as reference group “children exposed to NO₂ less than 15.40 µg/m³”.

CI: confidence interval.

[†]Mean score for psychological outcomes is 100, with a standard deviation of 15. A higher score indicates a better performance.

5.

*Hair mercury levels, fish consumption,
and cognitive development in preschool children
from Southern Spain*

(Niveles de mercurio en pelo, consumo de pescado y desarrollo cognitivo en niños en edad preescolar del Sureste de la península española)

Submitted: March 10th 2009, Environmental Research journal

HAIR MERCURY LEVELS, FISH CONSUMPTION, AND COGNITIVE DEVELOPMENT IN PRESCHOOL CHILDREN FROM SOUTHERN SPAIN

Carmen Freire¹, Rosa Ramos¹, Maria-Jose Lopez-Espinosa^{1,2}, Sergi Díez³, Jesús Vioque⁴, Ferrán Ballester², Mariana-Fátima Fernández¹.

¹Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 18071 Granada, Spain.

²Center for Research on Public Health (CSISP), Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 46020 Valencia, Spain.

³Environmental Geology Department, ICTJA-CSIC, 08028 Barcelona; Environmental Chemistry Department, IIQAB-CSIC, 08034 Barcelona, Spain.

⁴Department of Public Health, Universidad Miguel Hernandez (UMH), CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 03550 San Juan de Alicante, Spain.

Corresponding author: Carmen Freire, Laboratory of Medical Investigations, San Cecilio University Hospital, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

Telephone: +34 958 242864; Fax: +34 958 249953; E-mail: cfreire@ugr.es

Keywords: Hair mercury; fish consumption; children; cognition; Spain.

Funding

This study was supported by grants from the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía [SAS 07/0133], the Spanish Ministry of Health [FIS 07/0252], Spanish Ministry of Science and Innovation (FPU-Programme to C.F.; Juan de la Cierva Programme-FSE to M.J.L.E.), and the European Commission [CONTAMED FP7-ENV-212502].

Approval by committee for human subjects

Written informed consent was obtained from parents before the study, which was approved by the Ethics Committee of the San Cecilio University Hospital.

HEADERS

	Page
Abstract	4
Introduction	5
Methods	7
<i>Study area and population</i>	7
<i>Mercury exposure</i>	8
<i>Fish consumption</i>	9
<i>Covariates</i>	10
<i>Neuropsychological assessment</i>	10
<i>Statistical analysis</i>	11
Results	13
Discussion	15
<i>Mercury exposure</i>	15
<i>Effects on neurodevelopment</i>	17
<i>Risks and benefits of fish consumption</i>	18
Acknowledgments	19
References	20
Table legends	30
Tables	31

ABSTRACT

The main source of human exposure to mercury is the consumption of fish contaminated with methylmercury, which may adversely affect early neurodevelopment. This study assessed mercury levels in hair of preschoolers in Spain, where fish consumption is elevated, with the aim of investigating the influence of their fish intake and other factors on mercury exposure, and evaluating their association with cognitive development. A population-based birth cohort from Southern Spain was studied at the age of 4 yrs. Total mercury (T-Hg) levels were determined in children's hair, and daily fish intake was assessed by a food frequency questionnaire. The McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA) were used to assess children's motor and cognitive abilities. Complete data were gathered on 72 children, and multivariate analyses were performed to evaluate the influence of mercury exposure and fish intake on MSCA outcomes. Mean concentration of T-Hg in hair was 0.96 $\mu\text{g/g}$ (95% confidence interval= 0.76; 1.20 $\mu\text{g/g}$). T-Hg levels were associated with higher frequency of oily fish consumption, place of residence, maternal age, and passive smoking. After adjustment for fish intake, T-Hg levels $>1 \mu\text{g/g}$ were associated with decrements in the general cognitive (-6.6 points), memory (-8.4 points), and verbal (-7.5 points) MSCA scores. Higher mercury exposure in children from this Mediterranean area was associated with cognitive development delay. Studies on the putative benefits of fish intake during early development should consider mercury exposure from different fish species.

INTRODUCTION

Mercury is a heavy metal from both natural and antropogenic sources that is widespread and persistent in the environment (ATSDR, 1999). Once released into the environment, inorganic mercury is deposited in aquatic media and becomes methylmercury (MeHg), its most toxic organic form, which bioaccumulates in marine organisms and is biomagnified through the food chain (Sanfeliu et al., 2003). Humans can be affected by mercury from amalgam fillings, thermometers, fossil-fuel emissions, preservative vaccines, and cosmetic products, among others (Counter and Buchanan, 2004), but the main source of human exposure is consumption of MeHg-contaminated fish (US EPA, 2009)

MeHg is highly and selectively toxic to the central nervous system, especially in the foetus (Díez, 2009). Thus, chronic prenatal exposure to MeHg may result in neurological disabilities (Budtz-Jorgensen et al., 2007; Jedrychowski et al., 2006; Oken et al., 2005), including language, learning, and attention deficits and, to a lesser degree, motor and visual-spatial impairment (Castoldi et al., 2008; Counter and Buchanan, 2004). In two longitudinal-cohort studies in the Faroe Islands and New Zealand, both fish-eating communities, neurodevelopmental deficits in school-age children were associated with prenatal exposure to MeHg from maternal fish consumption (Crumpt et al., 1998; Grandjean et al., 1997). However, a study in the Seychelles Islands found no adverse effect on children's cognitive development (Myers et al., 2003). Hence, the effects of chronic prenatal exposure to MeHg remain unclear and controversial (Oken et al., 2005; 2008).

Fish is the primary source of nutrients considered to improve child development, such as n-3 fatty acids (Cohen et al., 2005), and the balance between the benefits and risks of fish consumption has yet to be fully elucidated (Oken et al., 2008). Three US studies reported that higher fish consumption in pregnancy was related to improved infant cognition but that higher prenatal mercury levels were associated with lower cognition (Lederman et al., 2008; Oken et al., 2005; 2008).

Based on the studies in Faroe, New Zealand, and the Seychelles, the US Environmental Protection Agency (EPA) adopted a reference dose (RfD) for MeHg of 0.1 µg/kg body weight per day (US EPA, 2001). This RfD is based on neurodevelopmental effects associated with *in utero* exposure to MeHg from the maternal diet and is related to a maternal hair mercury concentration of 1.0 µg/g (NRC, 2000). Among the few studies addressing postnatal exposure and potential neurodevelopmental impairment, contradictory results were published by two cross-sectional studies from Brazil (Grandjean et al., 1999; Tavares et al., 2005), and another study in the Faroe Islands found no association between higher hair mercury levels in children and delayed neurodevelopment (Murata et al., 2002).

Scalp hair has been widely used as a biomarker of human mercury exposure (McDowell et al., 2004). Mercury in the hair correlates with mercury in the brain, and MeHg accounts for approximately 70-80% of total hair mercury (Cernichiari et al., 1995). Although investigations of mercury exposure and postnatal neurodevelopment have largely relied on concentrations in maternal hair, it has been suggested that children's hair mercury levels reflect exposure to

the same dietary mercury sources as the mother (Marques et al., 2007).

Spain is considered one of the largest consumers of fish in Europe (Welch et al., 2002) and the second in the world (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2009). The Mediterranean basin contains important cinnabar deposits, and long-lived predatory fish have higher mercury content in the Mediterranean than elsewhere (Renzoni et al., 1998).

The potential sub-clinical effects on neurodevelopment of low-level exposure to MeHg from contaminated fish remain unclear. The aims of this study were to investigate exposure to mercury in preschool children from Southern Spain by quantifying hair mercury levels, to examine the influence of fish intake during infancy and other factors on this mercury exposure, and to evaluate their combined effect on cognitive and motor development at 4 yrs of age in a cross-sectional analysis of a birth cohort.

METHODS

Study area and population

The study sample was drawn from a cohort established in Granada (South-eastern Spain) (Freire et al., 2009a, b) within the INMA (Environment and Childhood) study (Ribas-Fitó et al., 2006). The survey was conducted in the area served by the San Cecilio University Hospital of Granada (population, 512 000 inhabitants). Granada is a Mediterranean province with little industrial activity that is mostly devoted to agriculture practices and services.

From 2000 to 2002, 700 eligible mother-son pairs registered at the San Cecilio University Hospital were enrolled after delivery. The inclusion and exclusion criteria were published elsewhere (Lopez-Espinosa et al., 2007). A medical follow-up of the children was carried out 4 yrs after delivery, including interviews, examination of growth assessment, neuropsychological evaluation, and biological sample collection. Briefly, between 2005 and 2006, 1 out of 3 mothers were randomly contacted and invited to participate in the cognitive testing of their children. A total of 220 boys were evaluated. Complete outcome data, information on total hair mercury (T-Hg) concentration, and frequency of fish intake were available for a subset of 72 subjects. No differences in study characteristics were found between this subset and the children without mercury measurements (Table 1). Written informed consent was obtained from parents before the study, which was approved by the Ethics Committee of the San Cecilio University Hospital.

Mercury exposure

A minimum of 10 mg of hair from the occipital scalp was collected for each child, placing samples in a plastic bag and storing them at room temperature until their dispatch to the Environmental Chemistry Department (IIQAB) of the CSIC (Barcelona, Spain) for analysis. T-Hg was analysed using the AMA-254 analyzer from the Leco Corp. (Praha, Czech Republic) following a previously described method (Díez et al., 2007). Briefly, hair strands (5-6 cm) were weighed in a nickel boat and analyzed by catalytic combustion, preconcentration by gold

amalgamation, thermal desorption, and atomic absorption spectrometry. The analytical procedure was validated by analyzing two human hair Certified Reference Material (CRM), the NIES CRM No. 13 and the IAEA-086, both obtained from the National Institute of Environmental Studies, Environmental Agency of Japan and the International Atomic Energy Agency (IAEA; Vienna, Austria), respectively. The limit of detection (LOD) for T-Hg was 0.0027 µg/g and limit of quantification (LOQ) was 0.009 µg/g.

The contribution of MeHg to T-Hg was assessed by analyzing MeHg in the 23 hair samples with the highest T-Hg levels, using a previously reported method (Díez and Bayona, 2002; Montuori et al., 2004). Briefly, the hair samples were digested in a 350 µl nitric acid solution (100°C). A cooled aliquot was transferred to a glass vial with an acetate buffer solution and dipentylmercury (as internal standard) and phenylmercury (as ethylation quality control). Finally, after derivatization with aqueous NaBEt₄, extraction was accomplished using solid-phase microextraction. The final detection was carried out using a gas chromatograph equipped with a cold-vapour atomic fluorescence spectrometry system. NIES CRM No. 13 was used to validate the method. LOD for MeHg was 0.040 µg/g and LOQ was 0.080 µg/g. Digestion recoveries were 75±11%.

Fish consumption

A semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) of 95 items was administered at the 4-yr visit to assess children's usual dietary intake. Parents were asked how often, on average, their child had consumed each food item over

the past 12 months. The FFQ was an adaptation of the Harvard questionnaire (Willet et al., 1985) validated in adult Spanish populations (Vioque and Gonzalez, 1991; Vioque, 2006). The original food list was modified to include foods frequently eaten by children, and serving sizes were reduced to avoid potential intake overestimation. The questionnaire had nine possible responses, ranging from “never or less than once per month” to “six or more per day”, and included four fish-intake items: white fish (e.g., hake, sole, golden bream), oily fish (e.g., tuna, swordfish, salmon, anchovy), varied fried fish, and canned fish (most of them small-medium size, e.g., tuna, mackerel, sardine). Frequency of consumption of each fish item was converted to average daily intake in grams.

Covariates

The attending pediatrician and trained interviewers gathered information at delivery and the follow-up visit, respectively, on maternal socio-demographic characteristics, reproductive history, parity, smoking during pregnancy, duration of breastfeeding, children’s passive smoking, weight and length at birth and at 4 yrs, age at which the children were introduced to the different food groups, and detailed residential address. The children’s place of residence was classified as urban (city of Granada, 236 000 inhabitants), metropolitan (towns of >20 000 inhabitants in city residential belt), sub-urban (town of 10 000-20 000 inhabitants), or rural (<10 000 inhabitants).

Neuropsychological assessment

Cognitive and motor abilities were assessed using a standardized Spanish

adaptation of the McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA) (McCarthy, 1972), which gives standardized test scores for five domains (quantitative, verbal, memory, perceptual-performance, and motor). A general cognitive score (GCS), which estimates global intellectual function (Jacobson et al., 1990), was calculated by combining the verbal, perceptual-performance, and quantitative scores. Two specifically trained neuropsychologists administered the MSCA in the Pediatrics Department of our Hospital. A strict protocol was applied to avoid inter-observer variability (Julvez et al., 2007), including inter-observer training and three sets of quality controls (inter-observer reliability-tests) during the field work. The inter-observer variability was <5%. Neuropsychologists were blinded to the degree of the child's mercury exposure.

In accordance with previous INMA studies (Freire et al., 2009b; Julvez et al., 2007), MSCA items were reorganized into sub-scales for tasks highly associated with specific neurocognitive functions: verbal memory, working memory, memory span, gross motor, fine motor, and executive functions.

Statistical analysis

Because hair T-Hg and MeHg levels were not normally distributed, the Spearman test was used for their correlation and for correlation between T-Hg and fish intake (g/day). Neurodevelopment scores followed a normal distribution. The geometric mean (GM) of T-Hg levels and arithmetic mean (AM) of the GCS, with 95% confidence intervals (CI), were used for descriptive analysis. T-Hg levels were transformed into natural logarithms (log T-Hg) to improve normality, and

graphical loess techniques were applied to evaluate the shape of the relationship between log T-Hg values and fish consumption to better capture distances from linearity (Hastie and Tibshirani, 1990). Neurodevelopmental outcomes were standardized to a mean of 50 points, with a standard deviation (SD) of 10. GCS were standardized to a mean of 100 and SD of 15.

Non-parametric tests were used to compare log T-Hg values as a function of children's and maternal characteristics, and fish consumption variables. Differences in the GCS were evaluated with the Student's t-test or ANOVA.

Multivariate regression analyses were used to assess the association of fish consumption and other factors with T-Hg concentrations and MSCA scores. The effect on cognitive functions was adjusted for covariates that might influence child neurodevelopment. In addition, T-Hg exposure was dichotomized based on the EPA RfD-related hair concentration of 1 $\mu\text{g/g}$. Association of fish intake and other factors with mercury exposure was explored by linear regression (with log T-Hg as dependent variable) and by logistic regression (with dichotomized T-Hg measures), evaluating variables associated with mercury levels at a $p\text{-value} < 0.2$ in bivariate analysis. Following a backward procedure, variables with $p\text{-value} > 0.10$ were sequentially excluded from the model. The F test for the change in R^2 and the LR test were used for the step-by-step exclusion (or not) of covariates in linear and logistic regression, respectively.

In order to assess the overall effect of T-Hg and fish intake on neurodevelopment, a model was first built for the GCS, adjusting for evaluator (1st

or 2nd), child's school term at evaluation, place of residence, maternal age, parity, mother's education and occupational status, and fish intake (total and different fish types). The same models were constructed for the other psychological scores. MSCA score models were rerun with T-Hg dichotomous measures. Analyses were performed using SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, US) and STATA version 9.0 statistical packages.

RESULTS

Mean age of the children at testing was 51 months (range=48-57 months). T-Hg and MeHg were quantified in all hair samples (n=72 and 23, respectively). GM of T-Hg concentrations was 0.96 µg/g (95% CI=0.8, 1.2 µg/g) and median was 1.04 µg/g. Mean MeHg concentration was 1.81 µg/g (95% CI=1.4, 2.3 µg/g). Spearman test showed that T-Hg and MeHg levels in the paired samples were highly correlated ($r=0.88$; $p<0.001$). Mean daily fish intake during the previous 12 months was 45 g and 61% of the children consumed >2 servings/week of fish. Fried and white fish were the most frequently consumed (76% and 65% of children consumed ≥ 1 serving/week of fried and white fish, respectively). Child GCS ranged from 53.9 to 138.1 points.

T-Hg concentrations were significantly higher among urban children and passive smokers (Table 2). Children with older mothers had lower hair T-Hg levels. The GCS was also higher among urban children, whereas significantly lower scores were found in children of mothers with secondary and primary

versus university education. T-Hg concentrations were higher in children who started eating fish earlier (Table 3). Daily fish intake was significantly associated with GCS, finding a lower score for children consuming ≥ 3 servings/week. Higher T-Hg levels were not associated with higher fish consumption ($p > 0.10$) but were significantly associated with canned fish intake ($r = 0.24$; $p = 0.04$). Frequency of oily fish consumption was associated with T-Hg levels but not with GCS. Bivariate association of T-Hg with psychological outcomes was only significant for working memory function ($r = 0.27$; $p = 0.02$).

In the multivariate analysis, area of residence, maternal age, passive smoking, and frequency of consumption of oily fish were independently associated with T-Hg levels, but daily fish intake (g/day) and frequency of consumption of all types of fish were not (Table 4). Children consuming 1-3 serving/month or > 1 servings/weeks of oily fish had around 3- or 2-fold higher T-Hg levels, respectively, compared to children rarely or never consuming oily fish. T-Hg concentrations were 3-fold higher among urban children (R^2 value was 0.38). Interaction between area of residence and oily fish consumption was not significant. The risk of hair T-Hg level ≥ 1 $\mu\text{g/g}$ was 11-fold higher ($\text{OR} = 10.81$) in children consuming 1-3 servings/month of oily fish *versus* children rarely or never consuming fish and around 14-fold higher in urban *versus* non-urban children.

A detrimental effect of mercury exposure (≥ 1 $\mu\text{g/g}$) on memory and verbal memory was found (7.2 and 8.8-point decreases, respectively) after adjusting for frequency of fish intake (Table 5). Fish intake ≥ 3 servings/week was associated

with decreases (about 7 points) in GCS, perceptual-performance score, and executive function scores. Both T-Hg and fish intake had a negative effect on most outcomes. After adjustment of consumption frequency of the four fish types, mercury exposure remained negatively associated with memory (-8.4 points) and verbal (-7.5 points) areas, and with the GCS (-6.6 points) (Table 6). Fried fish consumption was also negatively associated with the verbal score, whereas canned fish intake was positively associated with the GCS. In general, cognitive functions were positively related to oily and canned fish intake and negatively related to white and fried fish intake.

DISCUSSION

Mercury exposure

Hair mercury levels in these children from Southern Spain were higher than those reported in other young populations from North-eastern Spanish areas with important chemical and fishing-industry activities (Batista et al., 1996; Nadal et al., 2005; Torrente et al., 2005), much higher than concentrations found in children from US and Germany (Pesch et al., 2002; McDowell et al., 2004), but lower than levels reported in heavily exposed children from Brazil, Faroe and Seychelles Islands (Grandjean et al., 1997; Myers et al., 2003; Tavares et al., 2005). Mercury levels in the present population were similar to those found in Spanish children living near a chlor-alkali plant (Montuori et al., 2006) and in Menorca (Mediterranean island) (Díez et al., 2009). Some of these authors

reported that the children's exposure to mercury was highly influenced by their fish consumption (Batista et al., 1996; McDowell et al., 2004; Montuori et al., 2006; Pesch et al., 2002).

The present study found an association between hair mercury levels and higher frequency of oily fish intake, place of residence, maternal age, and passive smoking. Oily fish intake proved to have the greatest influence on hair mercury levels, in accordance with findings in Valencia, a Spanish Mediterranean coastal area, where high levels of mercury in cord blood were reported; white fish was the most frequently consumed group by the Valencian women but mercury exposure was associated with intake of oily fish (Ramón et al., 2008). A recent study (Martí-Cid et al., 2007) estimated a mercury daily intake of 6.5 µg/day from fish consumption by children in North-eastern Spain. Mercury concentrations were found to be higher in long-lived predatory fish, such as swordfish (1.59–2.22 µg/g fresh weight) and tuna (0.38–0.58 µg/g), followed by red mullet (0.14–0.36 µg/g) and hake (0.12–0.29 µg/g). Mercury levels in swordfish exceeded the European Union limit (0.5 µg/g for T-Hg) (Directive 2001/22/EC).

Although there is little industrial activity in our study area, water pollution with mercury has been reported from other local anthropogenic sources, including agricultural pesticides, waste water effluents, and metal waste dumps, mainly near urban locations (Cabrera-Vique et al., 2007). The present results show about 3-fold higher mercury hair levels in the urban *versus* rural children. As previously reported in German children (Pesch et al., 2002), passive smoking was found to

influence mercury exposure, probably due to the presence of elemental mercury in tobacco smoke (Rickert and Kaiserman, 1994). Exposure to mercury appeared to be mainly due to fish consumption in our study population, since hair concentrations reflect exposure to organic mercury (MeHg), which was highly correlated with T-Hg content.

Effects on neurodevelopment

A concentration of T-Hg >1 µg/g in hair was associated with decrements in MSCA general cognitive, memory, and verbal areas, in regression models that controlled for the consumption frequency of four different fish groups and selected confounders. Higher fish intake was found to adversely affect the GCS, perceptual-performance, and executive function scores. However, the effects of fish consumption on neurodevelopment appeared to depend on the type of fish, e.g., a higher consumption of canned fish showed a positive effect on the GCS. Our results support the findings of some studies that higher mercury exposure in young children is associated with lower cognition, even at relatively low-exposure levels (Oken et al., 2005).

Previous studies reported adverse effects of prenatal mercury exposure on cognitive development (Cohen et al., 2005; Crumpt et al., 1998; Grandjean et al., 1997; Jedrychowski et al., 2006; Lederman et al., 2008; Oken et al., 2005; 2008). However, postnatal exposure was not related to impaired neurodevelopment in some cross-sectional studies (Murata et al., 2002; Tavares et al., 2005), calling attention to the differential effects of prenatal and postnatal exposure. Infants can

be exposed to mercury from various sources, including breast milk and weaning foods. However, reports of an association between hair mercury levels in mothers and infants during the first months of life suggest that children ingest similar doses of MeHg to their mothers and may reflect family exposure through fish consumption (Marques et al., 2007). Hair can be used to estimate mercury exposure over extended periods of time, including fetal exposure (Cernichiari et al., 1995). Hence, the hair mercury levels in our study may be considered a proxy for both prenatal and postnatal exposure. An assessment of prenatal exposure of Spanish newborns (Díez et al., 2009) found a significant maternal transfer of T-Hg to the newborn and concluded that fish consumption during pregnancy was the best predictor of neonatal mercury concentrations. In this context, it has been proposed that early postnatal effects of low-exposures to MeHg may not emerge until later in life (Rice, 1996). Nevertheless, our study was able to establish a significant negative association between mercury exposure and infant cognition, specifically with verbal and memory areas. Similar brain function domains were found to be affected by prenatal mercury exposure in children in the Faroes (language and memory) (Grandjean et al., 1997) and in the US (visual memory) (Oken et al., 2005).

Risks and benefits of fish consumption

A moderate intake of low-contaminated fish during pregnancy is considered to benefit children's neurodevelopment and visual function (Daniels et al., 2004; Oken et al., 2005). The harmful effect of fish intake on cognition

detected in our sample may be partially explained by contaminants other than mercury in fish, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), which have been linked to neurological damage (Ribas-Fitó et al., 2001). Despite the small sample size, we found a positive association between cognition and intakes of oily or canned fish, suggesting that neurodevelopmental effects depend on the fish species. Oily and canned fish groups include species that may be rich in omega-3 fatty acids, while white and fried fish groups may have a lower content of beneficial nutrients. Hence, research into the effects of mercury on child development should consider the different types of fish consumed by the mothers and infants (Cohen et al., 2005).

The present study shows that mercury exposure in children from a Mediterranean area is related to fish intake. It is the first report on neurodevelopmental outcomes associated with infant mercury exposure and fish consumption in Spain. Given the widespread consumption of fish in Spain, it is important to accurately determine the associated risk to children's health of low-level mercury exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Richard Davies for editorial assistance. The results would not have been achieved without the selfless collaboration of the study participants and staff at the Pediatrics Department of San Cecilio University Hospital.

REFERENCES

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1999. Toxicological profile for mercury. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.html> [accessed March 2009]

Batista, J., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Corbella, J., 1996. Mercury in hair for a child population from Tarragona Province, Spain. *Sci. Total Environ.* 193, 143-148.

Budtz-Jorgensen, E., Grandjean, P., Weihe, P., 2007. Separation of risks and benefits of seafood intake. *Environ. Health Perspect.* 115, 323-327.

Cabrera-Vique, C., Ruiz-López, M.D., Javier, F., 2007. Mercury in waters from South-eastern Spain: possible sources of pollution. *Ars. Pharm.* 48, 37-53.

Castoldi, A.F., Johansson, C., Onishchenko, N., Coccini, T., Roda, E., Vahter, M., Ceccatelli, S., Manzo, L., 2008. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51, 201-214.

Cernichiari, E., Toribara, T.Y., Liang, L., Marsh, D.O., Berlin, M.W., Myers, G.J., Cox, C., Shamlaye, C.F., Choisy, O., Davidson, P., 1995. The biological monitoring of mercury in the Seychelles study. *Neurotoxicology.* 16,

613-628.

Cohen, J.T., Bellinger, D.C., Shaywitz, B.A., 2005. A quantitative analysis of prenatal methyl mercury exposure and cognitive development. *Am. J. Prev. Med.* 29, 353-366.

Counter, S.A., Buchanan, L.H., 2004. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 209-230.

Crumpt, K.S., Kjellstrom, T., Shipp, A.M., Silvers, A., Stewart, A., 1998. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. *Risk Anal.* 18, 701-713.

Daniels, J.L., Longnecker, M.P., Rowland, A.S., Golding, J.; ALSPAC Study Team, 2004. University of Bristol Institute of Child Health. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology.* 15, 394-402.

Díez, S., Bayona, J.M., 2002. Determination of methylmercury in human hair by ethylation followed by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 963, 345-351.

Díez, S., Montuori, P., Querol, X., Bayona, J.M., 2007. Total mercury in

the hair of children by combustion atomic absorption spectrometry (Comb-AAS).
J. Anal. Toxicol. 31, 144-149.

Díez, S., 2009. Human health effects of methylmercury exposure. Rev.
Environ. Contam. Toxicol. 198, 111-132.

Díez, S., Delgado, S., Aguilera, I., Astray, J., Pérez-Gómez, B., Torrent,
M., Sunyer, J., Bayona, J.M., 2009. Prenatal and early childhood exposure to
mercury and methylmercury in Spain, a high-fish-consumer country. Arch.
Environ. Contam. Toxicol. 56, 615-622.

Directive 2001/22/EC of 8 March 2001: laying down the sampling
methods and the methods of analysis for the official control of the levels of lead,
cadmium, mercury and 3-MCPD in foodstuffs.

Freire, C., Abril, A., Fernandez, M.F., Ramos, R., Estarlich, M., Manrique,
A., Aguirre, A., Ibarluzea, J., Olea, N., 2009a. Urinary 1-hydroxypyrene and PAH
exposure in 4-year-old Spanish children. Sci. Total Environ. 407, 1562-1569.

Freire, C., Ramos, R., Puertas, R., Lopez-Espinosa, M.J., Julvez, J.,
Aguilera, I., Cruz, F., Fernández, M.F., Sunyer, J., Olea, N., 2009b. Association of
traffic-related air pollution with cognitive development in children. J. Epidemiol.
Community Health. In press.

Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K.,

Murata, K., Sorensen, N., Dahl, R., Jorgensen, P.J., 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 417–428.

Grandjean, P., White, R.F., Nielsen, A., Cleary, D., de Oliveira Santos, E.C., 1999. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ. Health Perspect.* 107, 587–591.

Hastie, T.J., Tisbhirani, R.J., 1990. *Generalized additive models*. London: Chapman and Hall.

Jacobson, J., Jacobson, S., Humphrey, H., 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J. Pediatr.* 116, 38-45.

Jedrychowski, W., Jankowski, J., Flak, E., Skarupa, A., Mroz, E., Sochacka-Tatara, E., Lisowska-Miszczuk, I., Szpanowska-Wohn, A., Rauh, V., Skolicki, Z., Kaim, I., Perera, F., 2006. Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one-year-old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Ann. Epidemiol.* 16, 439–447.

Julvez, J., Ribas-Fitó, N., Torrent, M., Forns, M., Garcia-Esteban, R., Sunyer, J., 2007. Maternal smoking habits and cognitive development of children at age 4 years in a population-based birth cohort. *Int. J. Epidemiol.* 36, 825-832.

Lederman SA, Jones RL, Caldwell KL, Rauh V, Sheets SE, Tang D, Viswanathan, S., Becker, M., Stein, J.L, Wang, R.Y., Perera, F.P., 2008. Relation between cord blood mercury levels and early child development in a World Trade Center cohort. *Environ. Health Perspect.* 116, 1085-1091.

Lopez-Espinosa, M.J., Granada, A., Carreno, J., Salvatierra, M.T., Olea-Serrano, F., Olea, N., 2007. Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta.* 28, 631-638.

Marques, R.C., Dórea, J.G., Bastos, W.R., Malm, O., 2007. Changes in children hair-Hg concentrations during the first 5 years: Maternal, environmental and iatrogenic modifying factors. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49, 17-24.

Martí-Cid, R., Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2007. Intake of chemical contaminants through fish and seafood consumption by children of Catalonia, Spain: Health risks. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1968-1974.

McCarthy, D., 1972. *Manual for the McCarthy Scales of Children's Abilities.* New York, NY: Psychological Corporation (Spanish adaptation: Madrid, Spain. TEA Ediciones, S.A., 1996).

McDowell, M.A., Dillon, C.F., Osterloh, J., Bolger, P.M., Pellizzari, E., Fernando, R., Montes de Oca, R., Schober, S.E., Sinks, T., Jones, R.L., Mahaffey, K.R., 2004. Hair mercury levels in US children and women of childbearing age:

reference range data from NHANES 1999-2000. *Environ. Health Perspect.* 112, 1165-1171.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Available: <http://www.msc.es/ciudadanos/proteccionSalud/infancia/alimentacion/tema1.htm> [accessed March 2009]

Montuori, P., Jover, E., Alzaga, R., Díez, S., Bayona, J.M., 2004. Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1025, 71–75.

Montuori, P., Jover, E., Díez, S., Ribas-Fitó, N., Sunyer, J., Triassi, M., Bayona, J.M., 2006. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Sci. Total. Environ.* 369, 51-58.

Murata, K., Budtz-Jørgensen, E., Grandjean, P., 2002. Benchmark dose calculations for methylmercury-associated delays on evoked potential latencies in two cohorts of children. *Risk Anal.* 22, 465–474.

Myers, G.J., Davidson, P.W., Cox, C., Shamlaye, C.F., Palumbo, D., Cernichiari, E., Sloane-Reeves, J., Wilding, G.E., Kost, J., Huang, L.S., Clarkson, T.W., 2003. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet.* 361, 1686-1692.

Nadal, M., Bocio, A., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2005. Monitoring metals in the population living in the vicinity of a hazardous waste incinerator. Levels in hair of children. *Biol. Trace Elem. Res.* 104, 203-213.

National Research Council (NRC), 2000. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. Washington, DC: National Academies Press.

Oken, E., Wright, R.O., Kleinman, K.P., Bellinger, D., Amarasiriwardena, C.J., Hu, H., Rich-Edwards, J.W., Gillman, M.W., 2005. Maternal fish consumption, hair mercury and infant cognition in a U.S. cohort. *Environ. Health Perspect.* 113, 1376-1380.

Oken, E., Radesky, J.S., Wright, R.O., Bellinger, D.C., Amarasiriwardena, C.J., Kleinman, K.P., Hu, H., Gillman, M.W., 2008. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am. J. Epidemiol.* 167, 1171-1181.

Pesch, A., Wilhelm, M., Rostek, U., Schmitz, N., Weishoff-Houben, M., Ranft, U., Idel, H., 2002. Mercury concentrations in urine, scalp hair, and saliva in children from Germany. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 12, 252-258.

Ramón, R., Murcia, M., Ballester, F., Rebagliato, M., Lacasaña, M., Vioque, J., Llop, S., Amurrio, A., Aguinagalde, X., Marco, A., León, G., Ibarluzea, J., Ribas-Fitó, N., 2008. Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-

infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Sci. Total Environ.* 392, 69-78.

Renzoni, A., Zino, F., Franchi, E., 1998. Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations. *Environ. Res.* 77, 68-72.

Ribas-Fitó, N., Sala, M., Kogevinas, M., Sunyer, J., 2001. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review. *J. Epidemiol. Community Health.* 55, 537-546.

Ribas-Fitó, N., Ramón, R., Ballester, F., Grimalt, J.O., Marco, A., Olea, N., Posada, M., Rebagliato, M., Tardón, A., Torrent, M., Sunyer, J.; INMA study group, 2006. Child health and the environment: the INMA Spanish study. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 20, 403-410.

Rice, D.C., 1996. Evidence for delayed neurotoxicity produced by methylmercury. *Neurotoxicology.* 17, 583-596.

Rickert, W.S., Kaiserman, M.J., 1994. Levels of lead, cadmium, and mercury in Canadian cigarette tobacco as indicators of environmental change: Results from a 21 year study (1968-1988). *Environ. Sci. Technol.* 28, 924-927.

Sanfeliu, C., Sebastia, J., Cristofol, R., Rodriguez-Farre, E., 2003. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.* 5, 283-305.

Tavares, L.M., Camara, V.M., Malm, O., Santos, E.C., 2005. Performance on neurological development tests by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. *Cad. Saude Publica.* 21, 1160–1167.

Torrente, M., Colomina, M.T., Domingo, J.L., 2005. Metal concentrations in hair and cognitive assessment in an adolescent population. *Biol. Trace Elem. Res.* 104, 215-221.

US Environmental Protection Agency (US EPA), 2001. Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury. Washington: EPA Offices of Sciences and Technology.

US Environmental Protection Agency (US EPA). Mercury. Human exposure. Available: <http://www.epa.gov/mercury/exposure.htm> [accessed March 2009].

Vioque, J., Gonzalez, L., 1991. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur. J. Cancer Prev.* 1, 19-20.

Vioque, J., 2006. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. In: Serra Majem L, Aranceta Bartrina J, editors. *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones.* Barcelona: Masson-Elsevier. p. 199–210.

Welch, A.A., Lund, E., Amiano, P., Dorronsoro, M., Brustad, M., Kumle, M., Rodríguez, M., Laceras, C., Janzon, L., Jansson, J., Luben, R., Spencer, E.A.,

Overvad, K., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Klipstein-Grobusch, K., Benetou, V., Zavitsanos, X., Tumino, R., Galasso, R., Bueno-De-Mesquita, H.B., Ocké, M.C., Charrondière, U.R., Slimani, N., 2002. Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* 5, 1273-1285.

Willet, W.C., Sampson, L., Stampfer, M.J., Rosner, B., Brain, C., Witschi, J., Hennekens, C.H., Speizer, F.E., 1985. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am. J. Epidemiol.* 122, 51-65.

TABLE LEGENDS

Table 1. Characteristics of study population.

Table 2. Total hair mercury levels ($\mu\text{g/g}$) and general cognitive scores by characteristics of study population ($n= 72$), INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 3. Total hair mercury concentrations ($\mu\text{g/g}$) and general cognitive scores by fish consumption, INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 4. Association of children's fish consumption and other characteristics with total hair mercury concentrations ($\mu\text{g/g}$), INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 5. Adjusted effect of total hair mercury levels ($\mu\text{g/g}$) and fish intake on child neurodevelopment outcomes at age of 4 yrs in 72 children from the INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 6. Association of fish intake with child neurodevelopment test scores at age of 4 yrs in 72 children from the INMA-Granada cohort, 2000-2006.

Table 1. Characteristics of study population

	Children included (n= 72)	Children not included (n= 138)[§]
CHILD		
Place of residence (%)		
Rural	13	18
Sub-urban	21	21
Metropolitan	45	54
Urban	21	15
Weight at 4 yrs (Kg)	18.6	19.2
Height at 4 yrs (cm)	105.0	105.1
Passive smoking at 4 yrs (%)		
No	54	61
Yes	46	39
Age at evaluation (months)	51	51
MOTHER		
Age at delivery (yrs)	33.5	33.0
Educational level (%)		
Only primary school	15	20
Secondary school	70	63
University	15	17
Occupational status (%)		
Unemployed	47	42
Employed	53	58
Parity at child's birth (%)		
0	43	40
1	40	42
≥2	17	18
Breastfeeding (weeks) (%)		
<2	8	18**
2-15	47	36
16-27	39	38
≥28	6	8
Smoking during pregnancy (%)		
No	78	75
Yes	22	25

**p≤0.05 (difference between children included and not included)

[§]Children with data up to the age of 4-yr visit but not included in the analysis because of missing data on T-Hg hair concentration or fish intake at 4 yrs.

Table 2. Total hair mercury levels ($\mu\text{g/g}$) and general cognitive scores by characteristics of study population (n= 72), INMA-Granada cohort, 2000-2006.

	n (%)	Total hair mercury ($\mu\text{g/g}$)			General cognitive score ^s		
		GM	95% CI	p-value ^a	AM	95% CI	p-value ^b
CHILD							
Area of residence at 4 yrs				0.03			0.01
Rural	9 (13)	0.49	0.19; 1.23		100.3	89.6; 111.0	
Sub-urban	15 (21)	0.89	0.44; 1.80		99.5	91.8; 107.1	
Metropolitan	33 (45)	0.95	0.75; 1.22		95.7	91.0; 100.5	
Urban	15 (21)	1.55	1.01; 2.36		110.1	102.1; 118.0	
Weight at 4 yrs (kg)				0.64			0.61
<18	31 (43)	1.06	0.75; 01.51		99.1	93.3; 102.9	
18-21	28 (39)	0.90	0.60; 1.37		101.8	95.7; 107.9	
>21	13 (18)	0.85	0.55; 1.29		101.0	91.4; 110.5	
Height at 4 yrs (cm)				0.59			0.67
<100	10 (14)	1.30	0.74; 2.27		96.4	88.4; 104.3	
100-108	41 (57)	0.91	0.66; 1.27		101.0	96.5; 105.5	
>108	21 (29)	0.90	0.60; 1.36		100.0	92.5; 107.6	
Passive smoking at 4 yrs				0.02			0.78
No	39 (54)	0.78	0.59; 1.03		99.6	94.8; 104.4	
Yes	33 (46)	1.21	0.84; 1.75		100.6	95.5; 105.7	
School term of evaluation				0.44			0.25
3rd year, 3rd term	29 (41)	0.97	0.67; 1.14		96.3	90.6; 102.1	
4th year, 1st term	19 (26)	1.07	0.67; 1.71		101.4	95.2; 107.7	
4th year, 2nd term	19 (26)	0.76	0.49; 1.18		102.3	95.9; 108.7	
4th year, 3rd term	5 (7)	1.41	0.48; 4.15		108.2	84.8; 131.6	
MOTHER							
Age at delivery (yrs)				0.06			0.12
<32	33 (46)	1.21	0.96; 1.55		97.2	92.1; 102.2	
\geq32	39 (54)	0.78	0.55; 1.12		102.5	97.8; 107.2	
Educational level				0.54			0.03
Only primary	11 (15)	1.19	0.72; 1.97		95.5	86.6; 104.3	
Secondary school	50 (70)	0.85	0.64; 1.13		98.9	95.6; 102.1	
University	11 (15)	1.32	0.76; 2.28		110.2	94.9; 125.5	
Occupation status				0.48			0.07
Unemployed	34 (47)	0.90	0.65; 1.24		96.8	93.0; 100.6	
Employed	38 (53)	1.01	0.73; 1.40		103.0	97.5; 108.5	

Table 2 (continued)

	n (%)	Total hair mercury ($\mu\text{g/g}$)			General cognitive score [§]		
		GM	95% CI	p-value ^a	AM	95% CI	p-value ^b
Parity at child's birth				0.10			0.02
0	31 (43)	0.80	0.54; 1.20		103.1	98.0; 108.1	
1	29 (40)	0.93	0.69; 1.25		94.6	89.5; 99.7	
≥ 2	12 (17)	1.61	0.93; 2.79		105.6	95.5; 115.7	
Breastfeeding				0.58			0.58
< 2 weeks	6 (8)	1.21	0.31; 4.70		92.3	82.6; 102.1	
2-15 weeks	34 (47)	0.98	0.70; 1.39		100.2	94.6; 105.8	
16-27 weeks	28 (39)	0.87	0.61; 1.23		101.4	95.9; 106.9	
≥ 28 weeks	4 (6)	1.07	0.34; 3.37		101.9	92.6; 111.1	
Smoking during				0.84			0.45
No	56 (78)	0.97	0.76; 1.24		99.5	95.4; 103.7	
Yes	16 (22)	0.91	0.49; 1.69		102.0	96.6; 107.4	

GM: geometric mean; AM: arithmetic mean; CI: confidence interval

^ap-value for Mann-Whitney or Kruskal Wallis test; ^bp-value for T-test or ANOVA

[§]Mean score for the general cognitive is 100, with a standard deviation of 15

Table 3. Total hair mercury concentrations ($\mu\text{g/g}$) and general cognitive scores by fish consumption, INMA-Granada cohort, 2000-2006.

	n (%)	Total hair mercury ($\mu\text{g/g}$)			General cognitive score ^s		
		GM	95% CI	p-value ^a	AM	95% CI	p-value ^b
Child's age at fish				0.05			0.78
≤ 8 months	14 (19)	1.24	0.72; 2.15		102.0	92.9; 111.1	
9 months	33 (46)	1.12	0.81; 1.55		99.5	93.8; 105.2	
≥ 10 months	25 (35)	0.67	0.45; 0.99		99.8	94.8; 104.7	
Fish consumption (g/day)				0.25			0.07
< 25	18 (25)	0.66	0.38; 1.13		107.3	102.6;	
25-50	32 (45)	1.18	0.85; 1.65		96.1	89.9; 102.3	
51-75	11 (15)	1.10	0.63; 1.92		100.0	91.4; 108.6	
> 75	11 (15)	0.84	0.47; 1.48		100.0	92.7; 107.4	
FREQUENCY OF FISH CONSUMPTION							
All types of fish				0.50			0.02
< 3 servings/week	28 (39)	0.83	0.53; 1.31		104.9	99.7; 110.1	
≥ 3 servings/week	44 (61)	1.04	0.82; 1.33		97.0	92.6; 101.4	
Fried fish (varied)				0.07			0.12
Rarely/never	9 (13)	0.53	0.30; 0.94		105.6	96.3; 115.0	
1-3 servings/month	8 (11)	1.18	0.49; 2.82		103.5	90.7; 116.2	
1 serving/week	36 (50)	0.95	0.69; 1.31		101.3	96.5; 106.2	
≥ 2 servings/week	19 (26)	1.20	0.75; 1.86		93.6	86.6; 100.6	
White fish				0.36			0.71
Rarely/never	12 (17)	1.19	0.68; 2.06		96.9	89.2; 104.6	
1-3 servings/month	13 (18)	1.25	0.64; 2.45		98.9	90.0; 107.8	
1 serving/week	29 (40)	0.83	0.57; 1.23		102.4	95.8; 108.9	
≥ 2 servings/week	18 (25)	0.85	0.58; 1.26		99.3	93.9; 104.7	
Oily fish				0.01			0.72
Rarely/never	17 (23)	0.58	0.34; 0.99		100.5	94.2; 106.9	
1-3 servings/month	20 (28)	1.57	1.08; 2.29		97.8	90.5; 105.2	
≥ 1 serving/week	35 (49)	0.92	0.68; 1.24		101.1	96.0; 106.3	
Canned fish				0.07			0.19
Rarely/never	31 (43)	0.73	0.52; 1.03		97.9	92.6; 103.3	
1-3 servings/month	20 (28)	1.22	0.83; 1.77		98.3	91.2; 105.5	
≥ 1 serving/week	21 (29)	1.14	0.71; 1.84		104.9	99.0; 110.9	

GM: geometric mean; AM: arithmetic mean; CI: confidence interval

^ap-value for Mann-Whitney or Kruskal Wallis test; ^bp-value for T-test or ANOVA

^sMean score for the general cognitive is 100, with a standard deviation of 15

Table 4. Association of children’s fish consumption and other characteristics with total hair mercury concentrations ($\mu\text{g/g}$), INMA-Granada cohort, 2000-2006[¥]

	Total hair Hg ($\mu\text{g/g}$) [†]		$\geq 1 \mu\text{g/g}$ hair Hg [‡]	
	Exp(β)	95% CI [§]	OR	95% CI
Area of residence				
Sub-urban	1.81	0.93; 3.53*	5.57	0.69, 44.67
Metropolitan	1.86	1.03; 3.38**	3.86	0.60; 24.84
Urban	3.16	1.59; 6.28***	14.26	1.60; 127.19**
Maternal age (<32 yrs)	1.64	1.11; 2.42**	4.69	16.13; 1.36**
Passive smoking at 4 yrs	1.58	1.06; 2.35**	3.98	1.15; 13.81**
Oily fish consumption				
1-3 servings/month	2.86	1.69; 4.84***	10.81	1.97; 59.30**
≥ 1 serving/week	1.69	1.04; 2.74**	4.52	0.99; 20.48**

[¥]Multivariate models taking as reference group children living in rural areas, children with mothers ≥ 32 yrs old not living with smokers, and consuming oily fish less than 1 serving/month.

[†]Linear regression model with log T-Hg level as dependent variable.

[‡]Logistic regression model with dichotomous T-Hg level (<1, $\geq 1 \mu\text{g/g}$) as dependent variable.

* $p \leq 0.1$; ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$

CI: confidence interval; [§]confidence interval for Exp(β); OR: Odds ratio.

Table 5. Adjusted effect of total hair mercury levels ($\mu\text{g/g}$) and fish intake on child neurodevelopment outcomes at age of 4 yrs in 72 children from the INMA-Granada cohort, 2000-2006[‡]

Psychological outcomes [§]		Total hair Hg ($\mu\text{g/g}$) [†]		$\geq 1 \mu\text{g/g}$ hair Hg [‡]	
		β	95% CI	β	95% CI
General cognitive	T-Hg	-2.09	-5.72; 1.54	-5.61	-11.74; 0.53*
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-6.60	-12.76; -0.45**	-7.01	-13.03; -0.98**
Quantitative	T-Hg	0.73	-3.32; 4.79	-1.37	-8.33; 5.60
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-5.77	-12.64; 1.10	-5.66	-12.50; 1.17*
Memory	T-Hg	-2.45	-6.77; 1.87	-7.19	-14.44; 0.06**
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-4.81	-12.13; 2.50	-5.29	-12.41; 1.83
Verbal	T-Hg	-2.62	-7.04; 1.80	-6.54	-14.03; 0.95*
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-4.03	-11.52; 3.46	-4.53	-11.88; 2.83
Perceptual-performance	T-Hg	-1.66	-5.92; 2.59	-3.56	-10.85; 3.72
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-7.12	-14.33; 0.08**	-7.43	-14.59; -0.28**
Motor	T-Hg	-2.05	-6.20; 2.11	-4.01	-11.12; 3.11
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-2.61	-9.65; 4.43	-2.98	-9.97; 4.01
Executive function	T-Hg	-0.63	-4.28; 3.02	-2.67	-8.90; 3.56
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-7.36	-13.54; -1.18**	-7.49	-13.61; -1.37**
Memory span	T-Hg	-2.81	-6.87; 1.25	-5.75	-12.68; 1.81*
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-4.60	-11.49; 2.28	-5.12	-11.93; 1.68
Verbal memory	T-Hg	-3.60	-8.76; 1.56	-8.80	-17.51; -0.09**
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-3.18	-11.93; 5.57	-3.86	-12.41; 4.69
Working memory	T-Hg	3.36	-0.63; 7.35*	1.40	-5.61; 8.41
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-4.05	-10.80; 2.71	-3.49	-10.38; 3.40
Gross motor	T-Hg	-1.09	-5.25; 3.07	1.59	-5.56; 8.74
	Fish intake ≥ 3 sv/week	0.09	-6.95; 7.14	-0.06	-7.01; 6.96
Fine motor	T-Hg	-1.03	-5.46; 3.41	-3.72	-11.28; 3.84
	Fish intake ≥ 3 sv/week	-1.69	-9.20; 5.82	-1.90	-9.33; 5.52

[‡]Simultaneous adjusted effect of total hair Hg levels (T-Hg) and frequency of fish intake (≥ 3 servings/week), controlling for school term of evaluation, psychologist, place of residence, maternal age, parity, and mother's educational level and occupation status.

[†]Each row is a different multivariate model with total hair Hg levels on log-transformed scale.

[‡]Each row is a different multivariate model with total hair Hg levels as dichotomous variable ($< 1, \geq 1 \mu\text{g/g}$)

* $p \leq 0.1$; ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; CI: confidence interval

[§]Mean score for the General cognitive is 100, with a standard deviation (SD) of 15. Mean score for the rest of psychological outcomes is 50, with a SD of 10.

Table 6. Association of fish intake with child neurodevelopment outcomes at age of 4 yrs in 72 children from the INMA-Granada cohort, 2000-2006[‡]

Psychological outcomes		Total hair Hg ($\mu\text{g/g}$) [†]		$\geq 1 \mu\text{g/g}$ hair Hg [‡]	
		β	95% CI	β	95% CI
General cognitive	T-Hg	-2.85	-6.69; 0.99	-6.60	-13.04; -0.15**
	Oily fish	1.02	-6.39; 8.42	1.55	-5.76; 8.85
	Canned fish	7.98	0.28; 15.68**	7.68	0.16; 15.20**
	White fish	-3.32	-11.09; 4.46	-3.60	-11.23; 4.03
	Fried fish	-4.70	-12.34; 2.94	-5.07	-12.51; 2.37
Quantitative	T-Hg	-0.65	-4.96; 3.66	-2.76	-10.10; 4.57
	Oily fish	0.65	-7.67; 8.96	0.93	-7.38; 9.24
	Canned fish	2.36	-6.28; 11.00	2.36	-6.20; 10.91
	White fish	-5.54	-14.27; 3.18	-5.83	-14.52; 2.85
	Fried fish	4.13	-4.45; 12.70	4.12	-4.35; 12.58
Memory	T-Hg	-2.79	-7.36; 1.77	-8.40	-15.96; -0.83**
	Oily fish	1.97	-6.84; 10.78	2.74	-5.84; 11.31
	Canned fish	4.55	-4.61; 13.71	4.35	-4.47; 13.17
	White fish	-1.83	-11.08; 7.42	-2.45	-11.40; 6.50
	Fried fish	-4.15	-13.23; 4.94	-4.40	-13.13; 4.33
Verbal	T-Hg	-2.72	-7.21; 1.77	-7.50	-14.99; -0.02**
	Oily fish	4.20	-4.46; 12.86	4.86	-3.64; 13.36
	Canned fish	7.95	-1.05; 16.95*	7.72	-1.02; 16.47*
	White fish	-2.36	-11.45; 6.73	-2.84	-11.72; 6.03
	Fried fish	-8.02	-16.95; 0.91*	-8.31	-16.96; 0.34**
Perceptual-performance	T-Hg	-2.62	-7.20; 1.97	-3.91	-11.77; 3.95
	Oily fish	-3.53	-12.37; 5.32	-3.32	-12.23; 5.60
	Canned fish	6.70	-2.52; 15.87	6.28	-2.89; 15.45
	White fish	-1.91	-11.19; 7.38	-1.78	-11.09; 7.53
	Fried fish	-2.06	-11.19; 7.06	-2.54	-11.62; 6.54
Motor	T-Hg	-2.41	-6.86; 2.04	-4.16	-11.76; 3.45
	Oily fish	0.47	-8.11; 9.06	0.74	-7.89; 9.36
	Canned fish	5.15	-3.78; 14.07	4.81	-4.06; 13.68
	White fish	-0.64	-9.65; 8.37	-0.62	-9.63; 8.38
	Fried fish	-2.52	-11.37; 6.34	-2.92	-11.70; 5.86

[‡]Simultaneous adjusted effect of total hair Hg levels (T-Hg) and frequency of consumption of different types of fish (≥ 1 serving/week), controlling for school term of evaluation, psychologist, place of residence, maternal age, parity, and mother's educational level and occupational status.

[†]Each row is a different multivariate model with total hair Hg levels on log-transformed scale.

[‡]Each row is a different multivariate model with total hair Hg levels as dichotomous variable ($<1, \geq 1 \mu\text{g/g}$)

* $p \leq 0.1$; ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; CI: confidence interval.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Valores de trihalometanos en agua de consumo de Granada

Este es el primer trabajo donde se describen los niveles de trihalometanos (THM) en agua de bebida en diferentes municipios de la provincia de Granada. Las poblaciones estudiadas incluyen tanto municipios rurales, con menos de 1.000 habitantes, como la capital de la provincia, con 236.000 habitantes. Lo más interesante de los resultados de este trabajo es el bajo nivel de THM encontrados en el área de estudio, con valores en el rango 0,14-18,75 $\mu\text{g/l}$ para la suma de THM, sobre todo cuando se comparan con los descritos en otras zonas de España (Villanueva *et al.*, 2003; Fraile *et al.*, 2005), especialmente la región de Levante (Villanueva *et al.*, 2001a, 2003 y 2006). Además, la concentración máxima de THM encontrada en el área de estudio es inferior a la tercera parte del valor máximo admisible de 100 $\mu\text{g/l}$ establecido por la Unión Europea para la suma de estos compuestos (Directiva 1998/83/CE). Estos resultados podrían atribuirse a la calidad del agua en origen, ya que se trata, muy posiblemente, de abastecimientos con pocos residuos orgánicos.

El objetivo principal de este apartado de la presente Tesis Doctoral era conocer las posibles variaciones en la exposición a THM de los niños de la cohorte INMA-Granada atendiendo al lugar geográfico de su residencia. Tanto la variable urbano/rural como el origen del agua de consumo (subterráneo/superficial) fueron relevantes a la hora de explicar las diferencias geográficas en las concentraciones de THM. Así, se encontraron mayores niveles en zonas urbanas y donde el agua abastecida era de origen superficial. En las zonas urbanas la generación de THM puede verse favorecida ya que, al tratarse de áreas más pobladas, el contenido en materia orgánica suele ser mayor (por ejemplo, por residuos fecales). Por otra parte, es posible también que las plantas de tratamiento que abastecen a grandes poblaciones empleen mayor cantidad de desinfectante

para asegurar la potabilización del agua en redes de distribución de mayor extensión. En las zonas rurales, la actividad agrícola supone un aporte adicional de materia orgánica al agua. Además, las plantas de tratamiento en las zonas rurales posiblemente cuenten con procesos menos sofisticados, un peor mantenimiento de las redes de distribución y/o controles reglamentarios menos exhaustivos, lo que podría favorecer la generación de THM.

Los resultados obtenidos pueden ser considerados como representativos de los niveles medios de THM en el área de referencia de la cohorte INMA-Granada. Los puntos de muestreo incluyen los siete sistemas principales de abastecimiento del área de estudio, así como otros sistemas que suministran agua a poblaciones pequeñas, haciendo un total de 18. Estos sistemas abastecen a un 90% de la población del área y a la casi totalidad de municipios de residencia de la cohorte de Granada. Los municipios no muestreados estarían representados por alguno de los sistemas estudiados porque forman parte de las zonas de abastecimiento incluidas en el muestreo. Los municipios en los que no se muestreó son en su mayoría pequeños, rurales y con abastecimientos autónomos, que representan menos del 10% de la población de la zona.

El tratamiento de desinfección mayoritariamente utilizado por los gestores de los abastecimientos del área de estudio es la aplicación de cloro (Cl_2), utilizando en algunos casos hipoclorito (ClO^-) en una fase de pretratamiento (pre-oxidación) o posterior al tratamiento (postcloración). Ya que la desinfección con cloro es el tratamiento de potabilización del agua que más se utiliza en la actualidad, sería necesario que las plantas de tratamiento contemplaran la posibilidad de llevar a cabo acciones para reducir los niveles de subproductos de la desinfección generados, sin comprometer, claro está, la potabilización. Existen métodos de desinfección que no utilizan cloro en el tratamiento, como son la ozonización o la aplicación de radiación UV, pero presentan el inconveniente de ser más costosos. La ozonización, aunque en menor medida, también genera

subproductos perjudiciales. Sin embargo, la utilización de radiación UV no genera productos residuales pero es de coste elevado. En cualquier caso, uno de los mejores métodos para controlar los subproductos de la cloración (SPC) en cualquier proceso de desinfección sería la eliminación de los precursores orgánicos antes de la desinfección.

Nuestro trabajo, como ya se ha señalado, presenta algunas limitaciones. Quizás, la más importante es la falta de información “oficial” reglamentaria sobre los niveles de THM, principalmente en los abastecimientos pequeños, cuya realidad ha sido difícil conocer. Por otro lado, no se determinaron en las muestras de agua parámetros como la concentración de materia orgánica o de bromuros, lo que habría ayudado a entender mejor la presencia de THM en los distintos puntos de muestreo.

Entre los objetivos de la Red INMA está la obtención de los datos reglamentarios que registran los organismos públicos responsables de la vigilancia de la calidad del agua en cada zona de estudio (en el caso de la cohorte INMA-Granada, el Servicio de Sanidad Ambiental de la Consejería de Salud), de forma que sea posible conocer los datos con los que ellos trabajan y así valorar la coherencia con los resultados generados por la Red INMA (Villanueva *et al.*, 2006). De conformidad con lo establecido en el Real Decreto 140/2003, los niveles de THM deben ser analizados y vigilados periódicamente por las entidades gestoras del tratamiento y suministro del agua de consumo. Todas las empresas gestoras y ayuntamientos implicados en la gestión del agua en el área de estudio INMA-Granada recibieron un cuestionario diseñado *ad hoc* siguiendo los protocolos establecidos por la Red INMA. Se recibió el 60% de las encuestas cumplimentadas, que aportaron información sobre los niveles de THM registrados en las últimas mediciones (2005/2006). Según estos datos, las concentraciones para cada compuesto (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y cloroformo) no superaron en ningún caso los 10 µg/l. Las concentraciones más

altas para el total de THM estaban entre 20 y 25 $\mu\text{g/l}$, y correspondían a dos municipios de la zona metropolitana. En general, los datos de zonas urbanas fueron superiores a los facilitados por los municipios rurales.

A pesar de la variabilidad geográfica de las concentraciones de THM en la zona de estudio, el riesgo para la salud asociado a estos contaminantes puede considerarse pequeño. Por otro lado, los resultados obtenidos podrán servir como valores de referencia para estudios comparativos con otras regiones de España con mayores concentraciones de THM en agua de consumo, y por tanto, con una mayor exposición poblacional. A este respecto, en el estudio de cohortes INMA la concentración de THM en agua de bebida se ha utilizado como medida de exposición a subproductos de la cloración (SPC). Sin embargo, se sabe que los riesgos asociados a la exposición a THM, como cáncer de vejiga, nacimiento prematuro, aborto espontáneo y malformaciones congénitas, entre otros (Villanueva *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2008), no se limitan a este grupo de SPC, sino que existe un conjunto de contaminantes sospechosos de poder contribuir a la incidencia de estas patologías. En la actualidad, varias cohortes de la Red INMA, entre ellas la cohorte de Granada, participan en el proyecto europeo del VII Programa Marco “Hi-Wate” (*Health impacts of long-term exposure to disinfection by-products in drinking water*) (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2009), cuyo objetivo principal es estudiar el grado de exposición crónica de la población a SPC en distintos países de la Unión Europea, y evaluar el riesgo potencial para la salud humana asociado a dicha exposición. En este contexto, se están llevando a cabo mediciones de otros SPC como son los ácidos haloacéticos, acetonitrilos y cloropicrina, entre otros. El proyecto europeo permitirá valorar de manera más exhaustiva la relevancia en Salud Pública ligada a la presencia de estos contaminantes en agua de consumo en la provincia de Granada.

2. Niveles de contaminación atmosférica y exposición individual a NO₂ en población infantil de Granada

La caracterización de la exposición a contaminación atmosférica es un requisito indispensable para estudiar sus posibles efectos en la salud, especialmente en periodos de mayor vulnerabilidad, como es la infancia. Por ello, entre los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral se incluye la monitorización ambiental de contaminantes del aire (NO₂ y COVs) en el área de estudio de la cohorte INMA-Granada. Entre estos contaminantes cabe destacar que los niveles medios de NO₂ registrados fueron relativamente bajos en los tres periodos de muestreo; las concentraciones medias en las campañas de 2003, 2005 y 2006 fueron de 32,0; 23,5 y 17,4 µg/m³, respectivamente. Además, la concentración media de NO₂ en la zona urbana de Granada, 37 µg/m³, fue menor que las descritas en las principales ciudades españolas (50-63 µg/m³) (Balasano *et al.*, 2003). En ciudades más pequeñas como Pamplona se han descrito niveles medios similares a los observados en Granada (23,2 µg/m³) (Zabalza *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2009), mientras que en otras como La Coruña se han observado niveles inferiores (13,4 µg/m³) (Fernández-Villarenga *et al.*, 2004). Si comparamos con otras zonas de estudio incluidas en la Red INMA, se han observado niveles medios superiores en la ciudad de Sabadell (40 µg/m³) (Aguilera *et al.*, 2008) y niveles similares en el área de estudio de Valencia (32 µg/m³) (Íñiguez *et al.*, 2009). Las diferencias encontradas pueden ser debidas a distintos factores, entre ellos, las características particulares de cada zona de estudio, los lugares y periodos de muestreo, las actividades económicas predominantes en cada zona y/o diferencias relacionadas con los vehículos, como por ejemplo, la composición de la gasolina utilizada en cada región (Gee y Sollars, 1998).

La variabilidad espacial de los niveles de NO₂ observada en una zona no industrial como la provincia de Granada (García-Pérez *et al.*, 2007) se puede explicar por el impacto del tráfico en los niveles ambientales de este contaminante.

Como era de esperar, la concentración de NO₂ en el periodo más cálido (septiembre de 2006) fue significativamente menor que las registradas en las campañas de otoño (noviembre de 2003 y 2005), lo que coincide con lo publicado en otros estudios (Mayer, 1999; Batterman *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2007; Íñiguez *et al.*, 2009).

En cuanto a los compuestos orgánicos volátiles (COVs) medidos, las concentraciones medias de benceno y *orto*-xileno fueron inferiores a los valores descritos en ciudades del norte de la península (Pamplona y La Coruña), aunque los niveles medios de etilbenceno y *meta+para*-xileno fueron similares (Fernández-Villarenaga *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2009). El compuesto que presentó las concentraciones más elevadas en el área de estudio fue tolueno, con un rango de 2,3-34,8 µg/m³, aunque las concentraciones fueron inferiores a las descritas en los dos estudios realizados en Pamplona y La Coruña (Fernández-Villarenaga *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2009). La concentración media de benceno, 1,9 µg/m³, fue ligeramente superior a la descrita en Sabadell (Aguilar *et al.*, 2008) y en otras zonas rurales del norte de la península (Parra *et al.*, 2006), aunque la concentración máxima alcanzada fue de 5,6 µg/m³, en la zona urbana de Granada, ligeramente por encima del valor límite de 5 µg/m³ para la concentración media anual establecido por la UE (Directiva 2000/69/CE). La concentración media de benceno en cada una de las campañas no superó el valor de 3 µg/m³.

En el periodo 2005/2006, la concentración media de BTEX (suma de COVs: benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno y *m+p*-xileno) en Granada, 28,1 µg/m³, fue superior a la registrada en la cohorte INMA de Sabadell (17,1 µg/m³) (Aguilera *et al.*, 2008), y ligeramente superior a la descrita en Pamplona (24,3 µg/m³) y en otras zonas urbanas de Europa (Fischer *et al.*, 2000; Topp *et al.*, 2004). Las mayores concentraciones de COVs se dieron siempre en la zona urbana, debido a que estos contaminantes son emitidos mayormente por los vehículos. Fuera de la zona urbana, la variación espacial de las concentraciones de

COVs fue menor que para NO₂. En cuanto a la variación temporal, las concentraciones registradas en las campañas de otoño (noviembre de 2003 y 2005) también fueron más altas que las registradas en la campaña de verano (septiembre de 2006), de acuerdo con lo descrito por otros investigadores (Parra *et al.*, 2009).

Muchos trabajos han utilizando y utilizan la concentración de NO₂ como indicador de la contaminación atmosférica derivada del tráfico (Briggs *et al.*, 1997 y 2000; Krämer *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2002), aunque la correlación de NO₂ con otros contaminantes asociados a las emisiones de los vehículos es, no obstante, una cuestión que merece la pena estudiar (Jerrett *et al.*, 2005a). La alta correlación encontrada entre las concentraciones de NO₂ y COVs en los puntos de muestreo sugiere que la principal fuente de emisión para los contaminantes estudiados es la misma, pudiéndose afirmar, por tanto, que el tráfico es también la principal fuente de emisión de COVs en el área de estudio.

La interpolación espacial de las concentraciones de NO₂ mediante *kriging* mostró, en las tres campañas, el impacto del tráfico sobre los niveles de contaminación en la zona urbana y la zona metropolitana, especialmente en las proximidades de las dos carreteras principales del área de estudio (véase Figura 4.6). La combinación de la predicción del *kriging* en el periodo 2005/2006 con la información sobre usos de suelo y tráfico permitió la estimación de los niveles de NO₂ exterior en toda el área de estudio, con una varianza explicada de 45% para la zona urbana y de 75% para la zona no urbana. Una de las limitaciones de este estudio es la falta de datos de tráfico más específicos, como por ejemplo la intensidad media diaria de vehículos en la ciudad de Granada y en las calles del resto de municipios estudiados, que probablemente hubiesen mejorado la capacidad predictiva de los dos modelos. Aún así, utilizando sólo dos variables predictivas (la estimación del *kriging* y la longitud de tramos de carreteras en un entorno de radio 1.500 m), se obtuvo, para la zona no urbana, un modelo con un valor de R² similar al obtenido en las zonas de estudio de las cohortes INMA de

Valencia, que incluye zona urbana, metropolitana, semiurbana y rural ($R^2=81\%$ incluyendo el *kriging*; $R^2=73\%$ sin incluirlo), y de Sabadell, con una zona exclusivamente urbana ($R^2=75\%$) (Aguilera *et al.*, 2008; Íñiguez *et al.*, 2009).

La estimación de la exposición a NO_2 en el área no urbana resultó, por tanto, mucho más precisa que en el área urbana. El problema en la zona urbana fue que, además de la falta de datos cuantitativos de tráfico, no se consiguió la interpolación deseada, ya que el enrejado no era lo suficientemente denso para captar la variabilidad espacial de NO_2 , con lo que la superficie que se obtuvo mediante *kriging* suavizaba demasiado dicha variabilidad, obteniéndose una predicción constante. En las zonas urbanas en general, la existencia de múltiples fuentes y el efecto pantalla, entre otros factores, dan lugar a grandes variaciones de NO_2 en pequeñas distancias (50-100 m). Por este motivo, dadas las características que diferencian a la zona urbana de la zona no urbana, se utilizó una combinación del método *kriging* y de modelos de regresión (*land use regression*, LUR) para modelizar los niveles de NO_2 en toda el área de estudio, siguiendo una metodología previamente descrita dentro de la propia Red INMA (Aguilera *et al.*, 2008; Íñiguez *et al.*, 2009).

Los niveles de NO_2 exterior estimados en los domicilios particulares de los niños incluidos en la cohorte INMA-Granada tuvieron un valor medio de $21,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y un rango de $5,15\text{-}35,23 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Estos valores fueron ligeramente inferiores a la media de las concentraciones registradas en los puntos de muestreo en el periodo 2005/2006, que tuvieron una media de $20,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y un rango de $3,2\text{-}59,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Esto indica que los puntos de muestreo fueron seleccionados adecuadamente, ya que proporcionaron un gradiente de exposición considerable entre los niños de la cohorte. Las asignaciones de niveles de exposición en esta submuestra de niños de la cohorte de Granada fueron inferiores a las obtenidas, mediante metodologías similares, para las mujeres de las cohortes INMA-Sabadell, con una media de $37,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y un rango de $18,7\text{-}76,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$, y para las de la

cohorte INMA-Valencia, con una media de 37,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y un rango de 7,0-68,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, durante el embarazo (Aguilera *et al.*, 2008; Íñiguez *et al.*, 2009).

Según los modelos para el promedio anual de NO_2 , en el periodo 2005/2006, ninguno de los niños vivía en una zona con una concentración superior a 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, valor límite establecido por la UE para la protección de la salud humana, de obligado cumplimiento a partir de 2010 (Directiva 1999/30/CE). La variabilidad de los niveles de exposición a NO_2 en la zona urbana puede haber estado limitada por la falta de precisión en el modelo para esta zona. Aún así, el hecho de que la cohorte esté distribuida en un área extensa, con características sociodemográficas, de usos del suelo y ambientales diferentes ha proporcionado una variedad de escenarios y, por tanto, un rango de exposiciones más amplio.

Los modelos basados en sistemas de información geográfica (SIG), con información no sólo de carácter geográfico sino también temporal, constituyen una herramienta muy valiosa para evaluar la exposición infantil en estudios de epidemiología ambiental (Gilliland *et al.*, 2005). En este estudio, el modelo empleado se ha basado en el componente espacial, ya que se pretendía obtener una aproximación a la exposición en un periodo de tiempo determinado (cuando los niños tenían 4 años de edad) y conseguir el rango de gradientes de exposición por residir en lugares geográficos diferentes. Por tanto, aunque las condiciones climáticas (humedad, temperatura) juegan también un papel importante en los niveles de contaminación atmosférica, en este estudio se tuvieron en cuenta fundamentalmente las variaciones espaciales, más que las temporales.

Los modelos LUR se han usado principalmente para estimar la exposición a contaminación atmosférica a largo plazo. En este estudio, los modelos de regresión se construyeron a partir de los niveles medios procedentes de varias campañas de muestreo, siguiendo el procedimiento aplicado en estudios previos realizados en Europa (Briggs *et al.*, 1997; Lebret *et al.*, 2000), según los cuales un modelo para el promedio anual sería más estable que un modelo para cada

campana. Existe un número considerable de trabajos que han empleado modelos LUR en la modelización espacial de NO₂ (Briggs *et al.*, 1997; Bellander *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2007; Aguilera *et al.*, 2008), sin embargo, todos ellos se han llevado a cabo en un ámbito estrictamente urbano, más o menos industrializado. Es importante destacar que dichos estudios han constatado que las zonas más contaminadas dentro de un área urbana se mantienen a lo largo del año, con independencia de las variaciones temporales.

Otra cuestión de relevancia es en qué medida los niveles modelizados de NO₂ en el ambiente exterior representan la exposición personal a contaminación derivada del tráfico. Así, el estudio del patrón tiempo-actividad del niño ayudaría a obtener una estimación más precisa de la exposición. Los niños pasan la mayor parte de su tiempo en ambientes interiores (sobre todo los que residen en zonas urbanas) y la exposición a contaminantes del tráfico estará determinada por la medida en que éstos influyen en la calidad del aire interior (Fischer *et al.*, 2000). Rijnders y colaboradores (2001) encontraron que los niveles de exposición personal a NO₂ en niños estaban influidos de manera significativa por el grado de urbanización de la zona donde residían y por la intensidad de tráfico en la carretera más cercana.

A pesar de la complejidad de modelizar la distribución espacial de las concentraciones de COVs, hubiese sido también oportuno evaluar la exposición a estos contaminantes, especialmente en la zona urbana, debido a los riesgos para la salud que supone la exposición crónica a COVs, incluyendo el posible efecto cancerígeno del benceno (WHO, 2002b). La ventaja que presenta el estudio de la exposición a COVs frente al NO₂ y otros contaminantes gaseosos, es la posibilidad de determinar la exposición mediante la utilización de biomarcadores (Sexton *et al.*, 2005).

En resumen, a pesar de las limitaciones de este estudio, ha sido posible obtener una aproximación a la exposición individual a NO₂ en una submuestra de

niños de la cohorte INMA-Granada, a la edad de 4 años, mediante la medición de los niveles de contaminación atmosférica en aire exterior y el uso de técnicas de análisis espacial. De este modo, este estudio proporciona una estimación de la exposición individual más precisa que la utilizada de manera habitual en los estudios de epidemiología ambiental para evaluar los efectos en salud por exposición a contaminantes atmosféricos, la mayoría de ellos basados en mediciones indirectas o realizadas a mayor escala.

3. Niveles de 1-hidroxipireno en población infantil de Granada y exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos

Este es uno de los primeros trabajos realizados en España en el que se investigan las concentraciones de 1-hidroxipireno (1-OHP) en población infantil. En la cohorte INMA-Valencia se ha realizado un estudio similar, aunque los niveles de 1-OHP se determinaron en mujeres embarazadas (Llop *et al.*, 2008). En ambos trabajos se pretendía estudiar los niveles de este biomarcador y su asociación con la exposición a contaminación atmosférica en un grupo de población vulnerable, respondiendo a la necesidad de caracterizar la exposición a contaminantes ambientales, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), potencialmente dañinos para la salud del feto y del niño en sus primeros años de vida.

La biomonitorización humana, que emplea biomarcadores como la medida de 1-OHP en orina, permite evaluar de manera directa la exposición a las sustancias químicas presentes en el medio ambiente mediante la medida de estos compuestos o sus metabolitos en matrices biológicas, como pueden ser sangre, orina o pelo, en un momento determinado. Además, tiene la ventaja, frente a otras formas de evaluación de la exposición (por ejemplo, medida de la concentración ambiental de un contaminante o estimación de los hábitos de consumo), de integrar la exposición a través de distintas vías (inhalación, ingestión o absorción dérmica). No obstante, presenta el inconveniente de que no permite identificar la contribución de cada vía de exposición a la dosis interna de un residuo químico determinado.

Países como Estados Unidos y Alemania han sido pioneros en el desarrollo de programas de vigilancia o biomonitorización humana para conocer la exposición a contaminantes ambientales en población general, utilizando para ello distintos biomarcadores. En España, a pesar de los esfuerzos de algunas administraciones, es llamativa la falta de información sobre la exposición de la

población a contaminantes ambientales, ya que son escasos y muy limitados en su proyección los informes sobre niveles de residuos en diferentes matrices biológicas (Porta *et al.*, 2008). El conocimiento de los niveles en sangre u orina de compuestos químicos relevantes ayudaría a diseñar programas específicos de actuación en distintos escenarios.

Los programas NHANES, en Estados Unidos (NCHS, 2007), y GerES, en Alemania (Seifert *et al.*, 2000), incluyen entre sus objetivos la biomonitorización de la exposición poblacional a HAPs, debido al interés que ha despertado en los últimos años este grupo de contaminantes en el ámbito de la salud ambiental. A este respecto, el tercer “Informe sobre Exposición de la Población General a Compuestos Químicos Ambientales” del NHANES (CDC, 2005) proporciona datos de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, metabolitos de HAPs y ftalatos en orina. Por su parte, el GerES (Umweltbundesamt, 2008) incluye cadmio, mercurio y metabolitos de HAPs medidos en muestras de orina. El biomarcador establecido y que se considera apropiado para evaluar la dosis interna de exposición ambiental a HAPs es la concentración en orina del metabolito 1-OHP (*Human Biomonitoring Commission*, 2005; Hansen *et al.*, 2008). Es, por tanto, una tarea necesaria obtener datos representativos de los niveles de 1-OHP en orina en población general española, especialmente en grupos vulnerables, así como establecer valores de referencia, tarea que ya se está llevando a cabo en algunos países como los arriba mencionados (*Human Biomonitoring Commission*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Wilhelm *et al.*, 2008).

Los HAPs se encuentran en el medio ambiente en mezclas complejas de más de 100 compuestos distintos, siendo el pireno uno de los que se encuentra en la mayoría de ellas y en mayor cantidad. El pireno puede ser emitido por diversas fuentes de combustión industriales, urbanas y domésticas, con lo que la exposición poblacional será mayor y más generalizada que en el caso de otros HAPs. En el organismo, el pireno es metabolizado y excretado en la orina,

principalmente en forma de 1-OHP, por lo que este metabolito está considerado como un buen indicador de la exposición al total de HAPs (Wilhelm *et al.*, 2008).

El estudio de la exposición a HAPs en niños de la cohorte INMA-Granada, mediante la determinación de la concentración de 1-OHP en muestras de orina, mostró valores medios de este metabolito de 0,061 $\mu\text{mol/mol}$ y un rango de 0,004-0,314 $\mu\text{mol/mol}$, niveles relativamente bajos cuando se comparan con los encontrados en estudios realizados con población infantil de otros países, particularmente en países asiáticos y europeos con fuentes industriales de emisión de HAPs (Siwinska *et al.*, 1998; Mielzynska *et al.*, 2006; Mucha *et al.*, 2006), o con una alta densidad de tráfico (Hansen *et al.*, 2005; Ruchirawat *et al.*, 2006 y 2007). La concentración media encontrada en Granada fue similar a los niveles medios descritos en población infantil de Estados Unidos (NHANES 1999-2000) (Huang *et al.*, 2006) e inferior al valor de referencia de 0,155 $\mu\text{mol/mol}$ para niños de 3 a 14 años establecido por la Agencia Ambiental Federal Alemana (*Human Biomonitoring Commission of the German Federal Environmental Agency*), a partir de los estudios GerES III y IV (Wilhelm *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo se formuló la hipótesis de que la exposición a mayores niveles de contaminación atmosférica podrían llevar a una mayor excreción de 1-OHP, existiendo una relación entre la concentración de HAPs emitidos por el tráfico y la exposición infantil a estos compuestos (Kano *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 2005; Ruchirawat *et al.*, 2005). Además, se sugiere que la concentración de 1-OHP en orina refleja la exposición a HAPs incluso a bajos niveles de contaminación atmosférica (Castaño-Vinyals *et al.*, 2004). En la consideración de los determinantes de la exposición a HAPs, es importante señalar dos hechos que pueden ayudar a entender más fácilmente el desarrollo del trabajo: 1) el objetivo del mismo era evaluar la asociación de la concentración de 1-OHP con la exposición infantil a contaminación atmosférica, interior y exterior, relacionada con los HAPs del aire y 2) considerando que el tráfico es la principal fuente de

emisión de HAPs en área de estudio, se utilizó la concentración de NO₂ estimada en el domicilio del niño y la percepción de los padres sobre la intensidad del tráfico en las proximidades de su vivienda, como indicadores de la exposición a los contaminantes del tráfico.

En los niños de la cohorte de Granada, el análisis bivariante mostró una asociación positiva entre los niveles de 1-OHP en orina y las concentraciones de NO₂ estimadas en el exterior de los domicilios. Después de estratificar la población en función de la exposición pasiva al humo de tabaco, se encontró una asociación entre las concentraciones de 1-OHP y la intensidad de tráfico percibida por los padres, y entre 1-OHP y el tipo de cocina de la vivienda, indicando que el humo del tabaco podría actuar como factor de confusión en este tipo de exposición. En el análisis multivariante, los factores finalmente asociados de manera positiva e independiente con la concentración de 1-OHP ($p \leq 0,10$) fueron el nivel estimado de NO₂, la exposición pasiva al humo de tabaco y el uso de cocina de gas en la vivienda.

La intensidad de tráfico percibida por los padres y el nivel estimado de NO₂ en el domicilio estaban correlacionados de manera significativa, ya que son dos variables relativas al tráfico en el entorno de la vivienda. Sin embargo, sólo el nivel de NO₂ fue significativo en el modelo multivariante, indicando que esta variable cuantitativa refleja mejor la contaminación por tráfico que la variable subjetiva de percepción y, por tanto, explica mejor la variabilidad de los niveles de 1-OHP encontrados.

Estos resultados sugieren que en el área de estudio el tráfico puede ser considerado como la principal fuente de emisión de HAPs en aire exterior y que juega, por tanto, un papel importante en la exposición de la población a estos contaminantes, como ya lo habían indicado otros estudios realizados en España (Llop *et al.*, 2008), Dinamarca (Hansen *et al.*, 2005) y Estados Unidos (Chuang *et al.*, 1999). Además, otras posibles fuentes de emisión de HAPs, como el tabaco,

parecen tener influencia en los niveles de 1-OHP en población infantil, como también lo han señalado otros autores (Siwinska *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2006; Kolloso-Gehring *et al.*, 2007).

La orina es probablemente la segunda matriz biológica más usada, después de la sangre, en programas de biomonitorización humana. En estudios de epidemiología ambiental con población infantil, la determinación de biomarcadores de exposición en muestras de orina, como la medida de 1-OHP, resulta particularmente ventajoso porque: i) las muestras de orina son fáciles de obtener y por métodos no invasivos, ii) se puede disponer fácilmente de los volúmenes necesarios para el análisis, y iii) supone un coste pequeño en comparación con la obtención de otro tipo de matriz biológica (Esteban y Castaño, 2009). No obstante, utilizar la medida de la concentración de 1-OHP en orina como reflejo de la exposición crónica a HAPs tiene sus limitaciones. En una muestra de mujeres embarazadas de la cohorte INMA-Valencia, se encontró que la concentración de 1-OHP era un buen indicador de la exposición reciente a contaminación atmosférica relacionada con el tráfico (Llop *et al.*, 2008). Por tanto, la validez de este biomarcador como indicador de la exposición crónica es todavía cuestionable.

Evaluar la exposición crónica a los distintos contaminantes ambientales es una tarea compleja, especialmente cuando la exposición ocurre a través de diferentes rutas. En el caso de 1-OHP, los niveles excretados en niños pueden reflejar la exposición a HAPs a través de la inhalación, la dieta o el contacto con suelo contaminado. En este trabajo se pretendía estudiar la exposición a HAPs presentes en el aire (a través de la inhalación) y su influencia en la concentración de 1-OHP en orina. Pero, además de la contaminación atmosférica y el humo de tabaco, la dieta puede ser una fuente importante de exposición humana a HAPs, en ocasiones la que más contribuye a la exposición infantil (Vyskocil *et al.*, 1997 y

2000; Fiala *et al.*, 2001). Por tanto, el hecho de no haber contemplado esta ruta supone una de las principales limitaciones de este trabajo.

El contacto con suelo contaminado también es otra posible fuente de exposición infantil a HAPs, especialmente en niños que viven en las proximidades de carreteras con mucho tráfico o de fuentes industriales (Tang *et al.*, 2006). Sin embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, la principal fuente de contaminación atmosférica en el área de estudio es el tráfico y, por tanto, la que más contribuye a la concentración de estos contaminantes en el suelo. Cabe recordar que en la zona rural los niveles de NO₂ fueron bajos y es probable que la deposición de HAPs procedentes del tráfico no sea relevante, ni tampoco la exposición infantil por este vía.

Otros aspectos como el pequeño tamaño muestral (n=174) y la falta de mediciones ambientales directas de HAPs también pueden haber limitado la potencialidad de este estudio. No obstante, a pesar de estas limitaciones, se encontró una asociación entre los niveles de 1-OHP medidos en la submuestra de niños de la cohorte INMA-Granada y la contaminación relacionada con el tráfico, la exposición pasiva al humo de tabaco y el uso de cocina de gas en sus viviendas. Se concluye, por tanto, que el papel de la contaminación del aire en la exposición infantil a HAPs es considerable, aunque la falta de asociaciones más fuertes podría deberse a la contribución de otras rutas de exposición, especialmente la dieta.

4. Exposición a contaminación atmosférica y desarrollo cognitivo en población infantil de Granada

Entre los objetivos de este trabajo se encontraba el estudio de la asociación entre el desarrollo cognitivo en los niños de la cohorte INMA-Granada y la exposición a la contaminación atmosférica procedente del tráfico. Para ello, se realizó un análisis transversal que dio como resultado una relación inversa entre los niveles estimados de exposición residencial a NO₂ y el neurodesarrollo de los niños a los 4 años de edad, después de ajustar los modelos por distintos factores de confusión, sociodemográficos y físicos, y por variables psicológicas de la madre, esto es, salud mental y vínculo afectivo. Aunque el análisis realizado no establece causalidad, sólo una asociación, los hallazgos sugieren que podría existir una relación entre una mayor exposición a contaminación atmosférica procedente del tráfico (NO₂) y un peor rendimiento cognitivo en edades tempranas. Además, la asociación obtenida en el análisis ajustado fue consistente, ya que se encontró una relación de signo negativo con el NO₂ en todas las áreas y funciones del test McCarthy, empleado para evaluar el desarrollo cognitivo de los niños. A pesar de que las asociaciones encontradas no fueron estadísticamente significativas, no se puede descartar la hipótesis planteada.

Un estudio similar llevado a cabo en la ciudad de Boston (Estados Unidos) describió una asociación negativa entre la exposición a partículas del tráfico y el rendimiento cognitivo en 210 niños de entre 8 y 10 años (Suglia *et al.*, 2008). Se encontró una disminución de 3 puntos en el coeficiente de inteligencia (IQ) obtenido mediante el test de Kaufman (*Kaufman Brief Intelligence Test*), y de 4 puntos en el índice general obtenido a partir del test de memoria WRAML (*Wide Range Assessment of Memory and Learning*), como resultado de una mayor exposición a partículas del tráfico. La magnitud de estas asociaciones fue del mismo orden que las encontradas en el presente trabajo de Tesis Doctoral, aunque en el estudio americano sí se alcanzó la significación estadística. En nuestro

estudio, se observó una relación próxima a la significación estadística en la función motora gruesa, mostrando una disminución de 8,3 puntos para valores de exposición a NO₂ entre 15,40 y 24,75 µg/m³ (p=0,08) y de 8,6 puntos para valores de exposición >24,75 µg/m³ (p=0,1). También en niños residentes en la ciudad de Méjico, donde los niveles de contaminación atmosférica por tráfico son muy elevados, se ha descrito retraso en determinadas áreas cognitivas, como la memoria y la función ejecutiva, en comparación con niños que habitan en zonas menos contaminadas (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008a).

Existen varios mecanismos potenciales que podrían contribuir al efecto de la contaminación atmosférica en el neurodesarrollo de los niños en los primeros años de vida. Algunos estudios han demostrado que las partículas ultrafinas del aire pueden alcanzar el cerebro sin necesidad de penetrar en los pulmones (Oberdorster *et al.*, 2004). Las partículas depositadas en el cerebro probablemente están relacionadas con un aumento del estrés oxidativo en este órgano, al igual que se ha observado en otros tejidos (Beck-Speier *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, se ha demostrado que los metales contenidos en las partículas del aire inducen estrés oxidativo en los pulmones (Knaapen *et al.*, 2002; Ghio, 2004). También se ha relacionado la exposición a la contaminación derivada del tráfico con inflamación crónica en el sistema nervioso (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2002, 2004 y 2008b; Lai *et al.*, 2005). Ambos mecanismos podrían implicar un déficit cognitivo, como resultado del impacto de la contaminación del tráfico sobre el sistema nervioso en etapas tempranas del desarrollo.

Hasta el momento, sólo hemos podido identificar dos estudios que hayan evaluado el efecto de la contaminación del aire por partículas sobre el desarrollo cognitivo infantil (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008a; Suglia *et al.*, 2008). Otros estudios han investigado el impacto del ruido del tráfico o de otros contaminantes neurotóxicos del aire, como los HAPs, en el desarrollo cognitivo infantil (Jedrychowski *et al.*, 2003; Stansfeld *et al.*, 2005; Perera *et al.*, 2005a, 2006a y

2007). Ante la escasez de trabajos al respecto, tan sólo se puede especular sobre las asociaciones encontradas y los mecanismos patogénicos. El NO₂ exterior puede ser considerado un buen indicador de los niveles de otros contaminantes, como las partículas, emitidas también por los vehículos. La exposición a NO₂ exterior, en nuestro estudio no sería, por tanto, el agente causal, sino un posible indicador de la exposición a otros contaminantes atmosféricos con probado efecto neurotóxico y que tienen fuentes de emisiones comunes con el NO₂.

Como ya se ha indicado, el tamaño de la población de este estudio es la principal limitación del mismo, lo que podría haber contribuido, en parte, a la falta de significación estadística en los resultados obtenidos. Por otro lado, una de las fortalezas de este trabajo ha sido la selección de una serie de variables socioeconómicas, físicas y psicológicas como posibles confusores del efecto de la contaminación sobre el rendimiento cognitivo de los niños evaluados, siendo éste uno de los pocos trabajos sobre neurotoxicidad infantil asociada a contaminantes ambientales que contemplan el papel de algún determinante psicológico de los padres (Mink *et al.*, 2004; Perera *et al.*, 2006a). Aunque el estudio debería haber incluido además, entre las variables socioeconómicas, la clase social o el nivel de ingresos, ya que es conocido que el estatus socioeconómico está directamente asociado con el desarrollo cognitivo en la infancia (Noble *et al.*, 2007), al no disponer de esta información, el modelo se ajustó por el nivel de estudios de la madre y del padre, por la ocupación de la madre (empleada / no empleada) y por el lugar de residencia, que podrían reflejar en buena medida las diferencias socioeconómicas en la población de estudio. Otras de las ventajas de nuestro estudio, a diferencia del estudio de Suglia y colaboradores (2008), es que incluye un área extensa con zonas bien diferenciadas, lo que ha proporcionado una mayor variabilidad tanto en el estatus social de las familias como en el grado de urbanización.

Como ya se ha mencionado anteriormente, otra posible limitación de este estudio es que la asignación de los niveles de exposición a NO₂ se basó en las concentraciones estimadas en el exterior del domicilio, con lo que no se consideró la exposición en el colegio o en otros lugares en los que los niños pasan parte de su tiempo. Sin embargo, dadas las características sociodemográficas de la población, la mayoría de los niños de la cohorte INMA-Granada incluidos en este estudio acudían a un colegio cercano a su domicilio, y siempre en el mismo núcleo urbano en el que residían. Además, es importante tener en cuenta que, en comparación con los adultos, los niños pasan más tiempo en el interior de sus viviendas y alrededores (Liu *et al.*, 2003). Por otro lado, algunos trabajos han investigado las posibles fuentes de contaminación por NO₂ en el interior de las viviendas; así, un estudio de cohortes llevado a cabo en Gran Bretaña y en dos áreas de España (una urbana y otra rural) encontró que las diferencias en las concentraciones de NO₂ en el interior de las residencias reflejaban las diferencias observadas en el exterior, y los factores domésticos que influían en la concentración de NO₂ en el interior eran constantes en las tres cohortes estudiadas (García-Algar *et al.*, 2004). Otros estudios han indicado que la exposición residencial y en el interior de la vivienda son las que mejor representan la exposición individual (Rohas-Bracho *et al.*, 2000). Por tanto, se podría considerar que la estimación de la exposición basada en los niveles ambientales en el exterior es un buen reflejo de la exposición personal en la muestra de niños estudiados.

En cuanto a la variación temporal de los niveles de contaminación atmosférica, se puede asumir que la variación espacial es relativamente homogénea a lo largo del año y, por tanto, es poco probable que la asignación de un valor promedio anual de exposición (y no una asignación en el momento exacto de la evaluación neuropsicológica) haya influido en los resultados obtenidos. Dicho de otra manera, los niños con los valores más altos de

exposición serían probablemente los mismos con independencia del momento del año en el que se hubiese llevado a cabo la evaluación neuropsicológica.

En las ciudades, los niños están probablemente más expuestos a los contaminantes atmosféricos del tráfico que los niños que viven fuera de las zonas urbanas pero, a la vez, el grado de urbanización, que se relaciona con el nivel de estudios o la clase social, puede jugar un papel positivo en el neurodesarrollo infantil. Por esta razón, es digno de mención el hecho de haber estudiado estos factores en su conjunto, aunque también hubiese sido interesante incluir en el análisis la exposición a otros contaminantes del interior de la vivienda, como el humo de tabaco ambiental o COVs, que también pueden contribuir a un retraso en el rendimiento cognitivo de los niños (Fiedler *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2008). En nuestro trabajo, el modelo sí se ajustó por la exposición prenatal al humo de tabaco y por las variables de lactancia, peso y talla al nacer y edad gestacional, factores considerados como confusores del neurodesarrollo infantil, de acuerdo con lo publicado por otros autores (Ribas-Fitó *et al.*, 2003 y 2006; Julvez *et al.*, 2007a y 2007b; Herrmann *et al.*, 2008).

Como conclusión, cabe resaltar la novedad y oportunidad del trabajo planteado ya que, según la bibliografía revisada, hasta el momento se ha prestado muy poca atención a estos estudios y sólo hay dos trabajos publicados que investiguen la asociación entre la exposición a contaminación atmosférica derivada del tráfico y el neurodesarrollo infantil. En la cohorte de Granada la evaluación de los niños se realizó en una edad más temprana del desarrollo (4 años) que en las otras cohortes referidas y, además, al análisis incluía niños que residen en zonas urbanas y rurales. Por esta razón, los resultados encontrados sugieren que la contaminación atmosférica presente en ambientes urbanos puede suponer un riesgo para la salud y el desarrollo de los niños y se hace necesario profundizar en este tipo de investigaciones. A este respecto, dado el carácter global de este tipo de exposición, así como las posibles implicaciones en el

neurodesarrollo en edades más avanzadas, sería necesario realizar estudios que, incluyendo un número mayor de niños, fueran capaces de detectar los efectos subclínicos por exposición crónica a contaminantes atmosféricos, incluso a niveles relativamente bajos de contaminación, y especialmente en aquellas ciudades con una peor calidad del aire. La cohorte INMA-Granada ofrece una magnífica oportunidad para resolver algunos de los interrogantes planteados al tener previsto el seguimiento de los niños en edades más avanzadas.

5. Exposición a mercurio, consumo de pescado y desarrollo cognitivo en población infantil de Granada

Los niveles de mercurio total en pelo (T-Hg) determinados en la submuestra de niños de la cohorte INMA-Granada presentaron una media geométrica de 0,96 $\mu\text{g/g}$ y un rango de 0,04-6,67 $\mu\text{g/g}$. Cuando estos niveles se comparan con los niveles de exposición a mercurio encontrados en otros estudios de cohortes o en grupos de niños de España y otros países, la concentración media de T-Hg descrita en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue superior a la encontrada en niños de Cataluña, con niveles medios que oscilan entre 0,67 y 0,77 $\mu\text{g/g}$ (Batista *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 2005; Torrente *et al.*, 2005), por encima de los descritos en niños de Alemania, con valores medios de 0,23 $\mu\text{g/g}$ y un rango de <0,06-1,70 $\mu\text{g/g}$ (Pesch *et al.*, 2002), y también superior a la encontrada en Estados Unidos, con una media de 0,22 $\mu\text{g/g}$ y un rango de 0,18-0,25 $\mu\text{g/g}$ (NHANES 1999-2000) (McDowell *et al.*, 2004).

Sin embargo, los valores encontrados en la submuestra de niños de la cohorte de Granada fueron inferiores a las concentraciones en pelo referidas para población infantil, expuesta a metilmercurio (MeHg), de los tres estudios epidemiológicos de las Islas Faroe, las Islas Seychelles y Nueva Zelanda que en las últimas décadas han investigado extensamente los efectos del MeHg en el neurodesarrollo infantil (Grandjean *et al.*, 1997; Crumpt *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2003). Los niveles también fueron inferiores a los descritos en niños del Amazonas (Brasil) (Barbosa *et al.*, 2001; Dorea *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005), de Japón y de las Islas Madeira (Murata *et al.*, 2002 y 2004a). No obstante, es importante advertir que los niños estudiados tenían edades diferentes, lo que puede contribuir a las diferencias encontradas y dificultar la comparación de los resultados.

Las concentraciones en la cohorte INMA-Granada son comparables a las encontradas en algunas de las cohortes de la Red INMA. Así, por ejemplo, la

concentración media de T-Hg en la cohorte de Ribera d'Ebre fue de 1,09 µg/g, con un rango de 0,19-5,63 µg/g, y en la cohorte de Menorca la media fue de 0,70 µg/g, con un rango de 0,22-3,83 µg/g (Montuori *et al.*, 2006; Díez *et al.*, 2009), determinadas en ambos casos también a los 4 años de edad. La población de la cohorte de Ribera d'Ebre está situada en una zona rural próxima a una planta de producción cloroalcalina en Flix (Tarragona) (Ribas-Fitó *et al.*, 2006b).

Las diferencias en los niveles de mercurio en pelo antes comentadas pueden justificarse, en parte, por los hábitos dietéticos de las distintas regiones y países. España es un país con un consumo de pescado elevado, en comparación con otros países europeos (Welch *et al.*, 2002) o con países como Estados Unidos, pero es más moderado que en Japón y algunas islas donde el pescado constituye el componente principal de la dieta (Grandjean *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 2002 y 2004a). De manera secundaria, algunas fuentes locales de exposición a mercurio, generalmente inorgánico, también pueden ayudar a explicar las diferencias encontradas con algunos estudios (Dorea *et al.*, 2005; Nadal *et al.*, 2005; Montuori *et al.*, 2006); no obstante, debido a que la mayor parte del mercurio contenido en pelo es MeHg (Cernichiari *et al.*, 1995), la contribución del mercurio inorgánico a la concentración de T-Hg sería baja, en comparación con el aporte a través de la ingesta de pescado.

En nuestro estudio, al igual que lo descrito en otros trabajos (Lee *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2001; Montuori *et al.*, 2006), la concentración de T-Hg estaba altamente correlacionada con la concentración de MeHg en las muestras de pelo en las que se analizó este compuesto (n=23). Así, una mayor concentración de T-Hg en pelo reflejaría una mayor exposición a MeHg, cuya capacidad de bioacumulación es mucho mayor que la del mercurio inorgánico. Estos resultados son coherentes con otros trabajos que han estudiado la relación entre T-Hg y MeHg en sangre, poniendo de manifiesto la correlación que existe entre el contenido de mercurio en pelo y en sangre (Mahaffey *et al.*, 2004).

Como ya se ha señalado a lo largo de esta Tesis Doctoral, la dosis de referencia (RfD) para MeHg de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (USEPA, 2001; UNEP, 2002) está basada en los resultados de los estudios de las Islas Faroe, Islas Seychelles y Nueva Zelanda, y se corresponde con una concentración de 1,0 μg de MeHg por g de pelo materno (USEPA, 2001). Aproximadamente, el 50% de nuestra población de estudio tenía una concentración de T-Hg en pelo superior a 1,0 $\mu\text{g}/\text{g}$, indicando la relevancia de la exposición a mercurio en esta muestra de población infantil. Las concentraciones en Granada fueron del orden de una tercera parte de los niveles medios encontrados en el estudio de las Faroe y una quinta parte, aproximadamente, de los descritos en los niños de las Islas Seychelles y Nueva Zelanda.

Las variedades de pescado más consumidas por los niños de la cohorte INMA-Granada fueron las de pescado blanco y pescado frito mixto, aunque sólo el consumo de pescado azul resultó estar asociado con las concentraciones de mercurio encontradas, de manera que en los niños que consumían pescado azul, al menos una vez al mes, la concentración era de hasta tres veces mayor que en niños que nunca o raramente consumían este tipo de pescado ($p=0,01$). No se encontró, sin embargo, asociación entre un mayor consumo de pescado (incluyendo todos los tipos) y mayores niveles de T-Hg en pelo. La concentración de mercurio fue significativamente mayor en niños a los que se introdujo el pescado en la dieta a una edad más temprana ($p=0,05$). En el análisis multivariante, además de la frecuencia de consumo de pescado azul ($p<0,001$), resultaron determinantes de la exposición a mercurio total factores tales como la edad materna (<32 años) ($p=0,01$), la exposición pasiva a humo de tabaco ($p=0,02$) y, especialmente, el lugar de residencia ($p<0,001$) ($R^2=0,38$), de manera que los niños de la zona urbana tenían niveles tres veces superiores que los niños de ámbitos rurales. Ninguna otra variable considerada (peso y talla del niño, nivel

de estudios y ocupación de la madre, paridad, lactancia, y consumo de tabaco durante el embarazo) resultó asociada con la exposición a mercurio.

En algunos de los estudios llevados a cabo en poblaciones españolas del Mediterráneo también se ha observado que el consumo de pescado de los niños está asociado con los niveles de mercurio acumulados en su pelo (Batista *et al.*, 1996; Montuori *et al.*, 2006). A pesar de los bajos niveles de mercurio encontrados en la muestra de niños norteamericanos analizada en el programa NHANES de los años 1999-2000, el consumo de pescado fue uno de los determinantes que tenía un mayor efecto en los niveles de mercurio en pelo (McDowell *et al.*, 2004). Igualmente, el estudio alemán también describe una relación positiva entre la frecuencia de consumo de pescado y la concentración de T-Hg en el pelo de los niños examinados (Pesch *et al.*, 2002). En el estudio de mujeres de la cohorte INMA-Valencia, en la que se encontró unos niveles elevados de T-Hg en sangre de cordón umbilical (Ramón *et al.*, 2008), la ingesta de pescado durante el embarazo, expresada en g/día, resultó determinante de esta exposición. Entre las variedades de pescado estudiadas, el consumo de pescado azul grande, el pescado blanco y el pescado frito se asoció con las concentraciones de mercurio en sangre de cordón. Por su parte, Díez y colaboradores (2009), que describieron concentraciones de T-Hg en sangre de cordón de mujeres de Sabadell y Madrid, encontraron que un 40% y un 60% de las muestras analizadas, respectivamente, tenían niveles de mercurio superiores al nivel de referencia de 5,8 µg/l establecido por la EPA de Estados Unidos (NRC, 2000b). El consumo de pescado también resultó determinante de esta exposición (Díez *et al.*, 2009).

Un estudio reciente (Martí-Cid *et al.*, 2007) ha estimado, para población infantil de Cataluña, la ingesta media diaria de varios contaminantes, entre ellos mercurio, a partir de las concentraciones medidas en 14 especies de pescado. Las mayores concentraciones de mercurio se encontraron en especies de pescado azul grande, como pez espada (rango de 1,59–2,22 µg/g peso fresco) y atún (rango de

0,38–0,58 $\mu\text{g/g}$), seguidas de especies de pescado azul de menor tamaño, como el salmonete (rango de 0,14–0,36 $\mu\text{g/g}$), y de pescado blanco como la merluza (rango de 0,12–0,29 $\mu\text{g/g}$). Los niveles determinados en pez espada superaron el valor límite establecido por la UE (1 $\mu\text{g/g}$) (Directiva 2001/22/CE). Según estos y otros resultados (Renzoni *et al.*, 1998), las especies de pescado azul grande del Mediterráneo tendrían unos niveles de mercurio relativamente elevados, y su consumo habitual podría suponer una exposición inadvertida a concentraciones considerables de mercurio, con las implicaciones en salud que esta exposición conlleva, particularmente cuando la exposición ocurre en etapas críticas del desarrollo físico e intelectual.

Hasta los 4 años de edad, los niños pueden haber estado expuestos a mercurio a través de otras vías de exposición como la lactancia o los alimentos infantiles, el consumo de agua contaminada con trazas de mercurio inorgánico, la exposición a las emisiones del tráfico y de algunas industrias, o incluso a través de algunas vacunas (Counter y Buchanan, 2004; Cabrera-Vique *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2007). Por esta razón tiene aún más valor la observación de que los niños del área urbana de Granada tenían mayores niveles de mercurio en pelo que los niños de zonas rurales, quizás por la existencia de alguna fuente adicional de exposición, como la contaminación del agua abastecida en la zona a causa del vertido de residuos (Cabrera-Vique *et al.*, 2007). No obstante, creemos que el consumo de pescado contaminado con MeHg, así como la exposición que tuvo lugar durante la gestación, serían las fuentes que más contribuirían a la concentración de T-Hg en pelo, como ya se ha descrito previamente (Cernichiari *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2007; Díez *et al.*, 2009).

Entre nuestros objetivos se encontraba estudiar el efecto conjunto de la exposición a mercurio y el consumo de pescado sobre el neurodesarrollo de los niños de la submuestra de la cohorte INMA-Granada, a los 4 años de edad, controlando por distintas variables de confusión. Los resultados de este trabajo

sirvieron para poner de manifiesto una asociación entre una mayor concentración de mercurio en pelo ($>1 \mu\text{g/g}$) y un peor rendimiento cognitivo, que fue evaluado mediante la escala McCarthy. Particularmente, se vieron afectadas las áreas de memoria (-7,2 puntos) y memoria verbal (-8,8 puntos), después de ajustar el modelo de regresión lineal por la frecuencia de consumo total de pescado. Por otro lado, se vieron también afectadas la puntuación general cognitiva (IGC) (-6,6 puntos) y las áreas verbal (-7,5 puntos) y de memoria (-8,4 puntos) cuando el modelo se ajustó por el consumo de los distintos tipos de pescado (azul, blanco, frito y en conserva). Nuestros resultados coinciden con los encontrados en el estudio de las Islas Faroe y de Nueva Zelanda, en los que la exposición prenatal a mercurio se asoció con un retraso en las áreas de memoria, de atención, lenguaje, motora, espacio-visual y en el coeficiente de inteligencia (IQ) (Grandjean *et al.*, 1997; Crumpton *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 2004b). Igualmente, en niños de Estados Unidos y Polonia, se observó que la exposición prenatal a mercurio a concentraciones muy por debajo de las descritas en las Islas Faroe y Nueva Zelanda se asociaba con un déficit en la memoria de reconocimiento visual a los 6 meses de edad (Oken *et al.*, 2005 y 2008), con retraso mental y psicomotor al año de edad (Jedrychowski *et al.*, 2006a) y con un menor IQ y déficit en las funciones verbal y manipulativa a los 4 años de edad (Lederman *et al.*, 2008).

En los niños de Granada estudiados, una frecuencia de consumo de pescado superior a 3 veces/semana se asoció con una menor puntuación en el IGC, en el área ejecutiva y en el área perceptivo-manipulativa. El efecto del pescado en el desarrollo cognitivo resultó diferente cuando los modelos se ajustaron por el consumo de los diferentes tipos de pescado. El consumo de pescado en conserva se asoció con una mayor puntuación en el IGC. El resto de asociaciones no fueron estadísticamente significativas, aunque se observó una relación positiva con el pescado azul y el pescado en conserva, y negativa con el pescado blanco y el pescado frito. A la luz de estos resultados, el efecto del pescado en el

neurodesarrollo infantil parece depender de la especie consumida, siendo más beneficioso el consumo de especies con un alto contenido en nutrientes como los ácidos grasos omega-3 (Mahaffey, 2004; Domingo *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2008), esto es, el pescado azul y el pescado en conserva. El pescado blanco tiene un menor contenido en ácidos grasos poliinsaturados y el efecto del mercurio y de otros contaminantes neurotóxicos presentes en el pescado, como por ejemplo PCBs (Ribas-Fitó *et al.*, 2001), prevalecería sobre el efecto beneficioso de sus nutrientes. Atendiendo a estos resultados, el balance entre el riesgo y el beneficio de consumir pescado durante el embarazo y la primera infancia vendría determinado por el tipo de pescado y por la concentración de contaminantes neurotóxicos. Esto vendría a confirmar lo que ya han indicado otros autores (Daniels *et al.*, 2004; Oken *et al.*, 2005 y 2008; Lederman *et al.*, 2008), que consideran que una ingesta moderada de pescado poco contaminado durante el embarazo tiene un efecto beneficioso en el neurodesarrollo infantil, mientras que el consumo frecuente de especies con mayores niveles de mercurio tendría un impacto negativo en el desarrollo cognitivo del niño.

A diferencia de la mayoría de estudios comentados en la bibliografía reseñada, en la cohorte INMA-Granada se ha investigado la exposición postnatal a mercurio y su efecto en el neurodesarrollo infantil. El diseño transversal (y no prospectivo) del trabajo hace la comparación e interpretación de los resultados algo más complejas, y merece una atención particular. Se ha sugerido que los niños y sus madres ingieren dosis similares de MeHg, debido a patrones de exposición análogos, de manera que el nivel en el pelo en la primera infancia sería un buen reflejo de la exposición familiar a mercurio a través del consumo de pescado y estaría, por tanto, correlacionado con el nivel en el pelo materno (Marques *et al.*, 2007). Recientemente, Díez y colaboradores (2009) realizaron un análisis conjunto de la exposición infantil y neonatal a mercurio en tres cohortes de la Red INMA (Menorca, Ribera d'Ebre, Sabadell) y en un estudio de Madrid,

encontrándose que el consumo de pescado durante el embarazo era el mayor determinante de la concentración de mercurio en el recién nacido. De este modo, y partiendo de que la concentración en pelo es un buen indicador de la exposición a mercurio a largo plazo (Cernichiari *et al.*, 1995), se puede considerar que los niveles de exposición descritos en la población de estudio INMA-Granada serían una aproximación a la exposición tanto prenatal como postnatal.

El desarrollo del sistema nervioso, como ya se ha señalado, continúa tras el nacimiento, por lo que la exposición postnatal a mercurio puede afectar al desarrollo de este sistema de manera similar a la exposición prenatal, aunque probablemente la vulnerabilidad sea más específica después de nacer, y los efectos de la exposición a bajas dosis de MeHg no emergerían hasta etapas posteriores de la vida (Rice, 1996).

Los hallazgos de la cohorte INMA-Granada presentados en esta Tesis Doctoral confirman la hipótesis planteada sobre la asociación entre la exposición infantil a mercurio y déficit en el desarrollo cognitivo, incluso a dosis de exposición relativamente bajas. Sin embargo, los resultados de los estudios sobre el efecto en el neurodesarrollo de la exposición prenatal e infantil a mercurio son todavía contradictorios (Spurgeon, 2006). Sería necesario realizar más estudios, con mayor tamaño muestral, que analizaran el efecto conjunto de la exposición a mercurio y el consumo de diferentes tipos de pescado, con el fin de evaluar el riesgo de la ingesta de pescado en las primeras etapas del desarrollo. Sería también oportuno realizar investigaciones en las que se utilicen instrumentos y protocolos de evaluación neuropsicológica comunes que permitan la comparación de resultados entre estudios, lo que ayudaría a esclarecer el riesgo real de la exposición a mercurio en población infantil.

6. Consideraciones finales

La complejidad de los estudios de epidemiología ambiental radica, esencialmente, en el reto que supone identificar y caracterizar las múltiples exposiciones ambientales de manera directa y con la mayor precisión posible. Esta tarea es imprescindible para conocer la relación existente entre los contaminantes ambientales y la salud humana. Además, los efectos en salud asociados a la contaminación ambiental son sutiles y difíciles de discriminar en las sociedades modernas, en las que una gran cantidad de agentes y factores intervienen en el desarrollo de los procesos patológicos. Hemos sido conscientes, por tanto, de que un estudio de salud y medio ambiente necesita de una aproximación holística que identifique y caracterice de manera individual las diferentes exposiciones, contemple el análisis combinado de la exposición multifactorial y tenga en consideración factores ambientales, socioeconómicos y psicosociales. También por esta razón, en este trabajo de investigación han participado expertos en diferentes áreas -psicólogos, pediatras, ambientalistas, epidemiólogos, entre otros- cuya integración ha hecho posible abordar la hipótesis de trabajo desde una perspectiva multidisciplinar.

En el año 2003 se constituyó la Red de Investigación Cooperativa Infancia y Medio Ambiente (INMA), con el objetivo de estudiar los efectos del medio ambiente y la dieta en el desarrollo fetal e infantil en diversas zonas de España, mediante un estudio prospectivo de cohortes de base poblacional en el que se integró la cohorte de madres e hijos recién nacidos de Granada. La participación en la Red INMA ha permitido describir los niveles individuales de algunos de los contaminantes ambientales de interés en el área de estudio de Granada, y el trabajo cooperativo con profesionales dentro de la propia Red ha ampliado las posibilidades de este trabajo, ha posibilitado el intercambio de conocimientos y experiencias entre expertos, y ha facilitado la disponibilidad de recursos técnicos. Además, el seguimiento de protocolos comunes al resto de grupos de

investigación, así como el uso de herramientas validadas, ha supuesto una gran ventaja, ya que ha permitido contrastar los resultados de la cohorte de Granada con los hallazgos de otras cohortes participantes en la Red.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la exposición a contaminantes ambientales a través del agua, el aire y la dieta, en una muestra de población infantil de un área geográfica de la provincia de Granada, y se ha valorado la significación clínica y poblacional de dicha exposición en la cohorte de niños INMA-Granada, establecida entre 2000 y 2002. Así, en este trabajo se ha podido describir el grado de exposición infantil a contaminantes ambientales de especial interés, como son trihalometanos, NO₂, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mercurio y, siguiendo las hipótesis planteadas, se ha evaluado la asociación de la exposición a la contaminación atmosférica, por un lado, y a mercurio, por otra, con el neurodesarrollo infantil a los 4 años de edad.

A la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que en el área de estudio INMA-Granada la exposición a subproductos de la cloración, a través del uso y consumo de agua de bebida, supone un riesgo de pequeña magnitud para la salud de los niños de la cohorte. La poca carga de materia orgánica y, en general, la calidad del agua en los sistemas de abastecimiento de la zona, en comparación con otras regiones de nuestro país, podría ser la principal causa de los bajos niveles de trihalometanos (THM) encontrados en el agua de consumo analizada, y por ende del menor riesgo asociado a su consumo.

Hoy en día, una mayor parte de la población reside en zonas urbanizadas y la exposición a la contaminación atmosférica del tráfico es un problema global, de especial importancia para los niños que residen en zonas urbanas con tráfico intenso o en zonas próximas a carreteras muy transitadas. En nuestro estudio se ha puesto de manifiesto que el tráfico es la principal fuente de contaminación del aire en Granada, particularmente en la ciudad y el cinturón metropolitano. Y a pesar de que, en comparación con otras ciudades españolas, los niveles medios de

compuestos orgánicos volátiles (COVs) y NO₂ registrados en el área de estudio no han sido elevados en ninguno de los tres periodos de muestreo, la exposición prolongada de los niños, desde la gestación hasta la adolescencia, a este tipo de contaminantes en el entorno de sus viviendas y colegios, podría conducir a efectos negativos en la salud, como alteraciones de la función pulmonar o el desarrollo de asma, y también a otros daños como trastornos de la conducta o el aprendizaje, menos evidentes clínicamente pero de una gran trascendencia personal y colectiva.

Como ya se ha señalado en varias ocasiones a lo largo de esta memoria de Tesis Doctoral, el principal sector de actividad económica en el área de estudio INMA-Granada es, además del sector servicios, la explotación agrícola y forestal, siendo la actividad industrial escasa y de pequeño impacto económico, ambiental y social. En este ámbito geográfico del Sureste peninsular, nuestro propio grupo de trabajo ha descrito la exposición a compuestos orgánicos persistentes en diferentes grupos de población, especialmente la exposición materno-infantil a pesticidas organoclorados, usados de manera intensiva en la práctica agrícola y que parecen contribuir de forma importante a la patogenia de enfermedades de carácter hormonal. Además de la transferencia materna durante el embarazo y la lactancia, la dieta es la principal ruta de exposición infantil a estos y otros contaminantes, como es el caso del mercurio. Aunque, hoy día, la exposición a la gran mayoría de los contaminantes presentes en los alimentos tiene un carácter global, la distribución geográfica es evidente para algunos de ellos.

En el caso concreto del mercurio, los mayores niveles de exposición se han descrito en poblaciones con un consumo de pescado muy elevado (por ejemplo, Islas Faroe, Islas Seychelles y Nueva Zelanda). Aunque lejos de alcanzar los hábitos de estas poblaciones, España es uno de los países europeos con un mayor consumo de pescado, con un patrón muy particular en la variedad de especies consumidas. Granada es una provincia mediterránea y como tal, el consumo de pescado es relativamente elevado. La posibilidad de incorporar metilmercurio a

través de la ingesta de pescado contaminado, procedente del mar Mediterráneo, es una fuente potencial de exposición inadvertida a mercurio, de mayor importancia que la existente en otras regiones españolas. El balance riesgo-beneficio por consumo de pescado en grupos vulnerables de la población ha de ser bien evaluado, distinguiendo entre los posibles contaminantes y nutrientes según la variedad o especie consumida, especialmente en zonas donde el pescado forma parte de la dieta habitual de la población.

La alteración del desarrollo neurológico es uno de los frentes a los que se viene prestando especial atención en los últimos años en el campo de la salud ambiental. Como se señalaba en la sección de Introducción de esta memoria, cada vez es mayor, en los países desarrollados, la incidencia de patologías asociadas a los trastornos de la función neurológica y mayor el número de contaminantes catalogados como posibles neurotóxicos. La manifestación del daño originado por la exposición a este tipo de contaminantes puede no hacerse evidente hasta la edad adolescente o adulta, además, los efectos habitualmente consisten en desviaciones de la conducta o del comportamiento relativamente frecuentes o “normales”, lo que hace aún más difícil establecer una relación de causalidad con la exposición a contaminantes específicos. A esta dificultad se suma la necesidad de conjugar un gran número de factores, biológicos, psicológicos y sociales, que condicionan y determinan, no sólo el tipo y grado de exposición, sino también el estado cognitivo y psicológico de los niños.

A este respecto, en el estudio de la submuestra de niños de la cohorte INMA-Granada, se ha tenido en cuenta una serie de determinantes o confusores del neurodesarrollo que, una vez controlados en el análisis, han permitido sugerir una asociación entre una mayor concentración de mercurio en pelo ($>1 \mu\text{g/g}$) y un peor rendimiento cognitivo. Sin embargo, el posible efecto de la exposición a la contaminación atmosférica derivada del tráfico sobre el desarrollo cognitivo en la infancia requiere todavía de una investigación más amplia y en grupos con mayor

número de individuos, ya que probablemente se trate de un efecto más sutil o disperso que en el caso del mercurio. Nuestros resultados, no obstante, sugieren que la contaminación presente en ambientes urbanos puede suponer un riesgo para el neurodesarrollo de los niños y, por tanto, merece ser reseñado como un aspecto a considerar en próximas investigaciones.

La posibilidad de realizar un estudio de epidemiología ambiental en un área geográfica heterogénea presenta la gran ventaja de ofrecer la posibilidad de abarcar un rango amplio de exposiciones y condiciones sociodemográficas diversas. Ésta es una de las fortalezas de este estudio, que se ha realizado en una área extensa de la provincia de Granada y bien definida por su dependencia sanitaria, cuyo hospital de referencia, el Hospital Universitario San Cecilio, ha permitido la colaboración de un grupo multidisciplinar de profesionales que han participado en el reclutamiento y el seguimiento clínico de niños sanos en este estudio de cohorte de base poblacional.

Por último, hay que resaltar que en la investigación médica etiológica se ha potenciado el estudio de las causas de los procesos patológicos bien definidos, ya sea como enfermedades o como síndromes más o menos complejos. Pero en los últimos años se ha despertado un creciente interés por la investigación de cambios sutiles de la “normalidad” que pudieran desempeñar un papel importante en la génesis de algunos procesos patológicos. Estas observaciones subyacen en el trabajo de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral. Los niveles de exposición ambiental en la población infantil que integra la población de estudio son lo suficientemente bajos como para no causar trastornos evidentes, de carácter más o menos agudo, pero bien pudieran tener consecuencias sobre la homeostasis y el desarrollo infantil y presentarse de forma tardía con respecto a la exposición. Cualquiera que sea el grado de participación de las exposiciones ambientales en la etiología de la enfermedad, el simple hecho de actuar en épocas muy tempranas de

la vida abre las puertas a un campo trascendental en salud pública: la posibilidad de aplicar medidas de prevención para minimizar los problemas.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral nos ha permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. Las concentraciones de trihalometanos encontradas en el agua de consumo del área de estudio no son elevadas cuando se comparan con otras regiones, aunque se ha observado variabilidad geográfica y temporal, encontrándose concentraciones más altas en la zona urbana y en aquellos municipios donde el agua abastecida era de origen superficial. El riesgo para la salud de la población infantil de la cohorte INMA-Granada por exposición a estos contaminantes puede considerarse, por tanto, menor que en otras poblaciones. No obstante, es aconsejable, en cualquier caso, la realización de mediciones periódicas, en diversos puntos de muestreo y en distintos momentos del año, para realizar la valoración adecuada de la exposición poblacional a estos compuestos.
2. Las concentraciones del contaminante atmosférico NO₂, medido en el ambiente exterior del área de estudio, fueron inferiores a las descritas para otras ciudades españolas. Los compuestos orgánicos volátiles presentaron siempre mayores concentraciones en la zona urbana y, entre ellos, tolueno fue el que presentó las concentraciones más elevadas, mientras que la concentración media de benceno no superó en ninguna de las campañas el valor de 3 µg/m³, nivel inferior al valor límite establecido por la UE. La variabilidad espacial y temporal de estas concentraciones fue significativa, con concentraciones más altas en zonas urbanas y próximas a carreteras con densidad de tráfico alta, indicando que la principal fuente de emisión de estos contaminantes en el área de estudio de Granada es el tráfico de vehículos a motor.

3. Mediante la aplicación de técnicas de interpolación espacial y modelos de regresión fue posible modelizar la distribución espacial de la concentración de NO₂, lo que permitió la asignación de un valor de exposición individual a cada niño participante en el estudio, a este contaminante. Los niveles de NO₂ asignados, que oscilaron entre 5,15 y 35,23 µg/m³, fueron inferiores a los encontrados en trabajos similares realizados en otras áreas de estudio de la Red INMA e inferiores al valor límite (40 µg/m³) establecido por la Unión Europea.
4. Las concentraciones de 1-hidroxipireno (1-OHP) obtenidas en los niños de la cohorte INMA-Granada, a la edad de 4 años, estuvieron entre 0,004 y 0,314 µmol/mol, niveles que se sitúan en el mismo rango que los descritos en otras poblaciones infantiles no expuestas a niveles ambientales elevados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Los niveles de 1-OHP se asociaron con la exposición individual a NO₂, sugiriendo que la contaminación atmosférica relacionada con el tráfico influye en la exposición infantil a HAPs, siendo también la principal fuente de emisión de HAPs en aire exterior en el área de estudio. En cuanto a las fuentes en el interior de la vivienda, se observó una relación con la exposición pasiva al humo de tabaco y el uso de cocina de gas.
5. El análisis transversal de la exposición a contaminación atmosférica derivada del tráfico (NO₂) en la submuestra de niños de la cohorte INMA-Granada mostró una relación negativa con el rendimiento cognitivo evaluado a los 4 años de edad, después de controlar por las posibles variables de confusión. Estos resultados sugieren que la contaminación atmosférica propia de zonas urbanas puede tener un impacto negativo en la función neurológica y posterior desarrollo cognitivo del niño. Sin embargo, el efecto es posiblemente más sutil que el observado para otros

contaminantes neurotóxicos y requiere, por tanto, de nuevos estudios para ser confirmado.

6. Las concentraciones de mercurio total determinadas en el pelo de los niños de la cohorte INMA-Granada, a los 4 años de edad, estuvieron en el rango 0,04-6,67 $\mu\text{g/g}$, concentraciones que fueron superiores a las encontradas en otras poblaciones infantiles con un menor consumo de pescado, pero inferiores a los niveles encontrados en poblaciones altamente consumidoras. Los factores que determinaron esta exposición fueron: lugar de residencia, edad de la madre, exposición pasiva al humo de tabaco y consumo de pescado azul. Los resultados obtenidos sugieren que la principal fuente de exposición a mercurio en nuestra población de estudio es el consumo de pescado.

7. El análisis de la asociación del efecto conjunto de la exposición a mercurio y el consumo de pescado sobre el desarrollo cognitivo infantil mostró una relación positiva entre una concentración de mercurio total en pelo $>1 \mu\text{g/g}$ y retraso en el neurodesarrollo, particularmente en las áreas general cognitiva, de memoria y verbal. Un consumo de pescado >3 veces por semana se asoció con un peor rendimiento en las áreas general cognitiva, ejecutiva y perceptivo-manipulativa. No obstante, la relación observada fue distinta según el tipo de pescado consumido, siendo positiva para el pescado azul y pescado en conserva, y negativa para el pescado blanco y frito, sugiriendo que el balance riesgo-beneficio por el aporte de los nutrientes contenidos en el pescado y la presencia de contaminantes perjudiciales, ha de ser bien evaluado, distinguiendo entre las variedades o especies consumidas, especialmente en zonas donde el pescado forma parte de la dieta habitual de la población.

8. El estudio de la relación entre la salud infantil y el medio ambiente necesita de una aproximación holística, que sea útil para caracterizar y estudiar de manera conjunta las exposiciones de diferentes fuentes y naturaleza, y tenga en consideración factores ambientales, componentes genéticos, socioeconómicos y psicosociales. Este trabajo de Tesis Doctoral responde a esa necesidad y pretende integrar la biomonitorización sistemática de la exposición ambiental en la observación clínica durante el desarrollo infantil.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera I, Sunyer J, Fernández-Patier R, *et al.* Estimation of outdoor NO(x), NO(2), and BTEX exposure in a cohort of pregnant women using land use regression modeling. *Environ Sci Technol* 2008;42:815-21.
- Allen JO, Dookeran NM, Smith KA, *et al.* Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with size-segregated atmospheric aerosol in Massachusetts. *Environ Sci Technol* 1996;30:1023-31.
- Amaral OC. Análisis y comportamiento de compuestos orgánicos halogenados volátiles en agua, aire y sedimentos de zonas rurales, urbanas e industriales [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 1994.
- Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, *et al.* Intra-uterine methylmercury poisoning in Irak. *Pediatrics* 1974;54:587-95.
- Anderson HR, Cook DG. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 1997;52:1003-9.
- Angerer J, Schildbach M, Krämer A. S-*p*-Toluylmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure. *Arch Toxicol* 1998;72:119-23.
- Ates N, Kaplan SS, Sahinkaya E, *et al.* Occurrence of disinfection by-products in low DOC surface water in Turkey. *J Hazard Mater* 2007;142:526–34.
- ATSDR. Toxicological profile for mercury. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999. Atlanta, USA.
- Axelrad DA, Bellinger DC, Ryan LM, *et al.* Dose-response relationship of prenatal mercury exposure and IQ: an integrative analysis of epidemiological data. *Environ Health Perspect* 2007;115:609-15.

- Baldasano JM, Valera E, Jiménez P. Air quality data from large cities. *Sci Total Environ* 2003;307:141–65.
- Baldi F, Renzoni A, Bernhard M. Mercury concentration in pelagic fishes (anchovy, mackerel and sardine) from the Italian coast and Strait of Gibraltar. In “IV^{es} Journées Étud Pollutions”, 1978; pp. 251-4, Antalya, CIESM.
- Barbosa AC, Jardim W, Dorea JG, *et al.* Hair mercury speciation as a function of gender, age, and body mass index in inhabitants of the Negro River basin, Amazon, Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;40:439–44.
- Barker DJP. Fetal and infant origins of adult disease. London, BMJ Books, 1992.
- Bartsch J, Hictanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 3):569-77.
- Basu R, Samet JM. A review of the epidemiological evidence on health effects of nitrogen dioxide exposure from gas stoves. *J Environ Med* 1999;1:173–7.
- Bateson TF, Schwartz J. Children’s response to air pollutants. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:238-43.
- Batista J, Schuhmacher M, Domingo JL, *et al.* Mercury in hair for a child population from Tarragona Province, Spain. *Sci Total Environ* 1996;193:143-8.
- Batterman SA, Peng CY, Braun J. Levels and composition of volatile organic compounds on commuting routes in Detroit, Michigan. *Atmos Environ* 2002;36:6015–30.
- Becker K, Conrad A, Kirsch N, *et al.* GerES IV: Time trends in exposure of German children to PAHs, cotinine, PCP, and heavy metals. ISEA 2006, Paris, France, 2-6 September 2006. Abstract Book, p. 44.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, *et al.* Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1080–92.

- Bell ML. The use of ambient air quality modeling to estimate individual and population exposure for human health research: A case study of ozone in the Northern GA Region of the United States. *Environ Int* 2006;32:586–93.
- Bell ML, Ebisu K, Belanger K. Ambient air pollution and low birth weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2007;115:1118–24.
- Bellander T, Berglund N, Gustavsson P, *et al.* Using geographic information systems to assess individual historical exposure to air pollution from traffic and house heating in Stockholm. *Environ Health Perspect* 2001;109:633–9.
- Bellinger DC. What is an adverse effect? A possible resolution of clinical and epidemiological perspectives on neurobehavioral toxicity. *Environ Res* 2004;95:394-405.
- Bellinger DC. Children's cognitive health: the influence of environmental chemical exposures. *Altern Ther Health Med* 2007;13(Suppl 2):140-4.
- Bellinger DC, Stiles K, Needleman H. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. *Pediatrics* 1992;90:855–61.
- Berkowitz GS, Wolf MS, Matte T, *et al.* The rationale for a national prospective cohort study of environmental exposure and childhood development. *Environ Res* 2001;85:59-68.
- Berlin CM, Kacew S, Lawrence R, *et al.* Criteria for chemical selection for programs on human milk surveillance and research for environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65:1839–51.
- Bernard A, Carbonnelle S, Michel O, *et al.* Lung hyperpermeability and asthma prevalence in schoolchildren: unexpected associations with the attendance at indoor chlorinated swimming pools. *Occup Environ Med* 2003;60:385-94.
- Bernard SM, McGeehin MA. Prevalence of blood lead levels 5µg/dl among US children 1 to 5 years of age and socioeconomic and demographic factors

- associated with blood of lead levels 5 to 10 microg/dl, Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Pediatrics* 2003;112:1308–13.
- Bernhard M. Mercury in the Mediterranean. UNEP, 1988; No. 98. Regional Seas Reports and Studies.
- Björnberg KA, Vahter M, Berglund B, *et al.* Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environ Health Perspect* 2005;113:1381–5.
- Bobak M, Leon DA. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986-8. *Occup Environ Med* 1999;56:539-43.
- Bocskay KA, Tang D, Orjuela MA, *et al.* Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2005;14:506–11.
- Brauer M, Hoek G, van Vliet P, *et al.* Estimating long-term average particulate air pollution concentrations: Application of traffic indicators and geographic information systems. *Epidemiology* 2003;14:228–39.
- Brender JD. Paternal occupation and anencephaly. *Am J Public Health* 1990;131:17–24.
- Briggs D. The role of GIS: coping with space (and time) in air pollution exposure assessment. *J Toxicol Environ Health Part A* 2005;68:1243–61.
- Briggs DJ, Collins S, Elliott P, *et al.* Mapping urban air pollution using GIS: a regression-based approach. *Int J Geogr Inf Sci* 1997;11:699–718.
- Briggs DJ, de Hoogh C, Gulliver J, *et al.* A regression-based method for mapping traffic-related air pollution: application and testing in four contrasting urban environments. *Sci Total Environ* 2000;253:151 –67.

- Bruckner JV. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: the NAS panel report. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 2000;31:280-5.
- Brunekreef B. Health effects of air pollution observed in cohort studies in Europe. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007;17(Suppl 2):S61-5.
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002;360:1233-42.
- Brzeznicki S, Jakubowski M, Czerski B. Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;70:257-60.
- Cabrera-Vique C, Ruiz-López MD, Javier F. Mercury in waters from South-eastern Spain: possible sources of pollution. *Ars Pharm* 2007;48:37-53.
- Calderón RL. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. *Food Chem Toxicol* 2000;38:S13-20.
- Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, *et al.* Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* 2002;30:373-89.
- Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, *et al.* Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* 2004;32:650-8.
- Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Ontiveros E, *et al.* Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition* 2008a;68:117-27.
- Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, *et al.* Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol* 2008b;36:289-310.

- Campbell A, Oldham M, Becaria A, *et al.* Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology* 2005;26:133–40.
- Campoy C, Jiménez M, Olea-Serrano MF, *et al.* Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum Dev* 2001;65(Suppl):S183-90.
- Castaño-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, *et al.* Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 2004;61:e12.
- Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, *et al.* Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;51:201-14.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Blood mercury levels in young children and childbearing-aged women—United States, 1999–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:1018–20.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, GA: National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences, 2005. Disponible en: <http://www.cdc.gov/exposurereport/report.htm> [Consultado 13.04.2009].
- Cernichiari E, Toribara TY, Liang L, *et al.* The biological monitoring of mercury in the Seychelles study. *Neurotoxicology* 1995;16:613-28.
- Cerrillo I, Granada A, López-Espinosa MJ, *et al.* Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ Res* 2005;98:233-9.

- Chaix B, Gustafsson S, Jerrett M, *et al.* Children's exposure to nitrogen dioxide in Sweden: Investigating environmental injustice in an egalitarian country. *J Epidemiol Commun Health* 2006;60:234–41.
- Chauhan AJ, Inskip HM, Linaker CH, *et al.* Personal exposure to nitrogen dioxide (NO₂) and the severity of virus-induced asthma in children. *Lancet* 2003;361:1939–44.
- Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, *et al.* International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Environ Health Perspect* 2006;114:1744–50.
- Choi H, Rauh V, Garfinkel R, *et al.* Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect* 2008;116:658-65.
- Chuang JC, Callahan PJ, Lyu CW, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1999;9:85-98.
- Ciccone G, Forastiere F, Agabiti N, *et al.* Road traffic and adverse respiratory effects in children. SIDRIA Collaborative Group. *Occup Environ Med* 1998;55:771–8.
- Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997;34:369-403.
- Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 2002;110(Suppl 1):S11-23.
- Cohen JT, Bellinger DC, Shaywitz BA. A quantitative analysis of prenatal methyl mercury exposure and cognitive development. *Am J Prev Med* 2005;29:353-66.
- Cohen HE, Moya J, Selevan S. A lifestage approach to assessing children's exposure. *Bith Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:522-9.

- Cohn RD, Arbes SJ, Jaramillo R, *et al.* National prevalence and exposure risk for cockroach allergen in U.S. households. *Environ Health Perspect* 2006;114:522–6.
- Comission of the European Communities. Communication from the Commision to the Council and the European parliament, 2005 – Community strategy concerning mercury. Brussels, Belgium.
- Condon JT, Corkindale CJ. The assessment of parent-to-infant attachment: development of a self-report questionnaire instrument. *J Reproductive and Infant Psychology* 1998;16:57-76.
- Cook DG, Whincup PH, Jarvis MJ, *et al.* Passive exposure to tobacco smoke in children aged 5–7 years: individual, family, and community factors. *BMJ* 1994;308:384–9.
- Cook DG, Strachan DP. Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax* 1999;54:357-65.
- Cordier S, Garel M, Mandereau L, *et al.* Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res* 2002;89: 1–11.
- Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:209-30.
- Cressie NAC. 1993. Statistics for Spatial Data. New York: John Willey & Sons.
- Crinella FM, Cordova EJ, Ericson JE. Manganese, aggression, and attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurotoxicology* 1998;19:468–9.
- Crumpt KS, Kjellstrom T, Shipp AM, *et al.* Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. *Risk Anal* 1998;18:701-13.

- Daniels JL, Longnecker MP, Rowland AS, *et al*; ALSPAC Study Team. University of Bristol Institute of Child Health. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology* 2004;15:394-402.
- Davidson PW, Myers GJ, Cox C, *et al*. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption and neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA* 1998;280:701-7.
- Dietrich KN, Berger OG, Succop PA, *et al*. The developmental consequences of low to moderate prenatal and postnatal lead exposure: intellectual attainment in the Cincinnati lead study cohort following school entry. *Neurotoxicol Teratol* 1993;15:37-44.
- Díez S, Bayona JM. Determination of methylmercury in human hair by ethylation followed by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J Chromatogr A* 2002;963:345-51.
- Díez S, Montuori P, Querol X, *et al*. Total mercury in the hair of children by combustion atomic absorption spectrometry (Comb-AAS). *J Anal Toxicol* 2007;31:144-9.
- Díez S, Delgado S, Aguilera I, *et al*. Prenatal and early childhood exposure to mercury and methylmercury in Spain, a high-fish-consumer country. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009;56:615-22.
- DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 2004;113:1007-15.
- Directiva 1996/61/CE del Consejo, de 24 de septiembre de 1996, relativa a la prevención y control integrados de la contaminación. Bélgica, Bruselas. 1996.
- Directiva 1998/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Bélgica, Bruselas. 1998.

- Directiva 1999/30/CE del Consejo, de 22 de Abril de 1999, relativa a los valores límite de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en el aire ambiente. Bruselas, Bélgica. 1999.
- Directiva 2000/69/CE del Parlamento y del Consejo, de 16 de noviembre de 2000, relativa a los valores límite de benceno y monóxido de carbono en el aire ambiente. Bélgica, Bruselas. 2000.
- Directiva 2001/22/CE del Consejo, de 8 de marzo de 2001, por la que se fijan métodos de toma de muestras y análisis para el control oficial del contenido máximo de plomo, cadmio, mercurio y 3-MCPD en los productos alimenticios. Bélgica, Bruselas. 2001.
- Domingo JL, Bocio A, Falco G, *et al.* Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology* 2007;230:219–26.
- Dorea JG, Barbosa AC, Ferrari I, *et al.* Fish consumption (hair mercury) and nutritional status of Amazonian Amer Indian children. *Am J Hum Biol* 2005;17:507–14.
- Dubowsky SD, Wallace LA, Buckley TJ. The contribution of traffic to indoor concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Exposure Anal Environ Epidemiol* 1999;9:312–21.
- Duhme H, Weiland SK, Keil U, *et al.* The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescents. *Epidemiology* 1996;7:578–82.
- Dunbar JC, Lin CI, Vergucht I, *et al.* Estimating the contributions of mobile sources of PAH to urban air using real-time PAH monitoring. *Sci Total Environ* 2001;279:1–19.

- Elder A, Gelein R, Silva V, *et al.* Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 2006;114:1172–8.
- Eskenazi B, Castorina R. Association of prenatal maternal or postnatal child environmental tobacco smoke exposure and neurodevelopmental and behavioral problems in children. *Environ Health Perspect* 1999;107:991–1000.
- Espigares M, Lardelli P, Ortega P. Evaluating trihalomethane content in drinking water on the basis of common monitoring parameters: regression models. *J Environ Health* 2003;66:9-13.
- Esplugues A, Fernández-Patier R, Aguilera I, *et al.* Air pollutant exposure during pregnancy and fetal and early childhood development. Research protocol of the INMA (Childhood and Environment Project). *Gac Sanit* 2007;21:162-71.
- Esteban M, Castaño A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int* 2009;35:438-49.
- EU Council. European Environment and Health Strategy. Disponible en: <http://www.environmentandhealth.org/index.php> [consultado 13.04.2009].
- EU Council. European Environment and Health Strategy. Disponible en: http://europa.eu.int/comm/environment/health/strat_en.htm [consultado 13.04.2009]
- EU Council. European Environment and Health Strategy. Final Report Recommendations. Technical Working Group on priority diseases, subgroup. Neurodevelopmental disorders. 2004. Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/health/pdf/040329minority_statement.pdf [consultado 13.04.2009].
- EU Council. Final report of the European Conference on Human Biomonitoring: From the use of biomarkers to human biomonitoring. París (Francia), 4-5

noviembre, 2008. Disponible en: www.invs.sante.fr/publications/2008/biosurveillance/index.html [consultado 13.04.2009]

Fernández MF, Olmos B, Granada A, *et al.* Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2007a;115(Suppl 1):S8-14.

Fernández MF, Molina-Molina JM, López-Espinosa MJ, *et al.* Biomonitoring of environmental estrogens in human samples. *Int J Hyg Environ Health* 2007b; 210:429-32.

Fernández MF, Aguilar-Garduño C, Molina-Molina JM, *et al.* The total effective xenoestrogen burden, a biomarker of exposure to xenoestrogen mixtures, is predicted by the (anti)estrogenicity of its components. *Reprod Toxicol* 2008;26:8-12.

Fernández-Villarenaga V, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, *et al.* C1 to C9 volatile organic compound measurements in urban air. *Sci Total Environ* 2004;334–335:167–76.

Fiala Z, Vyskocil A, Krajak V, *et al.* Environmental exposure of small children to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:411–20.

Fiedler N, Laumbach R, Kelly-McNeil K, *et al.* Health effects of a mixture of indoor air volatile organics, their ozone oxidation products, and stress. *Environ Health Perspect* 2005;113:1542-8.

Fischer P, Hoek G, Van Reeuwijk H, *et al.* Traffic-related differences in outdoor and indoor concentrations of particles and volatile organic compounds in Amsterdam. *Atmos Environ* 2000;34:3713-22.

- Fraile P, Pérez JA, Sáiz I, *et al.* Residuos de contaminantes orgánicos de diferentes orígenes en Navarra. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 2005;28:247-56.
- Fustinoni S, Buratti M, Campo L, *et al.* Urinary *t,t*-muconic acid, *S*-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem Biol Interact* 2005;153–154:97-102.
- García-Algar O, Pichini S, Basagaña X, *et al.* Concentrations and determinants of NO₂ in homes of Ashford, UK and Barcelona and Menorca, Spain. *Indoor Air* 2004;14:298–304.
- García-Pérez J, Boldo E, Ramis R, *et al.* Description of industrial pollution in Spain. *BMC Public Health* 2007;7:40.
- Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, *et al.* The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004;351:1057–67.
- Ghio AJ. Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: a review. *J Aerosol Med* 2004;17:157–64.
- Gilbert NL, Steib DM, Woodhouse S, *et al.* Ambient nitrogen dioxide monitoring near a major highway using passive diffusion samplers. Presentado en la XII Conferencia ISEA, Vancouver, BC, Canada, 2002.
- Gilliland F, Avol E, Kinney P, *et al.* Air pollution exposure assessment for epidemiologic studies of pregnant women and children: lessons learned from the Centers for Children's Environmental Health and Disease Prevention Research. *Environ Health Perspect* 2005;113:1447-54.
- Gitterman BA, Bearer CF. A developmental approach to pediatric environmental health. *Pediatr Clin N Am* 2001;48:1071–84.
- Glezer V, Harris B, Tal N, *et al.* Hydrolysis of haloacetonitriles: linear free energy relationship, kinetics and products. *Water Res* 1998;33:1938–48.

- Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, *et al.* Particulate air pollution and fetal health. A systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology* 2004;15:36-45.
- Goldberg D, Williams P. A user's guide to the General Health Questionnaire. Windsor, 1988. UK: NFER-Nelson.
- Goldberg MS, Giannetti N, Burnett RT, *et al.* Shortness of breath at night and health status in congestive heart failure: Effects of environmental conditions and health-related and dietary factors. *Environ Res* 2009;109:166-74.
- Götschi T, Heinrich J, Sunyer J, *et al.* Long-term effects of ambient air pollution on lung function: a review. *Epidemiology* 2008;19:690-701.
- Grandjean P, Jorgensen PJ, Weihe P. Human milk as a source of methylmercury exposure in infants. *Environ Health Perspect* 1994;102:74-7.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, *et al.* Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:417-28.
- Grandjean P, White RF, Nielsen A, *et al.* Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ Health Perspect* 1999;107:587-91.
- Grandjean P, Weihe P, Burse VW, *et al.* Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* 2001;23:305-17.
- Grandjean P, White R. Neurodevelopmental disorders. In: Children's health and environment: a review of evidence. Environmental Sigué Report No. 29. Copenhagen (Denmark): WHO/European Environment Agency; 2002.
- Grandjean P, White RF, Weihe P, *et al.* Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambul Pediatr* 2003;3:18-23.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006;368:2167-78.

- Greenberg A. Assessment of carcinogenic risk from personal exposure to benzo(a)pyrene in the Total Human Environmental Exposure Study (THEES). *J Air Waste Manag Assoc* 1993;43:970-7.
- Ha EH, Hong YC, Lee BE, *et al.* Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology* 2001;12:643-8.
- Hadders-Algra M, Bouwstra H, van Goor SA, *et al.* Prenatal and early postnatal fatty acid status and neurodevelopmental outcome. *J Perinat Med* 2007;35(Suppl 1):S28-34.
- Hansel NN, Breyse PN, McCormack MC, *et al.* A longitudinal study of indoor nitrogen dioxide levels and respiratory symptoms in inner-city children with asthma. *Environ Health Perspect* 2008;116:1428-32.
- Hansen AM, Raaschou-Nielsen O, Knudsen LE. Urinary 1-hydroxypyrene in children living in city and rural residences in Denmark. *Sci Total Environ* 2005;347:98-105.
- Hansen AM, Mathiesen L, Pedersen M, *et al.* Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:471-503.
- Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 1995;25:1-24.
- Heller L, Grossman L. Formation of cynogen bromide and other volatile DBPs in the disinfection of bromide rich lake water. *Environ Sci Technol* 1999;33:932-7.
- Henderson SB, Beckerman B, Jerrett M, *et al.* Application of land use regression to estimate long-term concentrations of traffic-related nitrogen oxides and fine particulate matter. *Environ Sci Technol* 2007;41:2422-8.

- Herrmann M, King K, Weitzman M. Prenatal tobacco smoke and postnatal secondhand smoke exposure and child neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:184-90.
- Hertz-Picciotto I, Park HY, Dostal M, *et al.* Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:146-54.
- Hibbeln JR. From homicide to happiness--a commentary on omega-3 fatty acids in human society. Cleave Award Lecture. *Nutr Health* 2007;19:9-19.
- Hochadel M, Heinrich J, Gehring U, *et al.* Predicting long-term average concentrations of traffic-related air pollutants using GIS-based information. *Atmos Environ* 2006;40:542-53.
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, *et al.* Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002;360:1203-9.
- Huang W, Caudill SP, Grainger J, *et al.* Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on US reference range values. *Toxicol Lett* 2006;163:10-9.
- Human Biomonitoring Commission, 2005. 1-hydroxypyrene in urine as an indicator of internal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-reference value for 1-hydroxypyrene in urine. Disponible en: <http://www.umweltdaten.de/daten-e/monitor/PAH-in-urine.pdf> [consultado 13.04.2009].
- Hussain J, Woolf AD, Sandel M, *et al.* Environmental evaluation of a child with developmental disability. *Pediatr Clin North Am* 2007;54:47-62.

- Hylander LD, Meili M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci Total Environ* 2003;304:13-27.
- IARC. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Vols 1 to 42. International Agency for Research on Cancer, 1987. Lyon, France.
- IARC. Re-evaluation of some inorganic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. International Agency of Research on Cancer Publications, 1999. Lyon, France.
- INERIS. Compilation of toxicological and environmental data on chemicals – mercury and its derivatives. Submitted by France, 2000 (sub49govatt18).
- Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007;137:855-9.
- Iñiguez C, Ballester F, Estarlich M, *et al.* Estimation of personal NO₂ exposure in a cohort of pregnant women. *Sci Total Environ* 2009 (aceptado).
- IPCS. Methylmercury (Environmental Health Criteria 101). International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, 1990. Geneva, Switzerland.
- Jaakkola M, Jaakkola J. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *Eur Respir J* 1997;10:2384–97.
- Jacob J, Seidel A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;778:31–47.
- Jacobson JL, Jacobson SW, Humphrey H. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J Pediatr* 1990;116:38-45.
- Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero *N Engl J Med* 1996;335:783–9.

- Jacobson JL, Jacobson SW. Methodological issues in research on developmental exposure to neurotoxic agents. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:395-406.
- Janssen NAH, Brunekreef B, van Vliet P, *et al.* The relationship between air pollution from heavy traffic and allergic sensitization, bronchial hyperresponsiveness, and respiratory symptoms in dutch schoolchildren. *Environ Health Perspect* 2003;111:1512-8.
- Jedrychowski W, Maugeri U, Jedrychowska-Bianchi I, *et al.* Body growth rate in preadolescent children and outdoor air quality. *Environ Research* 2002;90:12-20.
- Jedrychowski W, Whyatt RM, Camann DE, *et al.* Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *Int J Occup Med Environ Health* 2003;16:21-9.
- Jedrychowski W, Galas A, Pac A, *et al.* Prenatal ambient air exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the occurrence of respiratory symptoms over the first year of life. *Eur J Epidemiol* 2005;20:775-82.
- Jedrychowski W, Jankowski J, Flak E, *et al.* Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one-year-old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Ann Epidemiol* 2006a;16:439-47.
- Jedrychowski W, Perera FP, Pac A, *et al.* Variability of total exposure to PM2.5 related to indoor and outdoor pollution sources Krakow study in pregnant women. *Sci Total Environ* 2006b;366:47-54.
- Jensen SS. Mapping human exposure to traffic air pollution using GIS. *J Hazard Mater* 1998;61:385-92.
- Jerrett M, Arain A, Kanaroglou P, *et al.* A review and evaluation of intraurban air pollution exposure models. *J Exposure Anal Environ Epidemiol* 2005a;15:185-204.

- Jerrett M, Buzzelli M, Burnett RT, *et al.* Particulate air pollution, social confounders, and mortality in small areas of an industrial city. *Soc Sci Med* 2005b;60:2845-63.
- Jerrett M, Arain MA, Kanaroglou P, *et al.* Modeling the intraurban variability of ambient traffic pollution in Toronto, Canada. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:200-12.
- Jerrett M, Shankardass K, Berhane K, *et al.* Traffic-related air pollution and asthma onset in children: a prospective cohort study with individual exposure measurement. *Environ Health Perspect* 2008;116:1433-8.
- Ji B, Shu X, Linet SM, *et al.* Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:238-44.
- Jiménez M, Campoy C, Cañabate F, *et al.* Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. *Sci Total Environ* 2006;372:32-8.
- Jongeneelen FJ. Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicol Lett* 1994;72:205-11.
- Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ* 1997;199:141-9.
- Julvez J, Ribas-Fitó N, Torrent M, *et al.* Maternal smoking habits and cognitive development of children at age 4 years in a population-based birth cohort. *Int J Epidemiol* 2007a;36:825-32.
- Julvez J, Ribas-Fitó N, Fornes M, *et al.* Attention behaviour and hyperactivity at age 4 and duration of breast-feeding. *Acta Paediatr* 2007b;96:842-47.

- Kampioti AA, Stephanou EG. The impact of bromide on the formation of neutral and acidic disinfection by-products in Mediterranean chlorinated drinking water. *Water Res* 2002;36:2596–606.
- Kanoh T, Fukuda M, Onozuka H, *et al.* Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in environment. *Environ Res* 1993;62:230–41
- Kim H, Shim J, Lee S. Formation of disinfection by-products in chlorinated swimming pool water. *Chemosphere* 2002a;46:123-30.
- Kim J, Chung Y, Shin Dongchun S, *et al.* Chlorination by-products in surface water treatment process. *Desalination* 2002b;151:1–9.
- Kim JJ, Huen K, Adams S, *et al.* Residential traffic and children's respiratory health. *Environ Health Perspect* 2008;116:1274-9.
- Kinney PL, Aggarwal M, Northridge ME, *et al.* Airborne concentrations of PM (2.5) and diesel exhaust particles on Harlem sidewalks: a community-based pilot study. *Environ Health Perspect* 2000;108:213–8.
- Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S, *et al.* Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2. Interviews and psychological tests at age 6, Report 3642. National Swedish Environmental Protection Board 1989. Solna, Sweden.
- Klaeboe R, Kolbenstvedt M, Clench-Aas J, *et al.* Oslo traffic study - Part 1: An integrated approach to assess the combined effects of noise and air pollution on annoyance. *Atmos Environ* 2000;34:4727–36.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, *et al.* Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* 2002;234:317–26.

- Knox EG. Childhood cancers and atmospheric carcinogens. *J Epidemiol Community Health* 2005;59:101-5.
- Koletzko B, Lien E, Agostoni C, *et al.* The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 2008;36:5-14.
- Kolossa-Gehring M, Becker K, Conrad A *et al.* German Environmental Survey for Children (GerES IV) - First results. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:535-40.
- Krämer U, Koch T, Ranft U, *et al.* Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 2000;11:64–70.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. American Heart Association. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:2747–57.
- Kume K, Ohura T, Amagai T, *et al.* Field monitoring of volatile organic compounds using passive air samplers in an industrial city in Japan.. *Environ Pollut* 2008;153:649-57.
- Kunzli N, Kaiser R, Medina S, *et al.* Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000;356:795–801.
- Kuttler W. Aspekte der Angewandten Stadtklimatologie. *Geowissenschaften* 1996;14: 221-8.
- Lacasaña M, Esplugues A, Ballester F. Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. *Eur J Epidemiol* 2005;20:183-99.
- Lai CH, Liou SH, Lin HC, *et al.* Exposure to traffic exhausts and oxidative DNA damage. *Occup Environ Med* 2005;62:216–22.

- Landrigan PJ, Carlson JE, Bearer CF, *et al.* Children's health and the environment: a new agenda for prevention research. *Environ Health Persp* 1998;106(Suppl. 3):S787-94.
- Lanphear BP, Dietrich KN, Auinger P, *et al.* Cognitive deficits associated with blood lead concentrations 10 µg/dl in US children and adolescents. *Public Health Rep* 2000;115:521-9.
- Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, *et al.* Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ Health Perspect* 2005;113:894-9.
- Lebel GL, Benoit FM, Williams DT. A one year survey of halogenated disinfection by-products in the distribution system of treatment plants using three different disinfection processes. *Chemosphere* 1997;34:2301-8.
- Lebret E, Briggs D, Van Reeuwijk H, *et al.* Small area variations in ambient NO₂ concentrations in four European areas. *Atmos Environ* 2000;34:177-85.
- Lederman SA, Jones RL, Caldwell KL, *et al.* Relation between cord blood mercury levels and early child development in a World Trade Center cohort. *Environ Health Perspect* 2008;116:1085-91.
- Lee WC, Lee MJ, Lee SM, *et al.* An observation on the mercury contents of scalp hair in the urban residents of South Korea. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000;8:275-8.
- Levy JI, Houseman EA, Spengler JD, *et al.* Fine particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration patterns in Roxbury, Massachusetts: a community-based GIS analysis. *Environ Health Perspect* 2001;109:341-47.
- Levy JI, Bennett DH, Melly SJ, *et al.* Influence of traffic patterns on particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in Roxbury, Massachusetts. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2003;13:364-71.

- Lewtas J. Human exposure to complex mixtures of air pollutants. *Toxicol Lett* 1994;72:163-9.
- Lewtas J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res* 2007;636:95-133.
- Liang L, Singer PC. Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. *Environ Sci Technol* 2003;37:2920–8.
- Liao D, Peuquet DJ, Duan Y, *et al.* GIS approaches for the estimation of residential-level ambient PM concentrations. *Environ Health Perspect* 2006;114:1374–80.
- Liard R, Zureik M, Le Moullec Y, *et al.* Use of Personal Passive Samplers for Measurement of NO₂, NO, and O₃ Levels in Panel Studies. *Environ Res* 1999;81:339-48.
- Liu L-J, Box M, Kalman D, *et al.* Exposure assessment of particulate matter for susceptible populations in Seattle. *Environ Health Perspect* 2003;111:909–18.
- Llop S, Ballester F, Estarlich M, *et al.* Urinary 1-hydroxypyrene, air pollution exposure and life style factors in pregnant women. *Sci Total Environ* 2008;407:97-104.
- Lopez-Espinosa MJ. Exposición materno-infantil vía placentaria a compuestos químicos medioambientales con actividad hormonal [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2006.
- Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, *et al.* Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta* 2007;28:631-8.

- Lopez-Espinosa MJ, Lopez-Navarrete E, Rivas A, *et al.* Organochlorine pesticide exposure in children living in Southern Spain. *Environ Res* 2008;106:1-6.
- Lopez-Espinosa MJ, Silva E, Granada A, *et al.* Assessment of the total effective xenoestrogen burden (TEXB) in extracts of human placentas. *Biomarkers* 2009 (aceptado).
- Lund KE, Helgason AR. Environmental tobacco smoke in Norwegian homes, 1995 and 2001: changes in children's exposure and parents attitudes and health risk awareness. *Eur J Public Health* 2005;15:123-7.
- Mahaffey KR. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environ Res* 2004;95:414-28.
- Mahaffey KR, Clickner RP, Bodurow CC. Blood organic mercury and dietary mercury intake: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 and 2000. *Environ Health Perspect* 2004;112:562-70.
- Maisonet M, Correa A, Misra D, *et al.* A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environ Res* 2004;95:106-15.
- Marques RC, Dorea JG, Bastos WR, *et al.* Changes in children hair-Hg concentrations during the first 5 years: Maternal, environmental and iatrogenic modifying factors. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49:17-24.
- Martí-Cid R, Bocio A, Llobet JM, *et al.* Intake of chemical contaminants through fish and seafood consumption by children of Catalonia, Spain: Health risks. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1968-74.
- Mayer H. Air pollution in cities. *Atmos Environ* 1999;33:4029-37.
- Mayer H, Hausteil Ch. Air pollution caused by motor traffic in urban spaces. *Meteorol Zeitschrift* 1994;3:138-42.

- McCarthy D. Manual for the McCarthy Scales of Children's Abilities. New York, NY: Psychological Corporation, 1972 (Spanish adaptation: Madrid, Spain. TEA Ediciones, S.A., 1996).
- McCormack MC, Hansel NN, Matsui EC, *et al.* Domestic particulate matter exposure and asthma morbidity in inner-city preschool children. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:A272.
- McDowell MA, Dillon CF, Osterloh J, *et al.* Hair mercury levels in US children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2004;112:1165-71.
- Mendez MA, Torrent M, Julvez J, *et al.* Maternal fish and other seafood intakes during pregnancy and child development at age 4 years. *Public Health Nutr* 2008;doi:10.1017/S1368980008003947.
- Mendola P, Selevan SG, Gutter S. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:188-97.
- Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L, *et al.* The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis* 2006;21:295-304.
- Miller RL, Garfinkel R, Horton M, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke, and respiratory symptoms in an inner-city birth cohort. *Chest* 2004;126:1071-8.
- Ministerio de Medio Ambiente. Disponible en: www.mma.es/secciones/medioscomunicacion/prensa/notas_pre/2007/02/PNUMANairobi_Mercuriook.pdf [consultado 13.04.2009]
- Montuori P, Jover E, Alzaga R, *et al.* Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction

- followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1025:71–5.
- Montuori P, Jover E, Díez S, *et al.* Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Sci Total Environ* 2006;369:51-8.
- Mortimer K, Neugebauer R, Lurmann F, *et al.* Early-lifetime exposure to air pollution and allergic sensitization in children with asthma. *J Asthma* 2008;45:874-81.
- Motykievicz G, Michalska J, Pendzich J, *et al.* A molecular epidemiology study in women from Upper Silesia, Poland. *Toxicol Lett* 1998;96–97:195–202.
- Moya J, Bearer CF, Etzel RA. Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics* 2004;113:996–1006.
- Mucha AP, Hryhorczuk D, Serdyuk A, *et al.* Urinary 1-hidroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in 3-year-old Ukranian children. *Environ Health Perspect* 2006;114:603-9.
- Murata K, Weihe P, Renzoni A, *et al.* Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* 1999;21:343–8.
- Murata K, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Benchmark dose calculations for methylmercury-associated delays on evoked potential latencies in two cohorts of children. *Risk Anal* 2002;22:465–74.
- Murata K, Sakamoto M, Nakai K, *et al.* Effects of methylmercury on neurodevelopment in Japanese children in relation to the Madeiran study. *Int Arch Occup Environ Health* 2004a;77:571–9.
- Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, *et al.* Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr* 2004b;144:177-83.

- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, *et al.* Twenty-seven years studying the human neurotoxicity to methylmercury exposure. *Environ Res* 2000;83:275-85.
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, *et al.* Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles Child Development Study. *Lancet* 2003;361:1686-92.
- Nadal M, Bocio A, Schuhmacher M, *et al.* Monitoring metals in the population living in the vicinity of a hazardous waste incinerator. Levels in hair of children. *Biol Trace Elem Res* 2005;104:203-13.
- National Academy of Sciences. Pesticides in the Diets of Infants and Children, National Academy Press, 1993. Washington, DC.
- NCHS. National Health and Nutrition Examination Survey. National Center for Health Statistics 2007 (CDC 22-3-2007).
- Needleman HL, Reiss JA, Tobin MJ, *et al.* Bone lead levels and delinquent behavior. *JAMA* 1996;275:363-9.
- Nicolai T, Carr D, Weiland SK, *et al.* Urban traffic and pollutant exposure related to respiratory outcomes and atopy in a large sample of children. *Eur Respir J* 2003;21:956-63.
- Nielsen T. Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city. *Atmos Environ* 1996;30:3481-90.
- Niemann H, Maschke C, Hecht K. Noise induced annoyance and morbidity. Results from the pan European LARES-survey. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005;48:315-28.
- Nieuwenhuijsen MJ, Toledano MB, Eaton NE, *et al.* Chlorination disinfection by products in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occup Environ Med* 2000;57:73-85.

- Nieuwenhuijsen MJ, Smith R, Golfinopoulos S, *et al.* Health impacts of long-term exposure to disinfection by-products in drinking water in Europe: HIWATE. *J Water Health* 2009;7:185-207.
- Noble KG, McCandliss BD, Farah MJ. Socioeconomic gradients predict individual differences in neurocognitive abilities. *Dev Sci* 2007;10:464–80.
- NRC. Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment. National Academy Press, 2000a. Washington, DC.
- NRC. Toxicological effects of methylmercury. National Academy Press, 2000b. Washington, USA.
- Nulman I, O’Haydon B, Gladstone J, *et al.* The effects of alcohol in the fetal brain. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology (Slikker W, Chang LW, eds). San Diego, CA: Academic Press, 1998.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004;16:437–45.
- Oglesby L, Kunzli N, Monn C, *et al.* Validity of annoyance scores for estimation of long term air pollution exposure in epidemiologic studies: the Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA). *Am J Epidemiol* 2000;152:75–83.
- Oken E, Wright RO, Kleinman KP, *et al.* Maternal fish consumption, hair mercury and infant cognition in a U.S. cohort. *Environ Health Perspect* 2005;113:1376-80.
- Oken E, Radesky JS, Wright RO, *et al.* Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am J Epidemiol* 2008;167:1171-81.
- Olds D. Tobacco exposure and impaired development: A review of the evidence. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1997;3:257–69.

- Oosterlee A, Drijver M, Lebret E, *et al.* Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density. *Occup Environ Med* 1996;53:241–7.
- Parker JD, Woodruff TJ, Basu R, *et al.* Air pollution and birth weight among term infant in California. *Pediatrics* 2005;115:121-8.
- Parra MA, Gonzalez L, Elustondo D, *et al.* Spatial and temporal trends of volatile organic compounds (VOC) in a rural area of northern Spain. *Sci Total Environ* 2006;370:157-67.
- Parra MA, Elustondo D, Bermejo R, *et al.* Ambient air levels of volatile organic compounds (VOC) and nitrogen dioxide (NO₂) in a medium size city in Northern Spain. *Sci Total Environ* 2009;407:999-1009.
- Pellizzari ED, Fernando R, Cramer GM, *et al.* Analysis of mercury in hair of EPA Region V population. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1999;9:393–401.
- Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997;278:1068-73.
- Perera FP. Children are likely to suffer most from our fossil fuel addiction. *Environ Health Perspect* 2008;116:987-90.
- Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, *et al.* Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland [erratum in *Nature* 1993;361:564]. *Nature* 1992;360:256–8.
- Perera FP, Mooney LA, Dickey CP, *et al.* Molecular epidemiology in environmental carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 3):S441-3.
- Perera FP, Illman SM, Kinney PL, *et al.* The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community-based research in New York City. *Environ Health Perspect* 2002;110:197-204.

- Perera FP, Rauh V, Tsai WY, *et al.* Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect* 2003;111:201-6.
- Perera FP, Tang D, Tu YH, *et al.* Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. *Environ Health Perspect* 2004;112:1133-6.
- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, *et al.* A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology* 2005a;26:573-87.
- Perera FP, Tang D, Whyatt R, *et al.* DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from northern Manhattan, the World Trade Center area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005b;14:709-14.
- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, *et al.* Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ Health Perspect* 2006a;114:1287-92.
- Perera FP, Viswanathan S, Whyatt R, *et al.* Children's environmental health research—highlights from the Columbia Center for Children's Environmental Health. *Ann N Y Acad Sci* 2006b;1076:15-28.
- Perera FP, Tang D, Rauh V, *et al.* Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, environmental tobacco smoke, and child development in the World Trade Center cohort. *Environ Health Perspect* 2007;115:1497-502.
- Pesch A, Wilhelm M, Rostek U, *et al.* Mercury concentrations in urine, scalp hair, and saliva in children from Germany. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002;12:252-8.

- Pirrone N. Mercury Research in Europe: Towards the preparation of the New EU Air Quality Directive. *Atmos Environ* 2001;35:2979-86.
- Pleijel H, Karlsson GP, Gerdin EB. On the logarithmic relationship between NO₂ concentration and the distance from a highway. *Sci Total Environ* 2004;332:261-4.
- Plomin R, Owen M, McGuffin P. The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 1994;264:1733-9.
- Pohl HR, Abadin HG. Chemical mixtures: evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233:116-25.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132-41.
- Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, *et al.* Estudios realizados en España sobre concentraciones en humans de compuestos tóxicos persistentes. *Gac Sanit* 2008;22:248-66.
- Prada JA, Tsang RC. Biological mechanisms of environmentally induced causes of IUGR. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(Suppl 1):S21-27.
- Premazzi G, Cardoso C, Conio O, *et al.* Exposure of the european population to trihalomethanes (THMs) in drinking water. Luxembourg: European Comission, 1997.
- Prüss-Ustün A, Corvalán CF. How much disease burden can be prevented by environmental interventions. *Epidemiology* 2007;18:167-78.
- Puertas R, López-Espinosa MJ, Cruz F, *et al.* Prenatal exposure to mirex impairs neurodevelopment at age of 4 years. *Neurotoxicology* 2009 (aceptado).

- Puig C, Garcia-Algar O, Monleon T, *et al.* A longitudinal study of environmental tobacco smoke exposure in children: parental self reports versus age dependent biomarkers. *BMC Public Health* 2008;8:47.
- Raaschou-Nielsen O, Reynolds P. Air pollution and childhood cancer: a review of the epidemiological literature. *Int J Cancer* 2006;118:2920-9.
- Ramón R, Ballester F, Rebagliato M, *et al.* La red de investigación “Infancia y Medio Ambiente” (Red INMA): protocolo de estudio. *Rev Esp Salud Pública* 2005;79:203-20.
- Ramón R, Murcia M, Ballester F, *et al.* Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Sci Total Environ* 2008;392:69-78.
- Ramos R, Cruz F, Pérez M, *et al.* Predicción del desarrollo mental a los 20 meses de edad por medio de la evaluación del desarrollo psicomotor a los seis meses de vida en niños sanos. *Salud Mental* 2008;31:53-61.
- Rauh VA, Whyatt RM, Garfinkel R, *et al.* Developmental effects of exposure to environmental tobacco smoke and material hardship among inner-city children. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:373-85.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero de 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- Rebagliato M, Ballester F, Ramón RM, *et al.* Efectos de la exposición prenatal a contaminantes ambientales y de la dieta materna en el neurodesarrollo. La Red de investigación “Infancia y Medio Ambiente”. *Rev Neurol* 2007;44(Suppl 3):S15-S18.
- Renzoni A, Zino F, Franchi E. Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations. *Environ Res* 1998;77:68-72.
- Ribas-Fitó N, Sala M, Kogevinas M, *et al.* Polychlorinated biphenyls (PCBs) and

- neurological development in children: a systematic review. *J Epidemiol Community Health* 2001;55:537-46.
- Ribas-Fitó N, Cardo E, Sala M, *et al.* Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics* 2003;111(5 Pt 1):e580-5.
- Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, *et al.* Child health and the environment: the INMA Spanish Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006a;20:403-10.
- Ribas-Fitó N, Torrent M, Carrizo D, *et al.* In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *Am J Epidemiol* 2006b;164:955-62.
- Ribas-Fitó N, Torrent M, Carrizo D, *et al.* Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy and children's social behavior at 4 years of age. *Environ Health Perspect* 2007;115:447-50.
- Rice DC. Evidence for delayed neurotoxicity produced by methylmercury. *Neurotoxicology* 1996;17:583-96.
- Rice DC. Developmental lead exposure: neurobehavioral consequences. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology (Slikker W, Chang LW, eds). San Diego, CA: Academic Press, 1998.
- Rice DC. Overview of modifiers of methylmercury neurotoxicity: Chemicals, nutrients and the social environment. *Neurotoxicology* 2008;29:761-6.
- Rice DC, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from human and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):S511-33.
- Rice G, Teuschler LK, Speth TF, *et al.* Integrated disinfection by-products research: assessing reproductive and developmental risks posed by complex disinfection by-product mixtures. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:1222-34.

- Rijnders E, Janssen N, van Vliet P, *et al.* Personal and outdoor nitrogen dioxide concentrations in relation to degree of urbanization and traffic density. *Environ Health Perspect* 2001;109(Suppl 3):411-7.
- Rodriguez MJ, Serodes JB. Spatial and temporal evolution of trihalomethanes in three water distribution systems. *Water Res* 2001;35:1572-86.
- Rodriguez MJ, Serodes JB, Levallois P. Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system. *Water Res* 2004;38:4367-82.
- Rohas-Bracho L, Suh H, Koutrakis P. Relationship among personal, indoor, and outdoor fine and coarse particle concentrations for individuals with COPD. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10:294-306.
- Roorda-Knape MC, Janssen NAH, de Hartog J, *et al.* Traffic related air pollution in city districts near motorways. *Sci Total Environ* 1999;235:339-41.
- Rosenlund M, Forastiere F, Stafoggia M, *et al.* Comparison of regression models with land-use and emissions data to predict the spatial distribution of traffic-related air pollution in Rome. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;18:192-9. [erratas en: *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;18:339]
- Ross Z, English PB, Scalf R, *et al.* Nitrogen dioxide prediction in Southern CA using land use regression modeling: potential for environmental health analyses. *J Exposure Sci Environ Epidemiol* 2006;16:106-14.
- Ruchirawat M, Navasumrit P, Settachan D, *et al.* Measurement of genotoxic air pollution exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;206:207-14.
- Ruchirawat M, Settachan D, Navasumrit P, *et al.* Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicol Lett* 2007;168:200-9.

- Sahsuvaroglu T, Arain A, Kanaroglou P, *et al.* A land use regression model for predicting ambient concentrations of nitrogen dioxide in Hamilton, Ontario, Canada. *J Air Waste Manag Assoc* 2006;56:1059–69.
- Samet JM, Zeger SL, Dominici F, *et al.* The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. *Res Rep Health Eff Inst* 2000;94(Pt 2):5-70; discussion 71-9.
- Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, *et al.* Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res* 2003;5:283–305.
- Sauer PJJ, Huisman M, Koopman-Eseeboom C, *et al.* Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins on growth and development *Hum Exp Toxicol* 1994;13:900–6.
- Savitz DA. Effect of parents' occupational exposures on risk of stillbirth, preterm delivery and small-for-gestationl age infants. *Am J Epidemiol* 1989;129:1201–10.
- Schettler T. Toxic Threats to neurologic development of children. *Environ Health Perspect* 2001;109(Suppl 6):813-6.
- Schlesinger RB, Kunzli N, Hidy GM, *et al.* The health relevance of ambient particulate matter characteristics: coherence of toxicological and epidemiological inferences. *Inhal Toxicol* 2006;18:95-125.
- Schnaas L, Rothenberg SJ, Flores MF, *et al.* Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environ Health Perspect* 2006;114:791-7.
- Schwartz J. Air pollution and children's health. *Pediatrics* 2004;113:1037-43.
- Seifert B, Becker K, Hoffmann K, *et al.* The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): a representative population study. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10:103-14.
- Selevan SG, Kimmel CA, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):451–5.

- Sexton K, Adgate JL, Church TR, *et al.* Children's exposure to volatile organic compounds as determined by longitudinal measurements in blood. *Environ Health Perspect* 2005;113:342-9.
- Shea KM. Global environmental change and children's health: understanding the challenges and finding solutions. *J Pediatr* 2003;143:149-54.
- Simoni M, Lombardi E, Berti G, *et al.* Effects of indoor exposures on respiratory and allergic disorders. *Epidemiol Prev* 2005;29(2 Suppl):57-61.
- Siwinska E, Mielzynska D, Smolik E, *et al.* Evaluation of intra- and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Total Environ* 1998;217:175-83.
- Siwinska E, Mielzynska D, Bubak A, *et al.* The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. *Mutat Res* 1999;445:147-53.
- Smith KR, Corvalán CF, Kjellström T. How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology* 1999;10:573-84.
- Smith KR, Samet JM, Romieu I, *et al.* Indoor air pollution in developing countries and acute lower respiratory infections in children. *Thorax* 2000;55:518-32.
- Spencer N. Poverty and child health. Radcliffe Medical Press, Oxon, 2000.
- Spurgeon A. Prenatal methylmercury exposure and developmental outcomes: review of the evidence and discussion of future directions. *Environ Health Perspect* 2006;114:307-12.
- Sram RJ, Binkova B, Dejmek J, *et al.* Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect* 2005;113:375-82.
- Stern AH, Smith AE. An assessment of the cord blood: maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. *Environ Health Perspect* 2003;111:1465-70.

- Steuerwald U, Weihe P, Jorgensen PJ, *et al.* Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurological function. *J Pediatr* 2000;136:599–605.
- Streissguth AP, Martin DC, Martin JC, *et al.* The Seattle longitudinal prospective study on alcohol and pregnancy. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1981;3:223-33.
- Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, *et al.* Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 2008;167:280-6.
- Suk WA, Murray K, Avakian MD. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat Res* 2003;544:235-42.
- Suzuki T. Hair and nails: advantages and pitfalls when used in biological monitoring. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR (Eds.), *Biological Monitoring of Toxic Metals* 1988. Plenum, New York, pp. 623–40.
- Swartout J, Rice G. Uncertainty analysis of the estimated ingestion rates used to derive the methylmercury reference dose. *Drug Chem Toxicol* 2000;23:293–306.
- Tang D, Warburton D, Tannenbaum SR, *et al.* Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:427-31.
- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, *et al.* Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 2001;61:6708–12.
- Tang D, Li TY, Liu JJ, *et al.* Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. *Environ Health Perspect* 2008;116:674-9.

- Tang XY, Tang L, Zhu YG, *et al.* Assessment of the bioaccessibility to polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an in vitro test. *Environ Pollut* 2006;140:279–85.
- Tavares LM, Camara VM, Malm O, *et al.* Performance on neurological development tests by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. *Cad Saude Publica* 2005;21:1160–7.
- Thickett KM, McCoach JS, Gerber JM, *et al.* Occupational asthma caused by chloramines in indoor swimming-pool air. *Eur Respir J* 2002;19:827-32.
- Tonne CC, Whyatt RM, Camann DE, *et al.* Predictors of personal polycyclic aromatic hydrocarbon exposures among pregnant minority women in New York City. *Environ Health Perspect* 2004;112:754-9.
- Topp R, Cyrus J, Gebefugi I, *et al.* Indoor and outdoor air concentrations of BTEX and NO₂: correlation of repeated measurements. *J Environ Monit* 2004; 6:807-12.
- Torrente M, Colomina MT, Domingo JL. Metal concentrations in hair and cognitive assessment in an adolescent population. *Biol Trace Elem Res* 2005;104:215-21.
- Trask CL, Kosofsky BE. Developmental considerations of neurotoxic exposures. *Neurol Clin* 2000;18:541-62.
- Tsubaki T, Irukayama K. Minamata disease – methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan. Kodansha Ltd, 1977: Tokyo, Japan.
- Umweltbundesamt. German Environmental Survey (GerES), 2008. Disponible en: <http://www.umweltbundesamt.de/survey-e/index.htm>[Consultado 13.04.2009]
- UNEP. Global mercury assessment. United Nations Environment Programme-Chemicals, 2002. Geneva, Switzerland.

- USEPA. Office of Pollution Prevention and Toxic Substances. Chemical Hazard Data Availability Study: What do we really know about the safety of high production volume chemicals? USEPA, 1998. Washington, DC.
- USEPA. Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury (EPA-823-R-01-001). USEPA, Office of Science and Technology, 2001. Washington, DC. Disponible en: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/methylmercury/document.html> [consultado 13.04.2009].
- Vahter M, Akesson A, Lind B, *et al.* Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ Res* 2000;84:186–94.
- Valent F, Little D, Bertollini R, *et al.* Burden of disease attributable to selected environmental factors and injury among children and adolescents in Europe. *Lancet* 2004;363:2032-9.
- Van Wijnen JH, Slob R, Jongmans-Liedekerken G, *et al.* Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among Dutch children. *Environ Health Perspect* 1996;104:530–4.
- Venners SA, Xiaobin W, Changzhong C, *et al.* Exposure-response relationship between paternal smoking and children's pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:973–6.
- Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett* 2002;134(1–3):9-16.
- Villanova RJG, Garcia C, Gomez JA, *et al.* Formation, evolution and modeling of trihalomethanes in the drinking water of a town: II. In the distribution system. *Water Res* 1997;31:1405–23.
- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. *Gac Sanit* 2001a;15:48-53.

- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Cloración del agua potable y efectos sobre la salud: revisión de estudios epidemiológicos. *Med Clin (Barc)* 2001b;117:27-35.
- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Haloacetic acids and trihalomethanes in finished drinking waters from heterogeneous sources. *Water Res* 2003;37:953-8.
- Villanueva CM, Grimalt JO, Ballester F, *et al.* Medida de contaminantes del agua y usos del agua potable durante el embarazo en un estudio de cohortes en España. *Gac Sanit* 2006;20(Supl 3):1-9.
- Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, *et al.* Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming in pools. *Am J Epidemiol* 2007;165:148-56.
- Villeneuve PJ, Chen L, Rowe BH, *et al.* Outdoor air pollution and emergency department visits for asthma among children and adults: a case-crossover study in northern Alberta, Canada. *Environ Health* 2007;6:40.
- Vioque J. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. In: Serra Majem L, Aranceta Bartrina J, eds. *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*. Barcelona: Masson-Elsevier; 2006. p. 199–210.
- Vioque J, Gonzalez L. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur J Cancer Prev* 1991;1:19-20.
- Vreugdenhil HJ, Lanting CI, Mulder PG, *et al.* Effects of prenatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J Pediatr* 2002;140:48–56.
- Vyskocil A, Fiala Z, Fialova D, *et al.* Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum Exp Toxicol* 1997;16:589-95.

- Vyskocil A, Fiala Z, Chenier VV, *et al.* Assessment of multipathway exposure of small children to PAH. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000;8:111–8.
- Walkowiak J, Wiener JA, Fastabend A, *et al.* Environmental exposure to polychlorinated byphenils and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet* 2001;358:1602–7.
- Welch AA, Lund E, Amiano P, *et al.* Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 2002;5:1273-85.
- Westerhoff P, Chao P, Mash H. Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. *Water Res* 2004;38:1502–13.
- WHO. Guidelines for the Study of Dietary Intakes of Chemical Contaminants. World Health Organization, 1985. Geneva, Switzerland.
- WHO. Methylmercury. Environmental Health Criteria 101, International Safety on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization, 1990. Geneva, Switzerland.
- WHO. Inorganic mercury. Environmental Health Criteria 118, International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization, 1991. Geneva, Switzerland.
- WHO. Nitrogen oxides (2nd ed.), environmental health criteria 188. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 1997. Geneva, Switzerland.
- WHO. Report of the International Conference on Environmental Threats to the Health of Children: Hazards and Vulnerability, Bangkok, Thailand, 3–7 March 2002. World Health Organization, 2002a. Geneva, Switzerland. Disponible en: <http://www.who.int/peh/ceh/Bangkok/Bangkokconfreport.pdf> [consultado 13.04.2009].

- WHO. Health for all data base: European Region (Computer file). WHO Regional Office for Europe, 2002b. Copenhagen, Denmark.
- WHO and the European Environment Agency. Environmental issue report: Children's health and the environment: a review of evidence. WHO Regional Office for Europe, 2002. Luxembourg.
- WHO/IPCS. Methylmercury. In "Environmental Health Criteria 101." World Health Organization, 1990. Geneva, Switzerland.
- Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, *et al.* Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11:373-517.
- Wilhelm M, Ritz B. Residential proximity to traffic and adverse birth outcomes in Los Angeles county, California, 1994-1996. *Environ Health Perspect* 2003;111:207-16.
- Wilhelm M, Hardt J, Schulz C, *et al.* New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1- and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: Basis for validation of human biomonitoring data and environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health* 2008;211:447-53.
- Willet WC, Sampson L, Stampfer MJ, *et al.* Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* 1985;122:51-65.
- Williams DT, Benoit FM, Lebel GL. Trend in levels of disinfection by-products. *Environmetrics* 1998;9:555-63.
- Windham GC, Eaton A, Hopkins B. Evidence for an association between environmental tobacco smoke exposure and birth weight: a meta-analysis and new data. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999;13:35-57.

Wright JM, Schwartz J, Dockery DW. Effect of trihalomethane exposure on fetal development. *Occup Environ Med* 2003;60:173-80.

Zabalza J, Ogulei D, Elustondo D, *et al.* Study of urban atmospheric pollution in Navarre (Northern Spain). *Environ Monit Assess* 2007;134:137–51.

Zhang J, Smith K. Indoor air pollution: a global health concern. *Br Med Bull* 2003;68:209–25.

VIII. ANEXOS

En las siguientes páginas se adjuntan los modelos de “Consentimiento informado” y la carta enviada a los padres de la cohorte INMA-Granada, así como los modelos de cuestionarios y formularios cumplimentados en la visita de los 4 años, utilizados para la recogida de datos de los niños y padres participantes en el estudio.

ANEXOS:

- 1. Consentimiento informado**
 - 1.1. Reclutamiento inicial**
 - 1.2. Seguimiento 4 años**
- 2. Carta a los padres para el seguimiento de los 4 años**
- 3. Plantilla antropometría 4 años**
- 4. Cuestionario general 4 años**
- 5. Cuestionario de frecuencia alimentaria 4 años**
- 6. Cuestionario de Salud mental (padre/madre)**
- 7. Cuestionario de Vínculo afectivo (padre/madre)**
- 8. Cuestionario ambiental 4 años**
- 9. Cuestionario uso y consumo de agua: modelo embarazo**

Anexo 1.1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/D^a _____

con DNI _____ como padre/madre/tutor del niño:

Autorizo libre y voluntariamente a los responsables del Proyecto de Investigación **INFANCIA Y MEDIOAMBIENTE "INMA"** y doy mi consentimiento para la utilización de la información obtenida a partir del cuestionario contestado y de la información necesaria de la historia clínica, y accedo a la recogida y utilización con fines de investigación de las muestras biológicas (placenta, sangre de cordón y leche materna)

He leído y comprendido previamente la hoja de información que se me ha entregado y he podido preguntar dudas sobre el mismo.

Comprendo que tengo derecho a revocar mi consentimiento en cualquier momento sin que ello afecte negativamente a la futura atención médica que requiera mi hijo.

En Granada, a de de 200

Fdo,

(Padre/madre/tutor)

Anexo 1.2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña.....

con D.N.I:como padre/madre/tutor del niño:

.....

Autorizo libre y voluntariamente a los responsables del Proyecto de Investigación y doy mi consentimiento para que mi hijo participe en el Proyecto de investigación **Red Infancia y Medio Ambiente “INMA”**: **“Exposiciones pre- y postnatales a contaminantes ambientales, dieta, crecimiento fetal y desarrollo neuro-inmuno-endocrino”**

- He leído y comprendido previamente la hoja de información que se me ha entregado y he podido preguntar dudas sobre el mismo.

- He sido informado de que los datos de mi hijo serán manejados de acuerdo a las bases reguladoras de la ley protectora de bases de datos (Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal; Ley 1/1996 de 15 de enero de Protección Jurídica del Menor y Ley 41/2002 de 14 de noviembre reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica).

- Comprendo que tengo derecho a revocar mi consentimiento en cualquier momento sin que ello afecte negativamente a la futura atención médica que requiera mi hijo.

En Granada, a de de 200

Fdo,

(Padre/madre/tutor)

Anexo 2

Granada, a de de 200

Queridos padres,

Nos dirigimos a vosotros para agradecer vuestra participación en la Red **Infancia y Medio Ambiente** “INMA”, cuyo lema es *Preparemos el futuro: ambientes saludables para los niños*.

La Red INMA pretende estudiar el papel de los contaminantes ambientales del aire, el agua y los alimentos en el desarrollo y crecimiento infantil; así como conocer el grado de exposición de los niños de varias de las comunidades de España y evaluar el impacto sobre la salud. Los objetivos responden a la inquietud de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea sobre la vulnerabilidad de los niños a los factores ambientales.

Inicialmente, su participación en el estudio implica que tendrá que someterse a algunos exámenes y procedimientos, los cuales se intentará en lo posible que coincidan con sus revisiones médicas. La toma de las muestras de placenta y sangre de cordón será realizada por profesionales cualificados.

Posteriormente, a la edad de 4 años, a cada niño se le realiza en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, una prueba psicológica, un examen pediátrico y se contesta a varios cuestionarios relacionados con su entorno ambiental y su salud. Es necesario, primero, evaluar en la población sana la prueba psicológica que posteriormente realizaremos en el Hospital, de ahí que vuestros hijos jueguen un papel importante.

Agradecemos sinceramente vuestra colaboración. Gracias a vosotros nuestra tarea investigadora es posible por lo que no quisiéramos perder el contacto con vuestros hijos en futuros exámenes.

Os recordamos que en la web <http://www.infanciaymedioambiente.org> podéis obtener toda la información acerca de lo que acontece en la Red INMA.

Un abrazo,

Dr. Nicolás Olea
Coordinador INMA en Granada
Teléfono de contacto: 958 240758

Anexo 3

ANTROPOMETRÍA 4 AÑOS

IDNUM:

Fecha de nacimiento: __/__/__

Fecha exploración: __/__/__

Nombre del pediatra: _____ Firma: _____

MEDIDAS ANTROPOMETRÍA	PESO (kg):	TALLA (cm):	
PLIEGUES (mm)	1ª Medida	BIA	
Bíceps		IMC	
Triceps		% Graso	
Subescapular		Agua corporal (kg)	
Suprailíaco		% Agua corporal	
Abdominal			
Muslo			
Gemelo			
PERÍMETROS (cm)	1ª Medida		
Brazo relajado		Craneal	
Brazo contraído		Torácico	
Cintura			
Cadera			
Muslo			
Gemelo			
DIÁMETROS (cm)	1ª Medida		
Muñeca			
Codo			
Rodilla			

Ni07	Visita al pediatra por enfermedad del bebé	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ninguno ▪ Fiebre ▪ Infección de las vías aéreas superiores ▪ Diarrea ▪ Otras enf. gastrointestinales ▪ Dermatitis atópica ▪ Fiebre del heno ▪ Asma bronquial ▪ Otros (especificar)_____
Ni08	Duración de las infecciones y/o alergias		
Ni09	Alteraciones detectadas por el pediatra desde el nacimiento	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ninguno ▪ Asfixia ▪ Hiperbilirrubinemia (con tratamiento) ▪ Poliglobulia ▪ Alteraciones metabólicas ▪ Alteraciones endocrinas ▪ Patología del desarrollo ▪ Enfermedades de los ojos ▪ Enfermedades de los oídos ▪ Alteraciones severas de la alimentación ▪ Enfermedades gastrointestinales ▪ Otras (especificar)_____

Ni10	Edad de inicio de la escolarización (guardería)	
Nombre y firma del pediatra		

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA Nº 3

IDNUM | | | | |

Estimada Sra., esta parte de la encuesta es para conocer la dieta que ha seguido su hijo/a a lo largo de todo el último año. Con ello tratamos de averiguar el papel que puede jugar la dieta en relación a su crecimiento y desarrollo. Sus respuestas serán muy útiles, y por ello, le agradecemos sinceramente que preste su máxima atención y colaboración. Cuando un alimento no se adapte plenamente a su consumo habitual, trate de aproximar su respuesta a las cantidades indicadas, con la ayuda de los ejemplos e indicaciones que se le den.

Para cada alimento, señalar **cuantas veces como media** ha tomado la cantidad que se indica durante el último año. Debe tener en cuenta las veces que toma el alimento solo y cuando lo añade a otro alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (Ej. frito o cocido) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si este en este año ha venido comiendo una tortilla de 2 huevos cada 2 días, deberá marcar "1 por día". No debe considerar el huevo que va con los productos de bollería o dulces.

I. LACTEOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
4. Leche energía y crecimiento (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
5. Leche enriquecida con calcio (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
6. Leche enriquecida con Vitamina A + D (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
7. Leche condensada (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
8. Yogur entero (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
9. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
10. Batidos de leche o bebidas lácteas tipo <i>Dan-up</i> (Una botellita pequeña)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
11. Petit suisse (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
12. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
13. Queso curado, semicurado, o cremoso (un trozo, 30 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
14. Crema o nata montada (1 cucharada, 7,5 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. Natillas, flan, puding (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
16. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
17. Huevos de gallina (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. Pollo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
20. Carne de ternera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
21. Hígado de ternera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22. Embutidos: jamón, salchichón, salami, mortadela, (1 ración de unos 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
23. Salchichas y similares (2 pequeñas o una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
24. Patés, foie-gras (media ración, 25 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
25. Hamburguesa (una mediana, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
26. Tocino, beicon, panceta (2 tiras o lonchas, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
27. Pescado frito o rebozado variado (1 plato mediano o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
28. Pescado hervido o plancha BLANCO: merluza, lenguado, dorada (1 plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
29. Pescado hervido o plancha AZUL: atún, emperador, bonito, boquerón, salmón (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
30. Una lata pequeña de conserva de atún, bonito, sardina o caballa en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
31. Almejas, mejillones, berberechos (1 ración o lata pequeña, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración pequeña, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración pequeña 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

Si no se especifica, los platos para carne, pescado, verdura, legumbres o frutas son de tamaño pequeño-mediano

Para alimentos que se consumen por temporadas (ej. frutas, helados), calcular el consumo medio para todo el año. Por ejemplo, si para un alimento como la sandía o el melón se comen 2 tajadas diarias durante todo el verano (3 meses), entonces el consumo medio al año de una tajada se marcaría en la casilla 4 "2-4 por sem"

III. VERDURAS, LEGUMBRES.

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
34. Espinacas o acelgas cocinadas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
35. Col, coliflor, brócolis cocinadas (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
36. Lechuga, endibias, escarola (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
37. Tomate (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
38. Zanahoria (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
39. Calabaza cocinada (ej plato de puré pequeño)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
40. Judías verdes cocinadas (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
41. Berenjenas, calabacín, pepino (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
42. Maíz hervido (mazorca o lata pequeña, 82 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
43. Legumbres: lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

IV. FRUTAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
44. Naranjas, mandarinas (Una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
45. Zumo de naranja natural (un vaso pequeño, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
46. Plátano (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
47. Manzana, pera (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
48. Melocotón, nectarina, albaricoque (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
49. Sandía, melón (1 tajada mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
50. Uvas (un racimo mediano o plato de postre)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
51. Fresas (plato pequeño)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
52. Cerezas, ciruelas, higos-brevas frescos (plato pequeño o dos unidades)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
53. Kiwi (una unidad)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
54. Fruta en almibar: melocotón, piña, pera (2 mitades o rodajas)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55. Aceitunas (un platito o tapa de unas 15 unidades pequeñas)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
56. Frutos secos: almendras, cacahuetes, piñones, avellanas (1 platito o bolsita, 30g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

V. PAN, CEREALES Y SIMILARES

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
57. Pan blanco (Una pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde, 60 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
58. Pan integral (Pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
59. Cereales desayuno (30 g en seco)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
60. Patatas fritas (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
61. Patatas cocidas, asadas (1 patata mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
62. Bolsa de patatas fritas (1 bolsa pequeña)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
63. Bolsa de cortezas de maíz, conos y similares -chips, doritos- (1 bolsa pequeña)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
64. Arroz cocinado (1 plato mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
65. Pastas: espaguetis, fideos, macarrones y similares (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
66. Pizza (1 porción o ración, 200 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VI. BOLLERÍA Y DULCES

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
67. Galletas tipo María (1 galleta)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
68. Galletas con chocolate (1 galleta doble)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
69. Magdalenas o bizcochos comerciales (uno mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
70. Croissant, ensaimada, donuts u otra bollería comercial sin relleno (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
71. Bollicao u otra bollería comercial con relleno de crema o chocolate (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
72. Bollería o repostería casera o panadería tradicional (una unidad mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
73. Pasteles, tarta (unidad o trozo mediano)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
74. Chocolate, bombones y similares (1 barrita o 2 bombones, 30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
75. Chocolate en polvo, <i>Cola-cao</i> y similares (1 cucharada colmada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VII. ACEITES Y GRASAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
76. Aceite de oliva añadido en la mesa a ensalada, pan y a platos (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
77. Otros aceites vegetales (ídem): girasol, maíz, soja (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
78. Mantequilla añadida al pan o comida (1 cucharada o untada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
79. Margarina añadida al pan/comida (1 untada) <i>marca</i> _____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VIII. BEBIDAS Y MISCELANEAS

	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
80. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
81. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. coca-cola o pepsi light) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
82. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
83. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
84. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
85. Zumo de frutas envasado (1 vaso o envase tipo brick pequeño, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
86. Croquetas de pollo, jamón (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
87. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
88. Sopa, crema o puré de verduras (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
89. Mayonesa (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
90. Salsa de tomate (media taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
91. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
92. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
93. Caramelos y otras chucherías (2 ó 3 unidades)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
94. Mermeladas, miel (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
95. Azúcar (ej. en la leche, postres, etc.) (1 cucharadita)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

¿Consume algún otro alimento al menos una vez a la semana?

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨

SUPLEMENTOS Y OTROS HáBITOS DIETÉTICOS

1. Durante los <u>2 últimos años</u> , ¿ha tomado suplementos de vitaminas o minerales?	Marca y presentación	Dosis semanal (unidad/sem)
a. Preparados de Calcio ① No ② Estacionalmente (3-6meses) ③ Regularmente	_____	_____
b. Suplementos ricos en fibra ① No ② Estacionalmente (3-6meses) ③ Regularmente	_____	_____
c. Multivitaminas ① No ② Estacionalmente (3-6meses) ③ Regularmente	_____	_____
d. Otros suplementos ① No ② Estacionalmente (3-6meses) ③ Regularmente	_____	_____

<p>2. ¿Ha seguido su hijo/a algún tipo de dieta en el último año? (Si responde NO pasar a pregunta 4)</p> <p style="text-align: center;">① No ② Sí ③ No sabe/No contesta</p> <p>3. ¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta? <i>Puede marcar más de una respuesta</i></p> <p>① para controlar su peso</p> <p>② por razones médicas</p> <p>¿cual? _____</p> <p>4. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas?</p> <p>① A diario.</p> <p>② 5-6 veces por semana.</p> <p>③ 2-4 veces por semana.</p> <p>④ 1 vez por semana.</p> <p>⑤ Menos de 1 vez por semana. ⑥ Ns/Nc</p> <p>5. ¿Cuándo come carne, cómo de hecha le gusta comerla?</p> <p>① No come carne (<i>pasar a pregunta 9</i>)</p> <p>② Cruda</p> <p>③ Poco hecha</p> <p>④ Hecha</p> <p>⑤ Muy hecha. ⑥ Ns/Nc</p> <p>6. ¿Cuándo come carne, qué hace Vd. con la grasa visible?</p> <p>① La quita toda.</p> <p>② Quita la mayoría.</p> <p>③ Quita un poco.</p> <p>④ No quita nada. ⑥ Ns/Nc</p>	<p>7. ¿Cómo suele comer la carne</p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">Veces al</th> <th rowspan="2">Ns/Nc</th> </tr> <tr> <th>Nunca</th> <th>Mes</th> <th>Semana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>a. A la plancha</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>b. A la parrilla (grill)</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>c. Asada (horno)</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>d. Frita en aceite</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>e. Guisada</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> </tbody> </table> <p>8. ¿Qué clase de grasa o aceite suele usar para:</p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mantequilla</th> <th>Margarina</th> <th>Ac oliva</th> <th>AcO.virgen</th> <th>Maiz/Girasol</th> <th>Mezcla Aceites</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>ALIÑAR</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>COCINAR</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> <tr><td>FREIR</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td><td>___</td></tr> </tbody> </table> <p>9. ¿Ha acudido su hijo al comedor escolar en el último año?</p> <p>① Nunca ② <1 vez/sem ③ 1-3 veces/sem ④ 4-5 veces/sem ⑥ Ns/Nc</p> <p>10. Habitualmente, ¿cuántas veces a la semana...</p> <table style="width: 100%;"> <tbody> <tr> <td>① Desayuna</td> <td> ___ veces/sem</td> <td>④ Merienda</td> <td> ___ veces/sem</td> </tr> <tr> <td>② Almuerzo</td> <td> ___ veces/sem</td> <td>⑤ Cena</td> <td> ___ veces/sem</td> </tr> <tr> <td>③ Come</td> <td> ___ veces/sem</td> <td>⑥ "Pica algo"</td> <td> ___ veces/sem</td> </tr> </tbody> </table>		Veces al			Ns/Nc	Nunca	Mes	Semana	a. A la plancha	___	___	___	___	b. A la parrilla (grill)	___	___	___	___	c. Asada (horno)	___	___	___	___	d. Frita en aceite	___	___	___	___	e. Guisada	___	___	___	___		Mantequilla	Margarina	Ac oliva	AcO.virgen	Maiz/Girasol	Mezcla Aceites	ALIÑAR	___	___	___	___	___	___	COCINAR	___	___	___	___	___	___	FREIR	___	___	___	___	___	___	① Desayuna	___ veces/sem	④ Merienda	___ veces/sem	② Almuerzo	___ veces/sem	⑤ Cena	___ veces/sem	③ Come	___ veces/sem	⑥ "Pica algo"	___ veces/sem
	Veces al			Ns/Nc																																																																						
	Nunca	Mes	Semana																																																																							
a. A la plancha	___	___	___	___																																																																						
b. A la parrilla (grill)	___	___	___	___																																																																						
c. Asada (horno)	___	___	___	___																																																																						
d. Frita en aceite	___	___	___	___																																																																						
e. Guisada	___	___	___	___																																																																						
	Mantequilla	Margarina	Ac oliva	AcO.virgen	Maiz/Girasol	Mezcla Aceites																																																																				
ALIÑAR	___	___	___	___	___	___																																																																				
COCINAR	___	___	___	___	___	___																																																																				
FREIR	___	___	___	___	___	___																																																																				
① Desayuna	___ veces/sem	④ Merienda	___ veces/sem																																																																							
② Almuerzo	___ veces/sem	⑤ Cena	___ veces/sem																																																																							
③ Come	___ veces/sem	⑥ "Pica algo"	___ veces/sem																																																																							

ACTIVIDAD FISICA Y EJERCICIO DEL NIÑO/A (referida al último año)

1. En los últimos 12 meses, ¿podría indicarme Vd. cuántas horas al día suele dormir su hijo/a, incluida la siesta?

----- horas

2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?

----- min.

3. ¿Cuántas horas ve su hijo/a la televisión a la semana?
(ajustar al número entero más cercano)

----- horas

4. ¿Cuánto tiempo camina o hace bicicleta al día?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 20 minutos al día
- ③ 20-40 minutos al día
- ④ 40-60 minutos al día
- ⑤ Entre 1 y 1 hora y media al día
- ⑥ Más de 1 hora y media al día

5. En su tiempo libre incluidas las actividades extraescolares deportivas, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicios o deportes?

- ① Menos de 1/2 hora al día
- ② ½ a 1 hora / día
- ③ 1 hora / día
- ④ 2 horas / día
- ⑤ 3 horas / día
- ⑥ 4 o más horas / día

6. En su tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a ver televisión, videos, juegos sedentarios, leer o a jugar con el ordenador?

- ① Menos de 1 hora al día
- ② 1 hora / día
- ③ 2 horas / día
- ④ 3 horas / día
- ⑤ 4 horas / día
- ⑥ 5 horas / día
- ⑦ 6 o más horas / día

7. Globalmente, considerando toda su actividad física (AF): ¿cómo considera Vd. a su hijo/a?

- ① **Sedentario/a:** sentado casi siempre, sin práctica de AF o deportes, bajo cuidados.
- ② **Poco activo/a:** actividades sentadas, escasa AF o deportes
- ③ **Moderadamente activo/a:** poco tiempo sentado, ligera AF o deportes.
- ④ **Bastante activo/a:** casi siempre de pie, frecuente AF o deportes.
- ⑤ **Muy activo/a:** siempre de pie/moviéndose, intensa AF o deportes a diario)
- ⑥ No sabe / no contesta

(Se asume una asistencia media de 5 a 6 horas/día al colegio)

Anexo 6

CUESTIONARIO SALUD MENTAL (CSM, Copia para los padres)

IDNUM niño/a: _____	Nombre y apellidos del niño: _____
Nombre padre/madre: _____	Apellidos: _____
Padre <input type="checkbox"/> Madre <input type="checkbox"/>	Niño <input type="checkbox"/> Niña <input type="checkbox"/>
Fecha nacimiento niño/a: ___ / ___ / 19__	
Fecha cumplimentación: ___ / ___ / 200__	
Cumplimentado por: _____	

A continuación hay una serie de preguntas que se refieren a problemas que haya podido tener durante los últimos 30 días.

1. ¿Se ha podido concentrar bien en lo que hacía?

1. Mejor que habitualmente
2. Igual que habitualmente
3. Menos que habitualmente
4. Mucho menos que habitualmente

2. ¿Sus preocupaciones le han hecho perder el sueño?

1. En absoluto
2. No más que habitualmente
3. Un poco más que habitualmente
4. Mucho más que habitualmente

3. ¿Ha sentido que desempeña un rol útil en la vida?

1. Me he sentido más útil que habitualmente
2. Me he sentido igual que habitualmente
3. Me he sentido menos útil que habitualmente
4. Me he sentido mucho menos útil que habitualmente

4. ¿Se ha sentido capaz de tomar decisiones?

1. Me he sentido más capaz que habitualmente
2. Me he sentido igual de capaz que habitualmente
3. Me he sentido menos capaz que habitualmente
4. Me he sentido mucho menos capaz que habitualmente

5. ¿Se ha notado constantemente cargado y en tensión?

1. No, en absoluto
2. No más que habitualmente
3. Sí, un poco más que habitualmente
4. Sí, mucho más que habitualmente

6. ¿Ha tenido la sensación que no puede superar sus dificultades?

1. No, en absoluto
2. No más que habitualmente
3. Sí, un poco más que habitualmente
4. Sí, mucho más que habitualmente

7. ¿Ha sido capaz de disfrutar de sus actividades diarias?

1. Más que habitualmente
2. Igual que habitualmente
3. Menos que habitualmente
4. Mucho menos que habitualmente

8. ¿Ha sido capaz de afrontar, adecuadamente, sus problemas?

1. Más capaz que habitualmente
2. Igual que habitualmente
3. Menos capaz que habitualmente
4. Mucho menos capaz que habitualmente

9. ¿Se ha sentido poco feliz y deprimido/a?

1. En absoluto
2. No más que habitualmente
3. Un poco más que habitualmente
4. Mucho más que habitualmente

10. ¿Ha perdido confianza consigo mismo?

1. En absoluto
2. No más que habitualmente
3. Un poco más que habitualmente
4. Mucho más que habitualmente

11. ¿Ha pensado que es una persona que no sirve para nada?

1. En absoluto
2. No más que habitualmente
3. Un poco más que habitualmente
4. Mucho más que habitualmente

12. ¿Se siente razonablemente feliz, considerando todas las circunstancias?

1. Me siento más feliz que habitualmente
2. Me siento igual de feliz que habitualmente
3. Me siento menos feliz que habitualmente
4. Me siento mucho menos feliz que habitualmente

Le agradecemos muy sinceramente su colaboración

Anexo 7

ESCALA SOBRE VÍNCULO AFECTIVO ADAPTACIÓN PARA NIÑOS DE 4 AÑOS

PF1 Cuando estoy atendiendo al niño/a me siento molesto/a o irritable:

- Muy a menudo
- A menudo
- De vez en cuando
- Muy raramente
- Nunca

PF2 Cuando estoy atendiendo al niño/a siento que él/ella tiene comportamientos deliberadamente difíciles o que intenta hacerme enfadar:

- Muy a menudo
- A menudo
- De vez en cuando
- Muy raramente
- Nunca

PF3 En las últimas dos semanas podría describir mis sentimientos hacia el niño/a como:

- Desagradables
- Sin sentimientos intensos hacia el niño

- Afecto leve
- Afecto moderado
- Afecto intenso

PF4 Puedo comprender lo que mi niño/a necesita o quiere:

- Casi siempre
- Normalmente
- De vez en cuando
- Raramente
- Casi nunca

PF5 Todo lo que se refiera a mi nivel de interacción o relación con el niño/a creo que yo estoy:

- Mucho más implicado que la mayoría de los padres/madres de mi posición
- Algo más implicado que la mayoría de los padres/madres de mi posición
- Igual de implicado que la mayoría de los padres/madres de mi posición
- Algo menos implicado que la mayoría de los padres/madres de mi posición
- Mucho menos implicado que la mayoría de los padres/madres de mi posición

PF6 Cuando estoy con el niño/a me aburro:

Muy a menudo

A menudo

De vez en cuando

Casi nunca

PF7 Cuando estoy con el niño/a y otra gente está presente, me siento orgulloso/a del él/ella:

Muy a menudo

A menudo

De vez en cuando

Casi nunca

PF8 Intento involucrarme todo lo que puedo en el cuidado y porvenir del niño:

Esto es verdad

Esto no es verdad

PF9 Hablo del niño/a con otras personas (que no sea mi pareja):

Muchas veces al día

Unas pocas veces al día

Una o dos veces al día

Raramente en un día cualquiera

PF10 Cuando tengo que dejar el niño/a:

- Normalmente me siento un poco triste
- A menudo me siento un poco triste
- Tengo sentimientos mezclados, de tristeza y de liberación al mismo tiempo
- A menudo me siento liberado/a
- Normalmente me siento liberado/a

PF11 Cuando estoy con el niño/a:

- Siempre disfruto/me satisface mucho
- A menudo disfruto/me satisface mucho
- De vez en cuando disfruto/me satisface mucho
- Muy raramente disfruto/me satisface mucho

PF12 Cuando no estoy con el niño/a, estoy pensando en él:

- Frecuentemente
- De vez en cuando
- Casi nunca

PF13 Cuando estoy con el niño:

- Normalmente intento prolongar el tiempo que paso con él/ella.
- Normalmente intento acortar el tiempo que paso con él/ella.

PF14 Cuando he estado alejado/a del niño/a por un tiempo y voy a volver a estar con él/ella otra vez, normalmente siento:

- Una ilusión intensa a la idea
- Una ilusión moderada a la idea
- Una ilusión media a la idea
- La idea no me provoca sentimientos
- Tengo sentimientos negativos a la idea

PF15 En los últimos tres meses, he estado sentado/a mirando el niño/a como dormía durante periodos de cinco minutos o más:

- Muy a menudo
- A menudo
- Algunas veces
- Casi nunca

PF16 Respeto las cosas que hemos tenido que renunciar por el niño/a:

- Bastantes veces siento resentimientos
- Algunas veces siento resentimientos
- Raramente siento resentimientos
- No siento resentimientos

PF17 En los últimos tres meses, siento que no tengo suficiente tiempo para mí, para llevar a cabo mis propios intereses:

- Casi todo el tiempo
- Muy a menudo
- De vez en cuando
- Casi nunca

PF18 Normalmente cuando estoy con el niño/a:

- Soy muy impaciente
- Soy un poco impaciente
- Soy bastante paciente

Preliminary Factor Structure

Items in brackets() are reverse scored

Quality of attachment: 3 6 (7) (11)

Absence of hostility: 1 2 16 17 18

Pleasure in interaction: all reversed (4 5 8 9 10 12 13 14 15)

To ensure equal weighting of all questions it is recommended that response options be recoded to represent a score of 1 (low attachment) to 5 (high attachment) for every question. For example:

Question 6 would be scored as: 1; 2.3; 3.6; 5

Question 8 would be (reverse) scored as: 5; 1

Anexo 8

CUESTIONARIO AMBIENTAL NIÑO 4 AÑOS

- a) IDNUM NIÑO: _____
- b) FECHA CUESTIONARIO: ____/____/____
- c) ENTREVISTADOR: _____ f) ENTREVISTADO: _____

A. ENTORNO DE LA VIVIENDA

1. Dirección postal: _____
2. ¿Desde cuándo vive el niño en esta vivienda?: _____ (meses/ años)
3. Clasifique el entorno como:
 - a. Rural
 - b. Residencial
 - c. Urbano
 - d. Comercial
 - e. Industrial
4. Anchura aproximada de la calle: _____ metros
5. Distancia a una calle en la que el tráfico pasa continuamente: _____ metros
6. ¿Cuál es la frecuencia con que pasan coches por la calle más cercana a la vivienda?
 - a. Continuamente
 - b. Con bastante frecuencia
 - c. Frecuencia regular
 - d. Poco
 - e. Prácticamente nunca
7. ¿Cuál es la frecuencia con que pasan vehículos pesados (camiones, autobuses,..., excepto el camión de la basura) por la calle más cercana a la vivienda?
 - a. Continuamente
 - b. Con bastante frecuencia
 - c. Frecuencia regular
 - d. Poco
 - e. Prácticamente nunca

8. Distancia aproximada a algún foco de emisión de contaminación atmosférica (humo, polvo, olores) distinto del tráfico, tal como chimeneas, extractores de humo,...: _____ metros

8.1. Especificar cuál es la actividad: _____

8.2. Grado de molestia: _____
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

9. Distancia aproximada a algún foco de emisión de ruido distinto del tráfico, tal como bares, taller, industria, obra,...: _____ metros

9.1. Grado de molestia: _____
 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10. Distancia aproximada a zona verde o arbolada: _____ metros.

B. INTERIOR DE LA VIVIENDA

1. ¿Cómo describiría la vivienda?

- a. vivienda unifamiliar separada de otras casas
- b. vivienda unifamiliar junta a una o más casas (casa de pueblo, adosado)
- c. Piso
- d. Otro. Especificar: _____

2. Nº de habitantes de la vivienda: _____

3. Superficie aproximada de:

Dormitorio niño: _____ m²

Salón: _____ m²

Cocina: _____ m²

4. N° de ventanas de:

Dormitorio niño: _____; int / ext: _____

Salón: _____; int / ext: _____

Cocina: _____; int / ext: _____

¿Cómo considera la ventilación de

		Inv	Ver		Inv	Ver		Inv	Ver
dormitorio niño?	Buena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Regular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
salón?	Buena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Regular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
cocina?	Buena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Regular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. ¿Tiene calefacción la vivienda?

Dormitorio niño: Sí No Tipo: _____

Salón: Sí No Tipo: _____

Tipos: Central o por aire / Gas Natural, gas butano (estufa), gas propano, gasoil, eléctrica, chimenea abierta, estufa de carbón o madera.

6. ¿Tiene aire acondicionado la vivienda?

Dormitorio niño: Sí No

Salón: Sí No

7. Tipo de calentador de agua de la vivienda:

Tipos: gas natural, gas propano, gas butano, caldera de aceite, fuel o gasoil, eléctrico, de parafina o queroseno, carbón o madera.

8. ¿Tiene extractor en la cocina? Sí No

8.1. ¿Lo usa habitualmente? Sí No

9. ¿Qué tipo de cocina tiene? _____

Tipos: gas natural, gas propano, gas butano, eléctrica, carbón o madera.

10. Nº de fumadores en la vivienda: _____

10.1. Cantidad total: _____ cigarros/día

10.2. ¿Se fuma en las siguientes habitaciones?

Dormitorio niño: Sí No

Salón: Sí No

Cocina: Sí No

11. Nº ocupantes del dormitorio del niño: _____

12. ¿Hay animales en la vivienda? Sí No

12.1. ¿Han dormido o duermen animales en la habitación del niño? Sí No

13. ¿Utiliza humidificador en el dormitorio del niño? Sí No

14. ¿Qué otras formas de emisión atmosférica existen en la vivienda?

Aerosoles ; frecuencia de uso: _____

Ambientadores* ; frecuencia de uso: _____

Otros ; especificar: _____; frecuencia de uso: _____

Anexo 9

CUESTIONARIO DE USO Y CONSUMO DE AGUA EN EL EMBARAZO

IDNUM: _____

Fecha cuestionario: ____/____/____

Entrevistador: _____

Entrevistado: _____

1. (56) ¿Cuántos vasos de agua bebía habitualmente cada día durante el embarazo? (en total, contando durante la comida y fuera de la comida)

- 1 Ninguno
- 2 1 vaso por día
- 3 2 vasos por día
- 4 3-4 vasos por día
- 5 5-6 vasos por día
- 6 Más de 6 vasos por día
- 9 No sabe

2. (57). ¿Cuál era el origen principal del agua que bebía en su residencia durante el embarazo? (indicar un solo origen, el que usted considere más frecuente)

- 1 Agua municipal
- 2 Pozo privado
- 3 Agua embotellada
- 4 Otro origen (especificar) _____
- 9 No sabe

Si la respuesta es "agua municipal", ir a la pregunta 2ª.

Si la respuesta es "pozo privado" o "agua embotellada" o "otro origen" o "no sabe", ir a la pregunta 3

2a. (57a) Si el origen del agua que bebía era agua municipal ¿Utilizaba algún tipo de filtro?

- 1 Sí → Indicar tipo: _____
- 2 No

3. (58) ¿Cuál era el origen principal del agua que utilizaba para cocinar en su casa durante el embarazo? (indicar un solo origen, el que usted considere más frecuente)

- 1 Agua municipal
- 2 Pozo privado
- 3 Agua embotellada
- 4 Otro origen (especificar) _____
- 9 No sabe

Si la respuesta es "agua municipal", ir a pregunta 3a.

Si la respuesta es "pozo" o "agua embotellada" o "otro origen" o "no sabe", ir a la pregunta 4.

3a. (58a) Si el origen del agua que usaba para cocinar era agua municipal, ¿Utilizaba algún tipo de filtro?

- 1 Sí → Indicar tipo:
 2 No

4. (59) ¿Cambió el agua que consumía mientras estaba embarazada?

- 1 Sí, la de beber
 2 Sí, la de cocinar
 3 No cambió

5. (60) ¿Cuál era el origen principal del agua que consumía fuera de casa (en su trabajo, en casa de familiares) durante el embarazo? (indicar un solo origen, el que usted considere más frecuente)

- 1 Agua municipal
 2 Pozo privado
 3 Agua embotellada
 4 Otro origen (especificar)
 9 No sabe

6. (61) ¿Cómo se aseaba habitualmente durante el embarazo?

- 1 Ducha
 2 Baño
 3 Ambos
 4 Otro (especificar)

7. (62) ¿Con qué frecuencia se solía duchar y/o bañar durante el embarazo?

	1. Ducha	2. Baño
a. Nº de veces a la semana.....	<input type="text"/>	<input type="text"/>
b. Si era menos de una vez a la semana, indicar el nº de veces al mes	<input type="text"/>	<input type="text"/>

8. (63) ¿Cuánto rato, en promedio, duraba la ducha y/o el baño?

	1. Ducha	2. Baño
Número de minutos	<input type="text"/>	<input type="text"/>

9. (64) ¿Se solía duchar y/o bañar con agua caliente o fría?

	Caliente	Fría	Ambas
a. Ducha	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
b. Baño	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

10. (65) Durante el embarazo, ¿se solía bañar en la piscina?

- 1 Sí
2 No

Si la respuesta es "Sí", ir a pregunta 10a y 10b.

Si la respuesta es "No", ir a pregunta 11.

10a. (65a) ¿Era una piscina pública?

- 1 Sí (especificar nombre)

 2 No

10b. (65b) ¿Con qué frecuencia se bañaba en la piscina durante el embarazo?

	Verano		Resto del año	
	Nº veces al mes	Tiempo (minutos)	Nº veces al mes	Tiempo (minutos)
1. Piscina descubierta	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2. Piscina cubierta	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

CONSUMO DE BEBIDAS

Estimada Sra., esta parte de la encuesta es para conocer el consumo de las siguientes bebidas durante su embarazo. Para tipo de bebida o alimento, señale cuántas veces como media había tomado la cantidad que se indica.

	Nunca o menos de 1 vez al mes	1-3 por mes	1 por semana	2-4 por sem.	5-6 por sem.	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6 o más por día
11. (85) Agua del grifo (1 vaso)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
12. (86) Agua embotellada sin gas (1 vaso)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
13. (87) Agua embotellada con gas (1 vaso)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
14. (89) Café (1 taza)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
15. (90) Café descafeinado (1 taza)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
16. (91) Sopa o puré de verduras (un plato)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
17. (101) Té o Infusiones (1 taza)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

OBSERVACIONES

¡GRACIAS POR CONTESTAR ESTE CUESTIONARIO!

