

# **Matrices biològiques y biomarcadores de exposició fetal a drogas de abuso durante el tercer trimestre de la gestació**

**Sandra Ortigosa Gómez**

---

**TESIS DOCTORAL UAB / 2012**

## **Directores**

**Óscar García Algar** (Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM); Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, Medicina Preventiva i Salut Pública, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB))

**Bibiana Fríguls Francitorra** (Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM))

IMIM - Institut de Recerca Hospital del Mar  
Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, Medicina  
Preventiva i Salut Pública, UAB  
Octubre, 2012







**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Tesis Doctoral**

**Doctorat en Medicina i Cirurgia  
Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i  
Medicina Preventiva  
Facultat de Medicina**

# **MATRICES BIOLÓGICAS Y BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN FETAL A DROGAS DE ABUSO DURANTE EL TERCER TRIMESTRE DE LA GESTACIÓN**

Memoria presentada por Sandra Ortigosa Gómez para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo se ha realizado en la Unitat de Recerca Infància i Entorn del IMIM - Institut de Recerca Hospital del Mar, bajo la codirección del Dr. Óscar García Algar y de la Dra. Bibiana Fríguls Francitorra.

Óscar García Algar  
(Director de Tesis)

Bibiana Fríguls Francitorra  
(Directora de Tesis)

Sandra Ortigosa Gómez  
(Doctoranda)





## **PREFACIO Y AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es un esfuerzo el cual no habría sido posible sin la ayuda directa o indirecta de las personas que me rodean, leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los diferentes momentos... Estas palabras van dirigidas a todas esas personas que me han ayudado y han estado a mi lado durante su realización. Gracias a todas ellas este trabajo ha salido adelante de la mejor manera posible.

En primer lugar a Óscar García y Bibiana Fríguls, directores de tesis, por la confianza en mi trabajo, por sus consejos, ideas y correcciones minuciosas para que la tesis se llevara a cabo. A Oscar en especial por insistir tanto en la importancia de la investigación en la práctica médica y por estar siempre dispuesto a realizar las correcciones necesarias de todos mis trabajos y a Bibiana por su apoyo y los momentos compartidos tanto en investigación como en la asistencia clínica.

A Oriol Vall por haber confiado en mí desde el primer momento cuando inicié mi residencia en pediatría y haberme abierto las puertas de su grupo de investigación, dándome la oportunidad de tener una visión más amplia e interesante del mundo de la investigación.

A mis compañeros del equipo de pediatría del Hospital del Mar, residentes, adjuntos, enfermeras, auxiliares... gracias por compartir conmigo el día a día, he intentado aprender lo mejor de cada uno de vosotros.

A todos los miembros del grupo de investigación URIE colaboradores indispensables en el trabajo, gracias sobre todo por el año que pasé junto a vosotros, haciendo del trabajo algo agradable.

A los co-autores de los artículos presentados, por permitirme realizar la tesis a partir de ellos.

A Francesc Alameda y Lluïsa Mariñoso, del Departamento de anatomía patológica del Hospital del Mar, que me han ayudado en

el trabajo de campo, gracias por enseñarme algo totalmente nuevo para mí y contestar muchas de mis dudas.

Al IMIM – Parc de Salut Mar, institución que ha hecho posible la realización de este trabajo y por facilitarme la financiación en la impresión de esta tesis.

A mis padres que me proporcionaron una educación sin la cual seguramente no habría llegado hasta aquí, permitiéndome estudiar siempre lo que he querido.

Pero sobre todo a ti, Enric, que desde un principio y hasta el día de hoy sigues dándome ánimos en todos los proyectos que me propongo realizar. Gracias por haber compartido conmigo cada uno de estos momentos, ayudarme en todo lo que has podido y enseñarme que nunca debo rendirme. Pero especialmente por saber sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles.

Finalmente a mi pequeña Èlia, la última en llegar a mi vida, pero la que más me la ha cambiado. Gracias por hacerme disfrutar del día a día. Con tu sonrisa, los malos momentos se olvidan fácilmente.

Gracias a los dos por lo que me habéis dado y me dais cada día, y por haber sabido adaptaros a mis ausencias en algunos momentos.

Y gracias a todos los que aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, habéis estado ahí durante el desarrollo de este trabajo haciendo posible, que se haga realidad.

Esta tesis también es vuestra.

**A Enric y Èlia**





## **RESUMEN GLOBAL**

El abuso de sustancias en los países occidentales ha acontecido un problema de salud pública. Estas sustancias también son consumidas por embarazadas, afectando al feto y recién nacido, especialmente vulnerables. Desde la década de los ochenta, la eventual presencia y disposición de una sustancia de abuso en el organismo y su correlación con efectos clínicos y/o subjetivos ha sido evaluada mediante el análisis de plasma u orina. Sin embargo, realizar estas determinaciones en fluidos y matrices biológicas diferentes a la sangre y la orina resultan mucho más atractivas. La no invasividad en la recolección de muestras y otorgar mayor información retrospectiva en el tiempo hacen de matrices biológicas como la placenta, el meconio y el pelo, buenas matrices para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante la gestación y diferentes etapas de la infancia.

### **Metodología**

Revisión de la metodología empleada para la detección del consumo de sustancias de abuso durante el embarazo. Se ha realizado una revisión sobre los diferentes biomarcadores del consumo de alcohol durante la gestación. Centrándose en los biomarcadores que pueden ser utilizados en matrices alternativas, ya que presentan una ventana de detección más amplia y son más fáciles de obtener.

Estudio microscópico y macroscópico de la morfología placentaria para valorar los cambios en mujeres consumidoras de sustancias de abuso durante el embarazo. Teniendo un marcador objetivo de exposición fetal durante el tercer trimestre (meconio).

Determinación de la exposición a sustancias de abuso mediante una matriz alternativa del tercer trimestre (pelo materno).

### **Resultados**

Se han publicado 3 artículos, relacionados con el tema.

Una revisión sobre los biomarcadores de alcohol durante la gestación que pone de manifiesto la utilidad de los biomarcadores en matrices alternativas.

Un estudio morfológico sobre los cambios en la placenta de madres consumidoras de sustancias de abuso, donde no se observan cambios macroscópicos pero sí algunas alteraciones de la vasculatura placentaria a nivel microscópico.

Por último un estudio sobre la determinación de sustancias de abuso en pelo materno, el cual demuestra la utilidad de dicha matriz alternativa para la detección de sustancias de abuso durante el tercer trimestre de la gestación y reafirma la infradeclaración por parte de las madres.

### **Discusión y conclusiones**

Esta tesis pone de manifiesto la utilidad de la detección del consumo de sustancias de abuso durante el tercer trimestre de la gestación mediante biomarcadores en matrices alternativas. De la misma manera indica cambios a nivel de la placenta, la cual puede ser utilizada también como matriz del tercer trimestre, los cuales nos podrían ayudar a entender los efectos nocivos que el consumo de sustancias provoca sobre el recién nacido, aunque son necesarios más estudios para llegar a conclusiones más objetivas.

En conclusión, con el fin de detectar la exposición a sustancias de abuso durante el tercer trimestre de la gestación, se recomienda utilizar diferentes matrices no convencionales o alternativas (meconio, pelo, placenta) con el fin de minimizar la invasividad en la recogida de las muestras y tener una información de consumo crónico en comparación con las matrices utilizadas tradicionalmente (sangre y orina).

## **SUMMARY**

Substances of abuse consumption in Western countries has become a public health problem. These substances are also consumed by pregnant women, affecting the foetus and the newborn, especially vulnerables. Since the eighties, presence and eventual disposal of a substance of abuse and its correlation with clinical and/or subjective effects has been evaluated by analysis of plasma or urine. However, determinations in biological matrices other than blood and urine are very interesting. Non-invasiveness in sample collection and obtention of more information back in time make biological matrices such as placenta, meconium and hair, attractive to assess chronic exposure to drugs of abuse during pregnancy and childhood.

### **Methodology**

Review of the methodology used for the detection of drugs of abuse consumption during pregnancy, specifically of the different biomarkers of alcohol in alternative matrices, as they have a large exposure window and are easier to obtain.

Microscopic and macroscopic study of changes in placental morphology in women using substances of abuse during pregnancy, detected through an objective marker of foetal exposure during the third trimester in an alternative matrix (meconium).

Determination of exposure to substances of abuse by another alternative third trimester matrix (maternal hair).

### **Results**

Three articles have been published related to the topic.

A review on biomarkers of alcohol during pregnancy that demonstrates the utility of biomarkers in alternative matrices.

A morphological study on the changes in the placenta of substances of abuse using mothers. No macroscopic changes were observed, but some alterations in placental vasculature at the microscopic level were found.

Finally, a study on the determination of substances of abuse in maternal hair was made, demonstrating the usefulness of this

alternative matrix for detecting drugs of abuse in the third trimester and confirming under-reporting by mothers.

### **Discussion and conclusions**

In this thesis we demonstrated the usefulness of the detection of substances of abuse in the third trimester of pregnancy using biomarkers in alternative matrices. Similarly, we found changes in the placenta, which can also be used as a third trimester matrix, which could help us to understand the causes of harmful effects of substance use on the newborn, although further studies are needed.

In conclusion, in order to detect exposure to substances of abuse during the third trimester of pregnancy, the use of different alternative matrices (meconium, hair, placenta) to minimize the invasiveness of collecting samples and to obtain information about chronic consumption compared to the matrices used traditionally (blood and urine) is recommended.

## ABREVIATURAS

6-MAM	6-Monoacetilmorfina
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ALT	Alanina aminotransferasa
AP	Anfetamina
AST	Aspartato aminotransferasa
BE	Benzoilecgonina
COC	Cocaína
COD	Codeína
COT	Cotina
di-THC-OH	Beta,11-dihidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
D/M	Droga/Metabolito
EDADES	Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España
EDDP	2-Etilideno-1,5-dimetil-3,3-Difenilpirrolidina
EMCDDA	European monitoring centre for drugs and drug addition
EME	Ecgonina metil ester
EMIT	Ensayo inmunológico multiplicado por enzimas
EtG	Etil glucurónido
EtS	Etil sulfato
FASD	Fetal alcohol spectrum disorder
FAEE	Etil ésteres de ácidos grasos
FPIA	Immunoensayo por detección de fluorescencia polarizada
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GGT	Gamma glutamiltransferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión

LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M3G	Morfina-3-glucurónido
M6G	Morfina-6-glucurónido
MDMA	3,4-Metilendioximetanfetamina
MET	Metadona
MOR	Morfina
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NIC	Nicotina
NCOC	Norcocaína
ND	No disponible
OED	Observatorio español sobre drogas y toxicomanías
OH-BE	Hidroxibenzoilecgonina
PEth	Fosfatidiletanol
RIA	Radioinmunoensayo
THC	Tetrahidrocannabinol
THC-COOH	Ácido carboxílico 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
THC-OH	11-Hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
SAMHSA	Substance abuse mental health services administration
SoHT	Society of hair testing
SPE	Extracción en fase sólida
VCM	Volumen corpuscular medio
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

VIH

Virus de la inmunodeficiencia humana





# SUMARIO

<b>Prefacio y Agradecimientos.....</b>	<b>V</b>
<b>Resumen global.....</b>	<b>IX</b>
<b>Summary.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Sumario.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Consumo de drogas de abuso en nuestro entorno....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.1. Consumo de drogas de abuso en la</b>	
<b>población general.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.2. Consumo de drogas de abuso durante</b>	
<b>la gestación.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.3. Consecuencias del consumo de</b>	
<b>drogas durante el embarazo.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2. Distribución de las drogas de abuso en humanos....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.1. Principios farmacocinéticos en el embarazo....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.1.1. Compartimento materno.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.1.2. Compartimento placentario.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.1.3. Compartimento fetal.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3. Matrices biológicas alternativas.....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.1. Sangre de cordón y líquido amniótico.....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.2. Placenta.....</b>	<b>40</b>
<b>1.3.3. Meconio.....</b>	<b>42</b>
<b>1.3.4. Pelo.....</b>	<b>46</b>
<b>1.3.4.1. Pelo materno.....</b>	<b>52</b>
<b>1.3.4.2. Pelo neonatal.....</b>	<b>52</b>
<b>1.3.5. Fluido oral.....</b>	<b>53</b>
<b>1.3.6. Leche materna.....</b>	<b>54</b>
<b>1.3.7. Dientes.....</b>	<b>55</b>
<b>1.3.8. Sudor.....</b>	<b>55</b>

<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.</b> Joya X., Friguls B., <b>Ortigosa S.</b> , Papaseit E., Martínez S. E., Manich A., Garcia-Algar O., Pacifíci R., Vall O., Pichini S. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review. J Pharm Biomed Anal. 2012 Oct;69:209-22. PMID: 22300909.....	63
<b>3.2.</b> <b>Ortigosa S.</b> , Friguls B., Joya X., Martínez S., Mariñoso M. L., Alameda F., Vall O. Garcia-Algar O. Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. Reprod Toxicol. 2012 Aug;34(1):73-9. PMID: 22525318.....	81
<b>3.3.</b> Joya X, Gomez-Culebras M., Callejón A., Friguls B., Puig C., <b>Ortigosa S.</b> , Morini L., Garcia-Algar O., Vall O. Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. BMC Pregnancy Childbirth. 2012 Jan 9;12:2. PMID: 22230295.....	93
<b>4. DISCUSIÓN GLOBAL.....</b>	<b>105</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>6. PUBLICACIONES ANEXAS.....</b>	<b>121</b>
<b>6.1.</b> <b>Ortigosa Gómez S.</b> , López-Vilchez M. A., Díaz Ledo F., Castejón Ponce E., Caballero Rabasco A., Carreras Collado R., Mur Sierra A. Consumo de drogas durante la gestación y su repercusión neonatal. Análisis de los períodos 1982-1988 y 2002-2008. Med Clin (Barc). 2011 ; 136(10): 423-430. PMID: 21296368.....	123
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. Consumo de drogas de abuso en nuestro entorno**

### **1.1.1. Consumo de drogas de abuso en la población general**

Según datos del OED obtenidos mediante encuesta domiciliaria a la población española de entre 15 y 64 años durante los años 2009/2010, un 31,8% consumían diariamente tabaco, un 11% alcohol y un 2% cannabis. Un 10,6% de la población encuestada admitía haber consumido cannabis en los últimos 12 meses, 1,2% COC, 0,1% heroína y 0,6% AP (OED, 2011).

Durante este mismo período el consumo en mujeres de entre 15 y 64 años durante los últimos 12 meses fue el siguiente: 37% tabaco, 72,7% alcohol, 6,2% cannabis, 1% COC, 0,3% éxtasis, 0,3% AP y < 0,01% heroína (OED, 2011) (tabla 1).

Las principales conclusiones de este informe son: 1) el alcohol es la sustancia psicoactiva más consumida (79%) y el cannabis es la droga ilegal más consumida (11%); 2) la mitad de los consumidores de sustancias psicoactivas realizan consumo de 2 o más sustancias, estando presente el alcohol en el 90%; 3) se mantienen estables el consumo de alcohol, tabaco y cannabis respecto a los últimos años; 4) ha aumentado el consumo de hipnosedantes, que es claramente mayor en mujeres; 5) disminuye el consumo de COC; 6) el consumo de heroína parece haberse estabilizado incluso puede haber comenzado a ascender después de muchos años de descenso; 7) el consumo de éxtasis y AP no ha presentado cambios significativos, continuando en niveles bajos (EDADES, 2009).

En comparación con datos de otros estados de la Unión Europea, obtenidos por el EMCDDA, en 2010, España ha demostrado un porcentaje de consumo de COC y cannabis de entre los más altos, con un porcentaje de heroína de entre los más bajos (EMCDDA, 2010).

**Tabla 1.** Evolución de las prevalencias de consumo de drogas en los últimos 12 meses en la población española de 15-64 años según sexo (porcentajes). España, 2001-2009.

	2001		2003		2005		2007		2009	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
<b>Tabaco</b>	51,5	40,5	53,0	42,6	47,2	37,5	46,0	37,6	48,4	37,0
<b>Alcohol</b>	85,2	70,9	84,5	68,4	84,0	69,2	80,4	66,4	84,4	72,7
<b>Cannabis</b>	13,0	5,5	16,2	6,3	15,7	6,6	13,6	6,6	14,8	6,2
<b>Éxtasis</b>	2,8	0,7	2,0	0,8	1,8	0,6	1,6	0,5	1,4	0,3
<b>Alucinógenos</b>	1,2	0,2	0,9	0,3	1,1	0,4	0,9	0,3	0,7	0,2
<b>AP/Speed</b>	1,6	0,6	1,1	0,5	1,4	0,5	1,3	0,3	1,0	0,3
<b>COC en polvo</b>	3,8	1,3	4,1	1,2	4,6	1,3	4,4	1,5	4,2	1,0
<b>COC base</b>	0,2	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,7	0,1	0,2	0,1
<b>COC general</b>	-	-	-	-	-	-	4,7	1,6	4,2	1,0
<b>Heroína</b>	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0
<b>Inhalables</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,0	0,0
<b>Tranquilizantes</b>	-	-	-	-	2,6	5,2	4,7	9,1	3,4	7,6
<b>Tranquilizantes (sin receta)</b>	-	-	-	-	0,8	1,0	0,9	0,9	1,5	1,7
<b>Somníferos</b>	-	-	-	-	2,0	3,5	2,8	4,3	2,6	4,6
<b>Somníferos (sin receta)</b>	-	-	-	-	0,7	0,9	0,6	0,8	1,1	1,0
<b>Hipnosedantes*</b>	-	-	-	-	3,5	6,7	6,8	11,5	4,6	9,3
<b>Hipnosedantes (sin receta)*</b>	2,5	3,1	2,9	3,3	1,1	1,3	1,2	1,4	1,9	1,9
<p><b>*Tranquilizantes y/o Somníferos</b>  <b>FUENTE: DGPNSD. Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España (EDADES).</b>  <b>Anfetamina (AP); cocaína (COC)</b></p>										

### **1.1.2. Consumo de drogas de abuso durante la gestación**

Los datos sobre prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo, proceden principalmente de América del Norte (Bar-Oz y cols., 2003; Birchfield y cols., 1995; Gillogley y cols., 1990; Ostrea y cols., 1992), donde las tasas estimadas de recién nacidos expuestos prenatalmente a drogas de abuso oscilan entre el 6 y el 40% de los recién nacidos vivos. Según la SAMHSA se ha visto un consumo de drogas de un 4,4% en el último mes en embarazadas de entre 15-44 años (SAMHSA, 2010).

Existen muy pocos datos sobre la prevalencia del consumo de drogas de abuso durante el embarazo en la Unión Europea. En el Reino Unido, se han realizado algunos estudios de prevalencia de consumo de drogas en embarazadas (Bosio y cols., 1997; Farkas y cols., 1995; Sanaullah y cols., 2006; Sherwood y cols., 1999). En tres de ellos se determinó mediante presencia de drogas de abuso en orina o mediante entrevista materna, encontrándose una prevalencia entre el 10,6 y el 16,7% (Farkas y cols., 1995; Sanaullah y cols., 2006; Sherwood y cols., 1999). En el último, se determinó la prevalencia de COC mediante análisis de meconio, revelando una exposición prenatal a COC de un 2,75% (Bosio y cols., 1997). En el mismo periodo, en Italia se realizó un estudio empleando vello púbico materno como matriz para la evaluación de la exposición prenatal (Chiarotti y cols., 1996), se determinó una prevalencia de consumo materno del 1,9%.

En España, a parte de los datos publicados por el OED basados en entrevistas telefónicas a mujeres en edad fértil (14 a 35 años), sólo tres estudios han sido realizados acerca de la prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo (García-Algar y cols., 2009; Martínez Crespo y cols., 1994; Pichini y cols., 2005b).

A mediados de los años noventa, Martínez Crespo y colaboradores, reflejaron la prevalencia del consumo de COC en una población de mujeres embarazadas reclutadas en el Hospital Clínic de Barcelona. Dicho estudio incluyó a 1.773 mujeres a las cuales se les evaluó a través de cuestionario y se les realizó un cribado para las principales drogas de abuso en orina. Mediante cuestionario se

estimó una prevalencia del 7,6% para el consumo de cualquier droga de abuso, mientras que mediante el cribado en orina, se alcanzó un dato similar, un 7,7% (Martínez Crespo y cols., 1994).

Los otros dos estudios fueron realizados también en Barcelona y pertenecen al denominado "Proyecto Meconio". Los estudios fueron realizados por el grupo del Servicio de Pediatría del Hospital del Mar entre octubre de 2002 y febrero de 2004, incluyendo a 1.209 parejas de madre-RN, basándose en la determinación de sustancias de abuso en meconio donde se encontró un 10,9% de positividad a drogas de abuso: 5,3% a cannabis, 4,7% a opiáceos, 2,6% a COC y 0,1% a MDMA con un 1,5% de policonsumo, estas cifras fueron superiores a las declaradas por las madres a través de cuestionario (García-Algar y cols., 2009; Pichini y cols., 2005b). Este grupo también ha publicado otro dato alarmante, que un 45% de las gestantes atendidas en este hospital habían consumido alcohol por encima de un nivel considerado moderado (García-Algar y cols., 2008) y el 22% de las mujeres eran fumadoras activas (datos no publicados). Otros datos de un estudio publicado recientemente encuentran que la prevalencia del consumo durante la gestación en Ibiza es de 15,9% principalmente cannabis y COC, determinado mediante análisis de pelo materno (Friguls B y cols., 2012; García-Serra y cols., 2012).

### **1.1.3. Consecuencias del consumo de drogas durante el embarazo**

Los efectos del consumo de sustancias de abuso sobre el embarazo son variados, no solo relacionados con el efecto de la propia sustancia consumida sino también debido al tipo de vida de estas mujeres.

La exposición prenatal a estas sustancias aumenta el riesgo de complicaciones obstétricas y tiene graves consecuencias, no solo en el desarrollo del feto, sino también del niño durante las etapas posteriores de la vida (Behnke y Eyler, 1993; Bennet y cols., 2002; Huestis y cols., 2002; Linares y cols. 2006; Mayers y cols., 1998; Messiah y cols., 2011; Shankaran y cols., 2003).

El consumo de sustancia de abuso se ha visto relacionado con una disminución de las visitas y controles prenatales, una malnutrición



materna, un aumento del número de abortos así como un aumento de la incidencia de infecciones como pueden ser la infección por VHB o VHC, VIH y otras enfermedades de transmisión sexual (Anonymous, 1993; Chasnoff y cols., 1985; Chasnoff y cols., 1987; Ellis y cols., 1993; Kain y cols., 1993; Kuczkowski y cols., 2007; Levy y cols., 1990; Shankaran et al., 2007; Sokol y cols., 1980; Thaithumyanon y cols., 2005; Vucinovic y cols., 2008). Otras anomalías que se han descrito más frecuentemente en embarazos en que ha habido un consumo de sustancias de abuso son: presencia de líquido meconial y aparición de amnionitis asociados con el consumo de alcohol (Anonymous, 1993; Baldwin y cols., 1982; Sokol y cols., 1980), rotura prematura de membranas en consumidoras de tabaco y COC y placenta previa con el tabaco (Jauniaux y cols., 2007; Levy y cols., 1990). Todos estos hechos podrían explicar el aumento de la prematuridad que se ha descrito en estos embarazos.

El consumo prenatal de COC se ha asociado con desprendimiento de placenta y parto prematuro, además de una disminución de parámetros somatométricos y microcefalia (Addis y cols., 2001; Cambell y cols., 2003; Chasnoff y cols., 1985; Chasnoff y cols., 1986; Chasnoff y cols., 1989; Dombrowski y cols., 1991; Ellis y cols., 1993; Hulse y cols., 1997; Kain y cols., 1993; Levy y cols., 1990; Schempf y cols., 2007; Shankaran y cols., 2007). Existen muchas controversias en relación a las anomalías congénitas y la COC, su consumo se ha relacionado con diversas anomalías a nivel genitourinario (las más consistentes), cardíaco, de extremidades y del sistema nervioso (Aguilera y cols., 2005; Kain y cols., 1993; Levy y cols., 1990; Shankaran y cols., 2007). Aun así, ni revisiones sistemáticas ni metanálisis han podido confirmar que la exposición prenatal a COC por sí sola aumente el riesgo de malformaciones congénitas. Tampoco se ha observado una clara asociación entre COC y el síndrome de muerte súbita del lactante o el riesgo de enterocolitis necrotizante (Kain y cols., 1993; Woods, 1996). En lo que sí están de acuerdo algunos estudios es en que la exposición prenatal a COC tiene un efecto negativo en el desarrollo neurológico, intelectual y emocional del niño debido al efecto de la COC sobre el sistema monoaminérgico (Mayes y cols., 1998; Bennett y cols., 2002. Linares y cols., 2006; Accornero y cols., 2002)

El consumo de cannabis durante la gestación se ha relacionado con falta de atención, impulsividad y deficiencia de atención y de memoria en los hijos (de Moraes y cols., 2006).

La exposición fetal a opiáceos se ha asociado principalmente con síndrome de abstinencia neonatal (Shankaran et al., 2007, Winklbaur y cols., 2008) y complicaciones obstétricas, así como alteraciones de parámetros somatométricos, principalmente del peso (Baldwin y cols., 1982; Levy y cols., 1990; Shankaran y cols., 2007).

Los efectos adversos del etanol en el embarazo quedan incluidos en el término general de Trastorno del Espectro Alcohólico Fetal (FASD), que incluye una serie de alteraciones físicas, conductuales y cognitivas (Sokol y cols., 2003), y pueden ir desde alteraciones leves a grados más graves. Es considerada una de las sustancias más teratogénicas. En la literatura se ha descrito que los neonatos presentan más riesgo de asfixia y puntuaciones más bajas de Apgar al nacimiento (Sokol y cols., 1980).

El consumo de tabaco durante la gestación dobla prácticamente el riesgo de la mujer de tener un recién nacido con bajo peso al nacer e incrementa el riesgo de parto pretérmino (Andres y cols., 2000). Algunos estudios también han detectado una posible asociación entre madres fumadoras y algunas anomalías como craneosinostosis, pie equino-varo, gastrosquisis, anomalías cardíacas o del tracto urinario, junto con un aumento de leucemia (Aguilera y cols., 2005).

## **1.2. Distribución de las drogas de abuso en humanos**

Para producir sus efectos característicos, las sustancias de abuso deben estar presentes en unas determinadas concentraciones en su(s) centro(s) de acción. Aunque este hecho depende en gran medida de la droga administrada, las concentraciones de las sustancias de abuso dependen del ciclo de ADME de dicha sustancia en el organismo: que abarca la absorción de la sustancia, la distribución en diferentes matrices y/o fluidos, la biotransformación y la excreción (figura 1) (Rowland y cols., 1989).

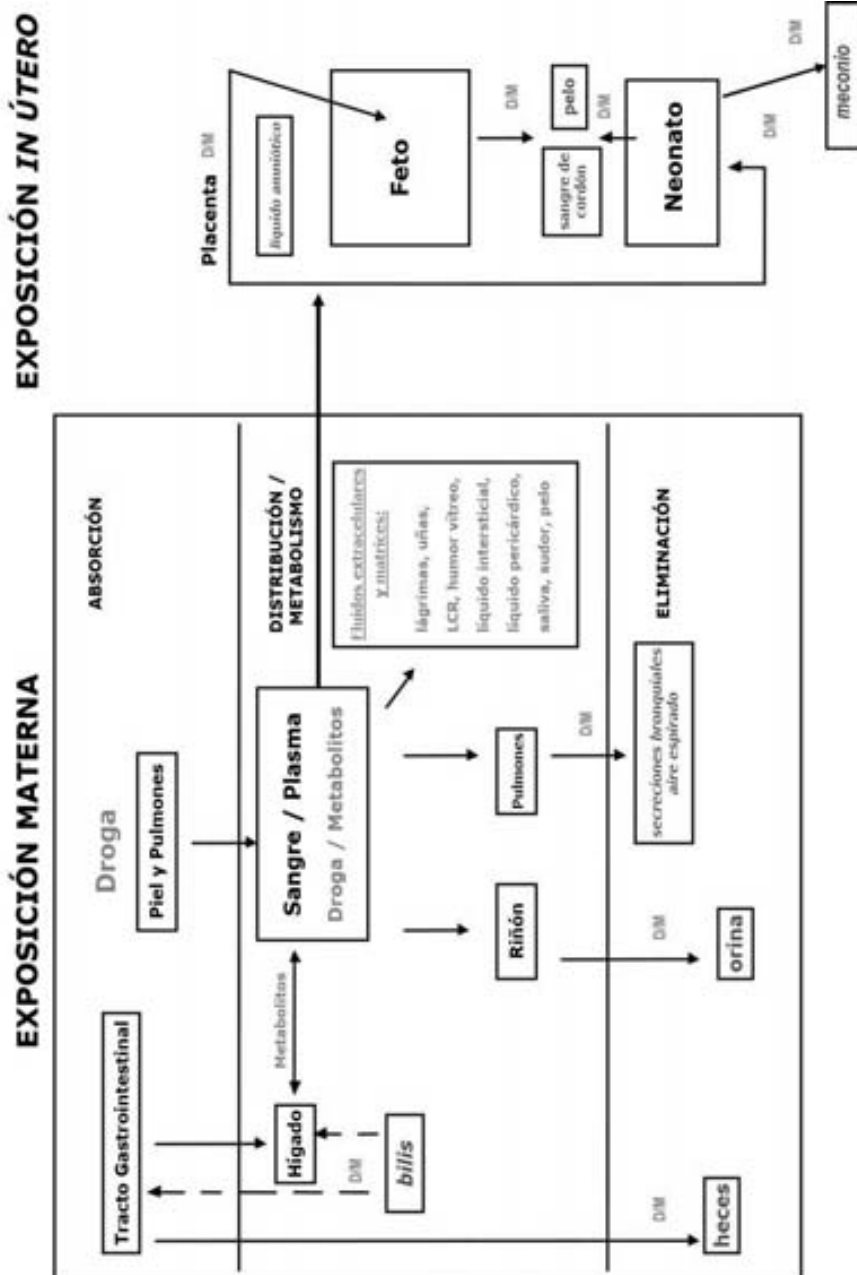
Desde la década de los 80, la eventual presencia y disposición de una sustancia de abuso en el organismo y su correlación con los efectos clínicos ha sido evaluada mediante el análisis de plasma u orina, ya que no era posible o conveniente (por dificultad o invasividad) tomar muestras de diferentes matrices o fluidos biológicos. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, la determinación de sustancias de abuso en fluidos y matrices biológicas diferentes a la sangre y la orina ("matrices no convencionales") han ido ganando importancia (Pichini y cols., 1996). Por un lado, la no invasividad en la recogida de muestras, el empleo de nuevos dispositivos dedicados a su recogida, diferentes posibilidades en los procedimientos de extracción y la disposición de nuevos métodos analíticos, han hecho posible la medición de cantidades ínfimas de sustancias extraídas de matrices biológicas complejas. Por otro lado, la determinación de sustancias de abuso y sus metabolitos en matrices biológicas no convencionales parece ser útil para tener la posibilidad de poder calcular los parámetros farmacocinéticos en el órgano diana y para la aplicación de la información obtenida en la toxicología forense y clínica.

Podemos clasificar las matrices biológicas según su aplicabilidad. Matrices como el humor vítreo y/o el líquido pericárdico son habitualmente recogidas con una finalidad forense (Contreras y cols., 2006; Drummer, 2004). En cambio, el pelo o las uñas proporcionan información acerca de la ingesta de sustancias de abuso en el pasado en relación a semanas hasta años y por lo tanto pueden ser utilizados en casos forenses (con la finalidad de buscar una causa de la muerte) o en casos clínicos (buscando la causa de

un efecto clínico crónico) (Palmeri y cols., 2000; Kintz y cols., 2006). Otras como el sudor y la saliva nos ofrecen información acerca de un consumo reciente y esta información puede ser asociada a unos efectos agudos (Pichini y cols., 2002; Shor y cols., 2010).

Algunos de estos fluidos y/o matrices pueden estar relacionadas con el período de gestación y también pueden ser útiles con el fin de aportar información toxicológica de la etapa intrauterina del recién nacido: como la presencia de drogas en sangre de cordón umbilical así como en el líquido amniótico, el pelo fetal, la placenta o el meconio.

Como muestra la tabla 2, por sus características (aplicabilidad en toxicología clínica y forense, baja invasividad y capacidad de recolección de las muestras) las matrices biológicas como el meconio y el pelo se han postulado como útiles para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante diferentes etapas de la vida, como la gestación.



**Figura 1.** Esquema de la distribución de las drogas en el cuerpo humano. Relación entre la exposición materno-fetal a drogas de abuso. Droga/Metabolito (D/M). Líquido cefalorraquídeo (LCR).

Tabla 2. Adecuación de las matrices no convencionales en toxicología clínica y forense.

Fluido/Matriz	Farmacología clínica	Toxicología Forense	Toxicología Clínica	Correlación con niveles plasmáticos	Correlación con efectos farmacológicos / toxicológicos	Invasividad	Dificultad de procesamiento
Plasma	+++	+	+++	+++	+++	++	+/-
Orina	+	+	+++	+/-	+++	+	-
Lágrimas	+/-	-	-	-	-	+	-
Uñas	+/-	++	-	-	-	-	+/-
LCR	++	-	-	+	++	+++	++
Secreciones bronquiales	+	-	+	-	++	-	-
Fluido intersticial	+	-	+	++	+	+++	++
Fluido seminal	+	-	++	+/-	++	-	++
Bilis	+/-	+	-	+/-	-	-	-
Heces	+/-	-	-	-	-	-	+
Meconio	-	+	+	-	++	-	+
Sangre cordón umbilical	-	-	++	++	++	+	+/-
Líquido amniótico	-	+	+	+/-	++	+++	+++
Leche materna	+	-	++	+	++	-	++
Humor vítreo	-	+++	-	+/-	+	+++	++
Fluido pericardio	-	+++	+	+/-	++	+++	+++
Saliva	+++	+	+++	++	+++	-	-
Sudor	++	+	++	+/-	+++	-	+/-
Pelo	++	+++	+	+/-	++	-	-

### **1.2.1. Principios farmacocinéticos en el embarazo**

Los cambios farmacocinéticos durante el embarazo deben considerarse en el contexto de una unidad integrada de múltiples compartimentos: madre – placenta – membranas extra-amnióticas – líquido amniótico – feto. Cada uno tiene funciones propias, con características genéticas o celulares y controles diferentes (Villanueva y Valenzuela, 1998).

Las fisiologías materna y fetal pueden ejercer una influencia compleja sobre la biodisponibilidad de una droga y, por lo tanto, sobre su respuesta en el organismo (Villanueva y Valenzuela, 1998).

Cuando se utiliza la vía intravenosa para el consumo de drogas, la concentración en el plasma fetal se incrementa debido a que se establece un gradiente materno-fetal con tendencia al equilibrio, momento que coincide con el pico de la concentración fetal. Conforme la droga se depura del plasma materno, el gradiente de difusión se revierte y la concentración fetal declina. Así, los niveles fetales de una droga dependen no sólo de la transferencia placentaria, sino también de la velocidad de eliminación materna de la droga. Si la velocidad de transferencia placentaria es más lenta con relación a la velocidad en la que la droga se elimina de la madre, entonces las concentraciones de la droga no alcanzarán niveles altos en el feto (Villanueva y Valenzuela, 1998).

La velocidad y extensión de la distribución de la droga al feto puede modificarse según la vía de administración empleada, siendo menor la exposición con la vía intramuscular en relación a la vía intravenosa (Villanueva y Valenzuela, 1998).

Cuando el consumo de una droga es repetido, la concentración de la droga alcanza un estado estable tanto en la madre como en el feto. De aquí que bajo condiciones de estado estable o estacionario, además de la permeabilidad placentaria y la eliminación materna de drogas sea importante considerar la unión a proteínas y la eliminación fetal de la droga (Szeto, 1995).

El feto es un sitio de localización o fijación, metabolismo y excreción seleccionado. Además de un sitio para la acción de una sustancia

química, puede constituir un depósito (Villanueva y Valenzuela, 1998).

Se debe considerar la posibilidad de que la droga y sus metabolitos se excreten por el riñón fetal y, por tanto, recirculen del feto a la orina y de ésta al líquido amniótico, a la vía gastrointestinal o piel fetal (el feto humano produce de 15 a 20 ml/h de orina y deglute de 5 a 7 ml/h de líquido amniótico). En consecuencia, el líquido amniótico puede funcionar como un reservorio, especialmente para metabolitos polares (Fabro y Scialli, 1986). Para drogas liposolubles, la velocidad de eliminación de la droga está determinada por las características de eliminación materna, lo cual sugiere que la depuración placentaria es la vía predominante de eliminación fetal de drogas liposolubles (Villanueva y Valenzuela, 1998).

Por otra parte, se ha demostrado que la placenta tiene la capacidad de metabolizar drogas a compuestos más activos o tóxicos; también puede actuar como un depósito. Por tanto es posible que la placenta module la eliminación de la droga produciendo metabolitos y reteniendo grandes cantidades para su liberación de regreso al feto. No se puede suponer que todas las drogas se transferirán rápidamente a la madre; más bien, es posible que estos agentes se distribuyan de preferencia a los órganos fetales, por ejemplo el encéfalo, en base a su liposolubilidad y fijación específica en sitios receptores fetales. Muchos receptores en el sistema nervioso central y otros órganos fetales aparecen tempranamente durante el desarrollo.

#### **1.2.1.1. Compartimento materno**

Durante el embarazo la absorción de las drogas consumidas por vía oral se modificará debido a la combinación tanto del retraso en el vaciado gástrico como de la disminución de la motilidad intestinal. La consecuencia de un vaciamiento gástrico más lento puede ser una reducción en el ritmo de absorción de la droga, en relación con el retardo en el ingreso al intestino delgado. El paso más lento a través del intestino delgado puede, sin embargo aumentar la absorción de ciertas drogas (Brody y cols., 1993). La absorción en sitios diferentes al tracto gastrointestinal también puede afectarse; por ejemplo, la absorción pulmonar se incrementa como resultado



de un incremento en la superficie y en el flujo sanguíneo (Gleicher, 1989).

El volumen aparente de distribución de varias drogas se incrementa durante el embarazo conforme se expande el volumen plasmático, aproximadamente un 40 – 50 %, desde el inicio de la gestación hasta alcanzar su punto máximo a las 32 semanas. Se presentan cambios concomitantes en el gasto cardíaco y en la tasa de filtración glomerular. La expansión del volumen aparente de distribución junto con un incremento en la depuración renal lleva a una disminución en la concentración materna circulante de la droga. El flujo sanguíneo hepático permanece constante, de modo que el porcentaje del gasto cardíaco total destinado al hígado disminuye, con lo que puede reducirse el metabolismo de primer paso hepático de algunas drogas, lo que puede provocar una elevación en su concentración plasmática. La colestasis se desarrolla frecuentemente durante el embarazo y puede causar una disminución en la depuración de fármacos que sufren excreción biliar (Gleicher, 1989).

### **1.2.1.2. Compartimento placentario**

Durante mucho tiempo se habló de la barrera placentaria como un mecanismo de defensa que preservaría la integridad del ser en desarrollo frente a agresiones químicas que pudieran llegar a través de la sangre materna. Actualmente se sabe que la barrera placentaria no existe, y que la mayoría de las sustancias químicas pueden atravesar la placenta y llegar al embrión o feto.

En general, compuestos con peso molecular superior o igual a 1.000 Da no cruzan rápidamente la placenta, mientras que aquellos con peso molecular igual o inferior a 600 Da sí lo hacen. La mayoría de los fármacos y drogas de abuso están entre los 250 y 400 Da, y por tanto, cruzan fácilmente la placenta. El pH de la sangre fetal es relativamente ácido en comparación con el de la sangre materna, por eso las drogas básicas tienden a alcanzar mayores concentraciones en sangre fetal. Diversos estudios han puesto de manifiesto que drogas como la COC, cannabis y heroína, entre otras, pueden atravesar la barrera placentaria (Behnke y Eyller, 1993). Las sustancias químicas pueden incluso actuar como

teratógenos afectando directamente a la función de la placenta, e impidiendo el aporte de oxígeno y nutrientes al feto.

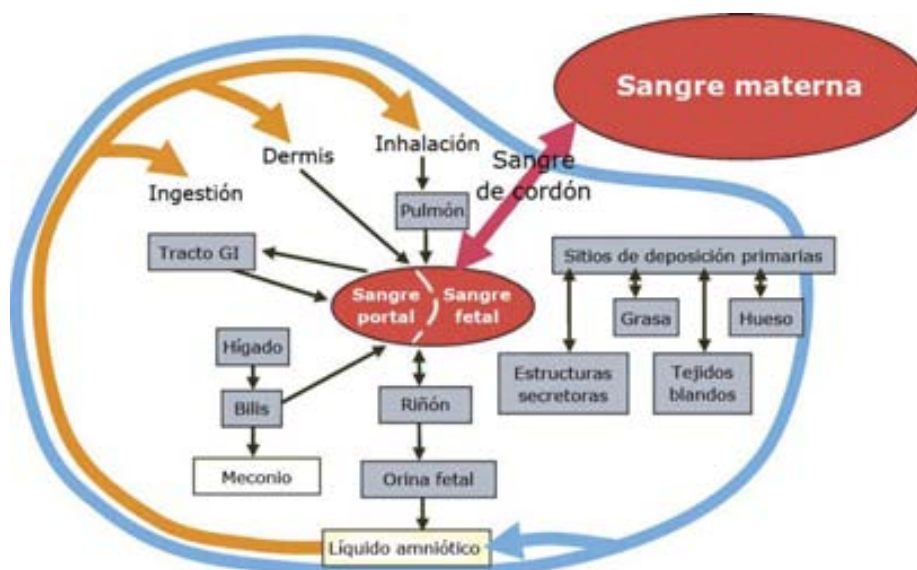
El transporte placentario de sustancias se establece alrededor de la quinta semana de vida embrionaria, pero antes de formarse la placenta cualquier sustancia puede actuar directamente sobre las células embrionarias o sobre los órganos maternos, alterando de forma indirecta el desarrollo fetal (Schuetze y cols., 2007).

A medida que la placenta madura, el espesor del epitelio trofoblástico disminuye y aumenta la superficie de contacto, lo cual conlleva a que se eleve la velocidad de difusión de las sustancias cuando la placenta tiene mayor edad (Simone y cols., 1994). Por otra parte, la eliminación de sustancias psicoactivas en el compartimento fetal se realiza por difusión hacia el compartimento materno, pero muchos metabolitos quedan en la porción fetal hasta que el riñón adquiere capacidad para eliminar las drogas circulantes al líquido amniótico (Schuetze y cols., 2007; Simone y cols., 1994). Esta capacidad de eliminación reducida y la circulación fetal a través de la vena umbilical, que alcanza directamente su corazón y cerebro sin paso previo por el hígado implica una disminución en el metabolismo de las drogas haciendo que el efecto de sustancias psicoactivas en el feto sea mayor (Simone y cols., 1994).

### **1.2.1.3. Compartimento fetal**

Desde la perspectiva de la distribución fetal de la droga es conveniente resaltar que, dado que las drogas que atraviesan la placenta llegan al feto por la sangre venosa umbilical, y de ésta, el 50% entra en la circulación hepática y el resto atraviesa el ducto venoso; entonces, la mitad de la droga transportada es susceptible de metabolismo hepático y la otra mitad ingresa a la circulación fetal directamente (Villanueva y Valenzuela, 1998) (figura 2).

La distribución de una droga en el feto constituye un factor determinante en el grado de exposición fetal y es en gran parte regulado por variaciones en el pH y en la unión a proteínas (Villanueva y Valenzuela, 1998).



**Figura 2.** Circulación de las sustancias de abuso en el compartimento fetal.

Al inicio del embarazo, el pH intracelular en el feto es mayor que en la madre, lo cual resulta en el secuestro de ácidos débiles y en la acumulación potencial de drogas ácidas en los tejidos fetales. Conforme avanza la edad gestacional, el pH intracelular fetal se hace más ácido, con el potencial atrapamiento de bases débiles. Durante el embarazo también pueden ocurrir variaciones en la unión a proteínas fetales (Green y cols., 1979). La concentración de la glicoproteína ácida- $\alpha_1$ , la cual une drogas lipofílicas ácidas, disminuye en el feto en relación con la madre a lo largo del embarazo, siendo insignificante a las 16 semanas de gestación y correspondiendo a un tercio de la concentración materna al momento del parto. La albúmina, la cual se une a drogas ácidas lipofílicas, está presente desde las semanas 12-15 de gestación, no obstante las concentraciones maternas superan en 3-4 veces las fetales. Sin embargo, conforme transcurre el embarazo, las concentraciones fetales de albúmina se incrementan en comparación con las maternas y a término son aproximadamente 20% mayores que las concentraciones maternas (Krauer y cols., 1984).

Los sistemas enzimáticos fetales destinados a la biotransformación se forman desde las semanas 5-8 de gestación y su actividad se incrementa hasta las semanas 12-14, cuando alcanza alrededor del 30% de la actividad del adulto. No es sino hasta el primer año de vida postnatal, que el sistema enzimático hepático se puede comparar con el del adulto (Pelkonen, 1980). El primer sistema que se expresa es el citocromo P450 que es más activo en la glándula adrenal fetal que en el hígado y también está presente en el riñón e intestino. Las monooxigenasas están compuestas de un conjunto de formas inducibles y puede dividirse en dos grupos principales de acuerdo a las sustancias que inducen su actividad: fenobarbital o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Dvorchik y cols., 1986).

Los fetos humanos generalmente tienen bien desarrollada la actividad enzimática de conjugación, excepto por la glucuronidación, la cual continúa baja hasta poco después del nacimiento a término (Burchell y cols., 1989). El metabolismo fetal puede generar intermediarios tóxicos indicando la participación del feto y de su estructura genética como factores en la susceptibilidad al desarrollo de toxicidad.

La presencia de drogas en los líquidos fetales y amniótico procede de su paso a través de la orina, la cual se excreta dentro del líquido amniótico o sacos alantoicos, por transferencia a través de la piel fetal o por transporte directo desde la madre a las membranas corioalantoicas (Rudolph, 1995).

### **1.3. Matrices biológicas alternativas**

En muchas ocasiones la sospecha clínica de consumo de tóxicos por parte de la embarazada, ya sea por síntomas maternos o del recién nacido, resulta eficaz pero no suficiente para su diagnóstico. Son necesarias herramientas suficientemente sensibles y específicas para detectar la droga o drogas consumidas durante el embarazo y así asegurar una correcta actuación médica tanto en la madre como en el recién nacido, que en algunos casos pueden tener consecuencias legales importantes.

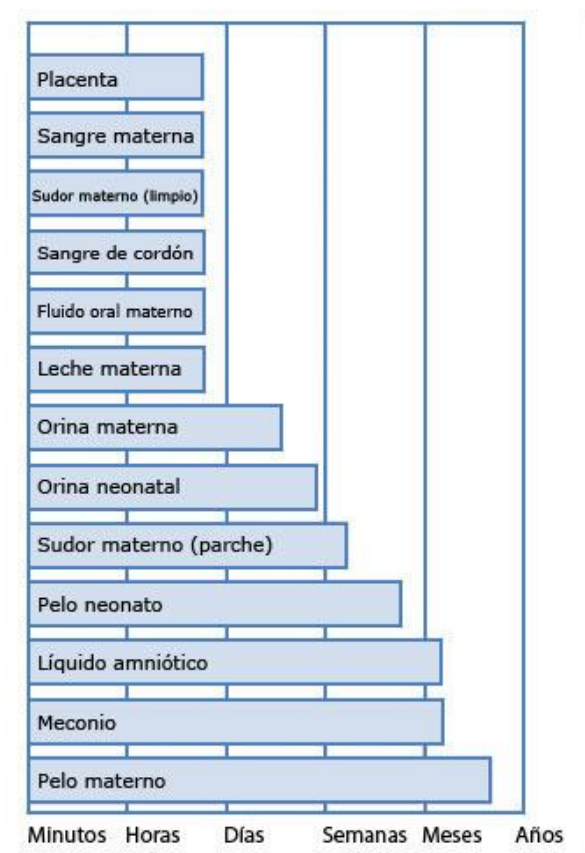
Los diferentes trabajos sobre detección de drogas de abuso en el embarazo coinciden en que existe una infradeclaración del consumo por las gestantes (García-Algar y cols., 2009; Manich y cols., 2011, Russell y cols., 1996), por lo que, durante el embarazo es difícil obtener una información exacta sobre el consumo de sustancias de abuso mediante cuestionarios. La sinceridad de las madres está influenciada negativamente por una serie de factores, entre los cuales destacan el miedo a repercusiones legales, el sentimiento de culpa, sesgos de memoria o la falta de confianza hacia el personal (Bessa y cols., 2010; Eyler y cols., 2005; García-Algar y cols., 2009; Lester y cols., 2001). La entrevista materna tiene como inconveniente una baja sensibilidad y la necesidad de mucho tiempo para implementarla. En el caso de las drogas de abuso más comunes (opiáceos, COC y otros) la entrevista sólo tiene una sensibilidad inferior al 70% con un elevado porcentaje de falsos negativos aunque no suelen existir falsos positivos.

Se necesitan métodos basados en biomarcadores que nos permitan detectar la exposición intraútero a sustancias de abuso. Idealmente este marcador debería estar presente en una matriz biológica, que existiera durante todo el embarazo o la mayor parte de éste, que acumulara estas sustancias durante todo el embarazo y de la cual se pudiera disponer de forma mínimamente invasiva tras el nacimiento.

Tradicionalmente los estudios para determinar la exposición fetal a tóxicos utilizaban matrices clásicas como la orina o la sangre, tanto materna como del recién nacido, pero la limitación principal de estas matrices es que sólo nos informan del consumo de sustancias

en las últimas horas o días de la gestación. La orina, utilizada de forma habitual como método de cribado, sólo detecta la exposición durante 1-4 días previos al parto (Eyler y cols., 2005; Huestis y Choo, 2008; Lozano y cols., 2007b).

En los últimos años, se están utilizando matrices biológicas alternativas procedentes del feto o recién nacido (meconio, pelo neonatal u orina neonatal), de la mujer embarazada o la madre lactante (sangre, orina, pelo, leche materna, fluido oral o sudor) o de ambos (placenta o líquido amniótico) para detectar la exposición a sustancias de abuso.



**Figura 3.** Ventana de detección en el tiempo para diferentes matrices neonatales, maternas y fetales válidas para el asesoramiento de la exposición intrauterina a sustancias de abuso.

Cada una de estas matrices tiene unas características diferentes (concentración de las sustancias y sus metabolitos, ventanas de detección, cantidad de muestra disponible, etc.) lo que hace que tengan diferentes utilidades (figura 3, tabla 2).

La elección de la matriz apropiada en la que llevar a cabo el análisis toxicológico dependerá de numerosos factores relacionados con los objetivos del análisis y la disponibilidad de las muestras, la sensibilidad analítica, la invasividad de la técnica o la ventana de detección. Las distintas ventajas e inconvenientes de las principales matrices de exposición a drogas de abuso se relacionan a continuación.

### **1.3.1. Sangre de cordón y líquido amniótico**

Los fármacos administrados y las sustancias de abuso consumidas por mujeres embarazadas tienen la posibilidad de atravesar la placenta y llegar al feto (Pacifci y Nottoli, 1995). Sin embargo, la recogida tanto de líquido amniótico como de sangre del feto son métodos suficientemente invasivos e incluso nocivos para el feto, por lo que estas matrices son poco atractivas para su uso en estudios clínicos. Al igual que la sangre, la determinación de fármacos, sustancias de abuso y sus metabolitos en sangre de cordón umbilical sólo aportan información acerca de las horas previas antes de la recogida y por lo tanto no permite evaluar la exposición crónica durante la gestación. En sangre de cordón se han hallado sustancias de abuso y sus metabolitos en un rango de concentraciones que varía desde los ng hasta los mg/ml de sangre (Dempsey y cols., 1998; Moore y cols., 1993; Pichini y cols., 2003; Winecker y cols., 1997).

La mayoría de los estudios que han utilizado la sangre de cordón como matriz para evaluar la presencia de sustancias de abuso han mostrado sus limitaciones en cuanto a su capacidad de predecir la exposición prenatal. Sin embargo, en el caso del tabaco, la determinación de COT en sangre de cordón parece ser el biomarcador más adecuado para determinar la exposición fetal a humo de tabaco, por delante de la orina neonatal y la orina materna (Pichini y cols., 2000; Tappin y cols., 1995). Un estudio reciente ha propuesto el tejido de cordón umbilical, en lugar de la sangre de cordón, como alternativa al uso de meconio para evaluar la

exposición prenatal a sustancias de abuso (Montgomery y cols., 2006).

Por otra parte, el líquido amniótico empieza a formarse en las primeras semanas de embarazo, por lo que la presencia de sustancias de abuso en este fluido puede informar acerca de la exposición durante las primeras fases del embarazo (Eyler y cols., 2005; Jain y cols., 1993; Pacifici y Nottoli, 1995; Ripple y cols., 1992; Winecker y cols., 1997). La recogida de líquido amniótico es peligrosa para el feto, pero puede llevarse a cabo en cualquier momento del embarazo. Se han identificado en líquido amniótico sustancias de abuso y sus metabolitos con concentraciones en el rango de ng/ml.

### **1.3.2. Placenta**

La placenta es el órgano que sirve de vínculo entre la mujer embarazada y el feto, interviniendo activamente en el paso de sustancias a través de la circulación materno-fetal. Su formación está completa a las 4 semanas de gestación, pero sufre cambios morfológicos durante todo el embarazo. Esta matriz es atravesada con facilidad por sustancias liposolubles, como son la mayoría de las sustancias de abuso.

Este tejido, fuente de la circulación fetoplacentaria, constituye una interfase entre la sangre fetal y la sangre materna y actúa como intercambiador de nutrientes y residuos entre el embrión o el feto y la madre.

Dado que el funcionamiento normal de la placenta es una necesidad absoluta para un óptimo crecimiento y desarrollo del feto, la afectación de las funciones de la placenta por parte de sustancias de abuso compromete el crecimiento y desarrollo del feto.

El carácter dinámico de la placenta, su vascularización y las enzimas presentes en las distintas etapas del embarazo juegan un papel fundamental en los mecanismos involucrados en la exposición intrauterina a sustancias de abuso, como han expuesto Vähäkangas y Myllynen (Vähäkangas y Myllynen, 2006).



La estructura y funciones de la placenta humana y su papel como barrera en la circulación materno-fetal siguen ofreciendo resultados contradictorios y poco concluyentes a la hora de atribuir a una sustancia y etapa del embarazo concreta los efectos manifestados en los recién nacidos expuestos a drogas durante el embarazo. En cualquier caso, la placenta no es simplemente un espectador inactivo en los efectos provocados por las drogas en el feto en desarrollo, sino que actúa como un objetivo directo de estas sustancias, lo que compromete las funciones esenciales de este órgano.

El uso de la placenta como matriz para la detección de exposición de tóxicos se encuentra actualmente en investigación y no se utiliza habitualmente en la práctica clínica. Existen numerosas investigaciones acerca de la estructura y las funciones de la placenta humana como barrera en la circulación materno-fetal, pero la complejidad de los mecanismos de transferencia y de los distintos factores que influyen en su desarrollo sigue siendo objeto de estudio.

Durante mucho tiempo se habló de la barrera placentaria como un mecanismo de defensa que preservaría la integridad del ser en desarrollo frente a las agresiones químicas que le pudieran llegar a través de la sangre materna. Actualmente se sabe que la mayoría de las sustancias químicas pueden atravesar la placenta y llegar al embrión y al feto (Olsen, 1995). Sin embargo, algunos metabolitos sí pueden quedar retenidos en dicho tejido y se pueden determinar como biomarcadores. Por ejemplo, los FAEEs procedentes del alcohol etílico consumido por la mujer durante el embarazo no se traspasan al feto, sino que son recaptados y degradados por la placenta humana. Así pues, los FAEEs detectados en el recién nacido provienen de forma exclusiva del metabolismo del neonato formados a partir del etanol que ha sido transferido desde la madre (Chan y cols., 2004). Además, las sustancias de abuso también pueden afectar a los sistemas de transporte de nutrientes en la placenta y pueden modificar su fisiología (Sastry, 1991).

Algunas investigaciones recientes (Concheiro y cols., 2010; de Castro y cols., 2011; Falcon y cols., 2012; Joya y cols., 2010) han estudiado la presencia de biomarcadores de exposición a sustancias

de abuso en la placenta con el fin de poner a prueba la capacidad de detectar la exposición intrauterina a dichas sustancias puesto que hay gran cantidad de muestra y su recolección no es invasiva si se toma durante el parto, pero aún no se conoce la ventana de detección de las distintas drogas de abuso en esta matriz.

Dichos estudios han cuantificado estos niveles en placenta obtenida en el momento del parto procedentes de madres consumidoras (Concheiro-Guisan y cols., 2009; Concheiro y cols., 2010; de Castro y cols., 2009; de Castro y cols., 2011) y en tejido placentario y restos fetales obtenidos como material de descarte en interrupciones voluntarias del embarazo (Falcon y cols., 2012; Joya y cols., 2010).

### **1.3.3. Meconio**

El meconio constituye la primera materia fecal del recién nacido y contiene información acerca de su metabolismo prenatal. Consta del material digerido por el feto en su etapa intrauterina: está formado por células del epitelio intestinal, mucopolisacáridos, líquido amniótico, sales biliares, lípidos y agua (Ostrea y cols., 1994b).

El meconio es una de las matrices alternativas con más ventajas; 1) informa sobre los tóxicos a los cuales ha estado expuesto el feto, no sólo del consumo materno, 2) presenta una ventana de detección bastante larga, ya que nos informa de las sustancias que han llegado al feto durante los dos últimos trimestres del embarazo, 3) la recogida de la muestra es simple, nada invasiva y se puede obtener en cantidad suficiente durante los 4-5 primeros días después del nacimiento y 4) las sustancias/metabolitos aparecen en el meconio acumuladas en altas concentraciones, lo que facilita su detección.

Se acepta generalmente que el meconio empieza a formarse a partir de la semana 12<sup>a</sup> de gestación, porque es en este momento cuando empieza la deglución del líquido amniótico (Gareri y cols., 2006) y continúa durante toda la gestación. Por lo general, el meconio se acumula en el intestino del feto hasta el nacimiento. De tal forma, que el meconio actúa como reservorio de las sustancias de abuso y sus metabolitos, que originalmente llegan a la sangre fetal, se metabolizan, pasan al líquido amniótico con la orina fetal y

son digeridas. Además, las concentraciones de sustancias de abuso en meconio habitualmente son más elevadas que las halladas en orina a causa de la acumulación a lo largo de varios meses de gestación (Bar-Oz y cols., 2003). De esta forma, el análisis de meconio permite la detección del consumo activo o de la exposición pasiva de sustancias de abuso por la madre durante las últimas 20 semanas de gestación, y por lo tanto, aporta información acerca de la exposición fetal crónica a las mismas (Koren y cols., 2002; Lester y cols., 2001; Levy y Koren, 1990; Gray, 2009).

En la misma línea, el análisis de drogas en meconio aporta mucha más información respecto a la exposición crónica a sustancias de abuso en contraposición con el análisis de orina neonatal, el suero de sangre de cordón umbilical o el pelo neonatal, que informa de la exposición reciente (Ostrea y cols., 2008). Las sustancias de abuso en meconio están presentes en el rango de ng a µg por gramo de meconio. El meconio es una matriz no homogénea y compleja con lo que la recuperación de sustancias de abuso depende en buena medida de la técnica de extracción escogida. Se recomienda la congelación inmediata de la muestra de meconio momentos después de la recogida con el fin de no degradar la eventual presencia de drogas en dicha matriz. Habitualmente, las sustancias en meconio se mantienen estables a una temperatura de -20°C durante un período prolongado en el tiempo (Pichini y cols., 2004) (tabla 3).

El meconio es especialmente útil en la evaluación de la exposición *in utero* a sustancias de abuso (Pichini y cols., 2004). Los primeros estudios realizados en meconio demostraron que las sustancias de abuso y sus metabolitos principales están presentes en dicha matriz. Sin embargo, mediante investigaciones posteriores realizadas con metodologías más sensibles y específicas se ha demostrado que los metabolitos principales de las sustancias de abuso suelen hallarse de forma predominante o incluso en muchos casos de forma única en meconio. Por ejemplo, en el caso de la COC, se detectan los metabolitos m- y p-OH-BE en detrimento de la sustancia madre (Pichini y cols., 2005a) y en el caso del cannabis, se obtiene principalmente THC-OH (ElSohly y Feng y cols., 1998).

**Tabla 3.** Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas usadas para la detección de las principales sustancias de abuso durante el embarazo en muestras de meconio.

Droga	Rango de concentración (µg/g)	Método de extracción	Método de detección	LOD/LOQ (ng/mg)	Referencia
<b>Cocaína</b>	COC: 0,1-0,78	SPE	HPLC/GC/MS	ND	(Browne y cols., 1992)
	COC: 0,24-0,78 NCOC: 0,1-0,56	SPE	HPLC/GC/MS	ND	(Browne y cols., 1994)
	BE: 0,04-1,9	SPE	FPIA/GC/MS	Cut-off: 0,1 µg/mL	(Rosengreny cols., 1993)
<b>Opiáceos</b>	6-MAM: 0-0,142 MOR: 0-0,397 COD: 0-0,048 M3G: 0-0,120 M6G: 0-0,091	SPE	LC/MS	LOD 6-MAM: 0,0003 MOR: 0,0012 COD: 0,0012 M3G: 0,0003 M6G: 0,0012	(Pichini y cols., 2003; Pichini y cols., 2005b)
<b>Metadona</b>	MET: 127-10.222 ng/g EDDP: 153-74.336 ng/g	SPE	FPIA/HPLC	LOD MET: 99 ng/g EDDP: 113 ng/g	(Stolk y cols., 1997)
	MET: 17-1.843 ng/g EDDP: 992-9.851 ng/g	Liq-Liq	FPIA-EMIT/GC/MS	Cut-off: 300 ng/g	(Vinner y cols., 2003b)
<b>Cannabis</b>	THC: 0-7 ng/g THC-OH: 0-929 ng/g diTHC-OH: 0-68,6 ng/g THC-COOH: 0-30,2 ng/g	Liq-Liq	EMIT/GC/MS	LOD THC: 5 ng/g THC-OH: 10 ng/g diTHC-OH: 2, ng/g THC-COOH: 2 ng/g	(ElSohly y cols., 1999)
<b>MDMA</b>	MDMA: 0,012	SPE	LC/MS	0,001/0,004 ng/g	(Pichini y cols., 2004)

6-monoacetilmorfina (6-MAM); benzoilecgonina (BE); cocaína (COC); codeína (COD); beta,11-dihidroxi- 9-tetrahydrocannabinol (di-THC-OH); 2-Etilideno-1,5-Dimetil-3,3-Difenilpirrolidina (EDDP); cromatografía líquida de alta presión (HPLC); inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA); cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS); límite de detección (LOD); límite de cuantificación (LOQ); morfina-3-glucuronido (M3G); morfina-6-glucuronido (M6G); metilendioximetanfetamina (MDMA); metadona (MET); morfina (MOR); norcocaína (NCOC); no disponible (ND); extracción en fase sólida (SPE); tetrahydrocannabinol (THC); ácido carboxílico 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH); 11-hidroxi-Δ9-tetrahydrocannabinol (THC-OH); Ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT); Inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA); cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

Sin embargo, una desventaja del análisis de meconio es la elevada tasa de falsos positivos hallada en los métodos de detección por inmunoensayo. Las técnicas de inmunoensayo diseñadas para el análisis en orina han sido modificadas para su uso en meconio y muchos de estos métodos carecen de una rigurosa validación del proceso analítico y generalmente no existe una posterior confirmación del resultado. Por ejemplo, en el trabajo de Moore y colaboradores de 1995, en 535 muestras positivas por inmunoensayo a metabolitos de THC, COC y opiáceos, tan sólo confirmó mediante GC/MS del 56% a 59% de las muestras (Moore y cols., 1995).

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de cromatografía de gases que utilizando el meconio como matriz permiten la detección de sustancias de abuso con mayor sensibilidad y especificidad, por lo que los resultados obtenidos por inmunoensayo deben ser confirmados por un método más específico como GC/MS, LC/MS o MS/MS. El inconveniente es la complejidad, así como el coste de estas técnicas y el hecho de no estar disponibles en todos los centros. Esto hace que estos análisis no se realicen de forma rutinaria en todos los recién nacidos.

Se ha llevado a cabo la evaluación de la exposición *in utero* a diferentes sustancias de abuso mediante el análisis de meconio. Por ejemplo, para el tabaco se han identificado NIC y sus metabolitos en meconio y se ha hallado diferencias significativas entre las concentraciones de COT de recién nacidos de madres no fumadoras y no expuestas a humo de tabaco, de madres no fumadoras pero sí expuestas y de madres fumadoras (Ostrea y cols., 1994a). Por otra parte, el consumo materno de alcohol durante el embarazo es alarmante en algunas poblaciones (García-Algar y cols., 2008) y en ocasiones produce FASD y los FAEEs han sido propuestos como biomarcadores en meconio (Pichini y cols., 2008; Klein y cols., 2000; Burd, 2008). La suma de las diferentes concentraciones de FAEEs por encima del punto de corte de 2 nmol/g de meconio ha sido propuesta como evidencia de consumo excesivo de alcohol durante el embarazo (Chan y cols., 2003; Moore y cols., 2003). Recientemente se ha descrito la presencia en meconio de EtG, un biomarcador de exposición crónica a etanol ya descrito en otras matrices biológicas (Morini y cols., 2008).

La prevalencia de exposición fetal a sustancias de abuso se ha podido determinar mediante el análisis de meconio en diferentes poblaciones. Recientemente, García-Algar y colaboradores (García-Algar y cols., 2009) han presentado unos resultados de exposición fetal a drogas en una población de bajo nivel económico de Barcelona mostrando un 10,9% de positividad para cualquier droga de abuso (COC, opiáceos, cannabis y AP), confirmando los resultados preliminares (Pichini y cols., 2005b). Además, en la misma población de estudio se ha encontrado una elevada exposición gestacional a alcohol etílico (García-Algar y cols., 2008).

### **1.3.4. Pelo**

El pelo está formado aproximadamente por un 65% a 95% de proteínas, 1% a 9% de lípidos, pequeñas cantidades de oligoelementos, polisacáridos y agua. El folículo piloso está recubierto por un rico sistema vascular envolvente que proporciona el material necesario para el crecimiento del cabello (Pragst y Balikova, 2006).

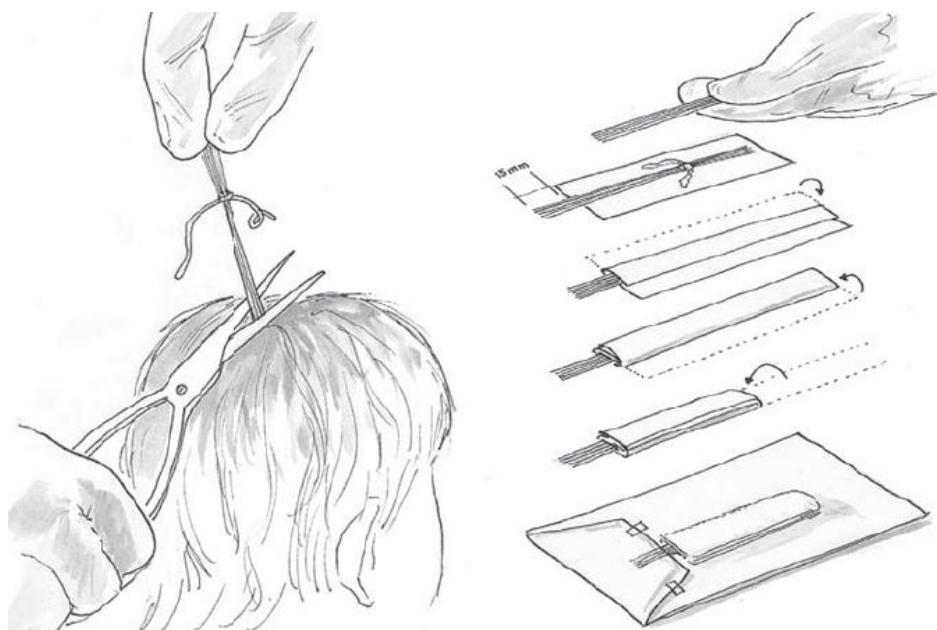
El cabello crece aproximadamente entre 0,6 y 1,4 cm por mes, dependiendo del tipo de pelo y el lugar anatómico en que se encuentre (Balabanova y Wolf, 1989; Han y cols., 2005; Offidani y cols., 1993). Lo que permite ampliar la ventana de detección hasta meses o años y proporcionar información de la exposición a lo largo de la gestación (Eyler y cols., 2005; Huestis y Choo, 2002; Lozano y cols., 2007b).

De hecho no tan sólo el pelo del cuero cabelludo puede ser utilizado para estimar la presencia de sustancias de abuso, sino que el vello púbico, el de las extremidades o incluso el axilar se han sugerido como alternativas cuando la recogida del pelo de cuero cabelludo no es posible. Sin embargo, hay que tener cuidado en la interpretación de las concentraciones halladas en estas muestras, ya que diferentes estudios han encontrado diferencias en las concentraciones comparando el vello púbico o axilar con el del cuero cabelludo (Han y cols., 2005; Offidani y cols., 1993). Estas diferencias en las concentraciones de sustancias de abuso se pueden explicar por la diferente tasa de crecimiento de los diferentes tipos de vello y también por la mejor circulación

sanguínea y la mayor presencia de glándulas apocrinas en estas regiones.

Se acepta que las sustancias de abuso se pueden incorporar al pelo por 3 vías: 1) desde el torrente sanguíneo en el proceso de crecimiento del pelo; 2) desde el sudor y posterior recubrimiento por el sebo, y 3) por la exposición pasiva a las sustancias de abuso, como por ejemplo, contacto con el humo o contaminación del sudor con el humo y posterior depósito de éste en el sebo (Blank y Kidwell, 1993).

La captación de sustancias de abuso por el pelo depende fundamentalmente de 3 factores: 1) la cantidad de melanina que contiene el cabello; 2) el carácter lipófilo de la sustancia y 3) el carácter básico en que se encuentre dicha molécula. Se ha sugerido que las sustancias de abuso se unen a la melanina, lo que explicaría que las mayores concentraciones se alcancen en el pelo más oscuro (Mieczkowski y Kruger, 2007).



**Figura 4.** Mecanismo habitualmente utilizado para recoger muestras de pelo para finalidades toxicológicas.

Las muestras de cabello se suelen recoger de la zona posterior de la cabeza, ya que en esta región es donde el pelo crece más y de forma más uniforme, y donde existe el mayor número de folículos pilosos activos. El pelo debe cortarse lo más cerca posible al cuero cabelludo con tijeras. Posteriormente, el pelo se fija en un soporte de papel y hay que indicar la zona proximal (más cercana al cuero cabelludo) para poder llevar a cabo un análisis segmentario. Después, la muestra se puede almacenar a temperatura ambiente y protegida de la luz directa (figura 4).

Además el análisis de pelo materno ha demostrado ser más sensible en comparación con otras matrices con una ventana amplia de exposición como el meconio o el pelo neonatal (DiGregorio y cols., 1994; Garcia-Boumissen y cols., 2007; Ostrea y cols., 2001). Las sustancias de abuso pueden ser incorporadas y permanecer de forma indefinida en el pelo (Kintz y Mangin, 1993), pudiendo ser detectadas al cabo de años después de la recogida (Pragst y Balikova, 2006). El pelo suele estar expuesto a diferentes agentes que pueden afectar al análisis toxicológico como jabones, polvo, luz solar o lluvia. De hecho, diferentes estudios han evaluado el efecto de los tratamientos cosméticos en la estabilidad de las sustancias de abuso en pelo (Martins y cols., 2008; Potsch y Skopp, 1996; Yegles y cols., 2000).

Para minimizar el riesgo de la contaminación ambiental del pelo se recomienda que los procedimientos de análisis toxicológico en pelo incluyan previamente un proceso de lavado. Existen varios procedimientos de descontaminación de la muestra descritos en la literatura que abarcan desde el uso de disolventes orgánicos, tampones acuosos, agua y jabones hasta combinaciones de estos (Eser y cols., 1997; Girod y Staub, 2000, Kintz y cols., 1995; Schaffer y cols., 2002; Schaffer y cols., 2005; Skender y cols., 2002; Tsanaclis y Wicks, 2008; Vilamor y cols., 2005).

Además, la SoHT recomienda la detección de las sustancias madres y de los metabolitos derivados de las sustancias de abuso y la determinación de la relación de proporción entre ellos (SoHT, 2004). Puesto que la contaminación ambiental no puede ser totalmente eliminada, la detección de los metabolitos de la sustancia (los procedentes del metabolismo endógeno de la propia



sustancia) son los únicos que garantizan que la sustancia ha sido consumida activamente. Esto es especialmente importante en aquellas sustancias de abuso que pueden estar en el medio ambiente debido a la forma en que se consumen como por ejemplo el cannabis y la COC (SoHT, 2004).

La mayor ventaja práctica que nos ofrece el análisis toxicológico en pelo respecto el análisis efectuado en orina o en sangre es la mayor ventana de detección en el tiempo que nos ofrece (desde semanas a meses, dependiendo de la longitud del mechón de pelo). La evaluación de la exposición crónica a sustancias de abuso se realiza mediante el análisis segmentario del pelo. El pelo crece a un ritmo aproximado de 1 cm por mes, con lo cual es posible asociar patrones de distribución de sustancias en el pasado teniendo en cuenta la tasa de crecimiento del pelo. Además, las sustancias de abuso son muy estables en la matriz queratínica durante largos períodos de tiempo.

Otra ventaja del análisis toxicológico del pelo respecto a la sangre o la orina es el procedimiento de recogida de muestras debido a que: 1) es un procedimiento no invasivo y fácil de realizar, 2) la muestra no es fácil de adulterar por dilución con agua (como sucede con la orina) y 3) en el caso en que exista un problema en el procesamiento de la muestra (cambio, fallo en el envío, etc.), es posible obtener una muestra idéntica. Este último punto es de gran importancia en toxicología forense.

El análisis toxicológico del pelo se ha aplicado en diferentes escenarios, por ejemplo, la evaluación del consumo de drogas en población general (Hartwig y cols., 2003; Jurado y cols., 1996; Tsanaclis y Wicks, 2007), en poblaciones de estudiantes (Kidwell y cols., 1997; Quintela y cols., 2000), en la renovación de licencias de conducción (Riscossa y cols., 2000), en la evaluación de la exposición intrauterina a sustancias de abuso (Koren y cols., 2002) o con el fin de evaluar el cumplimiento de la terapia de sustitución del consumo de drogas de abuso (Kintz y cols., 1998).

Habitualmente, el estudio analítico toxicológico de pelo se inicia con una técnica de cribado mediante inmunoensayo, seguida de una confirmación con técnicas cromatográficas. En la tabla 4 se recogen las principales técnicas que se han desarrollado para cuantificar las

sustancias de abuso en pelo materno y neonatal. La GC/MS es la técnica confirmatoria más ampliamente utilizada para analizar sustancias de abuso en cabello. Sin embargo, la LC/MS es cada vez más importante en el campo del análisis toxicológico en pelo, debido a su mayor sensibilidad para determinar compuestos termolábiles, aportando así límites de detección y cuantificación cada vez más bajos y además no requieren procesos que consumen largos períodos de tiempo como la derivatización. Sin embargo, antes del análisis cromatográfico, los analitos deben ser extraídos del interior de la matriz y concentrados en un disolvente compatible con los instrumentos de análisis. No existe un método universal para extraer los analitos de la matriz del cabello y depende de la naturaleza química y la estabilidad del compuesto a analizar. Por lo tanto, opiáceos y COC son los compuestos que mejor se extraen utilizando una hidrólisis ácida leve, a fin de evitar la conversión de la heroína o la 6-MAM a MOR o de la COC a BE (Girod y Staub, 2000). Por otro lado, los compuestos anfetamínicos o cannabinoides pueden ser extraídos utilizando fuertes condiciones alcalinas (Stanaszek y Piekoszewski, 2004; Quintela y cols., 2000; Villamor y cols., 2005). Otros métodos de extracción están basados en el uso de disolventes o tampones de extracción (Scheidweiler y Huestis, 2004) o en extracciones enzimáticas (Vincent y cols., 1999).

Estas técnicas analíticas aplicadas al análisis de pelo tienen la ventaja de presentar una elevada sensibilidad y selectividad, alcanzando precisiones del 89% y límites de detección en el rango de los ng/mg a los pg/mg. Sin embargo, existen una serie de inconvenientes que impiden erigir a esta matriz como única o definitiva: el tratamiento y análisis de la muestra es complejo, costoso y no disponible en todos los centros.

**Tabla 4.** Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas usadas para la detección de las principales sustancias de abuso durante el embarazo en muestras de pelo neonatal y materno.

<b>Droga</b>	<b>Rango de concentración (µg/g)</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>Método de detección</b>	<b>LOD/LOQ (ng/mg)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Pelo neonatal</b>					
<b>Cocaína</b>	BE: 0,71–2,47	Liq-Liq	GC/MS	LOD: 0,1	(Kintz y Mangin, 1993)
	BE: 0,72–5,44	Liq-Liq	RIA	LOD: 32	(Sallee y cols., 1995)
	BE: 0–5,44	Liq-Liq	RIA/GC/MS	LOD: 5	(Katikaneni y cols., 2002)
	COC: 2,5–4	Liq-Liq/SPE	RIA/GC/MS	Cut-off: 2	(Strano Rossi y cols., 1998)
	BE: 4,37±12,5	Liq-Liq	RIA	LOD: 0,25	(Ursitti y cols., 1997)
	COC: <2–83,5 EME: 2–8	ND ND	FPIA/EMIT/ GC/MS	LOD: 1 LOQ: 2	(Pellegrini y cols., 2006)
<b>Opiáceos</b>	MOR: 0,61–3,47	Liq-Liq	GC/MS	LOD: 0,1	(Kintz y Mangin, 1993)
<b>Anfetaminas</b>	AP: 1,21	Liq-Liq	GC/MS	LOD: 0,1	(Kintz y Mangin, 1993)
<b>Benzodiazepinas</b>	ND	Liq-Liq	EMIT/GC/MS	LOD: 200 µg/mL	(Samperiz y cols., 1996)
<b>Pelo materno</b>					
<b>Cocaína</b>	COC: 38±37,2	Liq-Liq	RIA	ND	(Marques y cols., 1993)
	BE: 0,8–2,3	Liq-Liq	RIA	ND	(Potter y cols., 1994)
	BE: 2,38–23,7	Liq-Liq	RIA/GC/MS	LOD: 5	(Katikaneni y cols., 2002)

Anfetamina (AP); benzoilecgonina (BE); cocaína (COC); ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT); inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA); cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); líquido (liq); límite de cuantificación (LOQ); límite de detección (LOD); morfina (MOR); no disponible (ND); radioinmunoensayo (RIA); extracción en fase sólida (SPE); ecgonina metil ester (EME)

#### **1.3.4.1. Pelo neonatal**

El cabello neonatal es una matriz biológica capaz de informar acerca de la exposición acumulativa a sustancias de abuso durante el último trimestre de vida intrauterina (Klein y cols., 2000; Lozano y cols., 2007b; Lozano y cols., 2007a; Marchei y cols., 2006; Pichini y cols., 1996; Strano Rossi y cols., 1998; Ursiti y cols., 1997). En el feto, el pelo del neonato comienza a crecer a partir del 5º o 6º mes del embarazo y presenta un crecimiento medio de 1 cm al mes. Se requieren entre 20 y 50 mg de pelo para poder llevar a cabo la detección de sustancias de abuso en esta matriz. Aunque la ventana de detección del meconio es mayor, el pelo neonatal tiene la ventaja de estar disponible durante 4 o 5 meses de la vida postnatal (Bar-Oz y cols., 2003). Sin embargo, la muestra de cabello que se puede obtener en los recién nacidos es a menudo escasa ya que algunos recién nacidos carecen de pelo y en otros, a pesar de que existe muestra, la cantidad es inferior a la requerida para llevar a cabo la determinación analítica adecuadamente y la recogida en estos casos especiales puede ser considerada casi invasiva. El principal inconveniente es que el crecimiento del pelo fetal al final del embarazo no es uniforme en todos los casos.

La principal sustancia de abuso que se ha estudiado mediante el pelo neonatal es la COC (Sallee y cols., 1995; Samperiz y cols., 1996). Recientemente, se ha comparado el pelo neonatal con el meconio para diagnosticar la exposición prenatal a sustancias de abuso (Bar-Oz y cols., 2003; Vinner y cols., 2003a; Vinner y cols., 2003b) y el análisis de meconio obtuvo los mejores resultados para predecir la exposición prenatal a sustancias de abuso.

#### **1.3.4.2. Pelo materno**

El análisis de pelo materno se ha considerado la matriz biológica de referencia para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante el embarazo ya que la recogida del cabello no es invasiva, permite obtener una gran cantidad de muestra y proporciona información respecto al consumo de drogas durante toda de gestación (cada centímetro desde el cuero cabelludo corresponde retrospectivamente a un mes) (Eyler y cols., 2005; Marques y cols., 1993; Potter y cols., 1994). No obstante hemos de considerar otra serie de limitaciones. Diversos trabajos han puesto de manifiesto

que factores como el grado de hidratación o el uso de cosméticos capilares, especialmente los que emplean ácidos o bases fuertes (la decoloración y la permanente), pueden dañar la cutícula, cambiando la estructura molecular de los pigmentos como la melanina o incluso pueden llegar a degradar las moléculas presentes (Lozano y cols., 2007b). Esto provoca una disminución de la concentración del analito a determinar, lo que puede inducir a errores en la interpretación de los resultados.

El pelo materno aporta una información acerca de la exposición activa o pasiva de la madre, que corresponde a una estimación indirecta de la exposición del feto. Las sustancias madre prevalecen en el pelo por delante de los metabolitos y se encuentran en valores de ng/mg de pelo.

### **1.3.5. Fluido oral**

La saliva es el producto de excreción originado por las tres glándulas salivales principales (parótida, submandibular y sublingual), un número importante de glándulas salivares menores, la mucosa oral y las encías. Como la excreción de este producto es una mezcla de líquidos, el término "fluido oral" es más adecuado. El agua (99%) es el principal constituyente del fluido oral, además de proteínas (enzimáticas y mucinas) y una pequeña proporción de sales minerales. Su pH es de 6,8 en situación de reposo, pero con el aumento del flujo salival, se convierte en más básico (aproximándose al pH del plasma) (Crouch, 2005; Kintz y cols., 2000). El volumen total producido por un adulto puede ser de 1.000 ml/día, con un ritmo aproximado de 0,05 ml/min, aunque depende del ritmo circadiano de cada individuo (Crouch, 2005).

La mayoría de sustancias de abuso se incorporan al fluido oral mediante difusión pasiva generada por un gradiente de concentraciones que depende de las características fisicoquímicas de cada clase de componente. Por lo tanto, las sustancias de abuso en fluido oral están representadas mayoritariamente por la fracción no ionizada de las mismas en plasma.

Existe una gran variedad de métodos de recogida de muestras de fluido oral, aunque habitualmente se utilizan métodos mecánicos de estimulación de su formación, como el ácido cítrico. Sin embargo, la

estimulación de saliva puede acarrear problemas que pueden comprometer a la precisión en el análisis de sustancias de abuso ya que se puede alterar el pH y las concentraciones de las sustancias de abuso (Crouch, 2005). Los dispositivos de recogida comercializados consisten en un material absorbente que se introduce en la boca del donante y posteriormente el fluido oral se recupera por centrifugación o presión.

Una de las ventajas que proporciona el análisis de saliva es que la muestra se recoge mediante supervisión directa. Además, las sustancias de abuso que se ingieren o se administran de forma fumada adquieren altas concentraciones en fluido oral al cabo de pocos minutos u horas después de la ingesta. El análisis de fluido oral es un instrumento de análisis utilizado para el control de la monitorización farmacológica de diferentes fármacos (Quintela y cols., 2005), estudios farmacocinéticos (Drummer, 2005; Huestis y Cone, 2004) y en la detección de sustancias de abuso en controles de circulación (Concheiro y cols., 2007; Kintz y cols., 2005; Samyn y cols., 2002).

Uno de los inconvenientes del análisis de fluido oral es que a menudo los sujetos no son capaces de producir la cantidad necesaria de muestra para realizar el análisis. Además, la concentración de sustancias de abuso depende directamente de las concentraciones plasmáticas y éstas presentan una semivida corta y se eliminan rápidamente del organismo, por lo que tan sólo son detectables en fluido oral durante un corto período de tiempo, siendo sólo de utilidad para aseverar el consumo en períodos cortos previos a la recolección de la muestra pero en ningún caso para demostrar un consumo prolongado en el tiempo, lo cual supone una clara desventaja respecto a matrices como el pelo. La saliva juntamente con la sangre son las matrices biológicas que ofrecen una menor ventana de detección.

### **1.3.6. Leche materna**

El principal motivo para investigar la presencia de sustancias de abuso en leche materna es calcular la tasa de excreción de diferentes compuestos en este fluido y, como consecuencia, calcular la dosis aproximada de ingesta de estos compuestos con la lactancia (Atkinson y cols., 1998).

Algunas sustancias de abuso (por ejemplo, COC, MOR, fenciclidina y AP) son bases débiles y han sido halladas como productos de excreción de la leche materna, debido a su carácter ácido respecto al plasma (Pichini y cols., 1996; Pons y cols., 1994, Robieux y cols., 1990; Steiner y cols., 1984; Winecker y cols., 2001). Además, también se ha hallado la presencia de NIC, cafeína y arecolina, 3 de las 4 sustancias psicoactivas más consumidas en el mundo (Pellegrini y cols., 2007).

### **1.3.7. Dientes**

Recientemente, los dientes se han postulado como matriz biológica en la que se pueden depositar sustancias exógenas, en la pulpa o en el tejido calcificado (Haustein y cols., 1994). Algunos autores han podido identificar opiáceos (COD y MOR) y/o COC en dientes de personas que habían fallecido como consecuencia de una sobredosis (Cattaneo y cols., 2003). Estas evidencias apoyan el papel de los dientes desde un punto de vista toxicológico. Por primera vez, Pascual y colaboradores desarrollaron y validaron un procedimiento para determinar NIC y su metabolito principal, COT, en dientes de leche (Pascual y cols., 2003). Este método fue aplicado por García-Algar y colaboradores con el fin de detectar los niveles de NIC y COT en dientes de leche de niños que estaban expuestos al humo de tabaco (García-Algar y cols., 2003). Dichos resultados apoyan el papel de los dientes como una prometedora herramienta no invasiva para el seguimiento y la categorización de la exposición acumulativa al humo de tabaco ambiental capaz de acumular tóxicos desde la etapa fetal, cuando se inicia la formación de los dientes, hasta el final de la infancia (generalmente, estos dientes se pierden entre los 6 y 8 años).

### **1.3.8. Sudor**

El análisis del sudor materno implica la intervención de diversos mecanismos como la difusión pasiva y la migración transdermal, favorecido para sustancias liposolubles. Así, los compuestos básicos se acumulan en el sudor frente a la acumulación sanguínea como consecuencia de la diferencia de pH entre estos fluidos (Pichini y cols., 1996). Por tanto, pese al carácter no invasivo de la técnica, el sudor materno se ha descartado de cara a la determinación de la

exposición fetal a sustancias de abuso, pues la metodología conlleva errores en la detección.

En definitiva, no existe una matriz que nos permita la detección de la exposición fetal a drogas durante toda la gestación. No obstante, el análisis de pelo materno o el cribado periódico de la orina, del sudor, la saliva o la sangre materna podría utilizarse para monitorizar la exposición a sustancias de abuso en el embarazo, aunque por motivos económicos es una opción inviable.

Independientemente de la matriz seleccionada, lo que ha sido ampliamente demostrado es el paso transplacentario de estas sustancias y de sus metabolitos hasta el compartimento fetal con una accesibilidad variable en función de diversos factores, entre los que destacamos las características estructurales y funcionales de la placenta a lo largo del embarazo. Diversas variables personales como el estado nutricional, la cantidad y número de drogas legales/ilegales que consume la madre o la falta de cuidado prenatal y otros problemas de salud, la dosis y el momento de la exposición son factores cruciales para el análisis y la interpretación de los datos obtenidos.



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La detección de la exposición prenatal a sustancias de abuso es fundamental para asegurar un adecuado seguimiento de los recién nacidos y niños afectados, debido a los posibles efectos perjudiciales del consumo durante el embarazo. El cuestionario materno no es una herramienta de cribado eficiente ni fiable y la detección mediante matrices convencionales (sangre y orina) presentan una ventana de detección estrecha. En los últimos años, se ha descrito la utilidad de varias matrices como alternativas para valorar esta exposición y de esta manera poder detectar de manera precoz el consumo materno. El uso de meconio y pelo han sido más estudiados, pero el empleo de la placenta como matriz para la detección de la exposición a tóxicos se encuentra actualmente en investigación.

### **Objetivos**

1. Conocer los diferentes métodos utilizados para la detección de sustancias de abuso durante la gestación en matrices alternativas durante el tercer trimestre.
2. Investigar el uso de la placenta como matriz alternativa del tercer trimestre para la detección del consumo de sustancias de abuso durante la gestación, estudiando los cambios morfológicos producidos en la placenta ante la exposición prenatal a diversas drogas de abuso.
3. Comprobar la utilidad del pelo materno como matriz biológica alternativa durante la gestación en comparación con el meconio.
4. Detectar los posibles efectos perjudiciales del consumo de sustancias de abuso en los recién nacidos teniendo una determinación objetiva del consumo.

### **Justificación de la unidad temática de la tesis**

La tesis se basa en la publicación de 3 artículos relacionados directamente con el título de la misma y con los objetivos de la investigación (la determinación en matrices biológicas no convencionales (o alternativas) de biomarcadores de exposición prenatal a sustancias de abuso y el análisis de marcadores de daño

placentario. Estos trabajos han sido aceptados para la presentación de la tesis por compendio de publicaciones.

En el primero de ellos [Joya X., Friguls B., Ortigosa S., Papaseit E., Martínez S. E., Manich A., Garcia-Algar O., Pacifici R., Vall O., Pichini S. *Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review. J Pharm Biomed Anal. 2012 Oct;69:209-22. PMID: 22300909*] se realiza una revisión sobre la metodología utilizada en la determinación de biomarcadores de exposición prenatal a alcohol.

En el segundo [Ortigosa S., Friguls B., Joya X., Martinez S., Mariñoso M. L., Alameda F., Vall O., Garcia-Algar O. *Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. Reprod Toxicol. 2012 Aug;34(1):73-9. PMID: 22525318*] se utiliza la placenta como matriz biológica alternativa del tercer trimestre, donde se determinan los efectos morfológicos placentarios del consumo de sustancias de abuso durante la gestación y los posibles efectos perjudiciales del consumo en el recién nacido.

En el tercero [Joya X., Gomez-Culebras M., Callejón A., Friguls B., Puig C., Ortigosa S., Morini L., Garcia-Algar O., Vall O. *Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. BMC Pregnancy Childbirth. 2012 Jan 9;12:2. PMID: 22230295*], se aplica la determinación de biomarcadores a sustancias de abuso en pelo materno (matriz biológica alternativa) durante el tercer trimestre de gestación, determinando la prevalencia de exposición prenatal a las mismas.

## **3. RESULTADOS**



## **ARTÍCULO 1**

### **DETERMINATION OF MATERNAL-FETAL BIOMARKERS OF PRENATAL EXPOSURE TO ETHANOL: A REVIEW**

Joya X., Friguls B., Ortigosa S., Papaseit E., Martínez S. E.,  
Manich A., Garcia-Algar O., Pacifici R., Vall O., Pichini S.

J Pharm Biomed Anal. 2012 Oct;69:209-22.

[PMID: 22300909](#)

FI: 2,967 (2011)





## Resumen

Los efectos perjudiciales producidos por la exposición prenatal a alcohol incluyen problemas físicos, mentales, conductuales y/o de aprendizaje que se incluyen en el término trastorno del espectro alcohólico fetal. La evaluación objetiva de la exposición a etanol tanto prenatal como postnatal es esencial para una prevención e intervención tempranas. Dado que las mujeres embarazadas tienden a subestimar el consumo de alcohol a través de cuestionarios, se han propuesto y evaluado una serie de marcadores biológicos por su capacidad para identificar el consumo de alcohol durante la gestación. Estos biomarcadores incluyen biomarcadores clásicos (aunque indirectos) de la patología inducida por el alcohol (VCM, GGT, AST y ALT), conjugados derivados del acetaldehído y, finalmente, los derivados del metabolismo no oxidativo del etanol (FAEEs, EtG, EtS y PEth). Dado que el etanol y el acetaldehído en sí se detectan sólo unas pocas horas después de la ingesta de etanol en matrices convencionales, tales como sangre, orina y sudor, sólo son útiles para detectar la exposición de etanol reciente. En los últimos años, los metabolitos no oxidativos del etanol han recibido una atención creciente a causa de su especificidad y en algunos casos amplia ventana de tiempo de detección en las matrices no convencionales de madres embarazadas (saliva y pelo) y el recién nacido-feto (pelo neonatal, meconio, placenta y cordón umbilical). Este artículo revisa los procedimientos bioanalíticos para la determinación de estos marcadores de consumo de etanol durante el embarazo y relacionados con la exposición prenatal. Además, se presentan y discuten las aplicaciones clínicas toxicológicas de estos procedimientos.





## Review

## Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review

X. Joya<sup>a,b,c</sup>, B. Friguls<sup>a,b,d</sup>, S. Ortigosa<sup>a,b,d</sup>, E. Papaseit<sup>d,e</sup>, S.E. Martínez<sup>a</sup>, A. Manich<sup>a</sup>,  
O. Garcia-Algar<sup>a,b,d</sup>, R. Pacifici<sup>f</sup>, O. Vall<sup>a,b,d</sup>, S. Pichini<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), IIMB – Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Real SAMD, IETC, Institut Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departament de Biociència i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>d</sup> Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>e</sup> Unitat de Recerca en Farmacologia Bàsica, IIMB – Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Via Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 November 2011

Received in revised form 5 January 2012

Accepted 7 January 2012

Available online 16 January 2012

## Key words:

Assay methods

Maternal biomarkers

Fetal biomarkers

Prenatal exposure to ethanol

## ABSTRACT

The deleterious effects exerted by prenatal ethanol exposure include physical, mental, behavioural and/or learning disabilities that are included in the term fetal alcohol spectrum disorder (FASD). Objective assessment of exposure to ethanol at both prenatal and postnatal stages is essential for early prevention and intervention. Since pregnant women tend to underreport alcohol drinking by questionnaires, a number of biological markers have been proposed and evaluated for their capability to highlight gestational drinking behaviour. These biomarkers include classical biomarkers (albeit indirect) of alcohol-induced pathology (mean corpuscular volume (MCV), gamma glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)), acetaldehyde-derived conjugates, and finally derivatives of non-oxidative ethanol metabolism (fatty acid ethyl esters (FAEEs), ethyl glucuronide (EG), ethyl sulphate (ES) and phosphatidylethanol (PEth)). Since ethanol itself and acetaldehyde are only measured few hours after ethanol intake in conventional matrices such as blood, urine and sweat, they are only useful to detect recent ethanol exposures. In the past few years, the non-oxidative ethanol metabolites have received increasing attention because of their specificity and in some case wide time-window of detection in non-conventional matrices from the pregnant mother (oral fluid and hair) and fetus/newborn (neonatal hair, meconium, placenta and umbilical cord). This article reviews bioanalytical procedures for the determination of these markers of ethanol consumption during pregnancy and related prenatal exposure. In addition, clinical toxicological applications of these procedures are presented and discussed.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction.....	210
2. Indirect maternal biomarkers.....	210
2.1. Liver enzymes: GGT, AST and ALT.....	210
2.1.1. GGT.....	210
2.1.2. AST and ALT.....	214

Abbreviations: 5-HTOL/5-HBAAS, hydroxytryptophol/5-hydroxyindolylacetic acid; CTOL/5-hydroxytryptophol glucuronide; AFA, acetaldehyde-protein adducts; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CE, capillary electrophoresis; CDT, carbohydrate-deficient transferrin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; E20:A, ethyl arachidonate; E22:S, ethyl docosahexanoate; E20:S, ethyl eicosapentaenoate; EG, ethyl glucuronide; E17:0, ethyl heptadecanoate; E12, ethyl laurate; E18:2, ethyl linoleate; E18:3, ethyl linolenate; E14, ethyl myristate; E18:1, ethyl oleate; E16, ethyl palmitate; E16:1, ethyl palmitoleate; ES, ethyl sulphate; E18, ethyl stearate; ELSO, evaporative light-scattering detector; FAEEs, fatty acid ethyl esters; FASD, fetal alcohol spectrum disorder; GGT, gamma glutamyltransferase; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; HS-SPME, headspace solid phase microextraction; HAA, hemoglobin associated acetaldehyde; HPLC, high-performance liquid chromatography; IEF, isoelectric focusing; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; MCV, mean corpuscular erythrocyte volume; NACE, ion aqueous capillary electrophoresis; PE, phosphatidylethanol; PEth, phosphatidylethanol; P5'-P, pyridoxal 5'-phosphate; SPE, solid phase extraction; WBAA, whole blood associated acetaldehyde assay.

\* Corresponding author. Tel.: +39 06 4990362; fax: +39 06 49902016.

E-mail address: s.pichini@iss.it (S. Pichini).

0731-7085/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jpba.2012.01.006

2.1.3.	MCV.....	215
2.1.4.	CDT.....	215
2.2.	5-HTOL/5-HIAA.....	215
2.2.1.	Brief description and history.....	215
2.2.2.	Determination of 5-HTOL/5-HIAA.....	215
2.2.3.	Use of 5-HTOL/5-HIAA for diagnosis of gestational alcohol use.....	215
2.3.	APAs.....	215
2.3.1.	Brief description and history.....	215
2.3.2.	Determination of APAs.....	215
2.3.3.	Use of APAs for diagnosis of gestational alcohol use.....	216
3.	Direct biomarkers.....	216
3.1.	Fatty acid ethyl esters (FAEE).....	216
3.1.1.	Brief description and history.....	216
3.1.2.	Determination of FAEEs in maternal matrices.....	216
3.1.3.	Use of FAEEs for diagnosis maternal consumption.....	216
3.1.4.	Determination of FAEEs in neonatal matrices.....	216
3.1.5.	Use of FAEEs for diagnosis prenatal exposure to ethanol.....	217
3.2.	Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (ES).....	217
3.2.1.	Brief description and history.....	217
3.2.2.	Determination of EtG and ES in maternal matrices.....	217
3.2.3.	Use of EtG and ES for diagnosis maternal consumption.....	218
3.2.4.	Determination of EtG and ES in neonatal matrices.....	218
3.2.5.	Use of EtG and ES for diagnosis prenatal exposure to ethanol.....	218
3.3.	Phosphatidylethanol (PEth).....	218
3.3.1.	Brief description and history.....	218
3.3.2.	Determination of PEth in maternal matrices.....	218
3.3.3.	Use of PEth for the diagnosis of gestational alcohol use.....	218
4.	Conclusions and perspectives.....	219
	Acknowledgement.....	219
	References.....	219

## 1. Introduction

Alcohol is the most popular legal drug used in our times, and its consumption by women of reproductive age remains a significant public health concern. The adverse effects of drinking in pregnancy have been well documented. Gestational alcohol use can result in a continuum of adverse fetal outcomes known as fetal alcohol spectrum disorder (FASD) [1], which encompasses distinctive craniofacial dysmorphism, growth retardation, and neurodevelopmental and cognitive deficits [2]. FASD may be as prevalent as 1% of live births and the affected person has increased risk for a wide range of mental disorders and social impairments over the entire life-span [3]. Moreover, FASD is one of the most recurrent and at the same time easily preventable developmental disorder [4].

Another aspect to consider is the cost of caring for children and adults with FASD. In North Dakota, the mean annual cost of health care for a child with FAS from birth through 21 years of age was \$2,342 more compared to a child without FAS [5]. Current cost includes health care, foster care, treatment for developmental disabilities, early intervention programs, special education, mental health, substance abuse treatment, for the most affected persons care for their entire adult life, and the cost of the corrections system including juvenile justice [6].

Currently, detection of prenatal alcohol exposure is based on maternal report, or suspicion of it based on history (lack of prenatal care, alcohol related life events, abuse, and alcohol impaired driving infractions). Until now, the only tools to obtain information about prenatal alcohol exposure have been questionnaires and interviews of the mother [7]. However, one of the major disadvantages of self-reports is that women tend to underreport the amount and frequency of their alcohol intake and they are reluctant to reveal gestational alcohol use, because the stigma and fear of punishment [8].

Thus, due to the difficulty in assessing alcohol-drinking behaviour from an objective point of view, in the last decades a

number of biological markers considered far more reliable for documenting ethanol use have been introduced and validated. These biomarkers include direct measurements of ethanol and measurements of the products of oxidative and non-oxidative ethanol metabolism (Fig. 1).

We report on the "state of the art" of the methodology for testing maternal and fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol. The analytical procedures are summarized in Table 1.

## 2. Indirect maternal biomarkers

The clinical parameters used routinely for diagnosis of chronically high alcohol use are indirect markers, such as the liver enzymes gamma-glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), mean corpuscular erythrocyte volume (MCV), or carbohydrate-deficient transferrin (CDT). Moreover, there are also certain low-molecular-weight indirect markers, such as the plasma ratio of 5-hydroxytryptophol/5-hydroxyindolylacetic acid (5-HTOL/5-HIAA) which changes with excessive ethanol use. Most of them are measured in blood (serum or plasma) and are not suitable for any other matrix such as hair. These indirect markers are indicative of chronic maternal alcohol use only.

### 2.1. Liver enzymes: GGT, AST and ALT

#### 2.1.1. GGT

**2.1.1.1. Brief description and history.** GGT is a glycoprotein enzyme situated on the cell membrane in several tissues. Although GGT is produced in many tissues, only the hepatic isoform is detectable in serum. GGT is one of the oldest biochemical tests for the detection of excessive alcohol use [9]. Clinically, it has been used for the assessment of liver damage. However, serum levels of GGT may increase in response to exposure to a variety of drugs and alcohol. Therefore, the use of GGT as a tool in screening for excessive alcohol use is

**Table 1**  
Detection window and analytical procedures for monitoring prenatal exposure to alcohol in biological matrices.

Matrix	Days	Assay method	Extraction method	Sensitivity (%)	Inter-assay (inter-assay) coefficients of variation (%)	LOQ and/or LOQ (cut-off in the case of immunological methods)	Remarks levels for the different exposure groups	Author, year (reference)	
Serum	Days	HPIC	Precipitation with dioxan	NA	NA	NA	LOQ = 0.17% of diastereoisomers 9 of 24 pregnant women (27.5%) had elevated levels	Kraus et al. [10]	
	Weeks	HPIC	Precipitation with dioxan	NA	Inter-assay >10	NA	NA	Manchev et al. [14]	
		HPIC	NA	NA	85–95	Inter-assay 0.5–0.5 Intra-assay 12.6–13	LOQ = 2 pmol/L	NA	Petrovic and Poljak [48]
Whole blood	Months	ELISA	NA	NA	Inter-assay 12.6 Intra-assay 16.5	NA	NA	Libra et al. [49]	
		GC-MS/MS	NA	NA	NA	LOQ = 0.04–10 <sup>-6</sup> –2.93–10 <sup>10</sup> M	Sober abstemious FAEE = 0.2 ng/ml Moderate social drinkers FAEE = 0.5 ng/ml	De Benedetto and Fenu (2010) [45] Prager and Veglio [46]	
		GC-MS	HS-SMME	NA	NA	LOQ = 0.01–0.04 ng/ml LOQ = 0.04–0.12 ng/ml	Sober abstemious FAEE = 0.2 ng/ml Moderate social drinkers FAEE = 0.5 ng/ml	Edging and Evers [47]	
Microsomal	Months 3–6	GC-MS	HS-SMME	NA	Inter-assay 2.0 Intra-assay 3.0	LOQ = 0.01–0.04 ng/ml LOQ = 0.04–0.12 ng/ml	Sober abstemious FAEE = 0.2 ng/ml Moderate social drinkers FAEE = 0.5 ng/ml Highly positive 165 (FAEE = 1.0 ng/ml) All the samples below LOQ (0.0 ng/ml) of total FAEEs	Edging et al. [76]	
		GC-MS	HS-SMME	NA	NA	LOQ = 0.01–0.04 ng/ml LOQ = 0.04–0.12 ng/ml	Sober abstemious FAEE = 0.2 ng/ml Moderate social drinkers FAEE = 0.5 ng/ml Highly positive 294 (FAEE = 0.5 ng/ml)	Moore et al. [89]	
		GC-MS	HS-SMME	NA	NA	LOQ = 0.01–0.04 ng/ml LOQ = 0.04–0.12 ng/ml LOQ = 1.0 pmol/L	Sober abstemious FAEE = 0.2 ng/ml Moderate social drinkers FAEE = 0.5 ng/ml Highly positive 165 (FAEE = 1.0 ng/ml) All the samples below LOQ (0.0 ng/ml) of total FAEEs	Mosini et al. [71]	
Microsomal	Months 3–6	GC-MS	Liq-Liq	>95	NA	LOQ = 0.01–0.04 ng/ml LOQ = 0.04–0.12 ng/ml	Correlation EIE2 in neonatum with prenatal exposure to ethanol	Beares et al. [74]	
		GC-MS	SPE	NA	NA	LOQ = 1.0 pmol/L	Total FAEE	Edging et al. [75]	
		GC-MS	SPE	NA	NA	NA	Non-exposed infants: 131/26 ng/ml Non-exposed group: 41/2 ng/ml 16.2% specimens were positive for FAEEs (1–9 ng/ml)	Moore et al. [89]	
		GC-MS	SPE	NA	NA	NA	E12 and E14 were most frequently detected in neonatum	Chen et al. [78]	
		GC-MS	SPE	NA	NA	NA	Total FAEE Non-exposed subjects Prevalence: 1.37 nmol/L Sensitivity: 2.00 nmol/L 27 (17.1%) of the E22 samples were positive	Dezaif et al. [96]	
		GC-MS	MS	NA	NA	Inter-assay 12.1 Intra-assay 14.6	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Quina et al. [74]	
		GC-MS	SPE	101	NA	Inter-assay 14.6 Intra-assay 14.6	LOQ = 0.05 pmol/L	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Pichini et al. [84]
		GC-MS	SPE	54.6–93.8	NA	Inter-assay 4.9–11.2 Intra-assay 4.0–12.8	LOQ = 13.2–15.9 ng/ml LOQ = 40.2–51.2 ng/ml	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Harmon et al. [81]
		GC-MS	HS-SMME	2.3–11.7	NA	Inter-assay 2.4–13.76 Intra-assay 2.75–13.04	LOQ = 0.05–0.16 nmol/L LOQ = 0.13–0.32 nmol/L	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Harmon et al. [81]
		GC-MS	HS-SMME	2.7–33.4	NA	Inter-assay 2.3–14.6 Intra-assay 1.3–11	LOQ = 5–100 ng/ml LOQ = 16–150 ng/ml	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Buckley et al. [94]
		GC-MS	HS-SMME	2.7–33.4	NA	Inter-assay 2.3–14.6 Intra-assay 1.3–11	LOQ = 5–100 ng/ml LOQ = 16–150 ng/ml	FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml) FAE (FAEE = 0.04 ng/ml)	Buckley et al. [94]

Table 1 (Continued)

Matrix	Detectable up to	Assay method	Extraction method	Recovery (%)	Intra-assay/inter-assay coefficients of variation (%)	LOQ and/or LOQ (cut-off in the case of immunological methods)	Biomarker levels for the different exposure groups	Author, year (reference)
		LC-MS/MS	BS-SIME	NA	NA	LOQ = 15–50 ng/g LOQ = 50–150 ng/g	12 of the 43 positive samples (FAEs > 500 ng/g) had concentrations above 5,000 ng/g 0–37.8 nmol/g	Bakdash et al. [62]
		LC-MS/MS	Liq-Liq	55–86	Intra-assay 7–21 Inter-assay 10–17	LOQ = 0.01–0.08 nmol/g LOQ = 0.02–0.27 nmol/g		Kozak et al. [65]
		GC-MS	BS-SIME	3.2–19.5	NA	LOQ = 37.7 ng/g LOQ = 113.0 ng/g	10.7 nmol/g (9.8–10.9)	Hanson et al. [63]
BG/BS Serum	Hours	EISA		92–100.6	Intra-assay 1.8 Inter-assay 2.2	LOQ = 0.055 ng/L LOQ = 0.125 ng/L	No detectable levels < 0.1 ng/L	Itanishi et al. [34]
Urine	Hours	EISA		92–100.6	Intra-assay 1.8 Inter-assay 2.2	LOQ = 0.055 ng/L LOQ = 0.125 ng/L	No detectable levels < 0.1 ng/L	Itanishi et al. [34]
Hair	Months	LC-MS/MS	Liq-Liq	NA	Intra-assay < 7 Inter-assay < 4.5	LOQ = 2 pg/mg LOQ = 3 pg/mg LOQ = 20 pg/mg	Noise of samples were positive for BEG in hair	Morini et al. [71]
	LC-MS/MS		SPE	72–111	Intra-assay < 9 Inter-assay < 7	LOQ = 3 pg/mg LOQ = 20 pg/mg	5/20 had concentrations above LOQ Median = 10 pg/mg	Tarcomistu et al. [109]
Micronium	Months	LC-MS/MS	SPE	BEG: 78.7–96.8 BS: 72.1–95.6	Intra-assay < 7.2 Inter-assay < 10.5	BEG LOQ = 5 ng/g BS	NA	Morini et al. [120]
		LC-MS/MS	SPE	BEG: 78.7–96.8 BS: 72.1–95.6	Intra-assay < 7.2 Inter-assay < 10.5	LOQ = 1 ng/g BEG LOQ = 5 ng/g BS	No pre-tatal ethanol exposure (FAE = 2 nmol/g) Foglio family group: BEG: median 14.3 ng/g BS: median 0.0 ng/g Bare-loza group: BEG: median 45.5 ng/g BS: median 0.0 ng/g Pre-natal ethanol exposure (FAE > 2 nmol/g) BEG: median 17.4 ng/g BS: median 1.1 ng/g Bare-loza group: BEG: median 152.3 ng/g BS: median 2.1 ng/g	Pekhtin et al. [121]
		LC-MS/MS	SPE	BEG: 78.7–96.8 BS: 72.1–95.6	Intra-assay < 7.2 Inter-assay < 10.5	BEG LOQ = 0.002 nmol/g LOQ = 0.008 nmol/g BS	BEG: 0.032–4.023 nmol/g (mean 0.347 nmol/g) BS: 0.008–0.023 nmol/g (mean 0.012 nmol/g) Bare-loza group: LOQ = 0.007 nmol/g (mean 0.487 nmol/g) BS: 0.010–0.039 nmol/g (mean 0.022 nmol/g)	Morini et al. [71]







Fig. 1. Classification of markers for alcohol abuse [66].

limited by its nonspecificity and also by its relatively low sensitivity. Only 30–50% [10,11] of excessive drinkers in the general community have elevated levels. Moreover, GGT levels typically correlate only moderately with alcohol use [10] and this marker does not respond to a single dose of alcohol.

**2.1.1.2. Determination of GGT.** The chemical reaction in which GGT acts as a catalyst is the transfer of a glutamyl residue, linked through glutamate's gamma carboxylic acid to an amine or to another amino acid, which acts as an acceptor. A wide range of compounds can act as the gamma-glutamyl donor or acceptor. Among the gamma-glutamyl donors the most significant natural substrate is believed to be glutathione (gamma-glutamyl cysteinyl glycine), but a range of artificial substrates are also acted on by GGT. The acceptors are amino acids or peptides, with glycylglycine the most active and commonly used example. Immunoassays and highly sensitive methods based on the fluorescence of certain compounds have also been described for specialized uses [9,12].

**2.1.1.3. Use of GGT for diagnosis of gestational alcohol use.** The low sensitivity of GGT in detecting unsafe drinking in women does not lend it high reliability, but several groups has published results in this field. The first study of Larsson [13] took the generally desirable approach of enrolling all pregnant women attending to an antenatal clinic. Consequently, the study had small numbers of excessive drinkers, and only two women had babies affected by alcohol. Similarly, Halmesmaki et al. [14] recruited high-risk women. Twenty-five women taking at least 150g of alcohol per week were compared with 20 abstinent pregnant controls; 13 of the 25 gave birth to affected infants. Mean maternal GGT was higher in high-risk mothers of unaffected babies, and even higher in the mothers of affected babies compared to the abstinent pregnant controls.

In conclusion, the use of GGT in screening for alcohol abuse in pregnant women has poor sensitivity, with many false positive results. Nevertheless, it is interesting that GGT is higher in women giving birth to babies with fetal alcohol effects or fetal alcohol syndrome. It is not clear whether the elevated GGT in high-risk mothers of affected babies reflects simply higher alcohol intake, or a different and more harmful response to ethanol.

### 2.1.2. AST and ALT

**2.1.2.1. Brief description and history.** AST and ALT are elevated liver enzymes in the serum of alcohol abusers because alcohol is a direct hepatotoxin. These enzymes catalyze the reversible transformation of alpha-keto acids into amino acids by transferring amino groups. Their elimination rate is up to 3 weeks. Like GGT, aminotransferases are not increased by a single episode of excessive drinking [15]. Aminotransferases are even less sensitive than GGT in the detection of excessive ethanol consumption [16].

**2.1.2.2. Determination of transaminases.** AST and ALT are typically measured by their catalytic activity [17]; both require pyridoxal 5'-phosphate (P5'-P) for maximum activity, although the effect of P5'-P deficiency on the activity of ALT is greater than on the AST [18].

**2.1.2.3. Use of transaminases for diagnosis of gestational alcohol use.** In pregnant women, it is common to find decreased levels of AST and ALT, thus, these enzymes are poor indicators of abusive drinking due to the low sensitivity, as shown by a study measuring several markers [19]. As with GGT, aminotransferases are often ordered as part of a battery of routine biochemical tests [20]. Halmesmaki et al. [14] in the previously mentioned study determined, in addition to GGT, also the levels of transaminases in the serum of the pregnant women. AST and ALT were increased in all alcohol-abusing women



but the study proved that these biomarkers are not optimal for the evaluation of chronic alcohol use.

### 2.1.3. MCV

**2.1.3.1. Brief description and history.** It has been known for many years that the mean volume of the red blood cell (mean corpuscular volume; MCV) is increasing with excessive alcohol consumption causing macrocytosis [21,22]. Due to the long half-life of red blood cells; 120 days, any change in the drinking pattern will be reflected in the MCV levels only after several months [23]. Similarly, sustained and regular excessive drinking appears to be needed to produce elevated MCV levels. The measurement of MCV can be applied for screening but it has limited value as a single marker. Meerkerk et al. [24] in a general practice setting detected elevated MCV in less than 20% of excessive drinkers.

**2.1.3.2. Determination of MCV.** There is a wide range of methods for MCV estimation. It is routinely measured whenever a full blood count is requested. Automated cell counts are more accurate than manual methods [25].

**2.1.3.3. Use of MCV for diagnosis of gestational alcohol use.** Sarkola et al. measured MCV in 18 heavy pregnant drinkers and concluded that it is an efficient biomarker for detecting excessive alcohol consumption [26].

### 2.1.4. CDT

**2.1.4.1. Brief description and history.** Transferrin is synthesized and secreted in the liver. With a half-life of 7–10 days it acts as a carrier for iron in the bloodstream. CDT is a group of minor isoforms of human transferrin with a lower degree of glycosylation in comparison to the major isoforms of this glycoprotein. CDT is a relatively new marker, which is, however, being increasingly used for detecting alcohol abuse due to its high specificity [27,28].

**2.1.4.2. Determination of CDT.** Several methods for CDT measurement are currently available. Previously, the most widely used method expressed the concentration of CDT as simple units (U/L), whereas in more recent methods the results are given as a percentage of total transferrin (%CDT). The main advantage of the latter approach is that it takes into account the natural variability in serum transferrin [29]. To date, the most common CDT measurement technique has been microcolumn anion-exchange chromatography based on different characteristic charges of desilylated transferrin isoforms, followed by immunoassay for transferrin quantification. Due to the development of monoclonal antibodies to human CDT and automation, CDT can now be analyzed more rapidly in a single-step procedure. For better isolation and quantification, high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) and isoelectric focusing (IEF) methods are also available [30,31]. HPLC is currently considered as a suitable candidate for a reference method [31].

**2.1.4.3. Use of CDT for diagnosis of gestational alcohol use.** The diagnostic accuracy of CDT for detecting alcohol abuse may be limited in pregnant women and should be carefully assessed in relation to alcohol consumption [32]. Kenan et al. found that CDT increases during pregnancy suggesting the risk for false-positive results when CDT is used to detect chronic alcohol abuse in pregnant women [33]. Recently, similar to other groups, Bianchi et al. [34], demonstrated that the levels of CDT are directly related to the length of gestation and, in a legal context, its use as a biomarker for gestational alcohol use may be limited.

### 2.2. 5-HTOL/5-HIAA

#### 2.2.1. Brief description and history

An alternative biomarker focusing more on recent moderate to high drinking is 5-hydroxytryptophol (5-HTOL), which is excreted in urine predominantly as 5-hydroxytryptophol glucuronide (GTOL) [35]. A widespread use of the 5-HTOL marker has been hindered mainly by methodological problems, because it normally occurs at low concentrations [35]. In routine clinical use, urinary 5-HTOL is reported as a ratio to 5-hydroxyindolylacetic acid (5-HIAA) instead of creatinine, because this practice compensates for interferences from variations in urine dilution as well as serotonin turnover [36].

#### 2.2.2. Determination of 5-HTOL/5-HIAA

The common analytical approach for urinary measurement of 5-HTOL and 5-HIAA has been the employment of separate methods for each compound; typically gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for 5-HTOL and HPLC for 5-HIAA [35]. A recent evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for GTOL showed promising results and offered a viable alternative to GC-MS [37] but a second, more sensitive analytical method is needed. This problem was overcome by the recent development of a direct liquid chromatographic-mass spectrometric (LC-MS) procedure for simultaneous measurement of GTOL and 5-HIAA in urine [38]. Bek et al. [39] described an immunological method for quantifying GTOL in urine.

#### 2.2.3. Use of 5-HTOL/5-HIAA for diagnosis of gestational alcohol use

No studies have been conducted in pregnant women so far.

### 2.3. APAs

#### 2.3.1. Brief description and history

Acetaldehyde is the main product of oxidative ethanol metabolism. However, acetaldehyde is rapidly converted to acetate by acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) and it is a highly reactive molecule that tends to bind to cellular compounds [40–42]. In addition, acetaldehyde might react with the nucleophilic groups of proteins forming adducts with several proteins, some of which have already been identified: hemoglobin, albumin and other serum proteins, lipoproteins, tubulin, CYP4502E1 and red blood cell membrane proteins. Among them, acetaldehyde-protein adducts (APAs) have been suggested as promising biomarkers of alcohol abuse. APAs have a longer half-life than free acetaldehyde and remain high in blood for approximately a month after alcohol intake [43].

#### 2.3.2. Determination of APAs

APAs have been detected in whole blood, serum, plasma and other tissues using either HPLC or immunological methodologies. HPLC coupled with fluorescence detection – known as the “whole blood associated acetaldehyde assay” (WBAA) – has been extensively used [43,44]. This assay is highly specific, extremely sensitive and has excellent inter- and intra-assay precision [45,46]. Moreover, the total run time is about four minutes, which allows measuring a large number of samples in a limited time. The main challenge for WBAA is its potential to produce false-positives due to the formation of acetaldehyde in blood after sample collection. APAs have also been detected using various antibodies developed against APAs in blood or serum by ELISA [47,48]. Unfortunately, these assays have poor specificity, because of the difficulties in the selection of specific APAs for the development of antibodies. Recently, a new capillary electrophoresis method coupled to electrospray ionization mass spectrometry (CE-ESI-MS) has been developed for the detection of hemoglobin-associated acetaldehyde (HAA) [49].

### 2.3.3. Use of APAs for diagnosis of gestational alcohol use

Several studies have reported increased levels of APAs in chronic alcoholics [50–52]. APAs have also been found in the erythrocytes of heavy drinkers and in abstinent volunteers after acute doses of alcohol [44]. HAA was detected in the blood of pregnant drinkers with the highest concentrations in the mothers who subsequently delivered infants with FASD [53,54].

## 3. Direct biomarkers

Direct alcohol markers are chemically derived from the ethanol molecule and contain still the two carbon atoms of ethanol. These are ethanol itself or metabolites of ethanol such as fatty acid ethyl esters (FAEEs), ethyl glucuronide (EtG), or phosphatidylethanol (PEth). Concerning ethanol itself, it is usually measured in breath and blood, although to detect only very recent single drinking occasion and thus useless to eventually assess gestational use and consequent prenatal exposure to this teratogen [55].

### 3.1. Fatty acid ethyl esters (FAEE)

#### 3.1.1. Brief description and history

FAEEs are formed by the esterification of ethanol with free endogenous fatty acids and acyl-CoA/fatty acids. The esterification process is facilitated by two enzymes: FAEE synthase and acyl-CoA:ethanol O-acyl-transferase [56,57]. In humans, FAEE synthases are found mainly in the liver and pancreas [56]. The FAEE group consists of more than 20 different compounds such as ethyl laurate (E12), ethyl myristate (E14), ethyl palmitate (E16), ethyl palmitoleate (E16:1), ethyl stearate (E18), ethyl oleate (E18:1), ethyl linoleate (E18:2), ethyl linolenate (E18:3), ethyl arachidonate (E20:4), and ethyl docosahexanoate (E22:6). The plasma elimination of FAEE has a two-phase kinetic profile with a primary half-life of about 3 h and a terminal half-life of about 11 h, followed by distribution into tissues or hydrolysis under the action of FAEE hydrolases [58]. Because of the longer secondary elimination phase, FAEEs persist in blood at least 24 h after the last ethanol intake [59].

#### 3.1.2. Determination of FAEEs in maternal matrices

FAEE can be detected in several maternal matrices: blood, hair and several tissues from different species after maternal ethanol consumption [60].

The methods used for the analysis of FAEE from blood (serum or plasma) are based on liquid extraction using an acetone/n-hexane mixture followed by solid phase extraction (SPE) on aminopropyl-silica columns [61–64]. For quantitative determination GC–MS is the preferred method because the low polar nature of FAEEs makes them well suited for GC separation. Ethyl heptadecanoate (E17:0) is used as internal standard. The use of FAEEs as alcohol markers in blood is limited to the detection of recent consumption [62]. According to Borucki and colleagues [65], FAEEs in serum decrease rapidly within 29 h following ethanol intake (dose not available).

On the other hand, the methodology to determinate FAEEs in hair is not the same as in plasma and/or serum. The methods reported for these two latter matrices are not suitable for hair samples because of insufficient sensitivity due the smaller available sample size (10–30 mg/hair) and high chromatographic background caused by other lipids in the hair extract. The analysis of FAEEs in hair uses headspace solid-phase microextraction and GC–MS after a washing procedure using n-heptane and extraction with a dymethyl sulfoxide-n-heptane mixture. The sum of the concentration of four FAEE (E14:0, E16:0, E18:0, E18:1) in hair samples gives a sensitivity of 90% and specificity of 90% with a cut-off value of 0.5 ng/mg [66].

### 3.1.3. Use of FAEEs for diagnosis maternal consumption

There is no data with respect to FAEEs levels in blood/plasma in a population of pregnant women. The levels of total FAEE concentration of E16, E18:0, E18:1 and E18:2 in plasma of patients with a history of chronic alcohol abuse were measured by Kaphalia et al. [67]. The population with a chronic alcohol abuse presented significantly higher levels (mean value = 15.09 mg/L) than that the group of patients with an acute history of alcohol abuse (mean value = 4.25 mg/L). To date, the best option for the evaluation of chronic alcohol use in pregnancy is the determination of FAEEs in maternal hair. Pragst and Yegles [68] were the first to suggest this possibility. Their study found a correlation between FAEE levels in hair samples and the amount of ethanol consumed even after 2 months of subsequent abstinence. Similarly, Kulaga and Koren [69] documented the use of FAEEs hair test in parents at risk of having children with FASD and quantified the prevalence of alcohol use in this population. From a total of 26 pregnant subjects whose hair was analyzed for FAEE, 19% tested positive for excessive drinking, with levels above 0.5 ng/mg. Subsequently, years later, Kulaga et al. [70] demonstrated that the mothers who were positive for heavy chronic alcohol use had a threefold increased risk of testing positive for cocaine. However, Morini et al. [71] reported that monitoring the levels of FAEEs in hair of pregnant women is not useful in detecting ethanol intake lower than 30 g/day. Moreover, surprisingly, a low concentration of FAEE: 0.06–0.37 ng/mg (mean 0.17 ng/mg, n = 17) has been detected in the hair of strict teetotalers [72,73]. Overall, the levels of FAEE detected in hair samples should be interpreted with caution since FAEE incorporation into hair may be influenced by inter-individual differences in alcohol metabolism, physiology of hair growth, activity of the sebum glands, hair care or hair cosmetics [72,73].

### 3.1.4. Determination of FAEEs in neonatal matrices

The FAEEs E16:0, E18:0, E18:2, E18:3, E20:4 have been suggested as biomarkers in meconium [74–76]. The sum of these FAEEs with a cut-off of 2 nmol/g or 50 ng/g meconium was recommended as evidence of maternal alcohol use [68,82]. Traditionally, all the methods were based on the method described by Bernhardt et al. [77]. This method involves a liquid-liquid and SPE extraction steps. Following extraction, FAEEs are then detected and quantified using GC coupled with either flame ionization detection (FID) or mass spectrometry (MS) [76,78,79]. The first method developed based on tandem mass spectrometry was published by Beazer et al. [80]. This method provides a highly sensitive and specific indicator of maternal alcohol use during pregnancy. In 2009, Hutson et al. [81] introduced a novel technique to quantify FAEEs in meconium using SPME coupled with GC–MS. The method had a good reproducibility making it ideal for routine analysis of clinical samples because it minimized manual labor. Bakdash et al. [82] optimized and validated the method described previously by Hutson et al. [81]. This method proved to be simple, robust, sensitive, and reliable in routine application. The small sample amount of 50 mg was particularly important since less than 1 g was collected in many cases. In an effort to optimize the utility and cost-effectiveness of FAEE analysis in meconium, Hutson et al. [83] developed an analytical technique that is fast, accurate, and inexpensive. This method provides an optimal approach to detecting and quantifying FAEE in meconium that could be used in a universal screening program for prenatal alcohol exposure. Moreover, it has several advantages over the previous methods such that it is more cost effective, minimizes manual labor, and has improved detection limits.

LC–MS/MS methods have the advantage of being more specific in simultaneously quantifying several analytes in complex biological matrices. The first method that used LC–MS/MS for quantifying FAEEs in meconium was developed by Pichini et al. [84].

Using LC-MS/MS, Kwak et al. [85] developed a robust method for the quantification of 9 different FAEs. The major advantages of the assay over the previously published method [84] include a smaller amount of meconium as the biological matrix, a shorter run time allowing high throughput analysis, a smaller injection volume, and improved sensitivity.

### 3.1.5. Use of FAEs for diagnosis prenatal exposure to ethanol

FAEs in meconium have been established in several studies as biomarkers of fetal ethanol exposure during the second and the third trimesters of pregnancy [86]. An important finding for the evaluation of gestational ethanol exposure is the fact that FAEs do not cross the placenta into the fetal circulation [87] but, since they can be detected in fetal matrices, must be produced in the fetus itself from the ethanol which crosses the placenta. Since it is accumulated in the fetal gut from about the 20th week of gestation until birth, it provides wide window of detection of chronic exposure to alcohol. However, the total weight of meconium increases exponentially from about 1 g in the 23–26 gestational weeks to 5 g in the 27–32 weeks and finally to 20–80 g at birth [88]. Therefore, at least 75% of the sample material originates from the last 8 weeks of pregnancy.

Bearer et al. [74] reported for the first time the use of FAEs for the assessment of *in utero* ethanol exposure. At the same time, in 1999, Klein et al. [75] reported the presence of FAEs in meconium from a newborn of a woman who acknowledged drinking beer throughout pregnancy. For the purpose of discriminating between neonates with and without prenatal alcohol exposure, since FAEs may be originate from endogenous ethanol or from ethanol traces contained in common foods, a cut-off value for FAEs in meconium had to be established. Small amounts of FAEs were found in meconium of neonates without active maternal alcohol consumption [78]. Moore et al. [89] used the concentration sum of 5 FAEs for interpretation and concluded from their results that a total FAE concentration above 10,000 ng/g may indicate that the newborn has been exposed to significant amounts of alcohol during gestation. In 1999, Derauf et al. [90] tried to assess the agreement between maternal self-reported ethanol use and metabolites associated with ethanol intake using samples from an urban center in Hawaii. Surprisingly, there was no agreement between reported ethanol intake during the third trimester and detected FAE. Bearer et al., in 2005 [74], and Ostrea et al. [76] demonstrated that E18:2 was the biomarker of high specificity for prenatal exposure to alcohol in newborn infants. Similar results were obtained by Peterson and collaborators [91]. Based on all the studies in this field, the cut-off value may include one specific FAE (cut-off: 50 pg/mg) or several FAEs (cut-off: multiples of 50 pg/mg, depending on the number of FAEs included).

Several studies have investigated the prevalence of prenatal exposure to alcohol in different populations. In 2008, Garee et al. [92] measured the levels of FAEs in 682 samples of meconium from Canada. Seventeen of 682 meconium samples tested positive for significant prenatal ethanol exposure. In the same year, García-Algar et al. highlighted 45% ethanol use during pregnancy in a low socioeconomic status cohort from Barcelona (Spain). Similarly, Hutson et al. [93] studied the prenatal alcohol exposure in Montevideo (Uruguay). Forty-four percent of meconium samples were above the positive cut-off for FAEs and represent the newborns with risky prenatal exposure during the final two trimesters of pregnancy [93]. Another study on a cohort from South America was done by Roehsig et al. [94]. This author determined the levels of FAEs in 63 meconium samples from Sao Paulo (Brazil). The small sample amount of 50 mg taken into analysis proved to be particularly important since less than 1 g was collected in many cases. Kwak et al. [85] screened 81 pregnant women who reported

alcohol use during their pregnancy. The FAEs levels exhibited high inter-individual variability.

## 3.2. Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS)

### 3.2.1. Brief description and history

Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS) are both direct minor nonoxidative alcohol metabolites. EtG is formed by the ethanol conjugation with glucuronic acid mediated by UDP-glucuronyl transferases (UGTs) whereas ethyl sulphate is formed by the transfer of a sulphuric group from 3'-phosphadenosine-5'-phosphosulfate to ethanol accomplished by the mitochondrial sulfotransferases [95,96].

### 3.2.2. Determination of EtG and EtS in maternal matrices

The first methods for the determination of EtG in blood and urine date back to the mid-1990s and were based on GC-MS [65,97]. Janda and Alt [98] proposed a method based on SPE using aminopropyl cartridges, silylation, and detection in selected ion monitoring (SIM). This fully validated method is able to reach a LLOQ of 0.17 mg/L in serum and 0.56 mg/L in urine. Other methods, with limited validation isolate the analyte from the substrate using deproteinization of serum and evaporation. Nowadajys, LC-MS/MS is considered the technique of choice. All the methods published after 2000 describe the use of LC-MS/MS. Other methods for the determination of EtG that are not based on mass spectrometric detection, and therefore provide less selectivity than the ones mentioned so far, have been published. EtG was determined in urine by pulsed electrochemical detection (PED) [99]. The possibility of detecting EtG by an immunochemical screening procedure has also been investigated [100]. Zimmer et al. [101] were the first in detecting EtG by ELISA using polyclonal antibodies. More recently, an immunoassay based on a monoclonal antibody for determination of the EtG concentration in urine samples has been evaluated.

EtG in serum has also been detected by CE in serum samples [102]. In this case, CE with UV detection provided an adequate LOD (0.047 mg/L) without the need for analyte extraction. CE-UV was also used for the determination of EtS in urine samples [103]. The method was fully validated and also cross-validated with that of Bicker et al. [104].

The methods traditionally used for EtG analysis in hair are based on GC-MS and LC-MS/MS [105–108]. Using this technique, detection limits of 2 pg/mg and 50 pg/mg have been established for GC-MS and LC-MS, respectively [90]. In contrast to biological fluids and tissues where LC-MS methods largely prevail, especially since 2000, for the determination of EtG in hair there are more GC-MS methods than LC-MS ones. This appears to be due to the solid nature of the hair matrix that requires the analyte to be isolated from the substrate even when using LC for separation. EtG can be easily extracted from the keratinic matrix using an alkaline aqueous solution. However, probably owing to the lability of glucuronides at non-neutral pH, hair samples always have been incubated in distilled water with the help of an ultrasonic bath, and in a couple of cases a mixture of water and organic solvent was used. Three LC-MS/MS methods have been published so far for EtG in hair. In 2010, Tarcomnicu et al. [109] developed and validated a new method for the analysis of EtG in hair using only 25 mg of hair with minimal sample preparation starting from the validated method for EtG analysis in meconium. The LLOQ of 20 pg/mg was in the range of the results obtained with LC-MS/MS [105,110,111]. Moreover, the obtained LLOQ is in agreement with the cut-off concentration (30 pg/mg) stated in the Consensus of the Society of Hair Testing (SoHT) on hair testing for chronic excessive alcohol use [112].



### 3.2.3. Use of EtG and EtS for diagnosis maternal consumption

During the past decade, due to the importance of timing of maternal alcohol exposure during pregnancy for neonatal outcomes, EtG and EtS in different biological fluids and tissues have been proposed as maternal biomarkers of ethanol intake (blood, urine and maternal hair).

The maximum concentrations of EtG and EtS in blood are reached 2–3.5 h after ethanol peak and are detectable up to 4–8 h after ethanol elimination [113,114].

In urine, EtG is detectable between 1 h – up to 5 days after ethanol intake [115]; EtS has a shorter detection period in urine (up to 30 h after alcohol ingestion) [116]. Thus, EtG and EtS are considered sensitive urinary alcohol biomarkers that can be excreted in urine for prolonged periods of time compared to ethanol excretion in urine [117]. In this context, it is important to remember the possibility of false negative results in pregnant patients due to the hydrolysis of EtG by *E. coli* in patients with urinary tract infections, which are particularly common among pregnant women [118]. At this time, there is only one study, by Bianchi et al. [34], where the levels of EtG in serum and urine of 64 pregnant women were determined by immunoassay. All the samples were negative for EtG.

EtG determination in hair, it may be possible to discriminate between teetotalers, social drinkers, and heavy drinkers. EtG concentrations below the limit of quantification may indicate weak social drinkers or teetotalers, but do not completely exclude alcohol abuse. Yegles et al. [106] proposed the following preliminary cut-offs using GC-MS:  $C_{EtG} < 8$  pg for teetotalers,  $C_{EtG}$  between 8 pg/mg and 25 pg/mg for social drinkers and for heavy drinkers they proposed a  $C_{EtG} > 25$  pg/mg.

EtG testing in maternal hair samples was not performed until 2008, in a pilot study [119] in Sweden indicating that screening for EtG in parallel with FAEs can identify more potential alcohol consumers among pregnant women than the AUDIT questionnaire alone, but the sensitivity of this test in pregnant women has not been established. Lately, Morini et al. [71] measured EtG in maternal hair by an LC-MS/MS previously published method [110]. They concluded that EtG in maternal hair is not a good predictor of gestational alcohol use due to its impossibility to diagnose an ethanol intake lower than 30 g/day.

### 3.2.4. Determination of EtG and EtS in neonatal matrices

In addition to FAEs testing in meconium and the purpose of discriminating between heavy maternal ethanol use, occasional use or no use at all the determination of EtG and EtS in meconium was proposed as alternative biomarker. In 2008, for the first time, Morini et al. validated a method based on LC-MS/MS with post-column addition of acetonitrile for the measurement of EtG and EtS in meconium [120].

In this context, EtG screening in meconium was proposed as a simple, low-cost and easy-to-perform immunoassay in contrast to the 7 FAEs whilst EtS, considered a more specific biomarker, increases the accuracy of the interpretation and helps to avoid false positive and false-negative results. Recently, in 2010 Tarcomnicu et al. [109] developed and validated a new hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) method for the analysis of EtG in meconium and the results were consistent with previously published ones. Bakdash et al. [82] validated a headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method in combination with GC-MS for EtG analysis.

### 3.2.5. Use of EtG and EtS for diagnosis prenatal exposure to ethanol

Pichini et al. conducted several studies for assessed gestational ethanol exposure in two Mediterranean cohort (Reggio Emilia and Barcelona). On the one hand, they did not find EtG and EtS correlation with total FAEs concentration in meconium, although EtG, EtS

correlated well with ethyl stearate, EtG with ethyl palmitoleate, and EtS with ethyl laurate, myristate and linolenate [71]. On the other hand, EtG values discriminated between samples which tested positive (FAEs > 2 nmol/g) and negative (FAEs < 2 nmol/g) confirming a good qualitative correlation between EtG and EtS [121,122]. Furthermore, positive cut-off of 2.0 nmol/g for EtG yielded the best sensitivity and specificity to discriminate for true prenatal exposure to ethanol [122]. Bakdash et al. [82] in 602 meconium samples, found 97 (16.3%) with detectable EtG at concentrations between LOD and 10,200 ng/g with one outlier of 82,000 ng/g (FAE 10,500 ng/g). On the basis of the above reported cut-offs a 2011 pilot study, carried out by Pichini et al. in 7 neonatology wards along the Italian peninsula, showed an overall prevalence of newborns prenatally exposed to maternal ethanol of 7.9% with a range of exposure going from 0% in Verona to 29.4% in Rome [123].

Recently, for first time, Morini et al. [124] had identified EtG and EtS in placental and fetal tissues obtained from women undergoing voluntary termination of pregnancy at 12 weeks of gestation. 35 placentas and 35 fetal tissue samples were deproteinized and directly injected into a liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system confirming the possibility of testing for both metabolites to evaluate alcohol use in mothers at the beginning of the pregnancy.

## 3.3. Phosphatidylethanol (PEth)

### 3.3.1. Brief description and history

The PEth comprises a group of ethanol-derived phospholipids that have a common phosphoethanol head group onto which 2 fatty acid moieties are attached. PEth is formed from phosphatidylcholine (PC) in cell membranes by a transphosphatidyl reaction catalyzed by phospholipase D [125,126]. Phospholipase D normally hydrolyzes PC into phosphatidic acid (PA) and choline, but because the affinity for ethanol is >1000-fold higher than for water, PEth is formed at the expense of PA when ethanol is present [126–128]. Because PEth is specifically formed in the presence of ethanol and it has a long half-life due to its slow degradation rate [129,130], it has been suggested that PEth could potentially be used as a marker of ethanol use. Indeed, PEth has a mean half-life of about 4 days in blood of alcoholics, and it was still measurable after up to 2 weeks of sobriety [131].

### 3.3.2. Determination of PEth in maternal matrices

Several analytical approaches have been utilized so far for quantifying PEth in blood and other biological matrices and tissues: TLC [129], LC coupled to ESI – [132,133] or TOF – MS [134], LC coupled to an evaporative light-scattering detector (ELSD) [130,132,135], non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) with conventional UV detection [136] and NACE system coupled with an online ESI-MS [137]. The last mentioned method has proved to be sensitive and accurate, currently being the most utilized one.

### 3.3.3. Use of PEth for the diagnosis of gestational alcohol use

The finding that PEth can be detected at even 15–20 days after last alcohol intake, suggests that PEth could prove a useful biomarker for retrospective detection of alcohol use during the first weeks of pregnancy when women may not even be aware of their pregnancy. However, to date there are no published studies in this area except the study from Stewart and co-workers which demonstrates that PEth is a highly sensitive indicator of moderate and heavy alcohol use in women of reproductive age [138]. No studies have been conducted with neonatal matrices so far.

#### 4. Conclusions and perspectives

The fetal, neonatal and maternal matrices are, to different extent, repositories of substances, among them ethanol and its biomarkers to which the fetus is exposed in utero.

Therefore the accurate assessment of fetal exposure to ethanol through the use of these objective biomarkers, could be of major importance since it provides the basis for appropriate treatment and adequate follow-up of exposed newborns. Whereas indirect maternal biomarkers are only indicative of chronic maternal alcohol use and can be unspecific and affected by many physiological and pathological states other than ethanol consumption, direct biomarkers are highly specific especially when measured in fetal/neonatal biological matrices. Only in this latter case, the real exposure to ethanol during intrauterine life can be demonstrated.

In this concern, neonatal meconium is easily obtainable, and gives information about exposure in both the second and third trimester of the pregnancy. Conversely, neonatal hair, formed in the last trimester, is a valued matrix to measure exposure in the later stage of pregnancy; however, in some newborns it is not available in sufficient amounts. Regarding the biomarkers to be measured, FAEEs testing in meconium and hair is presently the most used tool to estimate the incidence of prenatal exposure to ethanol as it has high sensitivity and specificity. Conversely, the other suggested metabolite, EtG, is fifteen years younger than FAEEs, and a lot of the data existing for FAEEs is missing for EtG. Nonetheless, in contrast to FAEEs, which are seven different compounds measurable only by chromatographic methods coupled to mass spectrometry EtG is just one molecule which at moment is also measured by chromatographic assay and mass spectrometric detection, but it could be potentially screened e.g. in meconium samples by a simple, low-cost, easy-to-perform immunoassay, currently available for urine samples, which can be routinely applied in neonatology wards for an early diagnosis of prenatal exposure to ethanol [123].

Using objective biomarkers in a wide variety of matrices already in the prenatal period has been a tremendous step in assessing the deleterious effects of prenatal alcohol exposure. Evaluation of prenatal exposure using different unusual matrices is at times difficult since sampling may be challenging.

Ideally, as many matrices as possible should be sampled to obtain an accurate picture of exposure in the entire prenatal period. Further research is needed using large-scale prospective studies involving pregnant women and their neonates with detailed gestational drinking history to establish a definitive quantitative threshold for the screening test and to correlate distinct drinking behaviours with different test results. Because of the ethical issues involved in conducting such trials, the existing and future biological markers in different matrices in children of all age groups will play a major role in addressing these issues.

#### Acknowledgement

This study was supported by a grant of the Plan Nacional Sobre Drogas (2008/085) from the Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain).

#### References

- [1] H.M. Barr, A.F. Streissguth, Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 283–287.
- [2] R.C. Olson, B.A. Morse, C. Huffon, Development and psychopathology fetal alcohol syndrome and related conditions, *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 3 (2001) 262–284.
- [3] A.P. Streissguth, F.L. Bookstein, H.M. Barr, P.D. Sampson, K. O'Malley, J.K. Young, Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects, *J. Dev. Behav. Pediatr.* 25 (2004) 228–238.
- [4] E.L. Abel, Prevention of alcohol abuse-related birth effects – I. Public education efforts, *Alcohol Alcohol* 31 (1996) 411–436.
- [5] M.G. Klag, L. Bard, Fetal alcohol syndrome prevention: animal and cumulative cost saving, *Neurotoxicol. Teratol.* 25 (2003) 763–765.
- [6] C. Lapton, L. Bard, B. Harwood, Cost of fetal alcohol spectrum disorders, *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 127C (2004) 43–50.
- [7] G. Chang, Alcohol screening instruments for pregnant women, *Alcohol Res. Health* 25 (2001) 204–209.
- [8] M. Russell, S.S. Martier, R.J. Sokol, P. Mudar, S. Jacobson, J. Jacobson, Detecting risk drinking during pregnancy: a comparison of four screening questionnaires, *Am. J. Public Health* 86 (1996) 1435–1438.
- [9] S.B. Rosahl, D. rau, D. Lehmann, M. Prentiss, Gamma-glutamyl transpeptidase in chronic alcoholism, *Lancet* 2 (1970) 1130.
- [10] P. Sillanpaa, N. Mavrot, P. Jousilahti, E. Vartiainen, J. Sundvall, U. Oksa, K. Pitkanen, M. Pussis, J.P. Allen, H. Aho, Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population, *Am. J. Epidemiol.* 152 (2000) 747–751.
- [11] K. Pitkanen, E. Vartiainen, Determinants of gamma-glutamyl transaminase: positive interaction with alcohol and body mass index, negative association with coffee, *Am. J. Epidemiol.* 146 (1997) 1018–1024.
- [12] M. Masuki, M. Ogawa, T. Kitahara, A. Murata, K. Matsuda, G. Kosaki, Development of radioimmunoassay for gamma-glutamyl transaminase using pancreatic enzyme, *Ann. Clin. Biochem.* 26 (1983) 243–250.
- [13] G. Larsson, Prevention of fetal alcohol effects. An antenatal program for early detection of pregnancies at risk, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 62 (1983) 171–178.
- [14] E. Halmesmaki, E. Toimio, M. Salonen, Gamma-glutamyl transaminase, aspartate and alanine aminotransferase and their ratio, mean cell volume and urinary diethylol in pregnant alcohol abusers, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 99 (1992) 287–291.
- [15] M.S. Dwyer, J.A. Dunbar, J. Hagar, R.T. Martin, Alcohol intake and liver function tests, *Ann. Clin. Biochem.* 22 (1985) 104–105.
- [16] A. Helander, O. Beck, A.W. Jones, Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol, *Clin. Chem.* 42 (1996) 618–624.
- [17] H.U. Bergmeyer, F. Scheibe, A.W. Wahlefeld, Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, *Clin. Chem.* 24 (1978) 58–73.
- [18] R.E. Vanderhude, Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 16 (1986) 79–90.
- [19] Y. Littner, C.F. Bozari, Detection of alcohol consumption during pregnancy – current and future biomarkers, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31 (2007) 261–269.
- [20] D.S. Pratt, M.M. Kaplan, Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 1766–1771.
- [21] A. Wu, L. Chanatin, A.J. Lev, Macrocytosis of chronic alcoholism, *Lancet* 1 (1974) 829–831.
- [22] K.M. Conrgrave, P. Davies, F. Haber, J.B. Whitfield, Traditional markers of excessive alcohol use, *Addiction* 98 (2003) 31–41.
- [23] M. Haselblatt, F. Martin, O. Maul, H. Theresrich, G. Kernbach-Wigton, Persistent macrocytosis following abstinence from chronic alcohol use, *JAMA* 286 (2001) 2946.
- [24] G.J. Meerkerk, K.H. Nijss, L.M. Bongers, P. Trienekens, J.A. van Oem, Comparing the diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyl transaminase, and mean cell volume in a general practice population, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23 (1999) 1052–1058.
- [25] R.J. Davidson, F.J. Hamilton, High mean red cell volume: its incidence and significance in routine haematology, *J. Clin. Pathol.* 31 (1978) 493–498.
- [26] T. Sarkola, C.J. Eriksson, O. Niemela, P. Sillanpaa, E. Halmesmaki, Mean cell volume and gamma-glutamyl transaminase are superior to carbohydrate-deficient transferrin and hemoglobin acetaldehyde adducts in the follow-up of pregnant women with alcohol abuse, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79 (2000) 353–366.
- [27] K.M. Conrgrave, L.J. Depuehhardt, J.B. Whitfield, J.B. Saunders, A. Helander, B. Takashoff, C.D. GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/SERRA collaborative project, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 332–338.
- [28] J.P. Allen, R.Z. Litten, Recommendations on use of biomarkers in alcoholism treatment trials, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27 (2003) 1667–1670.
- [29] A. Helander, E. Vabo, K. Levin, S. Borg, Intra- and interindividual variability of carbohydrate-deficient transferrin, and gamma-glutamyl transaminase, and mean corpuscular volume in neonates, *Clin. Chem.* 44 (1998) 2170–2175.
- [30] F. Bertolotti, C. De Paoli, J.P. Faccoli, M.T. Trevisan, M. Fiorani, F. Tagliari, Analysis of carbohydrate-deficient transferrin: comparative evaluation of turbidimetric immunoassay, capillary zone electrophoresis, and HPLC, *Clin. Chem.* 51 (2005) 2368–2371.
- [31] A. Helander, J.P. Whitfield, R. Te Stroot, J.P. Bergstrom, Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1528–1531.
- [32] R.E. Stamber, B. Jusk, P. Fickert, M. Hasler, Increased carbohydrate-deficient transferrin during pregnancy: relation to sex hormones, *Alcohol Alcohol* 31 (1996) 389–392.
- [33] H. Kusan, A. Larsson, O. Aarhous, A. Helander, Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient

- transferrin (CDT) results in testing for risk of alcohol consumption, *Clin. Chim. Acta* 413 (2011) 129–132.
- [34] V. Bianchi, A. Jodis, A. Raspagli, C. Arfani, M. Vidali, Pregnancy and variation of carbonyl-*de*-deficient transferrin levels measured by the candidate reference HPLC method, *Alcohol Alcohol* 46 (2011) 173–177.
- [35] O. Beck, A. Helander, 5-hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake, *Addiction* 98 (2003) 63–72.
- [36] A. Helander, O. Beck, A.W. Jones, Urinary 5HTOL/5HBAAs as biochemical marker of postmortem ethanol synthesis, *Lancet* 340 (1992) 1150.
- [37] J. Dieker, M. Wollersdorf, K. Borucki, W. Weitzmann, G. Weibbeck, O. Beck, S. Borg, F.M. Wurst, Determination of glucuronated 5-hydroxytryptophol (GTOL) a marker of recent alcohol intake, by ELISA technique, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 128–131.
- [38] N. Stephanson, A. Helander, O. Beck, Alcohol biomarker analysis: simultaneous determination of 5-hydroxytryptophol glucuronide and 5-hydroxyindoleacetic acid by direct injection of urine using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 940–949.
- [39] O. Beck, N. Stephanson, M. Bosticher, N. Dahmen, C. Fehe, A. Helander, Biomarkers to disclose recent intake of alcohol: potential of 5-hydroxytryptophol glucuronide testing using new direct HPLC-tandem MS and ELISA methods, *Alcohol Alcohol* 42 (2007) 321–325.
- [40] D.J. Turner, M.F. Sorenk, functional consequences of acetaldehyde binding to proteins, *Alcohol Alcohol Suppl.* 1 (1987) 61–66.
- [41] V.J. Stevens, W.J. Fanti, C.R. Newman, R.V. Sims, A. Cerzani, C.M. Peterson, Acetaldehyde adducts with haemoglobin, *J. Clin. Invest.* 67 (1981) 361–368.
- [42] R. Nichols, J. de Jersey, S. Worrall, P. Wilce, Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance, *Int. J. Biochem.* 24 (1992) 1899–1906.
- [43] M.R. Hakonen, J.K. Nofflinger, C.M. Peterson, Studies of whole blood-associated acetaldehyde levels in teetotalers, *Alcohol* 10 (1993) 409–413.
- [44] P. Sillanpää, K. Seppä, T. Koivumäki, Y. Israel, O. Niemela, Acetaldehyde-modified hemoglobin as a marker of alcohol consumption: comparison of two new methods, *J. Lab. Clin. Med.* 120 (1992) 42–47.
- [45] P. Schmitt-Koppin, M. Frommberger, Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications, *Electrophoresis* 24 (2003) 3837–3867.
- [46] C.M. Peterson, C.M. Pellizzari, Improved method for acetaldehyde in plasma and hemoglobin-associated acetaldehyde: results in teetotalers and alcoholics reporting for treatment, *Alcohol* 4 (1987) 477–480.
- [47] O. Niemela, Y. Israel, Y. Mizoi, T. Fukunaga, C.J. Eriksson, Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human volunteers following acute ethanol ingestion, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14 (1990) 838–841.
- [48] K.C. Lin, L. Lumeng, S. Shaahidi, T. Kelly, D.C. Pound, Protein-acetaldehyde adducts in serum of alcoholic patients, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14 (1990) 438–441.
- [49] G.E. De Benedetto, M. Farigolito, A new CE-ESI-MS method for the detection of stable hemoglobin acetaldehyde adducts, the potential biomarkers of alcohol abuse, *Electrophoresis* 30 (2009) 1798–1807.
- [50] J.D. Bekker, G. Scaslan, J.D. Potter, The identification and partial characterization of acetaldehyde adducts of hemoglobin occurring *in vivo*: a possible marker of alcohol consumption, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 16 (1992) 1093–1101.
- [51] S.E. Hazlett, R.A. Liebelt, W.J. Brown, V. Androsiakakis, D. Jajoua, E.B. Traut Jr., Evaluation of acetaldehyde-modified hemoglobin and other markers of chronic heavy alcohol use: effects of gender and hemoglobin concentration, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 (1998) 1811–1819.
- [52] T. Takeshita, K. Morimoto, Accumulation of hemoglobin-associated acetaldehyde with habitual alcohol drinking in the atypical A1E0E0 genotype, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24 (2000) 1–7.
- [53] O. Niemela, E. Halmesmaki, O. Tikkerkala, Hemoglobin-acetaldehyde adducts are elevated in women carrying alcohol-damaged fetuses, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15 (1991) 1007–1010.
- [54] J.M. Strain, K.S. Huntington, C.M. Peterson, K.P. Peterson, P. Daniel, K.K. Aboagye, E. Lieberman, L. Ryan, L.B. Holmes, The prenatal detection of significant alcohol exposure with maternal blood markers, *J. Pediatr.* 133 (1998) 246–252.
- [55] A. Helander, Biological markers in alcoholism, *J. Neural Transm. Suppl.* 66 (2003) 15–32.
- [56] F.A. Laposata, L.G. Lange, Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse, *Science* 281 (1996) 497–499.
- [57] B.S. Kaphalia, G.A. Amari, Fatty acid ethyl esters and ethanol induced pancreatitis, *Cell Mol. Biol.* 47 (2001) 171–175.
- [58] K.M. Doyle, D.A. Bird, S. al-Salhi, Y. Hallag, J.E. Chaste-Brown, K.A. Goss, M. Laposata, Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 428–437.
- [59] K.M. Doyle, J.E. Chaste-Brown, D.M. Gudge, T.G. Bernhardt, C.R. Muray, M. Laposata, Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake, *JAMA* 276 (1996) 1152–1156.
- [60] C.F. Beazer, S. Goudil, R. Emerson, P. Kinnunen, C.S. Cook, Fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters, *Pediatr. Res.* 31 (1992) 492–495.
- [61] M.A. Refaai, P.N. Nguyen, T.S. Steffensen, R.J. Evans, J.E. Chaste-Brown, M. Laposata, Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for pre-mortem ethanol intake, *Clin. Chem.* 48 (2002) 77–83.
- [62] K. Borucki, S. Kuntzmann, J. Dieker, S. Westphal, S. Diekmann, B. Rogens, C. Loley, In heavy drinkers fatty acid ethyl esters in the serum are increased for 44 h after ethanol consumption, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28 (2004) 1102–1106.
- [63] M.A. Kalarzy, L.A. Duncan, M.V. Merritt, D.E. Epps, Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns, *J. Lipid Res.* 36 (1995) 125–140.
- [64] L. Dan, J.E. Chaste-Brown, A. Khabouzi, M. Laposata, Quantitation of the mass of fatty acid ethyl esters synthesized by Hep G2 cells incubated with ethanol, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 (1998) 1125–1131.
- [65] K. Borucki, K. Schreiner, J. Dieker, K. Jachan, D. Krasse, S. Westphal, F.M. Wurst, C. Loley, H. Schmidt-Gayk, Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29 (2005) 781–787.
- [66] F. Pragst, M. Yegles, Alcohol markers in hair, in: P. Kintz (Ed.), *Analytical and Practical Aspects of Drugs Testing in Hair*, CRC Taylor and Francis, Boca Raton, 2007, pp. 287–323.
- [67] B.S. Kaphalia, P. Cal, M.F. Khan, A.O. Okoroahia, G.A. Amari, Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism, *Alcohol* 34 (2004) 151–158.
- [68] F. Pragst, M. Yegles, Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 255–263.
- [69] V. Kodaga, G. Koren, Hair analysis of fatty acid ethyl esters in the detection of excessive drinking in the context of fetal alcohol spectrum disorders, *Ther. Drug Monit.* 31 (2009) 261–266.
- [70] V. Kodaga, S. Shee, G. Koren, Correlation between drugs of abuse and alcohol by hair analysis: parents at risk for having children with fetal alcohol spectrum disorder, *Alcohol* 44 (2011) 615–621.
- [71] L. Morini, E. Marchei, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, A. Croppi, L. Mastroiustina, S. Pichini, Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair: potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol, *Forensic Sci. Int.* 196 (2011) 74–77.
- [72] V. Anwarter, F. Sporkert, S. Hartwig, F. Pragst, H. Vater, A. Dieleibacher, Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption: Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers, *Clin. Chem.* 47 (2001) 2114–2122.
- [73] V. Anwarter, B. Kieseling, F. Pragst, Squalene in hair – a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 149–159.
- [74] C.F. Beazer, S. Lee, A.E. Salvator, S. Minnow, A. Swick, T. Yamashita, L.T. Singer, Ethyl linoleate in meconium: a biomarker for prenatal ethanol exposure, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23 (1999) 487–493.
- [75] J. Klein, T. Karasikov, G. Koren, Fatty acid ethyl esters: a novel biological marker for heavy intrauterine ethanol exposure: a case report, *Ther. Drug Monit.* 21 (1999) 644–646.
- [76] E.M. Ostrea, J.D. Hernandez, D.M. Bielewicz, J.M. Kan, G.M. Leonard, M.B. Abela, M.W. Church, J.H. Hannigan, J.J. Janisse, J.W. Ager, R.J. Sokol, Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30 (2006) 1152–1159.
- [77] T.G. Bernhardt, P.A. Cannistraro, D.A. Bird, K.M. Doyle, M. Laposata, Purification of fatty acid ethyl esters by solid phase extraction and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 675 (1996) 189–196.
- [78] D. Chan, B. Bar-Oz, B. Perleim, C. Facinorek, J. Klein, B. Kapur, D. Fatine, G. Koren, Population half-life of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto, *Ther. Drug Monit.* 25 (2003) 271–278.
- [79] C.M. Moore, D. Lewis, Fatty acid ethyl esters in meconium: biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates, *Clin. Chim. Acta* 312 (2001) 235–237.
- [80] C.F. Beazer, J.L. Jacobson, S.W. Jacobson, D. Barr, J. Crawford, C.D. Molino, D.L. Viljoen, A.S. Marab, L.M. Chiodo, A.S. Cook, Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol, *J. Pediatr.* 141 (2003) 463–469.
- [81] J.R. Hutson, K. Alekta, F. Pragst, G. Koren, Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2008) 8–12.
- [82] A. Hakouhi, F. Burger, T.W. Goock, P.A. Farthing, U. Rosenthal, S. Bloch, M. Hastedt, M. Rother, M.W. Beckmann, F. Pragst, J. Kornhuber, Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2011) 2469–2477.
- [83] J.R. Hutson, C. Rao, N. Fulga, K. Alekta, G. Koren, An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening, *Alcohol* 45 (2011) 139–150.
- [84] S. Pichini, M. Pellegrini, J. Gamet, O. Garcia-Algar, O. Vall, F. Vagnarelli, F. Zaccaro, E. Marchei, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 927–933.
- [85] H.S. Kwak, Y.S. Kang, K.O. Han, J.T. Moon, Y.C. Chung, J.S. Choi, J.Y. Han, M.Y. Kim, E.Y. Velazquez-Armenta, A.A. Nava-Ocampo, Quantitation of fatty



- acid ethyl ester in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2011) 1871–1874.
- [106] O. García-Algar, V. Kafaga, J. Garret, G. Koren, O. Vall, P. Zaccaro, R. Facelli, S. Pichini, Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 240–254.
- [107] D. Chan, B. Kise, R. Boskovic, G. Koren, Placental handling of fatty acid ethyl ester: perinatal and subsequent studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (2004) 75–82.
- [108] L. Bued, R. Hofer, Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl ester in meconium. *Birth Defects Res. A: Clin. Mol. Teratol.* 82 (2008) 487–492.
- [109] C. Moore, J. Jones, D. Lewis, K. Bush, Prevalence of fatty acid ethyl ester in meconium specimens. *Clin. Chem.* 49 (2003) 133–136.
- [110] C. Doraid, A.R. Katz, D. Easa, Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl ester and cotinine. *Am. J. Epidemiol.* 158 (2002) 705–709.
- [111] J. Peterson, H.L. Kirchner, W. Xue, S. Miznes, L.T. Singer, C.F. Beemer, Fatty acid ethyl ester in meconium are associated with poorer neurodevelopmental outcomes to two years of age. *J. Pediatr.* 152 (2008) 788–792.
- [112] J. Garret, H. Lynn, M. Handley, C. Rao, G. Koren, Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population-based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl ester. *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 229–245.
- [113] J.R. Hutson, K. Magri, J.N. Garret, G. Koren, The incidence of prenatal alcohol exposure in meconium uruguay as determined by meconium analysis. *Ther. Drug Monit.* 32 (2010) 311–317.
- [114] M. Koeslag, D.M. de Paula, E.M. Dosti, M. Yamamoto, Determination of eight fatty acid ethyl ester in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 33 (2011) 2115–2122.
- [115] F.M. Wurst, C.L. Skupper, W. Weimann, Ethyl glucuronide – the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 98 (2003) 51–61.
- [116] F. Pragt, M.A. Balliwa, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 320 (2006) 17–40.
- [117] H. Schloegl, S. Driesen, K. Spaczynski, M. Storzelt, F.M. Wurst, W. Weimann, Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int. J. Legal Med.* 120 (2006) 93–98.
- [118] I. Janá, A. Ab, Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid phase extraction. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 758 (2000) 229–234.
- [119] R. Shan, W.R. Licoarse, An improved method to detect ethyl glucuronide in urine using reversed-phase liquid chromatography and pulsed electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 239–246.
- [120] J. Lohvika, S. Pulkkinen, J. Melkko, O. Niemela, Acetaldehyde adduct in blood and bone marrow of patients with ethanol induced erythrocyte abnormalities. *Mol. Med.* 7 (2001) 401–405.
- [121] H. Zimmer, G. Schmidt, R. Aderjan, Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 11–16.
- [122] L. Krivankova, J. Galavicka, H. Malasikova, P. Gebauer, W. Thomann, Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 2–8.
- [123] F.A. Esteve-Turrillan, W. Fischer, M. Lammerhofer, T. Keller, W. Lindner, Determination of ethyl sulphate – a marker for recent ethanol consumption – in human urine by CE with indirect UV detection. *Electrophoresis* 27 (2006) 4762–4771.
- [124] W. Fischer, M. Lammerhofer, T. Keller, R. Schumacher, K. Kriska, W. Lindner, Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulfate in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78 (2006) 5884–5892.
- [125] C. Jarado, T. Soriano, M.P. Gimenez, M. Menendez, Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl glucuronide. *Forensic Sci. Int.* 146 (2004) 161–166.
- [126] M. Yegles, A. Labatthe, V. Anwaer, S. Harwig, H. Vater, E. Wronig, F. Pragt, Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and non-drinkers. *Forensic Sci. Int.* 146 (2004) 167–173.
- [127] H. Kharbouch, F. Sporkert, S. Tremler, M. Augsburg, P. Mangin, C. Stach, Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2327–2343.
- [128] I. Janá, W. Weimann, T. Koefede, M. Lohde, A. Ab, Determination of ethyl glucuronide in hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 138 (2002) 59–65.
- [129] I. Tarcemescu, A.L. van Nuijs, K. Aerts, M. De Donckere, A. Covaci, H. Neels, Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 196 (2011) 121–127.
- [130] I. Morini, L. Politi, A. Groppi, C. Strammi, A. Poletini, Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 54–62.
- [131] F. Lamonarca, J.M. Guillot, F.L. Saucage, M. Mercemille, C. Vallejo, G. Lachatre, Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2006) 1895–1901.
- [132] F. Kintz, Consensus of the society of hair testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption. *Forensic Sci. Int.* 196 (2010) 2.
- [133] G. Schmitt, R. Aderjan, T. Keller, M. Wu, Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J. Anal. Toxicol.* 19 (1996) 91–94.
- [134] C.C. Hutter, S. Driesen, V. Anwaer, F.M. Wurst, W. Weimann, Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int. J. Legal Med.* 122 (2008) 173–178.
- [135] F.M. Wurst, C. Alling, S. Anandritz, F. Pragt, J.P. Allen, W. Weimann, P. Mansueto, P. Ghosh, E. Lohschman, G.E. Skupper, T. Neumann, C. Spies, M. Jaars, B.A. Johnson, N. Ad-Danaf, F. Ahtar, J.D. Roache, R. Litzen, Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29 (2005) 465–473.
- [136] J.C. Kissack, J. Bishop, A.L. Roper, Ethyl glucuronide as a biomarker for ethanol detection. *Pharmacotherapy* 28 (2008) 769–781.
- [137] K. Janghans, I. Graf, J. Pfluger, G. Wettrelling, C. Ziem, D. Ehrhardt, M. Zehner, L. Dittler, J. Backhaus, W. Weimann, F.M. Wurst, Urinary ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulfate (EtS) assessment: valuable tools to improve verification of abstinence in alcohol-dependent patients during in-patient treatment and at follow-ups. *Addiction* 104 (2009) 921–926.
- [138] F.M. Wurst, G.A. Wimböck, J.W. Metzger, W. Weimann, On sensitivity, and specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine—results from the WHO/SIRRA study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28 (2004) 1220–1228.
- [139] F.M. Wurst, E. Krato, W. Weimann, F. Pragt, M. Yegles, I. Sandstrom Forsman, Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUEIT – a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198 (2008) 491–495.
- [140] I. Morini, E. Marchei, M. Pellegrini, A. Groppi, C. Strammi, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, R. Facelli, S. Pichini, Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of postnatal ethanol exposure? *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 725–732.
- [141] S. Pichini, I. Morini, E. Marchei, I. Palini, M.C. Rotolo, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, O. Vall, P. Zaccaro, Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium to assess postnatal ethanol exposure: preliminary results in new Mediterranean cohort. *Can. J. Clin. Pharmacol.* 16 (2009) 270–275.
- [142] I. Morini, A. Groppi, E. Marchei, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, P. Zaccaro, S. Pichini, Population baseline of meconium ethyl glucuronide and ethyl sulfate concentrations in newborns of non-drinking women in 2 Mediterranean cohorts. *Ther. Drug Monit.* 32 (2010) 355–362.
- [143] S. Pichini, E. Marchei, F. Vagnarelli, I. Taranzi, F. Raimondi, R. Maffucci, R. Sacher, M. Biondella, G. Rappanelli, M.R. Ellico, P. Bidan, P. Zaccaro, R. Facelli, A. Pierantoni, I. Morini, Assessment of prenatal exposure to ethanol by meconium analysis: results of an Italian multi-center study. *Alcohol Clin. Exp. Res.*. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01647.x. in press.
- [144] I. Morini, M. Falcon, S. Pichini, O. Garcia-Algar, P. D'Amico, A. Groppi, A. Luna, Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 418 (2011) 30–36.
- [145] I. Gustavsson, C. Alling, Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (1987) 958–963.
- [146] M. Kobayashi, J.R. Kanfer, Phosphatidylethanol formation via transphosphatidyl transfer by rat brain cytosol/plasma phospholipase D. *J. Neurochem.* 48 (1987) 1597–1603.
- [147] J.H. Enton, Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol. Rev.* 77 (1977) 303–320.
- [148] V. Chulifa-Capt, Y. Ek, M. Lisovitch, Kinetic analysis in mixed micelles of partially purified rat brain phospholipase D activity and its activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neurochem. Res.* 23 (1998) 589–599.
- [149] P. Hansson, M. Caron, G. Johnson, I. Gustavsson, C. Alling, Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21 (1997) 108–110.
- [150] A. Varga, P. Hansson, C. Lundqvist, C. Alling, Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 (1998) 1832–1837.
- [151] A. Varga, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling, Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clin. Chim. Acta* 299 (2000) 141–150.
- [152] T. Gunnarsson, A. Karlsson, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling, G. Odham, Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 705 (1998) 243–249.
- [153] T. Gunnarsson, I. Dittler, A. Karlsson, P. Michelsen, G. Odham, B. Jergil, Separation of polyphosphoinositides using normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection or electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 254 (1997) 293–296.
- [154] A. Tolonen, T.M. Lehto, M.I. Harjuoksa, M.J. Savolainen, A method for determination of phosphatidylethanol from high density lipoprotein by

Author's personal copy

222

X. Jeyu et al. / *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69 (2012) 209–222

- reversed-phase HPLC with TOF-MS detection, *Anal. Biochem.* 341 (2005) 82–88.
- [135] S. Aradottir, B.L. Olsson, Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection, *BMC Biochem.* 6 (2005) 18.
- [136] A. Varga, S. Nilsson, Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol, *Electrophoresis* 29 (2008) 1667–1671.
- [137] A. Nalesso, G. Viel, G. Cecchetto, G. Frison, S.D. Ferrara, Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS, *Electrophoresis* 31 (2011) 1227–1233.
- [138] S.H. Stewart, T.L. Law, P.K. Ranauld, E. Newman, Phosphatidylethanol and alcohol consumption in reproductive age women, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 34 (2011) 488–492.



## **ARTÍCULO 2**

### **FETO-PLACENTAL MORPHOLOGICAL EFFECTS OF PRENATAL EXPOSURE TO DRUGS OF ABUSE**

Ortigosa S., Friguls B., Joya X., Martinez S., Mariñoso M. L.,  
Alameda F., Vall O., Garcia-Algar O.

Reprod Toxicol. 2012 Aug;34(1):73-9.

[PMID: 22525318](#)

FI: 3,226 (2011)



## Resumen

*Introducción.* El objetivo del estudio fue conocer los cambios morfológicos en la unidad feto-placentaria debidos a la exposición prenatal a drogas de abuso.

*Metodología.* Un estudio histomorfométrico ciego se realizó con 225 placentas. En base al análisis de meconio, los recién nacidos fueron clasificados como expuestos y no expuestos a opiáceos, COC, cannabis o alcohol. Para establecer la exposición prenatal al tabaco, se analizó COT en sangre del cordón umbilical.

*Resultados.* No se observaron diferencias significativas a nivel macroscópico. A nivel microscópico se observó una reducción no significativa de la vascularización placentaria en las madres consumidoras de COC, opiáceos y alcohol. Se observó una dilatación de las arterias umbilicales en hijos de madres consumidoras de cannabis, tabaco y alcohol, así como un diámetro interno de la vena umbilical mayor en consumidoras de cannabis y un grosor de la pared de la vena mayor en fumadoras. No hubo diferencias respecto a la presencia de infartos placentarios, calcificaciones, signos de corioamnionitis o cotiledones fragmentados. El uso prenatal de COC y tabaco se asoció con una disminución en el peso y longitud del recién nacido. Por otra parte, el consumo de tabaco se asoció con una tasa más alta de abortos anteriores. Además las madres consumidoras de COC y opiáceos presentaban peor control del embarazo y más infecciones por VHC y VIH.

*Conclusiones.* En conclusión, las placentas de madres que consumen tabaco, COC, opiáceos o alcohol durante el embarazo pueden presentar cambios vasculares que podrían explicar los resultados perinatales adversos en los recién nacidos. Se necesitan más estudios para entender mejor los mecanismos a través de los cuales el consumo prenatal de drogas de abuso produce un menor peso y longitud al nacimiento y un mayor riesgo de aborto.





## Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse

S. Ortigosa<sup>a,b,c</sup>, B. Friguls<sup>a,b,c,d,\*</sup>, X. Joya<sup>a,b,d</sup>, S. Martínez<sup>a,b,d</sup>, M.L. Mariñoso<sup>e</sup>, F. Alameda<sup>e</sup>, O. Vall<sup>a,b,c,d</sup>, O. García-Algar<sup>a,b,c,d</sup><sup>a</sup> Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)- Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain<sup>b</sup> Servei de Pediatría, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain<sup>c</sup> Departament Pediatría, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain<sup>d</sup> Red SAIMS, IETC Instituto Carlos III, Madrid, Spain<sup>e</sup> Servei de Patologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)- Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 March 2011

Received in revised form 4 March 2012

Accepted 6 April 2012

Available online 13 April 2012

## Keywords:

Placental morphology

Drugs of abuse

Prenatal exposure

Cocaine

Alcohol

Opiates

Cannabis

Tobacco

## ABSTRACT

The aim of the study was to find morphological changes in the feto-placental unit due to prenatal exposure to drugs of abuse. A blind histomorphometric study was performed using 225 placentas. Based on meconium testing, the fetuses were classified as exposed or unexposed to opiates, cocaine, cannabis or alcohol. To establish prenatal tobacco exposure, cotinine in cord blood was analyzed. At the microscopic level a non statistically significant reduction of placental vascularization was observed in cocaine, opiates and alcohol using mothers. In addition, alcohol-consuming mothers did not present with larger placental vessel diameter than controls. Prenatal use of cocaine and tobacco was associated with a decrease in newborn weight and length. Furthermore, tobacco use was associated with a higher rate of previous abortions. In conclusion, placentas from mothers using tobacco, cocaine, opiates or alcohol during pregnancy present vasculature changes that may explain the adverse perinatal outcomes in their newborns.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The prevalence of recreational drug abuse among young adults, including women of childbearing age, has increased markedly over the last two decades [1]. Data about prevalence of drug use during pregnancy comes mostly from North America, where estimated rates of infants exposed prenatally to drugs range between 2% and 40% of all live births [2–5]. In Barcelona (Spain), using meconium testing, we found an overall 10.9% positivity for drugs of abuse in a cohort of 1300 women [6]. In a subgroup ( $N=353$ ) of the same cohort, 45% of the women had consumed more than a moderate level of ethanol [7] and 22% of the women were active smokers (unpublished data).

There is consistent evidence in the scientific literature that use of illicit drugs by pregnant women may cause multiple complications for both the baby and the mother [8–10]. Prenatal cocaine use has been associated with placental abruption and premature labor, as well as with increased rate of low birth weight, microcephaly and

congenital anomalies [11–13]. Fetal exposure to opiates has been associated mainly with neonatal withdrawal syndrome [10,14] and poor obstetric outcome. The adverse effects of ethanol in pregnancy are well described by the all-encompassing term: fetal alcohol spectrum disorder (FASD), which includes a range of physical, behavioral, and cognitive deficits [15]. Smoking during pregnancy nearly doubles a woman's risk of having a low-birth weight baby and also increases the risk of preterm delivery [16]. Therefore, the identification of mechanism (pathological, biochemical and epigenetic changes) through which drugs induce their deleterious effects in the fetus is essential.

Although placenta acts as a barrier to protect the fetus from toxic chemicals present in the mother, it has been shown that most drugs used by the mother during pregnancy cross the placenta and reach the fetus [13,17]. These active substances can be metabolized by the placenta and they, as well as their metabolites can accumulate in the placenta or amniotic fluid. These compounds may induce changes in placental morphology by altering angiogenic and endothelial factors and even alter the proper function of the placenta by modifying biochemical pathways involved in hormone synthesis. There are only a few published studies describing morphological changes in the placenta following substance misuse during pregnancy and they have controversial results.

\* Corresponding author at: Servicio de Pediatría, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Paseo Marítimo, 25–29, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932483245; fax: +34 932483254.  
E-mail address: bfriguls@imim.es (B. Friguls).

Within the framework of a population study on prenatal exposure to drugs of abuse called the Meconium Project, 225 placentas were examined in order to determine if gestational drug of abuse consumption (tobacco, alcohol, cannabis, cocaine and opiates) induces morphological changes in the foeto-placental unit. These histomorphometric effects on placenta induced by drugs may alter normal placental function, mainly by producing blood flow disturbances, and may cause the detrimental effects seen in the newborns. Obstetric and perinatal outcomes were also evaluated with the purpose of identifying the effects of exposure to illicit drugs during pregnancy in the fetus and infant.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects and samples

The study was conducted in the Pediatric Unit of the Hospital del Mar in Barcelona (Spain), located in an urban area with a population of low socioeconomic status and a high percentage of immigrants. The study was a satellite of the "Meconium Project" [6]. Between October 2002 and February 2004, 1209 mother-infant dyads met the eligibility criteria (single pregnancies, completed questionnaire and enough meconium for the analysis of drugs of abuse) and agreed to participate in the study. From the initial 1209 mother-infant dyads from the "Meconium Project", 225 mother-newborn pairs and their placentas were included in the present study in order to get a convenient number of exposed samples (positive for drugs) and non-exposed samples (negative for drugs). The study was approved by the Local Ethics Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, and signed informed consent was obtained from all the participants.

The study included anatomopathologic study of placenta, meconium analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) for drugs of abuse, cord blood radioimmunoassay for cotinine, structured questionnaire on socio-economic and demographic characteristics and drug habits during pregnancy administered to all participants the day after the delivery, neonatal somatometry and clinical examination at birth and finally, records of the obstetric history of the mother. Neonatal meconium was collected in the first 24h after birth and was analyzed by LC-MS for the presence of alcohol, opiates, cocaine, cannabinoids and amphetamines or their metabolites, as reported previously by our group [18]. The analyses investigated in meconium to prove drug use (with the corresponding limit of quantification [LOQ]) were 6-monoacetylmorphine (MAM) [1 ng/g], morphine (MOR) [4 ng/g], morphine-3-glucuronide (M3G) [4 ng/g], morphine-6-glucuronide (M6G) [1 ng/g] and codeine (COD) [4 ng/g] for opiates use; cocaine (COCA) [3 ng/g], benzoylecgonine (BE) [4 ng/g] and cocaethylene (COCAETH) [4 ng/g] for cocaine use; D9-tetrahydrocannabinol (THC) [20 ng/g], 11-hydroxy-D9-tetrahydrocannabinol (THC-OH) [20 ng/g], 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) [20 ng/g] for cannabis use and nine fatty acid ethyl esters (FAEEs) (lauric, myristic, palmitic, palmistoleic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, and arachidonic acid ethyl esters) as biomarkers of chronic maternal alcohol intake. The presence of opiates, cocaine or cannabis over and under the limit of quantification classified the fetus as exposed and non-exposed. For alcohol use, samples were considered positive if the total amount of the nine FAEEs was equal or above 2 nmol/g meconium, the cutoff internationally accepted to differentiate heavy maternal alcohol use during pregnancy from occasional use or no use at all [19]. The nicotine daily intake (NDI) was obtained from the average number of cigarettes smoked per day multiplied by the nicotine content (in milligram) of each cigarette. The classification of participants into the smoking or the control group was confirmed using a radioimmunoassay for cord serum cotinine as previously described [20]. All the mothers included in the tobacco group based on questionnaires, had cord serum cotinine values above 14 ng/ml, the cut-off used to distinguish daily smokers from non-smokers [21].

Using the medical reports of the mothers and their newborns we tabulated the following data: (1) mothers: maternal age, parity (term births, preterm births, abortions, living children), perinatal infections (hepatitis B, hepatitis C, HIV, syphilis), prenatal follow-up (lack of prenatal follow-up was defined as less than 3 visits to the obstetrician during pregnancy), hypertension, gestational diabetes, labor complications (meconium stain, premature rupture of membranes, abruptio placentae); (2) newborns: newborn's sex, size, weight and cranial perimeter at birth, gestational age, Apgar score, presence of acidosis (umbilical cord pH < 7.15), presence of withdrawal syndrome (Finnegan's test score over 4 points) and congenital malformations clinically diagnosed at birth.

Of the 225 samples, 162 tested positive for the presence of opiates, cocaine, cannabis or alcohol in meconium and/or positive for cord serum cotinine; they were divided into 6 groups: cocaine (39), opiates (30), cannabis (38), alcohol (32) and tobacco (34). In the 38 samples positive for cocaine, 17 were positive also for opiates, 3 samples had traces of cannabis and 20 were positive for cotinine as well. In the 30 samples positive for opiates, 11 were positive also for cocaine, 2 were positive for cannabis and 14 were also positive for cotinine. In the 38 samples positive for cannabis, 7 were also positive for cotinine. The tobacco and alcohol group were negative for all other substances tested. Finally 63 samples were used as controls

(negative for all drugs in meconium and by interview and negative for cotinine in cord serum). No differences in social class and ethnic origin were found between controls and drug-using mothers [6].

### 2.2. Anatomopathologic study of placenta

#### 2.2.1. Macroscopic study

Fresh placentas were obtained and examined macroscopically no later than 12 h after birth by a pathologist, who determined the following parameters: placental weight,  $p$  largest diameter, smallest diameter, and thickness, umbilical cord length, and diameter and finally the insertion of the umbilical cord (central or marginal). Once the external surface on the maternal and fetal sides and umbilical cord were examined, the placentas were cut into cross sections in order to examine the placental parenchyma. The cuts were made approximately every one and a half centimeter. If no macroscopic lesion were observed, random samples were taken for fixation in formalin, both from placental parenchyma (from the center of the placenta and from the periphery) and from the umbilical cord.

#### 2.2.2. Microscopic study

From the fixed fragments, umbilical cord and cotyledons samples were embedded in paraffin using Tissue Tech VIP, Olympus. The paraffin blocks obtained were cut into 5  $\mu$ m sections, automatically stained with hematoxylin and eosin (Leica ST4080) and mounted with DPX (Leica CV 5030).

The following variables were documented: signs of infarctions, calcifications, acute or chronic chorioamnionitis, presence of fragmented cotyledons and the internal and external diameter of umbilical vein (the umbilical vein thickness was calculated by subtracting the internal diameter from the external diameter). These measurements were performed with the Olympus BX51 microscope at 4 $\times$  magnification with the program Olympus Micro-Controller DP-SP-85. The number of vessels per surface of placenta were also determined: selecting a random surface and with the help of a grid, the number of vessels existing in one area of 25 mm<sup>2</sup> were counted at 25 $\times$  magnification with a Leica Polysar microscope and finally the number of vessels/mm<sup>2</sup> were calculated. Finally, the average diameter of placental vessels was determined by measuring 20 consecutive vessel diameters on the same surface, with the Olympus BX51 microscope at 20 $\times$  magnification, connected to a PC equipped with the Olympus Micro-DP Controller DP-85 program.

### 2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed considering the drug use (yes or no) as the independent variable. Statistical analysis for the categorical variables (marginal insertion, presence of calcifications, presence of infarction, presence of chorioamnionitis signs, newborn sex, maternal hypertension, gestational diabetes) was done with the nonparametric Chi-square test. The parametric Student's *t*-test for independent data was used to compare the averages of continuous variables (all other variables studied). Differences associated with *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was carried out using the statistical package SPSS 12.0 for Windows.

## 3. Results

### 3.1. Macroscopic placental changes (Table 1)

No significant differences were detected between drug users and controls with respect to weight, largest diameter, smallest diameter and thickness of the placenta.

There were no significant differences between drug-users and controls in either the length or the diameter of the umbilical cord. Cord insertion into the placenta, which may be central or marginal, showed no significant differences between positive cases and controls; single umbilical artery was not more frequent in drug using mothers compared to controls.

### 3.2. Microscopic placental changes (Table 1)

The number of vessels/mm<sup>2</sup> was lower but not reaching statistical significance in placentas from mothers who consumed alcohol ( $p=0.013$ ), opiates ( $p=0.024$ ), or cocaine ( $p=0.016$ ) compared to control placentas. There were no differences in the diameter of the placental vessels. Regarding umbilical cord arteries, the diameters of umbilical arteries were significantly higher in cannabis ( $p=0.007$ ), tobacco ( $p<0.001$ ) and alcohol ( $p=0.002$ ) using mothers compared to controls. The internal diameter of umbilical vein was significantly larger in the cannabis-using group compared to

**Table 1**  
Results of macroscopic and microscopic study of the placenta.

	Control (n = 61)	Cocaine (n = 28)	Opiates (n = 30)	Cannabis (n = 38)	Tobacco (n = 34)	Alcohol (n = 32)
<b>Macroscopic placental parameters</b>						
Placental weight (g) mean (S.D.)	603.0 ± 179.1	539.4 ± 102.4	533.2 ± 79.1	598.0 ± 136.1	546.5 ± 110.5	552.6 ± 108.8
Placental largest diameter (mm) mean (S.D.)	211.8 ± 81.4	197.6 ± 78.0	199.5 ± 75.2	200.8 ± 71.4	198.6 ± 10.4	190.9 ± 38.6
Placental smallest diameter (mm) mean (S.D.)	155.8 ± 28.5	160.4 ± 23.6	151.6 ± 25.2	164.1 ± 20.3	164.2 ± 20.9	155.7 ± 29.4
Placental thickness (mm) mean (S.D.)	22.7 ± 4.9	24.2 ± 13.4	25.1 ± 12.3	21.2 ± 4.7	22.2 ± 5.0	20.9 ± 5.4
Umbilical cord length (mm) mean (S.D.)	320.2 ± 110.8	273.9 ± 74.7	312.4 ± 94.3	365.8 ± 121.0	343.6 ± 125.0	337.7 ± 85.3
Umbilical cord diameter (mm) mean (S.D.)	12.3 ± 2.7	12.0 ± 2.9	11.8 ± 3.1	11.8 ± 2.8	11.9 ± 2.7	12.1 ± 2.5
Marginal insertion (%)	9.84	7.41	3.57	7.89	8.82	10
<b>Microscopic placental parameters</b>						
Vessels (mm <sup>2</sup> ) mean (S.D.)	14.9 ± 10	9.5 ± 5.2	30.1 ± 5.7	14 ± 9	12 ± 8.6	10 ± 4.1
Vessel diameter (µm) mean (S.D.)	35.3 ± 3.8	37.3 ± 6.1	38.5 ± 6.5	37.6 ± 7.4	36.6 ± 5.2	39.1 ± 6.2
Umbilical arteries diameter (mm) mean (S.D.)	1.8 ± 0.9	2.2 ± 0.7	2.1 ± 0.9	2.1 ± 0.9 <sup>a</sup> p=0.007	2.6 ± 1.1 <sup>a</sup> p=0.001	2.3 ± 0.47 <sup>a</sup> p=0.002
Umbilical vein external diameter (mm) mean (S.D.)	2.5 ± 1.2	2.3 ± 1.8	3.1 ± 1.6	3.1 ± 1.1	3.1 ± 1.2	2.9 ± 0.8
Umbilical vein internal diameter (mm) mean (S.D.)	1.5 ± 0.8	2.1 ± 1.6	2 ± 1.2	1.9 ± 0.8 <sup>a</sup> p=0.004	1.7 ± 0.8	1.8 ± 0.6
Umbilical vein thickness wall (mm) mean (S.D.)	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 1.2	0.7 ± 0.4 <sup>a</sup> p=0.005	0.6 ± 0.4
Infarctions (%)	4.9	11.1	6.9	5.3	0	6.7
Calcifications (%)	3.3	3.7	3.5	5.3	17.2	13.3
Amenioths (%)	3.3	3.7	3.5	7.8	8.8	10
Fragmented cotyledons (%)	3.3	7.4	0	7.8	5.9	0

<sup>a</sup> Statistically significant parameters p<0.01.

controls, while the external diameter of the umbilical vein was not significantly larger than controls. The umbilical vein thickness wall was significantly larger in the tobacco using group compared to controls ( $p = 0.005$ ).

There were no significant differences with respect to the presence of placental infarctions, calcifications, chorioamnionitis or fragmented cotyledons among different drug-using groups and controls.

### 3.3. Maternal pregnancy outcomes (Table 2)

There were no statistically significant differences between the different groups of drug users and controls regarding maternal age, preterm birth, occurrence of maternal hypertension, gestational diabetes, meconium stained amniotic fluid, premature rupture of membranes or abruptio placentae. However tobacco using mothers had a significantly higher incidence of abortions compared to the controls ( $p = 0.007$ ). Tobacco ( $p = 0.008$ ) and opiates ( $p = 0.001$ ) using mothers showed also a significantly higher parity than the control group. A significantly higher incidence of the following infections: hepatitis C (HCV) ( $p = 0.008$ ) and HIV ( $p = 0.008$ ), but no hepatitis B (HBV) ( $p = 0.032$ ) and syphilis ( $p = 0.032$ ) was observed in cocaine using mothers compared to the controls, whereas mothers who used opiates prenatally showed a significantly higher incidence of HCV ( $p = 0.001$ ) and HIV ( $p = 0.01$ ) infections. In addition, a significant decline in prenatal care in cocaine ( $p < 0.001$ ) or opiates ( $p = 0.006$ ) users was detected.

### 3.4. Perinatal-neonatal outcomes (Table 2)

No significant differences were found in the newborns' sex, gestational age, asphyxia or incidence of congenital malformations clinically diagnosed at birth among the different groups of substance abusers and controls. The at birth length and weight of newborns from mothers using tobacco ( $p = 0.004$  and  $p = 0.001$ , respectively) and cocaine ( $p = 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively) were significantly lower than for the newborns of the non using mothers. Regarding cranial perimeter, no significant differences were found between any of the drug-using groups and the controls. No significant differences were detected in Apgar scores between any drug-using group and controls. Neonatal withdrawal syndrome was significantly more frequent in newborns from cocaine ( $p < 0.001$ ) and opiates ( $p = 0.001$ ) using mothers.

## 4. Discussion

An association between prenatal drugs of abuse consumption and an increased risk of low birth weight, preterm delivery and increased risk of congenital malformations have been reported in the literature; subsequently, the mechanism by which drugs induce these deleterious effects should be investigated. The number of publications on placental histomorphometric effects secondary to prenatal drug use is very limited and the results of the few investigations are not homogeneous. This may be due to interindividual heterogeneity, different levels of drug exposure and/or different methods of assessing the morphologic effects. Placental morphological changes following prenatal exposure to drugs of abuse were investigated at macroscopic and microscopic level. The results showed no relevant changes in the placental vascularization and in cord vessels induced by prenatal drug use.

### 4.1. Macroscopic placental changes

Most studies agree to the lack of relevant changes at macroscopic level following prenatal drugs of abuse consumption, but some authors describe a decrease in placental weight in smokers dependent on the number of cigarettes smoked per day and changes in coloration and decrease in the length of umbilical cord due to gestational smoking [22–24]. Single umbilical artery and thrombosis of the umbilical vein have been associated with prenatal opiates misuse [25,26]. In rats, prenatal use of alcohol causes a reduction in placental weight [27–29]. None of these effects have been observed in the present study.

### 4.2. Microscopic placental changes

#### 4.2.1. Cocaine

It is known that by blocking the reuptake of sympathetic amines, cocaine increases circulating catecholamines level at nerve terminals with a subsequent vasoconstrictive action in arterial beds [30–32]. Uterine vessels are very responsive to the vasoconstrictive effects of cocaine and this leads to diminished uteroplacental blood flow with resulting fetal hypoxia [31,33].

The few studies regarding morphological placental pathology in cocaine users [33–36] did not find significant differences between users and controls (non users) in placental vascularization, infarction areas or calcifications [33–35]. In our study, similar to the data published, hypovascularization of the villi was observed,



**Table 2**  
Maternal and perinatal-neonatal outcomes.

	Control (n = 63)	Cocaine (n = 28)	Opiates (n = 30)	Cannabis (n = 38)	Tobacco (n = 34)	Alcohol (n = 37)
<b>Maternal outcomes</b>						
Maternal age (years) mean ± S.D.	29 ± 6.4	27.5 ± 5	28.7 ± 5.5	29.2 ± 6.4	28.1 ± 5.6	28 ± 5.3
Previous term birth mean ± S.D.	0.5 ± 0.8	1 ± 1.1	1.3 ± 1.2*	0.8 ± 1	0.9 ± 1	0.8 ± 1
			p = 0.001			
Previous preterm birth mean ± S.D.	0 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.6	0 ± 0
Previous abortions mean ± S.D.	0.4 ± 0.7	0.9 ± 1.2	0.5 ± 0.7	0.6 ± 0.9	1 ± 1.2*	0.7 ± 1
					p = 0.007	
Previous living children mean ± S.D.	0.5 ± 0.8	1 ± 1.2	1.3 ± 1.2*	0.8 ± 1	1 ± 1*	0.8 ± 1
			p = 0.001		p = 0.008	
Micronium stain (%)	12.3	17.9	10.3	3.2	11.8	24.1
PRM (%)	7.9	3.7	3.3	8.1	14.3	3.2
HBV (%)	0	7.1	0	0	0	3.1
HCV (%)	0	10.7*	16.7*	2.6	5.9	3.1
		p = 0.008	p = 0.001			
HIV (%)	0	10.7*	10*	0	0	0
		p = 0.008	p = 0.01			
Syphilis (%)	0	7.1	0	0	0	0
Hypertension (%)	0	0	0	2.6	0	0
Gestational diabetes (%)	6.4	3.7	10.3	13.2	8.8	3.2
Abruption placentae (%)	0	3.6	0	0	0	0
Lack of prenatal follow-up (%)	1.6	35*	16.7*	5.3	2.9	3.1
		p = 0.001	p = 0.006			
<b>Perinatal-neonatal outcomes</b>						
Males (%)	42.9	46.4	50	50	38.2	34.4
Gestational age (days) mean ± S.D.	271.8 ± 11.7	267.3 ± 12.4	271.8 ± 10.9	275.2 ± 9.4	271.6 ± 12.5	276.1 ± 8.9
Birth weight (g) mean ± S.D.	3258.1 ± 507.9	2829.8 ± 373.2*	2984.5 ± 426.4	3271.5 ± 565.9	2944.1 ± 497*	3128.1 ± 437.5
		p = 0.001			p = 0.004	
Birth length (cm) mean ± S.D.	49.3 ± 2.3	47.5 ± 2.2*	48.2 ± 2.2	48.2 ± 2.2	47.6 ± 2.6*	48.7 ± 2.2
		p = 0.001			p = 0.001	
Cranial perimeter (cm) mean ± S.D.	34.2 ± 1.6	33.9 ± 1.8	33.9 ± 1.5	34.5 ± 1.5	33.5 ± 1.8	34.3 ± 1.4
Apgar 1 mean ± S.D.	8.9 ± 0.4	9 ± 0.2	9 ± 0.3	8.9 ± 0.6	8.9 ± 0.6	8.8 ± 0.9
Apgar 5 mean ± S.D.	9.9 ± 0.3	10 ± 0	10 ± 0.2	10 ± 0.2	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.3
Acidosis (%)	0	3.7	0	2.9	2.9	0
Withdrawal syndrome (%)	0	21.4*	17.2*	2.6	2.9	0
		p = 0.001	p = 0.001			
Congenital malformations (%)	6.6	0	3.3	2.6	8.8	13.8

PRM, premature rupture of membranes; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus.

\* Statistically significant parameters  $p < 0.01$ .

without reaching statistical significance. This phenomenon could be explained by an uteroplacental vasoconstriction that would lead to a long lasting underperfusion with a subsequent reduction in the number of placental vessels/mm<sup>2</sup>.

#### 4.2.2. Opiates

Several authors [28,29] documented increased vascularization of the villi, increased necrosis and increased microfibrin deposits in placentas from heroin addicted women. In contrast, we observed only a non significant hypovascularization in placentas from opiate using mothers compared to controls. As acetylcholine causes dilation of blood vessels, morphine and derivatives could induce excessive vasoconstriction by interfering with acetylcholine release through an opiate kappa receptor which, in turn could lead to underperfusion of the feto-placental unit inducing hypovascularization of the villi.

#### 4.2.3. Tobacco

The most prominent alterations in smoking women are maturative changes of the normal placenta, with an intensification of the degenerative and aging process which includes an increase of fibrosis and atrophic and hypovascular villi [22,23,37–42]. Proposed mechanisms by which smoking leads to these pathological placental changes include vasoconstriction in the uterine and placental vessels. This vasoconstriction would lead to feto-placental underperfusion and chronic hypoxia.

Although a decrease in volume, area and length of placental vessels from smokers have been observed by some authors

[38,39,41–44], we did not find significant differences in the number of placental vessels/mm<sup>2</sup> between tobacco using mothers and controls. It could be that this phenomenon is only observed in heavy smokers (more than 25 cigarettes per day); although our participants were considered daily smokers (cord serum cotinine >14 ng/ml), only a few admitted.

#### 4.2.4. Cannabis

For the first time, our study reports that there are no significant differences in the placental villi between controls and cannabis using mothers.

#### 4.2.5. Alcohol

It is known that the primary cardiovascular effect of alcohol is systemic vasodilation, but some authors using perfusion techniques have observed that exposure to alcohol produces a dose-dependent vasoconstriction at utero-placental level that is lasting as long as ethanol is present in maternal circulation [45–50]. On the other hand, it has been demonstrated that ethanol stimulates endothelial nitric oxide (NO) synthase and enhances the production of NO involved in the regulation of vascular tone in feto-placental circulation protecting against acute vasoconstriction [47,50,51]. In our study, with a high prevalence of prenatal alcohol consumption, we observed statistically non significant hypovascularization of the placenta and vasodilation of placental vessels in alcohol using women. Vasodilator factors produced by endothelial cells of placental vessels such as NO and prostacyclin could induce a vasodilation response to ethanol more persistent than the rapid and



evanescent vasoconstriction observed *in vitro*. The most important consequence would be deleterious effects on neurodevelopment in the future follow up.

#### 4.2.6. Microscopic changes in umbilical vessels

Perfusion studies indicated that alcohol produces a rapid vasoconstriction in umbilical vessels [41,42,49] and as a response to such vasospasm and the subsequent fetal stress, circulating angiotensin II would increase and would relax the umbilical vein. The mechanism by which tobacco acts on the umbilical vessels is unknown. It could be through a direct effect or due to a secondary response to previous hypoxia. In the present study an enlarged umbilical vessel diameter was observed in cannabis, alcohol and tobacco using mothers. We cannot associate the vasodilation of umbilical vessels to a direct effect of cannabis, because it could be due to tobacco mixed with cannabis when smoked.

#### 4.3. Maternal pregnancy outcomes

It is generally accepted that placental circulation is reduced in pregnant women with hypertension and gestational diabetes. In our study cohort there were no differences in maternal age or in the number of mothers with hypertension and gestational diabetes, therefore the changes observed in the placental circulation must be attributed to the effects of the drugs of abuse. Substance abuse by pregnant women has been associated with a decrease of prenatal care, maternal malnutrition and increased incidence of infections such as HBV or HCV, HIV and other sexually transmitted diseases [10,13,17,52,53]. The results of our study also point in this direction.

Tobacco, alcohol and cocaine use during pregnancy have been associated with an increased rate of abortions [8,23,54–58]. In our cohort a higher rate of previous abortions in tobacco users but not in alcohol or cocaine users was reported. In agreement with other authors [59], we found that parity was higher in opiates or tobacco users compared to controls, suggesting less family planning by these mothers.

#### 4.4. Perinatal–neonatal outcomes

Increased risk of perinatal death, asphyxia, and prematurity, decrease in somatometric parameters, and lower Apgar scores in newborns from drug using mothers have been documented previously [8–10,13,30,52,58,60]. Our study failed to find association between Apgar score and prenatal drug misuse, but a higher rate of acidosis phenomenon was noticed in newborns from cannabis using mothers.

A decrease in newborn weight in association with prenatal use of tobacco, alcohol, cocaine and opiates has been largely documented in the previous years [8,28,29,40,58–60]. In our study, reduced size and weight at birth were observed, without involvement of head circumference in newborns from tobacco and cocaine using mothers, but newborns from alcohol and opiates using mothers did not show significantly lower birth weight compared to controls. The amount of alcohol intake in participants from different studies during pregnancy is highly variable; this could possibly explain the heterogeneity of the results.

The results of our study suggest that prenatal drug use induces alterations on the feto-placental vasculature that would induce blood flow disturbances and may be responsible for the harmful effects seen on neonates exposed to drugs during the fetal life. The next step in order to elucidate the mechanism by which drugs induce these deleterious effects on neonates would be to focus on the angiogenic and endothelial factors involved in blood flow regulation of the feto-placental unit. By studying biochemical pathways and genetic mechanisms by which drugs of abuse may modify

placental function, we would obtain a better understanding of the damaging effects of prenatal drug use.

#### 5. Strengths

The main advantage of our study is that prenatal cocaine, opiates, cannabis and alcohol use were assessed using an objective biological marker: LC-MS analysis of drugs in meconium. Information on prenatal use of tobacco was obtained by structured questionnaire and verified by analyzing cord serum cotinine. Meconium analysis extends the window of detection from approximately 20 weeks of gestation to birth and has been used as the main matrix to assess fetal exposure to drugs [6,61–63].

Cord serum cotinine is considered the most adequate biomarker of fetal exposure to smoking at the end of pregnancy. Most of the published histomorphometric studies on placentas from drug using women are based only on maternal interview, but as there is a trend to under-report recreational drug use during pregnancy, data obtained directly from these women is inconsistent. Other studies regarding the effects of drugs on placenta reported on the analysis of drugs of abuse in urine or blood but these are limited to detecting only acute exposure to drugs in the previous 24–48 h. Another advantage of our study is that we analyzed simultaneously for the five drugs of abuse most consumed in the western world and the control group tested negative for all drugs tested.

#### 6. Limitations

There were several limitations to our study. Some of the mothers belonging to cocaine, opiates and cannabis group also admitted to prenatal use of tobacco and/or alcohol. As monodrug use of only one illicit drug is not common, these groups were not absolutely pure. Due to the very low prevalence of amphetamines use during pregnancy in our cohort, we did not have a group exposed prenatally to amphetamines. High cutoff concentrations for the cannabinoids (20 ng/g) can be also a limitation. All samples came from one single hospital with a low socio-economic population but with a high rate of drug use. Even though the project started with a large number of samples as we divided them in 6 groups, the number of samples for each group is low. Maternal consumption of drugs of abuse prior to meconium formation was not captured.

#### 7. Conclusions

Newborns from mothers using cocaine or tobacco during pregnancy have lower birth weight and length than controls and mothers using tobacco have higher rate of abortions. From the results obtained we conclude that gestational use of tobacco, cannabis, and alcohol could induce microscopic changes in placentas at the vasculature level, although not all the variables measuring placental vasculature were significant for each of them. These vascular changes would lead to underperfusion of the feto-placental unit producing a hypoxic microenvironment. Adverse perinatal events and newborn anomalies from drug-using mothers could be explained by the hypoxia of the feto-placental unit induced by prenatal use of drugs of abuse. More studies are needed for a better understanding of the mechanism through which prenatal use of drugs results in lower-birth weight and height babies and increased risk of abortion.

#### Conflict of interest

There is not actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationship with other people or organizations that may inappropriately influence the author's work.

## Acknowledgements

This study was supported by intramural funding of the Neuropsychopharmacology Program at IMIM-Hospital del Mar and partially supported by Generalitat de Catalunya (Spain) AGAUR (2009SGR1388), Red SAMID, RETIC Instituto Carlos III and Universitat Autònoma de Barcelona.

## References

- Informe anual. Observatorio Europeo de las Drogas y Toxicomanías; 2009.
- Birchfield M, Scully J, Handler A. Perinatal screening for illicit drugs: policies in hospitals in a large metropolitan area. *Journal of Perinatology* 1999;15:208–14.
- Lester BM, Elshohy M, Wright JL, Smeltzer VL, Verter J, Bauer CR, et al. The maternal lifestyle study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 2001;107:309–17.
- Bar-Oz R, Klein J, Karakov T, Koren G. Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2003;88:F98–100.
- Gilgley KM, Evans AF, Hamon RL, Samuels SJ, Batza KK. The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990;163(5 Pt 1):1525–42.
- García-Algar O, Vall Combellas O, Puig Solà C, Mar Sierra A, Scarsavelli G, Pacifici R, et al. Prenatal exposure to drugs of abuse using meconium analysis in a low socioeconomic population in Barcelona. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain)* 2009;70:151–8.
- García-Algar O, Kolaga V, Garret J, Kören G, Vall O, Zaccaro P, et al. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Therapeutic Drug Monitoring* 2008;30:249–54.
- Levy M, Koren G. Obstetric and neonatal effects of drugs of abuse. *Emergency Medicine Clinics of North America* 1990;8:613–52.
- Schompf AH. Illicit drug use and neonatal outcomes: a critical review. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2007;62:749–57.
- Shankaran S, Lester BM, Dai A, Bauer CR, Rada HS, Lagasse L, et al. Impact of maternal substance use during pregnancy on childhood outcome. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2007;12:143–50.
- Chanoff JL, Bussey ML, Savich R, Stack CM. Perinatal cerebral infarction and maternal cocaine use. *Journal of Pediatrics* 1986;108:664–9.
- Chanoff JL, Griffith DR. Cocaine: clinical studies of pregnancy and the newborn. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989;562:260–6.
- Hills JE, Byrd LD, Saxon WR, Paterson-Barnes CA. In utero exposure to cocaine: a review. *Southern Medical Journal* 1993;86:725–31.
- Winklbauer B, Jung E, Fischer G. Opioid dependence and pregnancy. *Current Opinion in Psychiatry* 2008;21:255–9.
- Sokol RJ, Delaney-Black V, Muehlenberg B. Fetal alcohol spectrum disorder. *Journal of the American Medical Association* 2002;287:2996–9.
- Anders RL, Day MC. Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Seminars in Neonatology* 2000;5:231–41.
- Kuczkowski KM. The effects of drug abuse on pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2007;19:578–85.
- Pichini S, Puig C, Zaccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo L, et al. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Science International* 2005;152:59–65.
- Chan D, Bar-Oz R, Pellerin E, Facionek C, Klein J, Kapur R, et al. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of non-drinking women in Jerusalem and Toronto. *Therapeutic Drug Monitoring* 2002;25:771–8.
- Pichini S, Baragana KB, Pacifici R, García O, Puig C, Vall O, et al. Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 2000;108:1079–83.
- Nafstad P, Kongerud J, Borgen G, Urdahl P, Siland T, Pedersen ES, et al. Fetal exposure to tobacco smoke products: a comparison between self-reported maternal smoking and concentrations of cotinine and thiocyanate in cord serum. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1996;75:302–7.
- Demir E, Demir AY, Yilmaz M. Structural changes in placental barrier of smoking mother. A quantitative and ultrastructural study. *Pathology Research and Practice* 1994;190:656–67.
- Jainian L, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the foeto-placental unit. *Early Human Development* 2007;81:699–706.
- Christianson RE. Gross differences observed in the placentas of smokers and nonsmokers. *American Journal of Epidemiology* 1979;110:178–87.
- Kopp W, Vogel M. Histologic and morphometric findings in placentas of heroin addicts (author's transl). *Zeitschrift für Geburtshilfe und Perinatology* 1982;186:37–40.
- Vavrickova B, Binder T, Vilková J, Zivny J. Placental and umbilical cord changes in drug-addicted women. *Ceska Gynecologie* 2001;66:345–9.
- Cundogan F, Elwood G, Longato L, Tsog M, Fejoo A, Carlson RL, et al. Impaired placentation in fetal alcohol syndrome. *Placenta* 2008;29:148–57.
- Karimski M, Rumeau C, Schwartz D. Alcohol consumption in pregnant women and the outcome of pregnancy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1978;2:155–63.
- Holmstedt C, Dahlgrén I, Rydberg U. Outcome of pregnancy in women treated at an alcohol clinic. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 1981;67:236–48.
- Plessinger MA, Woods Jr JR. Maternal, placental, and fetal pathology of cocaine exposure during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1993;36:267–78.
- Patel TG, Langstaff RG, Grosse EA, Dow Edwards DL. Cocaine decreases utero-placental blood flow in the rat. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 1999;21:559–65.
- Woods JR. Maternal and transplacental effects of cocaine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;846:1–11.
- Cejtin HE, Young SA, Ungarven J, Avicjan D, Inam S, Tsengpoeng E, et al. Effects of cocaine on the placenta. *Pediatric and Developmental Pathology* 1999;2:143–7.
- Salfub AS, DeVase CL, Mediano T, Bush WC, Tebbett IR, Shiverick KT. Fetoplacental growth and placental protein synthesis in rats after chronic maternal cocaine administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994;270:392–8.
- Gilbert WM, Lafferty CM, Benirschke K, Resnik E. Lack of specific placental abnormality associated with cocaine use. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990;163:998–8.
- Mooney EE, Duggan KA, Herbert WM, Layfield II. Placental pathology in patients using cocaine: an observational study. *Obstetrics and Gynecology* 1998;91:925–9.
- Ashfaq M, Jarjis MZ, Nawaz M. Effects of maternal smoking on placental morphology. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad* 2003;15:12–5.
- Mochizuki M, Maruo T, Masuko K, Ohtsu T. Effects of smoking on fetoplacental-maternal system during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1984;149:413–20.
- Burton GJ, Palmer ML, Dalton KJ. Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1995;98:307–15.
- Vogt Hansen C. Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatric and Developmental Pathology* 2004;7:433–42.
- Ammissen I. Ultrastructure of the human placenta at term. Observations on placentas from newborn children of smoking and non-smoking mothers. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1977;56:119–26.
- Ganapathy V, Leibach FH. Human placenta: a direct target for cocaine action. *Placenta* 1994;15:785–95.
- Larsen LG, Clausen HV, Jonsson I. Stereologic examination of placentas from mothers who smoke during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002;186:531–7.
- van der Veen F, Fox H. The effects of cigarette smoking on the human placenta: a light and electron microscopic study. *Placenta* 1987;8:243–56.
- Siler-Khodr TM, Yang Y, Grayson MB, Henderson GL, Lee M, Schenker S. Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol* 2000;21:169–80.
- Alhara BM, Alhara BT, Cavella A, Chatterjee M, Halevy S, Tejada R. Alcohol produces spasm of human umbilical blood vessels: relationship to fetal alcohol syndrome (FAS). *European Journal of Pharmacology* 1982;86:311–2.
- Acovedo CG, Carrasco G, Barotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. *Life Sciences* 2001;58:2893–903.
- Kay HH, Grindle KM, Magnus RE. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000;182:682–8.
- Saevy-Moore RT, Dombrowski MP, Cheng A, Abel EA, Sokol RJ. Low dose alcohol contracts the human umbilical artery in vitro. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1989;13:40–2.
- Acovedo CG, Huambachano AM, Bravo I, Contreras E. Endogenous nitric oxide attenuates ethanol induced vasoconstriction in the human placenta. *Gynecology and Obstetric Investigation* 1997;44:153–6.
- Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997;166(1):274–30.
- Vucinic M, Raje D, Vucinic J, Capkun V, Bucal M, Banovic I. Maternal and neonatal effects of substance abuse during pregnancy: our ten-year experience. *Yonsei Medical Journal* 2008;49:105–13.
- Thaitanyanont P, Limpontsarnak S, Prasitsawana P, Parachattanon S. Perinatal effects of amphetamine and heroin use during pregnancy on the mother and infant. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2005;88:1506–13.
- Zlatavkovic T, Gerbaev O, McMaster ME, Fisher SJ. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta* 2005;26(Suppl. A):S81–4.
- Chanoff JL, Burns WJ, Schnell SH, Burns KA. Cocaine use in pregnancy. *The New England Journal of Medicine* 1985;313:666–9.
- Kain ZM, Einar S, Barash PG. Cocaine abuse in the parturient and effects on the fetus and neonate. *Anesthesia and Analgesia* 1993;77:835–45.

Author's personal copy

X. Oteiza et al. / *Reproductive Toxicology* 34 (2012) 73–79

79

- [57] Sokol RJ, Miller SL, Eberl G. Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiologic study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1990;14: 135–45.
- [58] Effects of in utero exposure to street drugs. *American Journal of Public Health* 1993;83(Suppl.): 1–32.
- [59] Dembrowski MP, Wolfe HM, Welch RA, Evans M. Cocaine abuse is associated with abruptio placentae and decreased birth weight, but not shorter labor. *Obstetrics and Gynecology* 1991;77: 139–43.
- [60] Adhikari A, Moretti ME, Ahmed Syed F, Einarson TR, Koren G. Fetal effects of cocaine: an updated meta-analysis. *Reproductive Toxicology* 2001;15: 341–69.
- [61] Lozano J, García-Algar O, Vall O, de la Torre E, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29:711–34.
- [62] Eberl L. Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defects Research Part A, Clinical and Molecular Teratology* 2009;82: 487–91.
- [63] Cray TR. Identification of prenatal amphetamines exposure by maternal interview and meconium toxicology in the Infant Development, Environment and Lifestyle (IDIAL) study. *Therapeutic Drug Monitoring* 2009;11:769–75.



## **ARTÍCULO 3**

### **COCAINE USE DURING PREGNANCY ASSESSED BY HAIR ANALYSIS IN A CANARY ISLANDS COHORT**

Joya X., Gomez-Culebras M., Callejón A., Friguls B., Puig C.,  
Ortigosa S., Morini L., Garcia-Algar O., Vall O.

BMC Pregnancy Childbirth. 2012 Jan 9;12:2.

[PMID: 22230295](#)

FI: 2,834 (2011)



## Resumen

*Introducción.* El consumo de drogas durante la gestación es difícil de determinar, y los cuestionarios maternos suelen ser imprecisos. El objetivo de este estudio es estimar la prevalencia del consumo de drogas entre mujeres embarazadas mediante el análisis de pelo materno.

*Metodología.* Se realizó un análisis toxicológico de pelo para detectar el consumo crónico de drogas durante la gestación. Entre los años 2006-2007, se incluyeron 347 parejas madre-recién nacido del Hospital de La Candelaria, Santa Cruz de Tenerife. Se obtuvieron datos sobre las características socioeconómicas y sobre el consumo de sustancias de abuso durante el embarazo mediante un cuestionario estructurado. Se revisaron las historias de las madres y los recién nacidos. Se detectaron drogas de abuso (opióceos, COC, cannabinoides y AP) en pelo materno mediante inmunoensayo seguido por cromatografía de masas para su confirmación y cuantificación.

*Resultados.* El análisis de pelo detectó positividad en un 2,6% para COC y/o sus metabolitos. La etnia de los padres o su nivel socioeconómico no se asociaron con el consumo de COC durante la gestación, pero su consumo parece más prevalente en madres españolas con empleos no cualificados. Por otro lado, la exposición prenatal a COC se asoció a un mayor porcentaje de padres fumadores activos y la presencia de otros fumadores en el hogar y con el consumo de antidepresivos. El uso de COC durante la gestación se asoció con patrones de comportamiento con efectos potencialmente dañinos para el recién nacido.

*Conclusiones.* Los resultados del estudio muestran un consumo importante de COC en las mujeres embarazadas en las Islas Canarias. Los datos podrían ser utilizados con el propósito de realizar una estrategia preventiva destinada a detectar y posiblemente evitar en el futuro la exposición prenatal a drogas de abuso.





## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

## Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort

Xavier Joya<sup>1,2,3</sup>, Mario Gomez-Culebras<sup>4</sup>, Alicia Callejón<sup>4</sup>, Bibiana Friguls<sup>1,2,3,5,6</sup>, Carme Puig<sup>1,2,3</sup>, Sandra Ortigosa<sup>1,2,3,5,6</sup>, Luca Morini<sup>7</sup>, Oscar Garcia-Algar<sup>1,2,3,5,6\*</sup> and Oriol Vall<sup>1,2,3,5,6</sup>

### Abstract

**Background:** Drug use during pregnancy is difficult to ascertain, and maternal reports are likely to be inaccurate. The aim of this study was to estimate the prevalence of illicit drug use among pregnant women by using maternal hair analysis.

**Methods:** A toxicological analysis of hair was used to detect chronic recreational drug use during pregnancy. In 2007, 347 mother-infant dyads were included from the Hospital La Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands (Spain). Data on socioeconomic characteristics and on substance misuse during pregnancy were collected using a structured questionnaire. Drugs of abuse: opiates, cocaine, cannabinoids and amphetamines were detected in maternal hair by immunoassay followed by gas chromatography-mass spectrometry for confirmation and quantitation.

**Results:** Hair analysis revealed 2.6% positivity for cocaine and its metabolites. Use of cocaine during pregnancy was associated with unusual behaviour with potentially harmful effects on the baby.

**Conclusions:** The results of the study demonstrate significant cocaine use by pregnant women in Canary Islands. The data should be used for the purpose of preventive health and policy strategies aimed to detect and possibly to avoid in the future prenatal exposure to drugs of abuse.

### Background

As documented by the European Monitoring Centre on Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), drug use in Spain shows a growing trend. The prevalence for cocaine use appear to be at 3% [1], exceeding the rates reported from USA [1,2]. When cocaine is used during pregnancy, it can affect the cardiac and vascular systems of both, the pregnant woman and the foetus. The effects of cocaine on the foetal-placental unit can lead to placental detachment or diminished blood flow with subsequent hypoxia [3-5]. This could explain the frequency of spontaneous abortions and foetal deaths observed in cocaine abusing mothers [6].

The information in the literature regarding the prevalence of recreational drug use, specifically in pregnant women is limited. Studies carried out in USA estimate the rates of infants exposed prenatally to illicit drugs to be between 6% and 40% of all live births [7-11]. In Spain,

the single large study focused on prenatal exposure to drugs of abuse was conducted in Barcelona (alcohol, tobacco and prescription drugs were not included); using meconium testing an overall positivity of 10.9% for any drug of abuse was shown [12].

It is well known that maternal self-reports on drug use history proved to be unreliable therefore an objective biological marker which can yield a cumulative reflection of long-term exposure to illicit drugs is needed. Since drugs and their metabolites are permanently deposited in the protein matrix of the hair, they can be detected in hair several months after use, which provides an advantage over other biological markers, such as urine or blood which are limited to present only a "snapshot" of acute exposure to drugs in the previous 24-48 hours [13-15]. Moreover, maternal hair analysis allows for drug use studies in the first trimester of pregnancy and has proven to be more sensitive and stable compared to other matrices with large exposure windows, such as meconium or neonatal hair [16-19]. Acquiring maternal hair is easy and availability is a non-issue.

\* Correspondence: [OGA58@rus.irisnet.es](mailto:OGA58@rus.irisnet.es)

<sup>1</sup>Unitat de Recerca Infància i Entorn (IREE), Institut de Recerca Parc de Salut Mar (IRBM-Parc de Salut Mar), Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Prenatal exposure to drugs of abuse is, of course, dependent on maternal use during pregnancy. The exposure data is different in every area, depending on socio-economic and geographical factors. Prevalence of prenatal drug exposure in the Canary Islands is unknown. These islands are located in the Atlantic Ocean, about 100 km from the nearest point of the North African coast (south west of Morocco). The economy of Canary Islands is based on a few sectors: tourism and, to a much lesser extent, farming and fishing. Tenerife, the largest and most populated of the seven Canary Islands contains 43% of the total population of the Canary Islands and it is well known for being a holiday resort with a thriving night life, associated with clubs, music and recreational drugs use.

The aim of this study was to estimate the prevalence of illicit drug use among pregnant women in Tenerife by using maternal hair analysis.

## Methods

### Subjects and samples

The study was carried out in the paediatric department of the Hospital La Candelaria of Santa Cruz de Tenerife, Spain, the main hospital of the island. Between June 2006 and June 2007, 347 mother-infant dyads agreed to participate in the study, without any refusal. Fifteen dyads were not included due to different reasons: language issues, death of newborn, critical illness of the mother. ( $N = 347$ ). The study was approved by the Institutional Ethical Committee, conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and signed informed consent was obtained from participant parents. Parental socio-demographic characteristics, life habits and drug habits during pregnancy were recorded in previously validated questionnaires administered to all participants the day after the delivery (Additional file 1) [10-12,15,17,20]. Obstetric history of the mother was collected and neonatal anthropometric characteristics using customised growth charts for birth weight and height and clinical examination at birth were also recorded.

On the day of delivery, a lock of scalp hair approximately 0.5 cm thick was cut from the posterior vertex of the mothers as closely as possible to the skin. Since hair grows at an approximate rate of 1 cm/month, in order to document exposure in the last trimester of pregnancy, the proximal segment (3 cm long) of the hair was considered for the analysis of drugs of abuse. Hair was collected in accordance with the SoHT (Society of Hair Testing) recommendations and it was stored at room temperature in a paper bag until analysis [21].

### Determination of drugs of abuse in hair samples

Drugs of abuse including all the principal psychotropic drugs and metabolites (6-monoacetylmorphine (6-MAM), morphine and codeine for opiates; cocaine,

benzoylecgonine (BEG) and cocaethylene for cocaine;  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) for cannabinoids; and amphetamine, methamphetamine, and 3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA) for amphetamines were quantified.

Immunochemical screening for drugs of abuse in hair was done with Siemens EMIT<sup>®</sup> II Plus assay for opiates, amphetamines and ecstasy and Microgenics CEDIA<sup>®</sup> assay for cocaine. All the samples with positive results in the screening test (the cut-off values for opiates, amphetamines, ecstasy, cocaine, and THC (directly, not included in the previous screening) were 0.20 ng/mg, 0.50 ng/mg, 0.50 ng/mg, 0.20 ng/mg, and 0.50 ng/mg respectively) for any drug and/or metabolite were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) for confirmation and quantitation [9,15,21-23].

GC/MS analyses were carried out on an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with 5973 mass-selective detector and a 7673 automatic injector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Limits of quantification in hair were 0.2 ng/mg for 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine, 0.5 ng/mg for cocaine, BEG and cocaethylene; 0.1 ng/mg for  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 0.2 pg/mg 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and 0.2 ng/mg for amphetamine, methamphetamine, and MDMA.

### Statistical analysis

The continuous variables that followed a normal distribution were presented as mean and standard deviation. The categorical variables were presented as percentages and were compared between variables with the Chi-square. P value of less than 0.05 (two-tail) was considered to be statistically significant.

An initial descriptive statistical analysis of socio-demographic characteristics of mothers and anthropometric data of the newborns was completed for the 347 mother-infant dyads participating in the study. The group of positive mother-infant dyads was compared with the group of negative mother-infant dyads for any drug. Statistical analysis was performed considering the drug use (yes or no) as the dependent variable. For the bivariate analysis of the data we used the Student's t test for independent groups to compare between means of a continuous variable and the Chi-square test to compare between categorical variables. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Database management and statistical analysis were performed with SPSS v 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

## Results

### Socio-demographic characteristics and obstetric history

The mean age of the 347 mothers was 30 years. Seventeen percent were migrants, 85% from South-America. With respect to the level of schooling, 29% had a

university degree and 22% had only primary schooling. Regarding obstetric history, 49% were at their first pregnancy, and 22% had previous spontaneous abortions.

Parental socioeconomic and demographic characteristics in relation to results obtained by hair analysis are reported in Table 1. Parental ethnicity and maternal or paternal socioeconomic status were not associated with cocaine use during pregnancy, but cocaine use appeared to be more prevalent in Spanish mothers with unskilled jobs. On the other hand, the exposure to cocaine during pregnancy was associated with a significantly higher percentage of active tobacco smoking fathers and the presence of other smokers at home. There were no false negatives in our study population comparing biomarkers to questionnaires (admission of substance misuse). Finally, cocaine use during pregnancy was associated with antidepressants use.

#### Concentrations levels of drugs of abuse in hair from pregnant women

Of the 347 maternal hair samples minimum 3 cm long, 9 (2.6%) were positive for cocaine and/or BEG, its principal metabolite. All the samples were negative for the other drugs of abuse including cannabis, amphetamines, methamphetamines, opiates, and MDMA.

Cocaine concentration in hair ranged between 0.25 and 2.06 ng/mg with a median value of 1.1 ng/mg and BEG concentration ranged between 0.31 and 3.18 ng/mg with a median value of 1.55 ng/mg. Benzoyllecgonine/cocaine ratios ranged between 0.05 and 1.61 with a median value of 0.84.

#### Obstetric history and newborn anthropometric characteristics at birth

The obstetric history and newborn anthropometric characteristics are presented in Table 2. Maternal age was not associated with substance misuse. Drug using mothers had a higher number of previous abortions. There were no significant differences with respect to newborn's sex between the positive and negative groups, but there was a trend of more female newborns in both groups. Newborns from cocaine users showed lower birth weight, crown-heel length and cranial perimeter than newborns from non-using mothers, but these differences did not reach significance. There was no withdrawal syndrome or malformation in any of the drug exposed newborns.

#### Discussion

##### Prevalence of substance misuse among pregnant women

It is very difficult, based on the literature, to compare the prevalence of substance misuse by pregnant women in different populations for many reasons: studies may relate to different time periods, biological matrices have different windows of detection and there are specific patterns of substance misuse in different countries [24].

The European trend of increased cocaine use in the general population, including pregnant women, could also be observed in Tenerife. The results obtained in this study are very similar to the results obtained in Barcelona [12,20] and Glasgow (UK) [25] using meconium analysis.

Prevalence of drug exposure in our study is compared to the results reported in other population studies [12,20,25-28] and the results of the Spanish National Survey on Drug Abuse [1] in Table 3.

Hair testing as an analytical tool allowed for a more accurate identification of newborns exposed in utero to drugs of abuse compared to the identification based only on maternal questionnaire. Our findings are in agreement with the well-known under-reporting of tobacco smoke and drug use by pregnant women, as documented in several studies [11,26]. Overall, these data confirm the steady cocaine use showed by EMCDDA using questionnaires [1].

Surprisingly, we did not find any samples positive for cannabis, in spite of the fact that it is the most abused drug in European countries. According to data from the Canarias Government, daily use of cannabis by adult women in Tenerife is 1.0% [27]. It is worth mentioning that, in theory, a single exposure to drugs could lead to a positive result in hair analysis, but this occurrence has been demonstrated in only 1 experiment in adults after the administration of intravenous/intranasal cocaine, but certainly not with cannabis use [28].

Finally, no opiates were detected in the Tenerife population in contrast to the 4.7% opiates found in the Barcelona study population. This might be due to the fact that the population studied in Barcelona was from a low socioeconomic status using frequently a mixture of smoked heroin and cocaine [29].

No positive cases of maternal alcohol use were recorded by questionnaire in the exposed group of babies. This is in agreement with the results of other studies based on questionnaires, however, based on biomarkers, it has been shown that prenatal exposure to alcohol could reach 43% [30].

##### Characteristics of the drug users and of the newborns exposed in utero to drugs

Even though substance misuse has been associated with low income and lack of education [31], we found no associations with the level of schooling or profession. Our study showed that drug using mothers present with behavioural patterns with potentially harmful effects on the child's health (e.g. tobacco smoking, benzodiazepines and/or antidepressants use) to a significantly higher extent. Data from our study highlighted a higher rate of pre-pregnancy drug use (declared by questionnaire) among tobacco smoking women compared to non-smoking women. This tendency has been already reported in

**Table 1 Parental Socio-demographics and exposure to drugs of abuse during pregnancy**

	Mother's hair positive for cocaine and/or BEG (N = 9)	Mother's hair negative for any drug of abuse (N = 365)
<b>Parental Nationality</b>		
<b>Mother's nationality</b>		
Spanish	9 (100.0%)	298 (81.7%)
Non-Spanish	0 (0%)	67 (18.2%)
<b>Father's nationality</b>		
Spanish	9 (100.0%)	298 (81.7%)
Non-Spanish	0 (0%)	67 (18.2%)
<b>Maternal age (years), mean (SD)</b>	28.6 (5.0)	30.3 (5.3)
<b>Mother's Educational Level</b>		
Unfinished elementary school	4 (44.4%)	85 (23.2%)
<b>Employed mother (yes/no)</b>		
No	2 (22.2%)	110 (30.1%)
<b>Mother's socioeconomic status</b>		
Managerial, professional & skilled (non-manual)	3 (33.3%)	101 (28.0%)
Skilled (manual) and partly skilled	5 (55.6%)	224 (61.3%)
Unskilled	1 (11.1%)	40 (10.9%)
<b>Single Mother</b>		
Yes	0 (0%)	12 (3.3%)
<b>Father's Educational Level</b>		
Unfinished elementary school	4 (44.4%)	120 (33.2%)
<b>Employed father (yes/no)</b>		
No	0 (0%)	25 (7.0%)
<b>Father's socioeconomic status</b>		
Managerial, professional & skilled (non-manual)	1 (11.1%)	101 (28.0%)
Skilled (manual) and partly skilled	7 (77.8%)	244 (66.9%)
Unskilled	1 (11.1%)	20 (5.5%)
<b>Habitat</b>		
Rural (< 10,000 inhab.)	1 (11.1%)	56 (15.3%)
Semi-rural (10 - 100,000 inhab.)	5 (55.6%)	127 (34.7%)
Urban (> 100,000 inhab.)	3 (33.3%)	182 (50.0%)
<b>Maternal drug use at the visit</b>		
Fast substance misuse, yes	5 (55.6%)**	47 (12.8%)
Cocaine use, yes	4 (44.4%)**	15 (4.2%)
<b>Tobacco smoking</b>		
Mother	7 (77.8%)*	60 (16.3%)
Number of daily cigarettes, mean (SD)	6.5 (2.1)	7.2 (5.0)
Did you smoke before pregnancy?, yes	8 (88.8%)*	100 (27.3%)
Father	7 (77.8%)*	138 (37.9%)
Have been exposed to tobacco smoke during pregnancy?	4 (44.4%)	101 (28.0%)
Other smokers in the presence of the pregnant woman?	2 (22.2%)*	23 (6.3%)
<b>Use of Antidepressants, yes</b>		
	(11.1%)*	8 (2.2%)
<b>Alcohol use, yes</b>		
	1 (0%)	15 (4.2%)

\*\* P &lt; 0.005 respect control group

\* P &lt; 0.05 respect control group

**Table 2 Anthropometric Characteristics of the newborns according to the results obtained**

	Mother's hair positive for cocaine and/or BEG (N = 9)	Mother's hair negative for any drug of abuse (N = 365)
<b>Previous pregnancies</b>		
No	4 (44.4%)	177 (48.5%)
1	2 (22.2%)	120 (32.8%)
> 2	3 (33.3%)	58 (15.9%)
<b>Previous premature infants</b>		
Yes	0 (0%)	3 (0.9%)
<b>Previous abortions</b>		
Yes	4 (44.4%)	85 (23.2%)
<b>Children characteristics at birth</b>		
Gender, female	2 (22.2%)	193 (52.8%)
Gestational age (weeks), mean (S.D.)	38.9 (1.1)	38.8 (1.0)
Prematurity	0 (0%)	25 (6.9%)
Weight at birth (kg), mean (S.D.)	3.199 (0.23)	3.288 (0.29)
Length at birth (cm), mean (S.D.)	49.8 (2.6)	50.8 (2.7)
Cranial perimeter (cm), mean (S.D.)	33.4 (1.6)	34.2 (1.5)
<b>Outcomes at birth</b>		
Yes	3 (33.3%)	125 (34.1%)
Loss of foetal well-being	0 (0%)	4 (1.2%)
Risk of perinatal infection	3 (33.3%)	72 (19.8%)
Hypoglycaemia	0 (0%)	23 (6.3%)
Developmental dysplasia of the hip	0 (0%)	5 (1.5%)
Other outcomes †	0 (0%)	6 (1.8%)

\*\* P &lt; 0.005 respect control group

\* P &lt; 0.05 respect control group

† Including respiratory, cardiac and dermatological diseases.

**Table 3 Comparison of the prevalence of drug exposure in our study population with the one reported in the questionnaire-based PNSD and the results reported by other population**

	Sherwood et al. [25]	Pichini et al. [12,22]	Williamson et al. [23]	Mitsuhiro et al. [24]	PNSD [1]	Frigulo et al. [26]	Joya et al.
Year	1999	2005	2006	2007	2009	2010	2011
Place	London (UK)	Barcelona (Spain)	Glasgow (UK)	Sao Paulo (Brazil)	Spain	Ibiza (Spain)	Tenerife (Spain)
Matrix	Urine	Meconium	Meconium	Hair	Questionnaire	Maternal hair	Maternal hair
Trimester	1st	2nd - 3rd	2nd - 3rd	3rd	No pregnant	3rd	3rd
Population	general	Low-income	Low-income	Low-income	general	general	general
N	807	830	400	1000	23713	107	347
Cannabis (%)	14.5	5.3	13.2	4.0	13.2	10.3	0
Cocaine (%)	0.37	2.6	2.7	1.7	3.0	6.4	2.6
MDMA (%)		0.1			1.4	0.9	0
Opiates (%)	1.36	4.7			0.1	0	0
Any drug (%)	16.2	10.1		6.0		15.9	2.6

pregnant women [12] and in the general population [32]. We also found an association between maternal drug use during pregnancy and maternal and paternal tobacco smoking. Also, in our study, the correlation between cocaine use and concurrent antidepressants use was significant. This association was reported on previously by Joya et al [19]. The finding requires a close follow-up of these newborns [33] because of the high risk of withdrawal syndrome and adverse effects due to prenatal exposure not only to cocaine but antidepressants as well.

According to some studies, prenatal exposure to cocaine seems to have a negative effect on the child's neurological development and intellectual and emotional behaviour, due to the effect of cocaine on the monoaminergic system [34,35]. In our study, on the basis of self-reporting, the newborns exposed to cocaine did not show (significant) differences on somatometry characteristics. However, it is well documented that ongoing maternal and environmental risk factors (e.g. drug abuse, violence, poor child care, and maternal depressive symptoms) have been associated with worse developmental outcomes in prenatally exposed children [36,37]. The higher number of previous abortions may be due to problem behaviour and lack of family planning in the case of these women [38].

#### **Hair is a useful matrix to evaluate chronic substance misuse during pregnancy**

Even though 2.6% of the mothers had positive results for cocaine use during the third trimester of pregnancy, less than half of the mothers admitted drug use during pregnancy by questionnaire. This is not surprising, since the tendency to under-report recreational drug use by pregnant women was highlighted previously [12,15,18]. Hair testing for drugs provides a wide window of detection and sample collection is not invasive [39]. GC/MS proved to be a highly sensitive and specific technique for the detection of low concentrations of drugs [20,40]. Some authors [14,15] concluded that, compared to meconium analysis, hair analysis has higher sensitivity for detecting prenatal use of cocaine and opiates. The method of maternal hair analysis also allows for a more accurate estimation of the timing of drug use compared to neonatal hair testing, as neonatal hair has an irregular prenatal growth rate [24]. In spite of the fact that hair testing is very useful in prevalence studies on prenatal exposure to drugs of abuse, there are very few published reports to date on this topic.

#### **Interventions for a pregnancy free of drugs of abuse and for follow-up of prenatally exposed newborns**

The results of our study justify for future screening for drug use during pregnancy, that could provide the necessary proof to start treatment for substance abuse which is significantly more effective during pregnancy than in other periods in a woman's life. Early recognition, early

intervention, timely enrolment into treatment, and a sustained, long-term treatment regimen could minimize the foetal impact of perinatal maternal illicit drug use and may improve a woman's prognosis for successful, ongoing recovery from addiction. The development of a screening and intervention protocol will undoubtedly help medical care providers to make objective decisions regarding their screening/testing/intervention practices for women with substance abuse issues during pregnancy and for their offspring [12,20]. We must emphasize that these results are very important for public health and we suggest some actions in order to be informed about the prevalence of prenatal exposure to drugs of abuse and to implement specific programs such as counselling with brief intervention during pregnancy to avoid maternal substance misuse and screening interventions during pregnancy and at birth.

#### **Limitations**

The samples came from one single hospital, however, the Hospital La Candelaria in Tenerife has the largest number of births on the island, and by extension the entire archipelago. There are no results for prenatal exposure to alcohol as the main legal drug of abuse, but the samples are in the process of being analyzed and the results will be presented.

Finally, hair analysis results could have been compared to meconium analysis results as another standard tool to detect prenatal chronic exposure to drugs of abuse. Meconium is a direct neonatal biological matrix, but is informative only about the second (?) and third trimester of pregnancy. Conversely, a sufficiently long maternal hair will allow for information on the entire prenatal period; in our study we used only the proximal 3 cm. segment of hair.

#### **Conclusions**

These data underline the usefulness of hair analysis for the diagnosis of chronic drug use during pregnancy and demonstrate that there is significant hidden, undeclared use of cocaine by pregnant women in the Canary Islands that may cause multiple complications for both the baby and the mother. The data can be used for the purpose of preventive health and policy strategies aimed to avoid and to detect prenatal exposure to drugs of abuse. Therefore, it is essential to implement specific counselling and to introduce screening methods during pregnancy. Finally, uniform guidelines should be provided for health and social service professionals.

#### **Additional material**

**Additional file 1: Questionnaire.** Questionnaire administered to all participants the day after the delivery.

**Acknowledgements**

This study was supported by intramural funding of the Neuropsychopharmacology Program at IMM - Parc de Salut Mar and partially supported by Generalitat de Catalunya (Spain) AGAUR (2009SGR1388), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and by the RETIC SAMO "Red de Salud Materno-infantil y del Desarrollo" (RD08/0072/0027), Instituto Carlos III, Madrid, Spain.

**Author details**

<sup>1</sup>Unitat de Recerca Infància i Entorn (IURE), Institut de Recerca Parc de Salut Mar (IMM-Parc de Salut Mar), Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Red de Salud Materno-infantil y del Desarrollo (SAMO), Programa RETIC, Instituto Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, <sup>3</sup>Departamento de Cirugía Pediátrica, Universidad de Tenerife, Spain, <sup>4</sup>Unidad de Pediatría, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Departament de Pediatría, Ginecologia i Obstetrícia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, <sup>6</sup>Department of Legal Medicine and Public Health, University of Pavia, Italy.

**Authors' contributions**

XI was the main contributor in writing the manuscript, MGC analyzed the mother-infant data, reviewed the literature and the final manuscript, and contributed in writing the manuscript, AC was the main contributor to the recruitment, and contributed in writing the manuscript, SF analyzed the mother-infant data, and was a contributor in writing the manuscript, CF analyzed the mother-infant data, and was the statistical expert, SG analyzed the mother-infant data, reviewed the literature and the final manuscript, LM was the main laboratory technician in biomarkers analyses, and contributed in writing the manuscript, OGA analyzed the mother-infant data, reviewed the literature, and was a major contributor in writing the manuscript, OJ was the pediatrician responsible for coordination of data, and contributed in writing the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 June 2011 Accepted: 9 January 2012

Published: 9 January 2012

**References**

1. <http://www.emcdda.europa.eu/estados/99qf9g146g>, accessed on April 11, 2011.
2. INEGI Encuesta Demoscópica Sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) (2009/10). 2010.
3. Woods JR Jr, Plessinger MA, Clark RJ: Effect of cocaine on uterine blood flow and fetal oxygenation. *JAMA* 1987, **257**:957-61.
4. Haddad AJ, Siegel SR: Maternal cocaine use during pregnancy: effect on the newborn infant. *Pediatrics* 1989, **84**:205-10.
5. Ulfshutz SE, Frasca JJ, Osov EJ: Cardiovascular abnormalities in infants prenatally exposed to cocaine. *J Pediatr* 1991, **118**:44-51.
6. Meeker JL, Reynolds FC: Fetal and newborn death associated with maternal cocaine use. *J Anal Toxicol* 1990, **14**:379-82.
7. Gillogly KM, Evans AT, Hansen RL, Samuels SJ, Batts KC: The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *Am J Obstet Gynecol* 1990, **163**:Pt 2:1525-42.
8. Lester BM, Eloshy M, Wright LL, Smeriglio VL, Vetter J, Bauer CR, et al: The Maternal Lifestyle Study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 2001, **107**:309-17.
9. Birchfield M, Scully J, Handler A: Prenatal screening for illicit drugs: policies in hospitals in a large metropolitan area. *J Perinatol* 1995, **15**:238-44.
10. Bar-Oz B, Klein J, Karasik T, Koren G: Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003, **88**:F98-100.
11. Oestre EM Jr, Brady M, Gause S, Raymond AL, Stevens M: Drug screening of newborns by meconium analysis: a large-scale, prospective, epidemiologic study. *Pediatrics* 1992, **89**:107-13.
12. García-Algar O, Vall G, Puig C, Mur A, Scaravelli G, Pichini S, et al: Exposición prenatal a drogas de abuso mediante análisis de meconio en una población de bajo nivel socioeconómico de Barcelona. *An Pediatr (Barc)* 2008, **70**:151-8.
13. Mough TH: Hair: a diagnostic tool to complement blood serum and urine. *Science* 1978, **202**:1271-3.
14. Nakahara Y, Ochiai T, Okura R: Hair analysis for drugs of abuse. V. The facility in incorporation of cocaine into hair over its major metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. *Arch Toxicol* 1992, **66**:445-9.
15. Klein J, Karasik T, Koren G: Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience. *Forensic Sci Int* 2000, **102**:281-8.
16. DiGregorio GS, Felko AP, Babiker EI, Bush EK, Chawla H, Keohane D, et al: Determination of cocaine usage in pregnant women by a urinary DfIT drug screen and GC/MS analyses. *J Anal Toxicol* 1994, **18**:347-50.
17. Oestre EM Jr, Knapp DK, Fattenbaum L, Oestre AB, Romero A, Salari V, et al: Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *J Pediatr* 2001, **138**:344-8.
18. García-Bouillon T, Kolach B, Karasik T, Koren G: Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology. *The Drug Month* 2007, **29**:71-6.
19. Falcon M, Valero F, Pellegrini M, Rotolo MC, Scaravelli G, Joya X, et al: Exposure to psychoactive substances in women who request voluntary termination of pregnancy assessed by serum and hair testing. *Forensic Sci Int* 2010, **196**:22-6.
20. Pichini S, Puig C, Zuccaro F, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, et al: Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 2005, **153**:59-65.
21. Jurado C, Sacks H: Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing. *Forensic Sci Int* 2003, **133**:175-8.
22. Pichini S, Pacifici R, Altieri L, Pellegrini M, Zuccaro F: Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999, **23**:343-8.
23. Luzzano J, García-Algar O, Vall G, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S: Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *The Drug Month* 2007, **29**:71-34.
24. Maurer HH: Analytical toxicology. *ZfG* 2010, **100**:317-32.
25. Williamson S, Jackson L, Sleoch C, Azim G, Anderson R: Determination of the prevalence of drug misuse by meconium analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006, **91**:F291-2.
26. Mitsuhashi SS, Chalem E, Barros MC, Gámbourg R, Latorjeira R: Prevalence of cocaine and marijuana use in the last trimester of adolescent pregnancy: socio-demographic, psychosocial and behavioral characteristics. *Addict Behav* 2007, **32**:392-7.
27. Sheswood RA, Reeling J, Kawada Y, Greenough A, Peters T3: Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 1999, **158**:489-92.
28. Friguls B, Joya X, García J, Gómez-Culebras M, Pichini S, Martínez S, et al: Assessment of exposure to drugs of abuse during pregnancy by hair analysis in a Mediterranean island. *Addiction* 2011.
29. Pichini S, Basagana XB, Pacifici R, García O, Puig C, Vall G, et al: Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environ Health Perspect* 2000, **108**:1079-83.
30. Consejo de Sanidad G8C: Incidencia del Consumo de Drogas en la Comunidad Autónoma de Canarias: 2007-2008. 2008.
31. Henderson GL, Harley MR, Zhou C, Jones RT, Jacob P: Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1, dose-response relationships. *J Anal Toxicol* 1996, **20**:1-12.
32. Barrio G, de la Fuente L, Carril J: El consumo de drogas en España y su posición en el contexto europeo. *Med Clin (Barc)* 1995, **101**:344-55.
33. Shor S, Nulman L, Puluga V, Koren G: Heavy in utero ethanol exposure is associated with the use of other drugs of abuse in a high-risk population. *Alcohol* 2010, **44**:623-7.
34. Joya X, Paparelli E, Chit E, Pellegrini M, Vall G, García-Algar O, et al: Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis. *The Drug Month* 2009, **31**:391-5.
35. Vermeir T, Kassenbrood H, Visser G, Schobben F, de Jong-van den Berg L, Egberts T: Prevalence and patterns of antidepressant drug use during pregnancy. *Eur J Clin Pharmacol* 2006, **62**:803-70.
36. Mayes LC, Grillon C, Granger R, Schottenfeld R: Regulation of arousal and attention in preschool children exposed to cocaine prenatally. *Ann N Y Acad Sci* 1998, **846**:126-43.



37. Bennett DS, Bendenly M, Lewis M: Children's intellectual and emotional-behavioral adjustment at 4 years as a function of cocaine exposure, maternal characteristics, and environmental risk. *Dev Psychol* 2002, **38**:648-58.
38. Ursani TI, Singer LT, Kitchner HL, Short EJ, Min MO, Hussey J, et al: Mental health outcomes of cocaine-exposed children at 6 years of age. *J Pediatr Psychol* 2006, **31**:85-97.
39. Accornero VH, Morade CJ, Bandiera ES, Johnson AL, Anthony JC: Behavioral outcome of preschoolers exposed prenatally to cocaine: role of maternal behavioral health. *J Pediatr Psychol* 2002, **27**:259-69.
40. Sanz SA, Sabater A, Alfonso A, Cortajal JA, Sanchez E: Características sociales y clínicas de un grupo de madres infectadas por VIH en Valencia: influencia de la adicción a drogas de los padres. *Gac Sanit* 2000, **14**:429-34.

**Pre-publication history**

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2393/12/2/prepub>

doi:10.1186/1471-2393-12-2

**Cite this article as:** Joya et al.: Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2012, **12**:2.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## **4. DISCUSIÓN GLOBAL**



La valoración precisa de la exposición fetal a las diferentes sustancias de abuso mediante el uso de biomarcadores específicos objetivos en matrices biológicas alternativas, podría ser de gran importancia, ya que proporciona la base para un tratamiento y seguimiento adecuados de los recién nacidos expuestos.

Este trabajo, pone de manifiesto la elevada exposición a veces insospechada de las principales sustancias de abuso durante la gestación gracias al empleo de biomarcadores presentes en matrices no convencionales como son el pelo y el meconio.

La elevada prevalencia oculta de consumo de sustancias de abuso durante la gestación puesta de manifiesto mediante matrices alternativas permite conocer la existencia de poblaciones de alto riesgo que de otro modo no podrían ser identificadas ya que existe una infradeclaración por parte de la madre en la entrevista convencional, la clínica en el recién nacido podría pasar desapercibida y un análisis rutinario para sustancias de abuso en orina podría resultar negativo, ya que nos da información únicamente de los últimos días (García-Algar y cols., 2009; Manich y cols., 2011, Russell y cols., 1996). Este hecho también se pone de manifiesto en el artículo publicado en el Hospital del Mar (Ortigosa y cols., 2011) que incluye el mismo período en el que se realizó el Proyecto Meconio. En dicho estudio la prevalencia de recién nacidos diagnosticados como hijos de madres consumidoras de sustancias de abuso fue mucho menor que lo demostrado en meconio, donde se alertó sobre una exposición prenatal del 2,6% a COC, junto a un 5,3% a cannabis y un 4,7% a opiáceos, siendo por cuestionario de 1,2%, 1,5% y 0,3% respectivamente (García-Algar y cols., 2009; Lozano y cols., 2007a; Pichini y cols., 2005b). También se puede observar en el estudio realizado en las Islas Canarias donde a pesar de que el 2,6% de las madres tuvieron resultados positivos para consumo de COC durante el tercer trimestre del embarazo, menos de la mitad de las madres admitió el consumo de drogas durante el embarazo mediante cuestionario. Esto no es sorprendente, ya que la tendencia a subestimar el uso de drogas por mujeres embarazadas ya se había observado anteriormente (García-Algar y cols., 2009; Klein y cols., 2000; Garcia-Bournissen y cols., 2007).

En conjunto, estos resultados demuestran la magnitud del problema de la exposición durante el embarazo. Dichos datos apoyan los resultados ya revelados por el OED y el EMCDDA en el cual España muestra el mayor porcentaje en el consumo de COC, mostrando un 1% de prevalencia en el consumo durante el último año en mujeres entre 15 y 64 años (OED, 2011; EMCDDA, 2010). Estos datos deben alertar a las autoridades sanitarias acerca de esta circunstancia en poblaciones de alto riesgo y apoyar la intención de abogar por un cribado de sustancias de abuso en diferentes matrices biológicas durante la gestación.

### **Matrices alternativas y biomarcadores**

Desde hace unos años, el uso de matrices no convencionales se ha aplicado en diferentes campos de la rutina clínica y legal. Por ejemplo, en la renovación de licencias de conducción, en conductores en que se conoce un historial de consumo de sustancias de abuso se les realiza un análisis de pelo con el fin de verificar su abstinencia. Además, el análisis de sudor se emplea de forma rutinaria en los controles a pie de carretera con el fin de evaluar la presencia aguda de sustancias de abuso. El uso de matrices no convencionales tiene ventajas considerables en la práctica. En primer lugar, la recogida de estas muestras no requiere de un ambiente hospitalario, lo cual en determinados casos es muy importante ya que no se dispone del personal ni de los instrumentos necesarios para su correcta recogida. Además, esta recogida no es invasiva, lo cual no produce malestar en la persona. Finalmente, las matrices no convencionales proporcionan diferente información retrospectiva en el tiempo. Por ejemplo, el análisis de pelo proporciona una clara ventaja ya que un único análisis puede reflejar una exposición pasada a sustancias de abuso. Además, el análisis de dos segmentos consecutivos de pelo puede informar acerca de una exposición crónica a sustancias de abuso.

Las matrices fetales, neonatales y maternas son depósitos de sustancias a las cuales el feto está expuesto en el útero. Sin embargo, el conocimiento acerca de la distribución de las sustancias de abuso en estas matrices no convencionales es relativamente heterogéneo y es necesario realizar investigaciones que permitan obtener un mayor conocimiento acerca de los mecanismos

involucrados en la difusión de estas sustancias a las matrices no convencionales.

Además habitualmente las sustancias de abuso en estas matrices alternativas se hallan en concentraciones muy bajas, de forma que es necesario utilizar instrumentación altamente sensible para poder detectarlas y presentar resultados fiables, ya que a menudo, de estos resultados se desprenden consecuencias a nivel jurídico y legal.

Sólo mediante el uso de biomarcadores directos que son altamente específicos, especialmente cuando se mide en matrices biológicas fetales/neonatales, se puede demostrar de manera real la exposición a sustancias de abuso durante la vida intrauterina.

En este aspecto, el meconio neonatal es fácil de obtener y da información sobre la exposición tanto en el segundo como tercer trimestre del embarazo (Koren y cols., 2002; Lester y cols., 2001; Levy y Koren, 1990; Gray, 2009). A la inversa, el pelo del recién nacido, formado en el último trimestre, es una matriz de valor para medir la exposición en la última etapa del embarazo; sin embargo en algunos recién nacidos no está disponible en cantidades suficientes. Por ello el análisis de cabello materno podría resultar una alternativa, aunque no indicaría la exposición fetal directamente, sino del consumo materno.

El análisis de drogas mediante pelo ofrece una amplia ventana de detección y la recolección de muestras no es invasiva, la detección mediante GC/MS resulta ser una técnica altamente sensible y específica para la detección de bajas concentraciones de drogas. Algunos autores (Klein y cols., 2000; Nakahara y cols., 1992) han llegado a la conclusión de que, en comparación con el análisis del meconio, el análisis del pelo tiene mayor sensibilidad para la detección del consumo prenatal de COC y opiáceos. El método de análisis de pelo materno también permite una estimación más precisa del momento de consumo de drogas en comparación con el análisis del pelo neonatal, ya que el pelo del recién nacido tiene una tasa de crecimiento prenatal irregular (Maurer, 2010). A pesar del hecho de que el análisis de pelo es muy útil en estudios de prevalencia sobre la exposición prenatal a drogas de abuso, son muy pocos los informes publicados hasta la fecha sobre este tema.

La utilización de biomarcadores objetivos en una amplia variedad de matrices ya en el período prenatal ha sido un gran paso en la evaluación de los efectos nocivos de la exposición prenatal a sustancias de abuso, pero la evaluación de la exposición prenatal utilizando diferentes matrices alternativas es a veces difícil.

En cuanto a los marcadores a medir, los FAEEs en meconio y pelo es actualmente la herramienta más utilizada para estimar la incidencia de la exposición prenatal a etanol, ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad. Por el contrario, el otro metabolito sugerido, EtG, es 15 años más joven que FAEEs y mucha de la información disponible para FAEEs falta para EtG. No obstante, en contraste con FAEEs, que son 7 compuestos diferentes medidos sólo por métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas, EtG es sólo una molécula que actualmente también se mide por cromatografía y detección de espectrometría de masas, pero podría ser potencialmente seleccionado por ejemplo, en las muestras de meconio por tener un bajo coste, ser simple y fácil de realizar por inmunoensayo. Actualmente está disponible para orina, pudiendo ser utilizado rutinariamente en salas de neonatología para el diagnóstico precoz de la exposición prenatal a etanol (Bakdash y cols., 2010; Morini y cols., 2008; Morini y cols., 2010a; Morini y cols., 2101b). En cuanto a los biomarcadores de otras sustancias tanto la sustancia en sí misma como sus metabolitos han demostrado su eficacia para la detección de su consumo en diferentes matrices alternativas.

Idealmente, se deberían analizar tantas matrices como fuera posible para obtener una imagen precisa de la exposición durante todo el período prenatal. Se necesitan más investigaciones utilizando estudios prospectivos a gran escala con la participación de mujeres embarazadas y sus recién nacidos con información detallada de la historia de consumo durante la gestación para establecer un umbral de detección cuantitativo definitivo para la prueba de detección y correlacionar distintos comportamientos de consumo con los resultados de las diferentes pruebas. Debido a los problemas éticos involucrados en la realización de estos ensayos, estos estudios son difíciles de realizar.

Las ventanas temporales de las matrices placentarias y fetales siguen siendo difusas, y es necesario profundizar en el estudio de las mismas para conocer en qué momento del embarazo se produce la exposición, qué mecanismos intervienen en el paso transplacentario de las sustancias de abuso y qué capacidad metabólica presenta cada matriz.

### **Consecuencias del consumo prenatal**

Los recién nacidos son candidatos, por su tamaño y su baja masa corporal, a tener mayores efectos deletéreos después de su exposición a sustancias de abuso.

Las consecuencias del consumo de drogas descritas en los recién nacidos se basan la mayoría en estudios donde utilizan la entrevista materna como cribado de consumo de sustancias, pero al haber una tendencia a subestimar el consumo de drogas durante el embarazo, los datos obtenidos directamente de estas mujeres son inconsistentes. Otros estudios sobre los efectos de las drogas se basan en el análisis de drogas de abuso en orina o sangre, pero éstas se limitan a detectar sólo la exposición aguda de las últimas 24-48 horas, sin tener una determinación objetiva del consumo de sustancias de manera crónica. El evaluar la exposición de un biomarcador objetivo en una matriz alternativa que indica consumo crónico nos ayudaría a determinar mejor las consecuencias de este consumo.

Se ha descrito un aumento del riesgo de muerte perinatal, asfixia, prematuridad, disminución de los parámetros somatométricos al nacimiento y menores puntuaciones de Apgar en los recién nacidos de madres consumidoras de drogas (Addis y cols., 2001; Ellis y cols., 1993; Levy y Koren, 1990; Plessinger y Woods, 1993; Schempf, 2007; Shankaran y cols., 2007; Vucinovic y cols., 2008). Nuestro estudio realizado con datos de consumo objetivos, sólo encontró asociación entre el consumo prenatal a las drogas y los parámetros somatométricos.

La disminución del peso al nacimiento, en asociación con el consumo prenatal de tabaco, alcohol, COC y opiáceos ha sido ampliamente documentado anteriormente (Addis y cols., 2001; Dombrowski y cols., 1991; Kaminski y cols., 1978; Hollstedt y cols.,

1983; Vogt Isaksen, 2004). En nuestro estudio, se observó una disminución de la longitud y el peso al nacimiento, sin afectación del perímetro craneal en los recién nacidos de madres consumidoras de tabaco y COC.

Aunque es difícil relacionar los efectos de una exposición prenatal a las diferentes sustancias de abuso con consecuencias a largo plazo, diferentes trabajos apoyan la teoría de que existen alteraciones sanitarias, educativas y sociales en los niños que han sido expuestos a sustancias de abuso prenatalmente (Betancourt y cols., 2011; El Marroun y cols., 2011; Goldschmidt y cols., 2008; Gray, 2009; Karila y cols., 2006; Messiah y cols., 2011; Zammit y cols., 2009). Por ello, una intervención específica desde un punto de vista social y de salud de estos niños expuestos y sus familias podría ayudar a la prevención y el tratamiento de posibles trastornos intelectuales, emocionales y de comportamiento.

Además el consumo de sustancias de abuso por mujeres embarazadas también se ha asociado con una disminución del control prenatal, desnutrición materna y aumento de la incidencia de las infecciones tales como VHB, VHC, VIH y otras enfermedades de transmisión sexual (Ellis y cols., 1993; Kuczkowski, 2007; Shankaran y cols., 2007; Thaithumyanon y cols., 2005; Vucinovic y cols., 2008;). El consumo de tabaco, alcohol y COC durante el embarazo han sido asociados a una mayor tasa de abortos y mayor paridad el madres consumidoras lo que sugiere una menor planificación familiar por parte de estas madres (Anonymous, 1993; Chasnoff y cols., 1985; Dombrowski y cols., 1991; Jauniaux y Burton, 2007; Kain y cols., 1993; Levy y Koren, 1990; Sokol y cols., 1980; Zdravkovic y cols., 2005).

El mecanismo mediante el cual estas drogas inducen estos efectos deletéreos debería ser investigado. Éste podría ser debido a la afectación placentaria. El número de publicaciones sobre efectos secundarios histomorfológicos en la placenta debidos al consumo prenatal de drogas es muy limitado y los resultados de estas pocas investigaciones no son homogéneos. Esto podría ser debido a una heterogeneidad interindividual, diferentes niveles de exposición a la droga y/o diferentes métodos de evaluación de los efectos morfológicos. Se han investigado cambios morfológicos placentarios



a nivel macroscópico y microscópico después de la exposición prenatal a drogas de abuso (Ashfaq y cols., 2003; Asmussen, 1977; Burton y cols., 1989; Christianson, 1979; Demir y cols., 1994; Gilbert y cols., 1990; Gundogan y cols., 2008; Jauniaux y Burton, 2007; Kopp y Vogel, 1982; Mooney y cols., 1998; Van der Veen y Fox, 1982; Vavrinkova y cols., 2001). Los resultados no mostraron cambios relevantes en hallazgos macroscópicos, pero sí que se observó alguna pequeña alteración a nivel de la vasculatura, que podrían producir alteraciones del flujo sanguíneo que podrían ser responsables de los efectos nocivos sobre el recién nacido expuesto a drogas durante su vida fetal, produciendo un microambiente hipóxico.

Se necesitan más estudios para una mejor comprensión del mecanismo mediante el cual el consumo prenatal de drogas da como resultado un menor peso y longitud al nacimiento y un aumento del riesgo de aborto. Pero debido al policonsumo, el realizar un estudio con consumidoras exclusivamente de una sustancia y poder ver sus consecuencias puede ser difícil. El siguiente paso con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual las drogas inducen estos efectos nocivos en los recién nacidos sería centrarse en los factores angiogénicos y endoteliales que participan en la regulación del flujo sanguíneo de la unidad feto-placentaria. Al estudiar los mecanismos bioquímicos y genéticos por los cuales las drogas de abuso pueden modificar la función de la placenta, se obtendría una mejor comprensión de los efectos nocivos del consumo prenatal de drogas.

En conclusión, con el fin de detectar la exposición a sustancias de abuso durante el último trimestre de la gestación es recomendable utilizar diferentes matrices no convencionales o alternativas (meconio, pelo, placenta): minimiza la invasividad en la recogida de las muestras en comparación con las matrices utilizadas tradicionalmente (sangre y orina), la metodología analítica de la determinación está validada y el precio resulta razonable. Para diagnosticar una eventual intoxicación aguda (horas o días antes), el fluido oral y el sudor son buenas alternativas a sangre y orina. Sin embargo, para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso, es necesario emplear una matriz capaz de informar acerca de un período prolongado de tiempo: meconio o cabello.

La detección de sustancias de abuso debería ser universal en las gestantes ya que aunque el consumo de sustancias se ha asociado con bajos ingresos económicos y falta de educación, no se ha encontrado asociación con el nivel de escolarización o la profesión ni ningún otro parámetro que nos pueda indicar una tendencia al consumo.

Los hijos de madres consumidoras de sustancias de abuso requieren un seguimiento estrecho, tanto en el período neonatal por el riesgo de presentar síndrome de abstinencia y los efectos adversos debidos a la exposición prenatal, como a largo plazo para ver las consecuencias en la salud y a nivel conductual. Por lo que la detección de todos los fetos expuestos durante el tercer trimestre, nos podría ayudar a realizar un seguimiento adecuado de todos estos niños.

Los resultados de nuestro estudio justifican la detección en un futuro del consumo de drogas durante la gestación, lo que podría proporcionar la prueba necesaria para iniciar el tratamiento del consumo de sustancias de abuso, ya durante la gestación, lo que es significativamente más eficaz durante el embarazo que en otros períodos de la vida de una mujer. El reconocimiento y la intervención tempranas, inicio rápido del tratamiento, y un tratamiento a largo plazo pueden reducir al mínimo el impacto fetal del consumo materno perinatal de drogas ilícitas y pueden mejorar el pronóstico de la madre en la recuperación de su adicción. El desarrollo de un protocolo de detección e intervención, podría ayudar sin duda a tomar decisiones objetivas con respecto a su cribado/análisis/intervención practicadas en mujeres con problemas de consumo de sustancias de abuso durante el embarazo y su descendencia. Debemos destacar que estos resultados son muy importantes para la salud pública y sugieren algunas acciones con el fin de ser informados sobre el prevalencia de la exposición prenatal a drogas de abuso e implementar programas específicos tales como el asesoramiento con breve intervención durante el embarazo para evitar el consumo materno e intervenciones de cribado durante el embarazo y el parto.

Los datos pueden ser usados con el propósito de salud preventiva y estrategias políticas encaminadas a evitar y detectar prenatalmente

la exposición a drogas de abuso. Para ello, es esencial implementar consejo específico e introducir métodos de cribado durante la gestación, proponiéndose guías de práctica clínica para profesionales sanitarios y servicios sociales.



## **5. CONCLUSIONES**



El análisis de los datos presentados en este trabajo junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a la determinación de la exposición fetal intrauterina a sustancias de abuso en diversas matrices y períodos del embarazo permiten realizar las siguientes conclusiones:

- Existe una infradeclaración del consumo de sustancias de abuso durante la gestación, por lo que son necesarias técnicas de detección más objetivas.
- Se dispone de matrices biológicas alternativas no invasivas y biomarcadores objetivos para la detección del consumo de sustancias de abuso durante el tercer trimestre que podrían servir para realizar un cribado de la exposición prenatal.
- Se dispone de métodos analíticos validados utilizados para la detección de sustancias de abuso durante la gestación en matrices alternativas.
- El pelo materno y el meconio son buenas matrices biológicas alternativas para la detección del consumo de sustancias de abuso durante el tercer trimestre, por lo que podrían convertirse en herramientas de cribado.
- Una nueva matriz biológica en investigación es la placenta. La placenta, por su papel fisiológico, situación y características, es una matriz alternativa adecuada para el estudio de las sustancias de abuso durante la gestación, aunque son necesarios más estudios para poder ser utilizada como herramienta de cribado.
- Algunas sustancias de abuso pueden producir cambios macroestructurales y microestructurales en la placenta lo que podría ayudar a entender las consecuencias de su consumo sobre el feto y el recién nacido de manera objetiva.
- La determinación objetiva del consumo materno permitiría un seguimiento posterior de los niños expuestos a las diversas sustancias de abuso.

- Es esencial la implementación del consejo preventivo específico para evitar el consumo de sustancias de abuso durante la gestación.



## **6. PUBLICACIONES ANEXAS**



## **ARTÍCULO ANEXO 1**

### **CONSUMO DE DROGAS DURANTE LA GESTACIÓN Y SU REPERCUSIÓN NEONATAL. ANÁLISIS DE LOS PERÍODOS 1982-1988 Y 2002-2008**

Ortigosa S., López-Vilchez M. A., Díaz F., Castejón E.,  
Caballero A., Carreras R., Mur A.

Med Clin (Barc). 2011;136(10):423-430.

[PMID: 21296368](#)

FI: 1,385 (2011)



## Resumen

*Introducción.* El consumo de drogas durante la gestación es una situación de riesgo. El objetivo del estudio es conocer la prevalencia actual, las características del embarazo, parto y recién nacidos de madres consumidoras de drogas.

*Metodología.* Estudio retrospectivo de los hijos de madres consumidoras de drogas entre los años 2002-2008 y comparación con los años 1982-1988, atendidos en el Hospital del Mar.

*Resultados.* Actualmente hay un menor consumo de heroína y siempre asociada a otras drogas, siendo mayoritariamente inhalada o fumada. Se observa mayor edad materna (28,4 años), mejor control gestacional (60,5%) y más recién nacidos que van a centros de acogida (13,1%). Los programas de metadona proporcionan mejores resultados globales. Hay reducción de infecciones por VIH (25%) y VHB (2,5%). El desprendimiento de placenta en el consumo de COC es muy elevado (11%). En el comparativo de los dos períodos se observan diferencias estadísticamente significativas en la edad materna, control del embarazo, tipo de parto, tratamiento del síndrome de abstinencia a drogas y destino de los recién nacidos.

*Conclusiones.* Se observa un predominio de drogadicción en gestantes autóctonas y disminución del consumo de heroína, con predominio del policonsumo. Actualmente se observa mejor control gestacional, menor infección por VIH y VHB. Asimismo, más niños van a centros de acogida. La edad gestacional y parámetros somatométricos se han mantenido a lo largo de los años. Los programas de metadona mejoran los aspectos nocivos del consumo de opiáceos. El desprendimiento prematuro de placenta en las gestantes y las alteraciones neuroconductuales en el recién nacido son frecuentes en el consumo de COC.





## Original

## Consumo de drogas durante la gestación y su repercusión neonatal. Análisis de los períodos 1982-1988 y 2002-2008

Sandra Ortigosa Gómez<sup>a</sup>, María Angeles López-Vilchez<sup>a,b</sup>, Fina Díaz Ledo<sup>a</sup>, Esperanza Castejón Ponce<sup>a</sup>, Araceli Caballero Rabasco<sup>a</sup>, Ramón Carreras Collado<sup>b</sup> y Antonio Mur Sierra<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Sección de Neonatología, Hospital del Mar, Barcelona, España

<sup>b</sup>Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital del Mar, Barcelona, España

<sup>c</sup>Servicio de Pediatría, Hospital del Mar, Barcelona, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:  
Recibido el 23 de febrero de 2010  
Aceptado el 1 de junio de 2010  
On line el 3 de febrero de 2011

Palabras clave:  
Drogas de abuso  
Embarazo  
Repercusión neonatal  
Problemática social

## RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** El consumo de drogas durante la gestación es una situación de riesgo. Nuestro objetivo es conocer la prevalencia actual, las características del embarazo, parto y recién nacidos (RN) de madres consumidoras de drogas.

**Pacientes y método:** Estudio retrospectivo de los hijos de madres consumidoras de drogas entre los años 2002-2008 y comparación con los años 1982-1988, atendidos en nuestro hospital.

**Resultados:** Actualmente hay un menor consumo de heroína y siempre asociada a otras drogas, siendo mayoritariamente inhalada o fumada. Se observa mayor edad materna (28,4 años), mejor control gestacional (60,5%) y más RN que van a centros de acogida (13,1%). Los programas de metadona proporcionan mejores resultados globales. Hay reducción de infecciones por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2,5%) y de la hepatitis B (VHB) (2,5%). El desprendimiento prematuro de placenta en el consumo de cocaína es muy elevado (31%). En el comparativo de los dos períodos se observan diferencias estadísticamente significativas en edad materna, control del embarazo, tipo de parto, tratamiento del síndrome de abstinencia a drogas (SAD) y destino de los RN.

**Conclusiones:** Se observa un predominio de drogadicción en gestantes autóctonas, y disminución del consumo de heroína, con predominio del policonsumo. Actualmente se observa mejor control gestacional, menor infección por VIH y VHB. Asimismo, más niños van a centros de acogida. La edad gestacional y parámetros somatométricos se han mantenido a lo largo de los años. Los programas de metadona mejoran los aspectos nocivos del consumo de opiáceos. El desprendimiento prematuro de placenta en la gestante y las alteraciones neuroconductuales (ANC) en el RN son frecuentes en el consumo de cocaína.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Use of illicit drugs over gestation and their neonatal impact. Comparison between periods 1982-1988 and 2002-2008

## ABSTRACT

**Background and objective:** The use of illicit drugs during pregnancy becomes a high risk situation. Our objective is to determine the currently prevalence, pregnancy, delivery and newborn's characteristics of mothers who use illicit drugs.

**Patients and methods:** Retrospective study of children exposed prenatally to illicit drugs in the Neonatology's Unit of the Hospital del Mar during 2002-2008 and comparison with 1982-1988 data.

**Results:** Heroin use is lower currently and it is always associated with other drugs, mainly inhaled or smoked. There is an increase of the maternal age (28.4 years), an improved gestational control (60.5%) and more newborns are attended in shelters (13.1%). Methadone programs provide better overall results. Human immunodeficiency virus (HIV) (2.5%) and hepatitis B (HBV) (2.5%) infections have decreased. Placental abruption rate in cocaine users is very high (31%). By comparing both periods, there were

**Keywords:**  
Street drugs  
Pregnancy  
Neonatal effects  
Social problems

\* Autor para correspondencia.  
Correo electrónico: AMur@hospitaldelmar.cat (A. Mur Sierra).

statistically significant differences in maternal age, gestational control, delivery way, neonatal withdrawal syndrome treatment and newborn destination.

Conclusions: Drug abuse remains prevalent in native pregnant. Heroin use has decreased. At present, there is a better gestational control and less HIV and HBV infections. The gestational age and somatometric parameters have not changed over the years. Methadone programs improve the deleterious aspects of opioid use. Placental abruption in pregnancy and neurobehavioral disorders in newborn are common in cocaine users.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El consumo de sustancias de abuso es un problema sanitario importante en nuestra sociedad. En las últimas décadas el uso de drogas ilícitas ha ido en aumento, su incidencia se ha extendido, encontrándose que entre el 50-90% de las mujeres consumidoras de drogas están en edad fértil<sup>1-6</sup>.

La frecuencia del consumo de drogas de abuso es muy variable de unos países a otros. En España se realizan encuestas transversales periódicas dentro del Plan Nacional sobre Drogas de Abuso con el fin de establecer los consumos puntuales y su evolución a través de los años. Los resultados de la encuesta domiciliar realizada en 2007/8 mostró que el porcentaje de mujeres que admitían haber consumido drogas en los últimos 12 meses fue del 9,1% para benzodiazepinas, 6,6% para cannabis, 1,6% para cocaína, 0,3% para anfetaminas y menor al 0,1% para heroína<sup>7,8</sup>. Hay que tener en cuenta, no obstante, que las encuestas poblacionales tienen limitaciones para estimar la prevalencia y las tendencias de consumo de estas sustancias, por su dificultad para incluir a los consumidores más problemáticos, llegando a un máximo de detección de aproximadamente el 60%<sup>7,8</sup>.

La utilización de drogas ilícitas por parte de la mujer embarazada conlleva una situación de alto riesgo para la madre y el recién nacido (RN). La droga consumida puede repercutir en el crecimiento fetal, la aparición de malformaciones, el síndrome de abstinencia a drogas (SAD) o alteraciones neuroconductuales (ANC) e, incluso, en el desarrollo posterior del niño<sup>9-18</sup>.

Se tienen pocos datos sobre el consumo de drogas durante el embarazo. En EE.UU., la encuesta nacional realizada entre 2006-2007 por SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) encontró que un 5,2% de mujeres tomaron drogas ilícitas durante su embarazo<sup>19</sup>. En la Unión Europea se han encontrado 3 estudios sobre prevalencia de drogas de abuso durante el embarazo<sup>8,20,21</sup>. Dos de ellos revelaron que del 10 al 15,6% de las mujeres embarazadas tienen un test de orina positivo a drogas ilegales<sup>20,21</sup>; el último de ellos utilizó meconio como matriz biológica, lo que nos informa de un consumo más crónico, siendo positivo el 10,9% de los casos<sup>8</sup>.

En la práctica existen además otras variables asociadas al consumo de drogas durante la gestación que van a contribuir a una mayor morbilidad fetal o perinatal, como son el estilo de vida, la malnutrición, el mal control prenatal o el aumento de la incidencia de algunas enfermedades de transmisión vertical en las que destacan la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis C (VHC). Además, la gestante consumidora normalmente no utiliza una única sustancia sino que, con frecuencia, asocia otras drogas, siendo difícil relacionar manifestaciones clínicas concretas con una droga determinada<sup>8,7,11,12,15,16,22,23</sup>.

Por lo tanto, la repercusión en el niño no sólo es la privación de una droga concreta, siendo muy frecuente el SAD, sino todo lo que conlleva el consumo (problemática social, enfermedades de transmisión vertical, etc.)<sup>7,17,23</sup>.

En nuestro hospital, el consumo de drogas por parte de las mujeres embarazadas es una situación relativamente frecuente.

El objetivo de nuestro estudio ha sido conocer la proporción de hijos de madre consumidora de sustancias de abuso en nuestra área sanitaria, las características del embarazo, parto y RN de dichas madres, observar si existen diferencias entre las distintas sustancias consumidas y comparar dichos datos con los obtenidos hace 2 décadas.

## Material y método

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, retrospectivo de cohortes, de todos los casos hijos de madres consumidoras de sustancias de abuso en la Sección de Neonatología del Hospital del Mar de Barcelona desde el 1 de enero de 2002 al 31 de diciembre de 2008.

Se realizó una búsqueda activa de casos a través de la base de datos de la unidad de todos los niños diagnosticados al alta hospitalaria como hijo de madre consumidora de sustancias de abuso, definiéndose como tales aquellos que mediante historia clínica materna y/o determinación de tóxicos en orina en la madre o RN fueron positivos para alguna sustancia de abuso, incluyendo cocaína, heroína, cannabis, benzodiazepinas y anfetaminas, o aquellos cuyas madres estaban en programa de metadona (con la exclusión de tabaco y alcohol) y/o «SAD». Los criterios de inclusión fueron: niño nacido vivo en el Hospital del Mar (incluidos partos extramuros con remisión de madre y niño a este centro); fecha de nacimiento entre 1-1-2002 y 31-12-2008; madre con consumo durante la gestación de alguna sustancia de abuso (determinado mediante historia clínica y/o determinación de tóxicos en orina en la madre o RN, excluido tabaco y alcohol); y/o madre en programa de metadona.

Una vez seleccionados los casos, se revisó la historia clínica con el fin de obtener las distintas variables: filiación, fecha de nacimiento y sexo; datos maternos (edad, etnia, historia toxicológica [sustancia, tiempo y cantidad de consumo], infecciones); datos obstétricos (control de la gestación, complicaciones durante la misma, edad gestacional, tipo de parto, test de Apar, reanimación neonatal); datos neonatales (exploración física, peso, talla y perímetro craneal, clínica [presencia de SAD], definiéndose como el conjunto de síntomas que presentan los RN de madres que han consumido sustancias adictivas durante la gestación, como consecuencia de la interrupción del suministro transplacentario de la sustancia, o ANC, definido como aquellos síntomas presentes en madres consumidoras de cocaína como consecuencia de la alteración de la neurotransmisión), inicio y duración de la misma, tratamiento utilizado y duración, fecha de ingreso y de alta hospitalaria); datos al alta (destino del RN y tipo de lactancia).

Las gestantes se estratificaron en varios grupos (fig. 1): consumidoras de heroína (junto con otros tóxicos, ya que no se encontraron consumidoras de heroína puras); las que estaban únicamente en programa de metadona; madres consumidoras de cocaína, a las cuales dividimos según si consumían exclusivamente cocaína o más drogas, excluyendo las consumidoras de heroína; consumidoras de cannabis, exclusivamente o con otras drogas (principalmente metadona, excluyendo policonsumo con cocaína y heroína, ya incluidos en grupos anteriores); quedando sólo 4 consumidoras puras de benzodiazepinas y 1 de anfetaminas.





Figura 1. Grupos realizados para el estudio.

Finalmente comparamos nuestros datos con los obtenidos en un estudio realizado también en nuestro hospital entre los años 1982-1988, donde se recogieron 99 RN hijos de madres adictas a opiáceos y 50 controles. Dentro de este grupo se dividieron en las consumidoras de heroína (81) y las que estaban en programa de metadona (18)<sup>24</sup>.

Para la descripción de las variables categóricas se han utilizado frecuencias y porcentajes, y para las variables cuantitativas, media y desviación estándar en caso de que presentaran distribución normal, y mediana, mínimo y máximo para las variables que no presentaran dicha distribución.

Para comparar la asociación entre dos variables categóricas se ha utilizado el test de la  $\chi^2$  al cuadrado o el test exacto de Fisher según procediera, y la asociación entre las variables cuantitativas y las variables categóricas (de dos categorías) se ha comparado mediante el test t de Student para datos independientes si la variable presentaba distribución normal y el test no paramétrico de U de Mann-Whitney en caso contrario.

En todos los análisis se han considerado como significativos valores de  $p$  menores a 0,05.

El análisis se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago).

## Resultados

En los años revisados, 157 casos fueron hijos de madres consumidoras de alguna droga (76 niñas y 81 niños), lo que representa aproximadamente un 1,5% de los RN de nuestro hospital en ese periodo de tiempo (10.090 RN vivos). El número total de RN hijos de madre consumidora de sustancias de abuso se ha mantenido estable a lo largo de los años.

La droga más consumida fue el cannabis en 94 casos (59,9% de las consumidoras; 0,93% del total de partos), seguida de la cocaína en 86 (54,8% de las consumidoras; 0,85% del total de partos), metadona con 41 casos (26,1% de las consumidoras; 0,41% del total de partos), heroína con 26 (16,6% de las consumidoras; 0,26% del total de partos), benzodiazepinas con 23 (14,6% de las consumidoras; 0,23% del total de partos) y anfetaminas con 4 (2,5% de las consumidoras; 0,04% del total de partos), con un 47,1% de policonsumidoras (0,74% del total) (Fig. 2). Además, el 78,3% de las consumidoras eran fumadoras, la mayoría de más de 10 cigarrillos al día.

La edad media (DE) de la madre fue de 28 (5,9) años, con un intervalo que iba desde los 16 a los 41 años, siendo el 83,4% de ellas autóctonas.

El 60,5% tuvieron un control adecuado del embarazo, siendo insuficiente (< 4 visitas durante la gestación) en el 16,6% y no controlado en el 22,9%.

Encontramos un aumento de la patología infecciosa en la madre, donde destaca VIH en un 19,4%, VIH en un 9,7% y VHB en un 3,9%, existiendo coinfección entre cualquiera de ellos en el 8,3% de estos casos.

Otras complicaciones encontradas durante el embarazo fueron rotura prematura de membranas (RPM) en 10 (6,4%), 2 casos de corioamionitis (1,3%), 3 (2%) de desprendimiento prematuro de placenta y 1 placenta previa oclusiva.

En cuanto al tipo de parto, el 27,4% fueron cesáreas, 15,9% partos instrumentados y el 4,5% partos extrahospitalarios. El 7,7% requirieron alguna maniobra de reanimación al nacer, presentando un test de Apgar al minuto inferior a 7 en 7 casos (4,6%) y a los 5 minutos en 2 casos (1,3%).

La edad gestacional media fue de 38 (2,2) semanas, siendo el 22,3% prematuros moderados y el 1,3% extremos. El peso medio al nacimiento fue de 2.759 (567,1) g, el 32,5% fueron bajo peso (< 2.500 g), con talla media de 47 (3) cm y perímetro craneal medio de 33,1 (1,77) cm.

El 27,7%, de forma global, presentaron SAD y el 5,2% ANC, con inicio entre el primer y 12<sup>o</sup> día de vida y una mediana de duración de 10 días (extremos 2-63 días). Todos recibieron tratamiento con fereobarbital. La clínica más frecuente fue llanto agudo, hiperreflexia, temblor, hipertonia, irritabilidad o alteración en la succión.

Otras manifestaciones clínicas o malformaciones presentes se pueden ver en la tabla 1.

El 78,9% marcharon de alta con lactancia artificial. El 78,4% pudieron ir al domicilio materno, un 13,1% a un centro de acogida, un 4,6% a una familia de acogida o adopción y un 3,9% a la familia extensa.

## Heroína (tabla 1)

Si miramos los diferentes grupos vemos que el 16,6% (26 casos) consumieron heroína, todas ellas además junto con otras drogas o estaban también en programa de metadona. De las que se averiguó el consumo ( $n = 16$ ), en 4 fue endovenoso y en el resto fumado o inhalado. En este grupo destaca el poco control obstétrico, la elevada proporción de infección por VIH y coinfección VIH y VHB, el gran número de cesáreas por infección VIH materna y de partos extrahospitalarios. También hubo un aumento de prematuridad, con un 30,8% de prematuridad moderada, siendo el 38,5% menores de 2.500 gramos. El 69,2% presentaron SAD, 1 además ANC, con

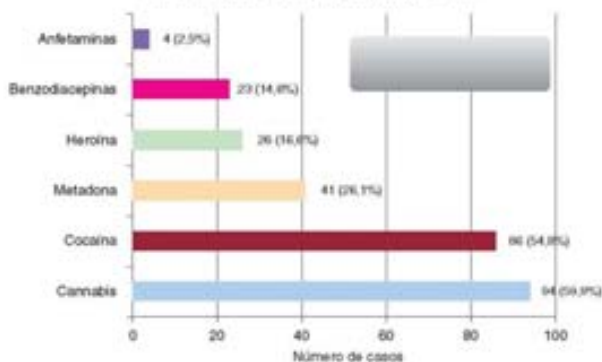


Figura 2. Consumo de cada sustancia de abuso.

inicio entre 1-12 días y duración entre 5-26 días. Sólo el 52% marchó de alta al domicilio materno, lo que refleja la alta problemática social.

#### Metadona (tabla 1)

El 8,9% (14 casos) estaban en programa de metadona, y 4 de ellas además consumían benzodicepinas. Además, 27 madres, no incluidas en este grupo, consumían otras drogas aun estando en programa de metadona. En este grupo encontramos un mayor control del embarazo. Destaca el alto porcentaje de VHC y coinfección VIH con VHC, un aumento del número de cesáreas, sobre todo debidas a infección materna por VIH, y la correcta puntuación de Apgar al nacimiento. El SAD estuvo presente en el 85,7%, con inicio entre los días 1-5 y duración 4-21 días. La edad gestacional fue mayor, el 7,1% presentaron prematuridad moderada y el 21,4% bajo peso. El 85,7% pudieron marchar a domicilio materno.

Si comparamos este grupo con el grupo de heroína encontramos menor prematuridad y un mejor control gestacional, de forma significativa.

#### Cocaína (tabla 1)

En el grupo de cocaína (40,8% de las consumidoras) encontramos un control obstétrico adecuado en aproximadamente la mitad de las pacientes (51,6%) y destaca el aumento del desprendimiento prematuro de placenta en el grupo con consumo exclusivo de cocaína (11,1%), no viéndose en ningún caso en los otros grupos, siendo también éste el grupo con más porcentaje de Apgar bajo al nacimiento tanto al minuto como a los 5 minutos. Así mismo, encontramos un número elevado de cesáreas y partos extrahospitalarios. Un 11% presentaron ANC de inicio entre los días 1-5 y duración de entre 2-11 días. También vemos un aumento de la prematuridad, bajo peso, talla y perímetro craneal. Un 73,4% pudieron ir a domicilio. En el subgrupo de las policonsumidoras (37 casos) se observan peores puntuaciones de Apgar al nacimiento, más partos extrahospitalarios, infecciones, bajo peso y prematuridad.

#### Cannabis (tabla 1)

En el grupo de cannabis encontramos 41 consumidoras exclusivas y 7 que asocian metadona o benzodicepinas. En este

grupo las madres son más jóvenes, con mucho mejor control del embarazo, siendo las enfermedades de transmisión mucho más frecuentes en el subgrupo que consumía metadona o benzodicepinas, con aumento del número de cesáreas y partos instrumentados y menor asistencia obstétrica en dicho grupo. El SAD estuvo presente en un 4,9%.

Si comparamos las consumidoras exclusivas de cocaína y cannabis, encontramos, de forma significativa, madres de mayor edad, más días de ingreso, menor control gestacional, mayor número de cesáreas y partos extrahospitalarios, junto con más problemática social y menos niños con lactancia materna en el grupo de cocaína.

#### Benzodicepinas (tabla 1)

En cuanto al consumo de benzodicepinas, se observa sobre todo asociado a otras drogas. De un total de 23, 4 eran consumidoras exclusivas y 19 en asociación con otras drogas. De las madres con consumo exclusivo de benzodicepinas, ninguna presentó complicaciones obstétricas ni infecciones, no hubo ningún caso de prematuridad y sólo se vio un bajo peso. La clínica presentada por sus hijos fue irritabilidad, temblor e hipotonía o hipertonía, siendo el destino de todos ellos al alta el domicilio materno.

#### Anfetaminas (tabla 1)

Sólo se encontró una madre consumidora de anfetaminas exclusivamente, existiendo 3 más que las consumían junto con otras drogas, incluidas en otros grupos. Fue una madre de 26 años, autóctona, con embarazo poco controlado, que presentaba un trastorno psiquiátrico, no existiendo ninguna complicación durante el embarazo. Tuvo un parto eutócico, con un Apgar correcto al nacimiento, naciendo un niño prematuro de 35,5 semanas con bajo peso (2.250 g), no presentando SAD y marchándose al alta a un centro de acogida por problemática social.

#### Comparación período 1982-1988 con 2002-2008 (tabla 2)

Si comparamos las madres consumidoras de heroína durante el período 1982-88 con las del período actual, vemos una disminución relativa respecto a otras sustancias del consumo de dicha droga y que, si se consume, es asociada a otras. En la nueva etapa se

Tabla 1  
Resultados obtenidos en el período 2002-2006.

	Número de casos (N)	Varicela 26 (16,6)	Metaxona 14 (9,0)	Gocales 37 (17,2)	Gocales + MRAC 37 (23,6)	Canaluchi 41 (26,1)	Canaluchi + MRAC 7 (4,5)	Bioradiografía 4 (2,5)	Adiuvante 1 (0,6)	
<b>Enfermedades</b>										
<b>Atad materno (efecto)</b>										
Controlado	26,3 (± 5,21)	30,3 (± 4,28)	26,4 (± 5,2)	26,3 (± 6,4)	24,9 (± 5,26)	29 (± 5,26)	26	32,8 (± 5,87)	26	
Preco controlado	8 (30,0)	12 (85,7)	14 (51,9)	19 (71,4)	34 (90,9)	4 (27,1)	4 (10,0)	4 (10,0)	0 (0)	
Mai controlado	7 (26,9)	0 (0)	3 (18,5)	3 (13,5)	6 (14,0)	2 (28,6)	2 (20,0)	0 (0)	1 (10,0)	
Aplicaciones maternas (2)	11 (42,3)	2 (14,3)	8 (28,6)	13 (35,1)	1 (2,4)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VH	0 (0)	1 (7,1)	1 (3,7)	1 (2,9)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VHC	4 (15,4)	6 (43)	1 (3,7)	4 (11,4)	0 (0)	3 (42,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VH + VHC	0 (0)	0 (0)	1 (3,7)	1 (2,9)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VH + VHB	3 (16,2)	4 (28,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VH + VHB + VHC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
VHB + VHC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
MRAC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Complejos virus (2)	MRP (17,7)	1 (7,1)	MRP (2,4)	MRP (3,3)	MRP (7,3)	Colgaterona (14,3)	-	-	-	
			IPP (11,1)							
			Concomitante (7,4)							
<b>Punto</b>										
Indice (2)	15 (57,7)	8 (53,7)	11 (42,3)	21 (56,8)	25 (61)	1 (14,3)	2 (50)	2 (50)	1 (10,0)	
Instrumentado (2)	1 (3,8)	1 (7,1)	3 (11,5)	6 (16,2)	10 (24,4)	3 (42,9)	3 (75)	3 (75)	0 (0)	
Gocales (2)	6 (23,1)	8 (57,1)	10 (37)	9 (24,3)	6 (14,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Zonohigiénicas (2)	4 (15,4)	0 (0)	2 (7,4)	1 (2,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Agua (2)	0 (0)	0 (0)	2 (7,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
< 4 días	0 (0)	0 (0)	2 (7,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
< 4 días + vacunación	1 (3,8)	0 (0)	2 (7,4)	7 (18,8)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Reserva núcleo</b>										
Atad paterno (veremos)	37,4 (± 2,05)	39 (± 1,37)	36,3 (± 1,84)	37,2 (± 3,06)	38,7 (± 1,83)	39,4 (± 1,12)	38,3 (± 6,38)	35,5	35,5	
Prevacuación (2)	8 (30,0)	1 (7,1)	5 (18,5)	14 (38,9)	8 (19,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10,0)	
Fosa (2)	2,09 (± 0,405,44)	2,093,9 (± 31,683)	2,094,6 (± 834,23)	2,308,5 (± 624,87)	2,303,5 (± 314,34)	2,600 (± 303,81)	2,387,5 (± 68,87)	2,290	2,290	
Riso post (2)	10 (38,5)	5 (21,4)	8 (28,6)	16 (43,2)	10 (24,4)	1 (29)	1 (25)	1 (25)	1 (10,0)	
Tubo (10)	40,0 (± 2,01)	47,6 (± 2,68)	47,6 (± 2,68)	46,1 (± 2,68)	47,5 (± 2,7)	47,2 (± 3,08)	45,3 (± 3,1)	46	46	
Instrumento control (cm)	32,9 (± 1,38)	33,3 (± 1,03)	33,0 (± 1,08)	32,8 (± 2,34)	33,3 (± 1,1)	33,3 (± 1,47)	34 (± 2,48)	32	32	
ANC (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
SAD + ABC (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Acus (obst.)	1 (3,8)	0 (0)	0 (0)	1 (2,9)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Derecho (obst.)	1 (3,8)	1 (7,1)	1 (3,7)	1 (2,9)	1 (2,4)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Mujeres/oscuras	19 (72,3)	14 (103)	8 (29,6)	19 (51,4)	10 (24,4)	1 (29)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Enfermedades paternas</b>										
Asistencia (2)	1 (3,8)	1 (7,1)	3 (11,5)	3 (13,5)	3 (7,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Maternas	1 (3,8)	13 (96,3)	23 (88)	3 (13,5)	3 (7,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Antidotal	21 (95,2)	19 (78,6)	19 (78,6)	31 (91,7)	23 (59)	2 (28,6)	2 (20)	3 (75)	0 (0)	
Derecho (2)	1 (3,8)	1 (7,1)	2 (7,4)	28 (80)	16 (41)	1 (14,3)	1 (25)	1 (25)	1 (10,0)	
Domicilio	3 (13,2)	0 (0)	1 (3,7)	3 (8,6)	40 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Centro	8 (36)	0 (0)	1 (3,7)	3 (8,6)	40 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Adopción/Arropia	2 (9)	1 (7,1)	2 (7,4)	2 (5,7)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	
Familia extensa	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Valores expresados como media (± DE) n e (%).  
 CV: vacunación intratecal; IPP: aspiración de líquido cefalorraquídeo; PMA: puntaje de actividad motora; KPM: escala puntaje de actividad motora; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VH: virus de la inmunodeficiencia humana.

**Tabla 2**  
Comparación entre los periodos 1982-1988 y 2002-2008

Número de casos	Heroína 1982-1988; 81	Heroína 2002-2008; 26	p	Metadona 1982-1988; 18	Metadona 2002-2008; 14	p
<b>Embarazo</b>						
Edad materna (años)	22,9 (±4,21)	28,3 (±5,21)	<0,001*	22,9 (±3,2)	30,1 (±4,28)	<0,001*
Control embarazo (%)	12 (14,8)	8 (30,8)	0,047*	6 (33,3)	12 (85,7)	0,002*
Controlado	26 (32,1)	7 (26,9)		9 (50)	0 (0)	
Poco controlado	43 (53,1)	11 (42,3)	0,429	3 (16,7)	2 (14,3)	1
Mal controlado	8PM 1 (1,2)	8PM 2 (7,7)	0,726	8PM 1 (5,5)	8PM 0 (0)	1
Complicaciones (%)	Mecotón 10 (12,4)	Mecotón 2 (7,7)		Mecotón 1 (5,5)	Mecotón 1 (7,1)	
<b>Parto</b>						
Estilo (%)	36 (45)	15 (57,7)	0,000*	7 (38,9)	5 (35,7)	0,317
Instrumentado (%)	23 (28,4)	1 (3,8)	0,02*	6 (33,3)	1 (7,1)	0,01*
Cesárea (%)	19 (23,5)	6 (23,1)	1	5 (27,8)	8 (57,1)	0,482
Extrahospitalario (%)	2 (2,4)	4 (15,4)		0 (0)	0 (0)	
Apgar (%)						
< 7 al min	15 (18,8)	0 (0)		7 (38,9)	0 (0)	
< 7 a los 5 min	3 (3,8)	0 (0)		2 (11,1)	0 (0)	
<b>Recién nacido</b>						
Edad gestacional (semanas)	38,1 (± 2,64)	37,4 (± 2,05)	0,186	38,6 (± 2,7)	39 (± 1,57)	0,653
Pretermaturidad (%)	11 (13,8)	8 (30,8)	0,076	5 (27,8)	1 (7,1)	0,196
Peso (g)	2.751,4 (± 610,33)	2.630 (± 405,44)	0,285	2.675,6 (± 711,28)	2.853,9 (± 513,65)	0,209
Bajo peso (%)	21 (26,0)	10 (38,5)	0,265	7 (38,9)	3 (21,4)	0,446
Talla (cm)	46,8 (± 4,53)	46,6 (± 2,01)	0,433	47,9 (± 2,13)	47,6 (± 2,88)	0,736
Perímetro craneal (cm) (C)	33,4 (± 1,68)	32,9 (± 1,59)	0,188	32,3 (± 2,14)	33,3 (± 1,63)	0,154
SAD (%)	48 (60,8)	18 (69,2)	0,363	14 (77)	12 (85,7)	0,672
Inicio (%)			0,268			0,883
< 24 h	23 (47,9)	11 (42,3)		7 (38)	6 (56)	
24-48 h	19 (38,6)	4 (23,5)	0,067	8 (35,7)	3 (25)	0,196
> 48 h	4 (8,3)	1 (5,8)		2 (14,3)	3 (25)	
> 7 d	0 (0)	1 (5,9)	0,009*	0 (0)	0 (0)	0,517
<b>Duración (%)</b>						
< 7 d	4 (9,3)	7 (38,9)	1	5 (38,5)	1 (8,3)	0,437
8-14 d	23 (53,5)	8 (44,4)		5 (38,5)	5 (41,7)	
15-21 d	9 (20,9)	1 (5,5)	0,001*	2 (15,4)	0 (0)	0,891
22-29 d	6 (14)	2 (11,1)		1 (7,7)	0 (0)	
> 30 d	1 (2,3)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
<b>Tratamiento (%)</b>						
Fenobarbital	29 (61,7)	18 (100)		11 (78,6)	12 (100)	
Tintura de opio	12 (25,5)	0 (0)		1 (7,1)	0 (0)	
Chlorpromacina	6 (12,8)	0 (0)		2 (14,3)	0 (0)	
<b>Lactancia (%)</b>						
Materna	3 (3,7)	1 (4,5)		0 (0)	1 (7,1)	
Artificial	78 (96,3)	25 (95,5)		18 (100)	13 (92,9)	
<b>Destino (%)</b>						
Doméstico	30 (72,8)	13 (50)		12 (66,7)	12 (85,7)	
Centro	2 (2,5)	9 (34,6)		1 (5,6)	1 (7,1)	
Adopción/acogida	10 (12,4)	2 (7,6)		2 (10,7)	0 (0)	
Familia extensa	6 (7,4)	1 (3,8)		1 (5,6)	1 (7,1)	
Traslado	2 (2,5)	1 (3,8)		1 (5,6)	0 (0)	
Muertes	2 (2,5)	0 (0)		1 (5,6)	0 (0)	

SAD: síndrome de abstinencia a drogas.

\* Resultado estadísticamente significativo. Valores expresados como media (± DE) n (%).

observan madres de mayor edad, un mejor control gestacional, menor instrumentalización de los partos pero más partos extrahospitalarios, mejor puntuación de Apgar al minuto, usándose actualmente en el tratamiento del SAD fenobarbital y siendo más elevado el número de niños que van a centros de acogida.

Centrándonos en el grupo de madres en programa de metadona, vemos que, en la actualidad, las madres son mayores, se controlan mejor el embarazo y los RN tienen mejor Apgar al minuto, todo ello de forma significativa.

En cuanto a las infecciones de dichas madres consumidoras de opiáceos (heroína o metadona), vemos una reducción de VIH y VHB (el VHC no ha podido ser comparado al no recogerse en el periodo anterior), siendo únicamente significativa la reducción de los casos de VIH (tabla 3).

En cuanto a las características de los RN (edad gestacional, peso, talla y perímetro craneal), no ha habido diferencias a lo largo del tiempo en ninguno de los casos.

## Discusión

El estudio presentado es un trabajo descriptivo de cohortes de todos los casos diagnosticados de hijo de madre consumidora de sustancias de abuso en nuestra área sanitaria entre 2002-2008. Con este diseño se planteó calcular la proporción actual en nuestro medio, describir sus aspectos clínicos más importantes y valorar los posibles cambios entre dichos años y la década de 1980. Existen limitaciones con este diseño, ya que puede haber casos no incluidos porque las madres no refieren el consumo y sus hijos no presentan una sintomatología llamativa. El policonsumo (incluyendo también el alto consumo de tabaco [78,3%] y alcohol, junto con consumo esporádico de otras drogas) y el tipo de vida de estas madres (pobre cuidado prenatal, nutrición deficiente, etc.), hacen difícil, desde el punto de vista metodológico, la comparación de los datos para cada droga en particular.



**Tabla 3**  
Comparación de prevalencia de infecciones maternas en consumidoras de opiáceos entre los períodos 1982-1988 y 2002-2008.

	Período 1982-1988	Período 2002-2008	p
VH1	67,6%	25%	< 0,01
VH8	6%	2,5%	0,663
VHC	-	30%	-

VH1: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VH8: virus de la inmunodeficiencia humana.

En los últimos años, estamos asistiendo a cambios en los hábitos de consumo de drogas. Desde los años 80 el consumo de drogas ilícitas ha ido en aumento, aunque en los últimos años tiende a estabilizarse. La heroína, principal droga utilizada en la década de los 80, va siendo sustituida por otras sustancias, viéndose un crecimiento de forma alarmante del consumo de cannabis y de cocaína, dato también recogido en nuestro estudio<sup>3,4,6,17,18,22,24,25</sup>. Destacar también que hemos observado que la heroína, actualmente, es una droga que no se consume sola y su vía de administración menos frecuente es la forma endovenosa<sup>17,22</sup>, lo que podría haber modificado los efectos en el RN.

Debido a varios factores (irrupción del VIH en la década de los 80, cambios sociales, aumento de la información de la población, aparición de nuevas drogas y de tratamientos de desintoxicación efectivos, etc.) podría haberse producido un cambio en los hábitos del consumo de drogas en nuestra sociedad y, en consecuencia, en la incidencia, presentación clínica y procesos asociados de los hijos de madre toxicómana.

La gestante adicta a drogas suele presentar problemática social grave, sobre todo en las adictas a heroína<sup>6,7,11,15-17,22,23-26</sup>, destacando una edad media de 28 años, y que la mayoría son autóctonas.

Las conductas de riesgo en estas mujeres, como promiscuidad sexual, poca atención personal y uso de agujas y jeringas contaminadas, favorece que determinadas patologías sean más frecuentes que en el resto de la población. La infección por VHC es hoy en día la infección más prevalente en este grupo poblacional (llegando al 19,4%), por encima de la infección por VIH y VH8, existiendo en muchos casos también coinfecciones. Esto ha cambiado respecto a la década de los 80, en la que era más frecuente la infección por VIH, que llegó hasta el 67% de media, y el VH8, en un 6%, siendo actualmente en nuestro estudio del 9,7% y 1,9%, respectivamente<sup>6,15,22,24,25</sup>.

La importancia de estos resultados radica sobre los RN, que son un grupo de riesgo elevado de transmisión vertical de dichas enfermedades. Es aquí donde el diagnóstico rápido de VIH y VH8, desde sala de partos, en los casos en los que se desconozcan, tiene un papel fundamental para establecer las medidas preventivas pertinentes.

Los problemas obstétricos que presentaron las gestantes adictas han sido consecuencia del tipo de vida que ocasiona su adicción, originando un deficiente control de la gestación<sup>6,17</sup>. El 39,5% no siguen un control de su embarazo o dicho control es insuficiente, acudiendo a veces, por primera vez en el momento del parto, por lo que sería conveniente establecer un diagnóstico precoz del embarazo para iniciar un seguimiento y tratamiento médico y psicológico adecuado. Las que presentan un mejor control son aquellas en programa de metadona o con consumo de cannabis exclusivamente, y las peor controladas las consumidoras de heroína. Destaca, en este último grupo, un 42,3% de gestantes sin control frente a un 14,3% en el grupo de metadona, datos similares a los obtenidos en los años 80 (53 frente a 16%)<sup>15,24,26</sup>.

Los programas de metadona pretenden posibilitar la adaptación social de estas pacientes a través de la estabilización farmacológica asociada a un soporte psicoterapéutico de la gestante adicta. El

éxito de dichos programas radica en un mejor control de la embarazada pero, en la práctica, como hemos podido ver también en el estudio, se observa que algunas de ellas continúan con polidrogadicción<sup>6,24-27</sup>.

Los problemas de estas gestantes durante el parto no han sido graves, aunque en algunos estudios sí que se han visto consecuencias relevantes<sup>3,19-24,28</sup>.

En cuanto al tipo de parto, destaca el aumento de partos instrumentados y cesáreas, observado también en otros estudios, entre ellos el realizado en nuestro hospital anteriormente<sup>22,24,25</sup>, relacionados posiblemente con el aumento de la instrumentalización global de la obstetricia en nuestra sociedad, pero también con el alto porcentaje de infección VIH materna, lo que se aprecia sobre todo en el grupo de metadona. También hay que destacar el alto porcentaje de partos extrahospitalarios (4,5%), duplicándose desde la década de los 80, limitándose a los grupos de consumidoras de heroína y cocaína<sup>24</sup>.

La puntuación de Apgar al nacer ha sido correcta en la mayoría (95,4%), mejorando respecto al estudio previo, siendo el grupo de consumidoras de cocaína el que presentó un porcentaje más elevado de menor puntuación de Apgar al nacimiento, siendo inferior a 7 en un 4,6% de los casos al minuto y 1,3% a los 5 minutos<sup>24</sup>.

Destacar también la asociación entre consumo de cocaína y desprendimiento prematuro de placenta, siendo su incidencia entre embarazos normales de entre 0,5-1% según las series<sup>6,29</sup> y viéndose un aumento en consumidoras de cocaína en varios estudios<sup>16-18,17,18,20</sup>, que en nuestro caso no se ha visto en consumidoras de otras sustancias.

El consumo de drogas en la mujer embarazada puede ocasionar numerosas alteraciones embrionarias, fetales y neonatales, con consecuencias que pueden afectar, posteriormente, al desarrollo del niño<sup>3,6,9-14,26,37</sup>.

El SAD es la principal manifestación en el RN de hijo de madre consumidora de drogas durante el embarazo, estando presente entre el 60-70% de las madres adictas a opiáceos, por lo que el conocimiento de su clínica es importante. El momento posnatal de aparición de los síntomas en el niño dependerá de la droga o drogas utilizadas, de su dosis y del tiempo transcurrido entre el último consumo y el parto, no produciéndose dicho síndrome si no se ha consumido durante el último mes, en el caso de los opiáceos. En el caso de la heroína aparece en las primeras 24 horas postnatales, sin embargo en la metadona está descrito como más tardío, con manifestaciones clínicas entre el 3° y 4° día, y más importante y prolongado<sup>6,7,15,16,24,25,27</sup>.

En nuestro caso el SAD apareció en el 27,7% de adictas, llegando al 68% en las adictas a heroína y al 85,7% de metadona, superior al de los años 80 (60% de las adictas a heroína y 77% en las de metadona). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el inicio y la duración de los SAD a heroína y metadona, como tampoco se encontraron en el estudio de los años 80, a diferencia de lo publicado en otros estudios<sup>16</sup>.

El tratamiento del SAD a opiáceos se ha realizado en todos los casos con fenobarbital, acompañado de otras medidas tales como ambiente tranquilo, poca luz y ruido, ropa suave y tomas frecuentes. En un metaanálisis reciente se llega a la conclusión de que los opiáceos podrían probablemente ser utilizados como terapia inicial en el tratamiento de dicho síndrome<sup>27</sup>.

En cuanto a las ANC provocadas por la cocaína, sin poder considerarse propiamente un SAD dado que se pueden presentar aunque sólo se haya consumido durante el primer trimestre del embarazo, se encontraron en el 11,1% de los RN.

Se ha observado en el grupo de madres en programa de metadona que los RN tienen una morbilidad menor que los de madres heroínómanas, con una menor prematuridad y bajo peso, aunque presenta igual o más SAD. Por esta razón es importante

detectar a las madres consumidoras e intentar introducir las en programas de metadona<sup>6,13,16,26,29</sup>.

En el estudio realizado en los años 80 en nuestro hospital, comparando el grupo de consumidoras de heroína con el grupo testigo, encontramos peso, talla, perímetro craneal y edad gestacional menores, al igual que en otros estudios, y en el grupo de metadona menor peso y perímetro craneal. Si comparamos el grupo de heroína con el de metadona, vemos que solamente el perímetro craneal está más disminuido en metadona<sup>24</sup>. En cambio, en nuestro estudio sólo resultó significativa la diferencia en cuanto a la edad gestacional, siendo ésta menor en las consumidoras de heroína.

Respecto a las malformaciones congénitas, no hemos encontrado datos significativos, ni tampoco en el estudio de los años 80, si bien algunos autores comunican casos de malformaciones urogenitales, intestinales, del sistema nervioso central (SNC), cardíacas y defectos de las extremidades, relacionadas principalmente con el consumo de cocaína<sup>6,10,11,13,14</sup>, que se están cuestionando en la bibliografía más reciente<sup>12,17,18</sup>. Destacar algún estudio que la relaciona con el síndrome de muerte súbita del lactante<sup>19</sup>.

La lactancia materna se debe desaconsejar desde el principio en caso de madres adictas. En nuestro caso las madres que recibieron lactancia materna fue debido a que no se detectaron drogas en orina y el consumo había sido esporádico al inicio del embarazo. Se recomienda la lactancia materna en las madres incluidas en programas sustitutivos con metadona, siempre que no utilicen otras sustancias y no padezcan infecciones que la contraindiquen<sup>7,16,30</sup>.

Un grave problema surge en el momento en que estos RN son dados de alta. Decidir el destino de estos niños resulta muy complejo por la problemática social y las condiciones ambientales a las que van a estar sometidos. En nuestro estudio sólo un 78,4% de los niños pudieron ir al domicilio materno, siendo este porcentaje inferior en los hijos de madres adictas a heroína y cocaína, lo que refleja la alta problemática social que acompaña a la adicción a drogas. Este porcentaje de RN que pasa con sus familias es más elevado en las madres en programa de metadona (85,7%), por lo que podemos decir que existe una socialización de dichas pacientes<sup>13,26</sup>.

Con este estudio hemos querido remarcar la importancia que sigue teniendo el consumo de drogas por parte de la mujer embarazada y sus consecuencias. Es necesario un diagnóstico precoz de dichas madres y su control mediante programas adecuados a su drogodependencia<sup>20,31</sup>. Es importante un seguimiento a largo plazo de sus hijos, ya que se ha descrito que la problemática social acompañante, así como la predisposición genética al consumo de sustancias de abuso en este grupo, podría afectar a la evolución de estos niños en cuanto a aspectos del desarrollo y problemas de comportamiento a largo plazo<sup>13,17,32</sup>.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Bibliografía

- The National Institute on Drug Abuse (NIDA) [web Web]. USA: National Institutes of Health, a component of the U.S. Department of Health and Human Services [acceso 4 de diciembre de 2009]. NIDA InfoFacts: El embarazo y las tendencias de uso de drogas. Disponible en: <http://drugabuse.gov/infofacts/EIfact6-09.html>
- Barrío G, Sánchez A, Mata M, Infante C, Llorens N, Ramírez V, et al. Observatorio Español sobre Drogas. Informe 2007 [monografía internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2008 [acceso 4 de diciembre 2009]. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/subseva/pdf/InformeEldades2007-2008.pdf>
- Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre alcohol y drogas en España (Edades) 2007/2008 [monografía internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2008 [acceso 4 de diciembre 2009]. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/subseva/pdf/InformeEldades2007-2008.pdf>
- Informe anual 2009. El problema de la drogodependencia en Europa [monografía internet]. Lutemburgo: Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías; 2009 [acceso 4 de diciembre 2009]. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria3/coopera/pdf/Informe2009.pdf>
- Kuzielowski KM. The effects of drug abuse on pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007;19:578-83.
- Vucinovic M, Ripe D, Vucinovic Z, Capkun V, Bucal M, Banovic I. Maternal and neonatal effects of substance abuse during pregnancy: our ten year experience. *Yonsei Med J*. 2008;49:705-13.
- Echeverría J. Drogas en el embarazo y morbilidad neonatal. *An Pediatr*. 2003;58:319-22.
- Garía-Algaró, V, Vall-Gombolles O, Puig Solà C, Mur Sierra A, Scaravelli G, Pacifico R, et al. Exposición prenatal a drogas de abuso a través del análisis de meconio en una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70:151-8.
- Woods JR. Adverse consequences of prenatal illicit drug exposure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1996;8:403-11.
- Ellis B, Byrd LD, Sisson WR, Patterson-Barnett A. In utero exposure to cocaine: a review. *South Med J*. 1993;86:725-31.
- Levy M, Koren G. Obstetric and neonatal effects of drugs of abuse. *Emerg Med Clin North Am*. 1980;8:633-52.
- Schempf AH. Illicit drug use and neonatal outcomes: a critical review. *Obstet Gynecol Surv*. 2007;62:749-57.
- Kain ZK, Ritar S, Barash PG. Cocaine abuse in the parturient and effects on the fetus and neonate. *Anesth Analg*. 1993;77:835-45.
- Effects of in utero exposure to street drugs. *Am J Public Health*. 1993;83(Suppl 1):32.
- Fajmanukun, Odolevi O, Samba C, Tutty S, Patraudrac P, Armstrong D, Phillips T, et al. Pregnancy outcome in women who use opiates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;126:170-5.
- Wirkhauer R, Jung E, Fischer C. Opioid dependence and pregnancy. *Curr Opin Psychiatry*. 2008;21:255-9.
- Shankaran S, Lester RM, Das A, Bauer CR, Rada HS, Lapage L, et al. Impact of maternal substance use during pregnancy on childhood outcome. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12:143-50.
- Aguilera C, Izarra A. Abuso de sustancias tóxicas durante el embarazo. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:714-6.
- Substance Abuse Mental Health Services Administration. Office of Applied Studies. Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National Findings [monografía internet]. Substance Abuse Mental Health Services Administration. Office of Applied Studies [acceso 4 de diciembre 2009]. Disponible en: <http://www.oas.samhsa.gov/nedsh/2007/nedsh/2007Results.pdf>
- Sherwood RA, Kozang J, Karvadia V, Greenough A, Peters TJ. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr*. 1999;158:488-92.
- Fackus AG, Colbert DL, Erskine KL. Anonymous testing for drug abuse in an antenatal population. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102:563-5.
- Martin MA, Selli G, Málaga S, Coadilloero C, Pérez C, Mateos J. Consumo de drogas durante el embarazo y morbilidad neonatal: cambios epidemiológicos en los últimos 10 años. *An Pediatr*. 2003;58:574-9.
- Schempf AH, Strobohm DM. Illicit drug use and adverse birth outcomes: is it drugs or context? *J Urban Health*. 2008;85:858-73.
- Mur Sierra A. Estudio del recién nacido de madre adicta a opiáceos [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina; 1992.
- Mur A, Martí C, Muñoz JA, de Torres S, Cans J, Llorens J. Problemática de los recién nacidos de madres adictas a opiáceos. *Arch Pediatr*. 1987;38:539-51.
- Burns L, Marwick RP, Lim K, Wallace C. Methadone in pregnancy: treatment retention and neonatal outcomes. *Addiction*. 2007;102:264-70.
- Osborn DA, Cole MJ, Jeffery HE. Opiate treatment for opiate withdrawal in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(3):CD002059.
- Dombrowski MP, Wolfe HM, Wirkh RA, Evans MI. Cocaine abuse is associated with abruptio placentae and decreased birth weight, but not shorter labor. *Obstet Gynecol*. 1991;77:139-43.
- Wang IC. Methadone treatment during pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 1999;28:617-22.
- Janzon IM, Chou R, Visher ML, Barrow C, Schroeder JR, Shakleya DM, et al. Methadone maintenance and breastfeeding in the neonatal period. *Pediatrics*. 2008;121:106-14.
- Godío T, Marcos T, Cerónimas J, Wáler L, Salasano M. Estudio de la eficacia y factores de riesgo en el tratamiento cognitivo-conductual del tabaquismo en el embarazo. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:607-11.
- Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci*. 2005;8:1450-7.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**





Accornero V. H., Morrow C. E., Bandstra E. S., Johnson A. L., Anthony J. C. (2002). Behavioral outcome of preschoolers exposed prenatally to cocaine: role of maternal behavioral health. *J Pediatr Psychol* 27, 259-269.

Addis A., Moretti M. E., Ahmed Syed F., Einarson T. R., Koren G. (2001). Fetal effects of cocaine: an updated meta-analysis. *Reprod Toxicol* 15, 341-369.

Aguilera C, Izarra A. (2005). Toxic substance abuse during pregnancy. *Med Clin(Barc)* 125, 714-716.

Andres R. L, Day M. C. (2000). Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Semin Neonatol* 5, 231-241.

Anonymous. (1993). Effects of in utero exposure to street drugs. *Am J Public Health* 83, Suppl: 1-32.

Ashfaq M., Janjua M. Z., Nawaz M. (2003). Effects of maternal smoking on placental morphology. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 15, 12-15.

Asmussen I. (1977). Ultrastructure of the human placenta at term. Observations on placentas from newborn children of smoking and non-smoking mothers. *Acta Obstet Gynecol Scand* 56, 119-126.

Atkinson H. C., Begg E. J., Darlow B. A. (1988). Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 14, 217-240.

Bakdash A., Burger P., Goecke T. W., Fasching P. A., Reulbach U., Bleich S., Hastedt M., Beckmann M. W., Pragst F., Kornhuber J. (2010). *Anal Bioanal Chem* 396, 2469-2477.

Balabanova S., Wolf H. U. (1989). Methadone concentrations in human hair of the head, axillary and pubic hair. *Z Rechtsmed* 102, 293-296.

Baldwin V. J., MacLeod P. M., Benirschke K. (1982). Placental findings in alcohol abuse in pregnancy. *Birth Defects Orig Artic Ser* 18, 89-94.

Bar-Oz B., Klein J., Karaskov T., Koren G. (2003). Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88, F98-F100.

Behnke M., Eyer F. D. (1993). The consequences of prenatal substance use for the developing fetus, newborn and young child. *Int J Addict* 28, 134-191.

Bennet D. S., Bendersky M., Lewis M. (2002). Children's intellectual and emotional-behavioral adjustment at 4 years as a function of cocaine exposure, maternal characteristics, and environmental risk. *J Child Psychol Psychiatr* 43, 648-658.

Bessa M. A., Mitsuhiro S. S., Chalem E., Barros M. M., Guinsburg R., Laranjeira R. (2010). Underreporting of use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation among pregnant adolescents. *Addict Behav* 35, 266-269.

Betancourt L. M., Yang W., Brodsky N.L., Gallagher P. R., Malmud E. K., Giannetta J. M., Farah M. J., Hurt H. (2011). Neurotoxicological effects of cocaine on fetal development. *Teratol* 33, 36-46.

Birchfield M., Scully J., Handler A. (1995). Perinatal screening for illicit drugs: policies in hospitals in a large metropolitan area. *J Perinatol* 15, 208-214.

Blank D. L., Kidwell D. A. (1993). External contamination of hair by cocaine: an issue in forensic interpretation. *Forensic Sci Int* 63, 145-160.

Bosio P., Keenan E., Gleeson R., Dorman A., Clarke T., Darling M., O'Connor J. (1997). The prevalence of chemical substance and alcohol abuse in an obstetric population in Dublin. *Ir Med J* 90, 149-150.

Brody T. M., Larner J., Minneman K. P. (1993). Human pharmacology: molecular to clinical, (St Louis, Mosby).

Browne, S., Moore, C., Negrusz, A., Tebbett, I., Covert, R., Dusick, A. (1994). Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. *J Forensic Sci* 39, 1515-1519.

Browne, S. P., Tebbett, I. R., Moore, C. M., Dusick, A., Covert, R., Yee, G. T. (1992). Analysis of meconium for cocaine in neonates. *J Chromatogr* 575, 158-161.

Burchell B., Coughtrie M., Jackson M., Harding D., Fournel-Gigleux S., Leakey J., Hume R. (1989). Development of human liver UDPglucuronosyltransferases. *Dev Pharmacol Ther* 13, 70-77.

Burton G. J., Palmer M. E., Dalton K. J. (1989). Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers. *Br J Obstet Gynaecol* 96,907-915.

Burd L. (2008). Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Bierth Defects Research Part A. Clinical and Molecular Teratology* 82, 487-493.

Cambell S. (2003). Prenatal cocaine exposure and neonatal/infant outcomes. *Neonatal Netw* 22, 19-21.

Cattaneo C., Gigli F., Lodi F., Grandi M. (2003). The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains. *J Forensic Odontostomatol* 21, 1-5.

Chan D., Bar-Oz B., Pellerin B., Paciorek C., Klein J., Kapur B., Farine D., Koren G. (2003). Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit* 25, 271-278.

Chan D., Knie B., Boskovic R., Koren G. (2004). Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 75-82.

Chasnoff I. J., Burns K. A., Burns W. J. (1987). Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality. *Neurotoxicol Teratol* 9, 291-293.

Chasnoff I. J., Burns W. J., Schnoll S. H., Burns K. A. (1985). Cocaine use in pregnancy. *N Engl J Med* 313, 666-669.

Chasnoff I. J., Bussey M. E., Savich R., Stack C. M. (1986). Perinatal cerebral infarction and maternal cocaine use. *J Pediatr* 108, 456-459.

Chasnoff I. J., Griffith D. R. (1989). Cocaine: clinical studies of pregnancy and the newborn. *Ann N Y Acad Sci* 562, 260-266.

Chiarotti M., Strano-Rossi S., Offidani C., Fiori A. (1996). Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal Toxicol* 20, 555-558.

Christianson R. E. (1979). Gross differences observed in the placentas of smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol* 110, 178-187.

Concheiro-Guisan M., Shakleya D. M., Huestis M. A. (2009). Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine glucuronide, and norbuprenorphine glucuronide in human placenta by liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394, 513-522.

Concheiro M., de Castro A., Quintela O., Cruz A., Lopez-Rivadulla M. (2007). Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Sci Int* 170, 156-162.

Concheiro M., Jones H. E., Johnson R. E., Choo R., Shakleya D. M., Huestis M. A. (2010). Maternal buprenorphine dose, placenta buprenorphine and metabolite concentrations and neonatal outcomes. *Ther Drug Monit* 32, 206-215.

Contreras M. T., Hernandez A. F., Gonzalez M., Gonzalez S., Ventura R., Pla A., Valverde J. L., Segura J., de la Torre R. (2006). Application of pericardial fluid to the analysis of morphine (heroin) and cocaine in forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 164, 168-171.

Crouch D. J. (2005). Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int* 150, 165-173.

De Castro A., Concheiro M., Shakleya D. M., Huestis M. A. (2009). Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 33, 243-252.

De Castro A., Jones H. E., Johnson R. E., Gray T. R., Shakleya D. M., Huestis M. A. (2011). Maternal methadone dose, placental methadone concentrations and neonatal outcomes. *Clinical Chemistry* 57, 449-458.

Demir R., Demir A. Y., Yinanc M. (1994). Structural changes in placental barrier of smoking mother. A quantitative and ultrastructural study. *Pathol Res Pract* 190:656-667.

De Moraes M. C., Guinsburg R., de Araújo C., Mitsuhiro S., Chalem E., Laranjeira R. R. (2006). Exposure to marijuana during pregnancy alters neurobehavior in the early neonatal period. *J Pediatr* 149, 781-787.

Dempsey D. A., Partridge J. C., Jones R. T., Rowbotham M. C. (1998). Cocaine, nicotine, caffeine, and metabolite plasma concentrations in neonates. *J Anal Toxicol* 22, 220-224.

DiGregorio G. J., Ferko A. P., Barbieri E. J., Ruch E. K., Chawla H., Keohane D., Rosenstock R., Aldano A. (1994). Determination of cocaine usage in pregnant women by a urinary EMIT drug screen and GC-MS analyses. *J Anal Toxicol* 18, 247-250.

Dombrowski M. P., Wolfe H. M., Welch R. A., Evans M. I. (1991). Cocaine abuse is associated with abruptio placentae and decreased birth weight, but not shorter labor. *Obstet Gynecol* 77, 139-141.

Drummer O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int* 142, 101-113.

Drummer O. H. (2005). Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int* 150, 133-142.

Dvorchik B. H., Woodward G., Sitar D. S., Tweed W. A. (1986). Hydroxylation and glucuronidation of various xenobiotics by hepatic microsomes from the fetal lamb, pregnant ewe and human fetus. *Dev Pharmacol Ther* 9, 282-289.

EDADES (2009). Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España 2009/2010 [monografía internet]. Madrid: Ministerio de sanidad y consumo. Delegación del gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. [acceso 01 de septiembre 2012]. Disponible en: <http://www.mspsi.es/gabinetePrensa/notaPrensa/pdf/presentacionEdades200910.ppt>

Ellis J. E., Byrd L. D., Sexson W. R., Patterson-Barnett C. A. (1993). In utero exposure to cocaine: a review. *South Med J* 86, 725-731.

El Marroun H., Hudziak J.J., Tiemeier H., Creemers H., Steegers E. A., Jaddoe V. W., Hofman A., Verhulst F. C., van den Brink W., Huizink A.C. (2011). Intrauterine cannabis exposure leads to more aggressive behavior and attention problems in 18-month-old girls. *DDrug alcohol Depend* 118, 470-474.

EISohly M. A., Feng S. (1998). Delta 9-THC metabolites in meconium: identification of 11-OH-delta 9-THC, 8 beta,11-diOH-delta 9-THC, and 11-nor-delta 9-THC-9-COOH as major metabolites of delta 9-THC. *J Anal Toxicol* 22, 329-335.

EMCDDA (2010). Informe anual 2010. El problema de la drogodependencia en Europa [monografía internet]. Luxemburgo: Observatorio Europeo de las drogas y las toxicomanías; 2010 [acceso 01 de septiembre 2012]. Disponible en: [http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att\\_120104\\_ES EMCDDA AR2010 ES.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_120104_ES EMCDDA AR2010 ES.pdf)

Eser H. P., Potsch L., Skopp G., Moeller M. R. (1997). Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. *Forensic Sci Int* 84, 271-279.

Eyler F. D., Behnke M., Wobie K., Garvan C. W., Tebbett I. (2005). Relative ability of biologic specimens and interviews to detect prenatal cocaine use. *Neurotoxicol Teratol* 27,677-687.

Fabro S., Scialli A. R. (1986). Drug and chemical action in pregnancy: pharmacological and toxicologic principles. (New York: Marcel Dekker).

Falcon M., Pichini S., Joya J., Pujadas M., Sanchez A., Vall O., Garcia-Algar O., Luna A., de la Torre R., Rotolo M. C., Pellegrini M. (2012). Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains. *Forensic Sci Int* 218, 92-96.

Farkas A. G., Colbert D. L., Erskine K. J. (1995). Anonymous testing for drug abuse in an antenatal population. *Br J Obstet Gynaecol* 102, 563-565.

Friguls B., Joya X., Garcia J., Gómez-Culebras M., Pichini S., Martinez S., Vall O., Garcia-Algar O. (2012). Assessment of exposure to drugs of abuse during pregnancy by hair analysis in a Mediterranean island. *Addiction* 107, 1471-1479.

Garcia-Algar O., Kulaga V., Gareri J., Koren G., Vall O., Zuccaro P., Pacifici R., Pichini S. (2008). Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit* 30,249-254.

García-Algar O., Vall Combelles O., Puig Sola C., Mur Sierra A., Scaravelli G., Pacifici R., Monleón Getino T., Pichini S. (2009). Exposición prenatal a drogas de abuso utilizando el análisis del meconio en una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona. *An Pediatr (Barc)* 70, 151-158.

Garcia-Algar O., Vall O., Segura J., Pascual J. A., Diaz D., Mutnoz L., Zuccaro P., Pacifici R., Pichini S. (2003). Nicotine concentrations

in deciduous teeth and cumulative exposure to tobacco smoke during childhood. *Jama* 290, 196-197.

Garcia-Bournissen F., Rokach B., Karaskov T., Koren G. (2007). Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology. *Ther Drug Monit* 29, 71-76.

García-Serra J., Ramis J., Simó S., Joya X., Pichini S., Vall O., García-Algar O. (2012). Matrices biológicas alternativas para detectar la exposición prenatal a drogas de abuso en el tercer trimestre de la gestación. *An Pediatr (Barc)* [Epub ahead of print].

Gareri J., Klein J., Koren G. (2006). Drugs of abuse testing in meconium. *Clin Chim Acta* 366, 101-111.

Gleicher N. (1989). *Medicina clinica en obstetricia.*, (Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana).

Gilbert W. M., Lafferty C. M., Benirschke K., Resnik R. (1990). Lack of specific placental abnormality associated with cocaine use. *Am J Obstet Gynecol* 163, 998-999.

Gillogley K. M., Evans A. T., Hansen R. L., Samuels S. J., Batra K. K. (1990). The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *Am J Obstet Gynecol* 163, 1535-1542.

Girod C., Staub C. (2000). Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int* 107, 261-271.

Goldschmidt L., Richardson G. A., Willford J., Day N. L. (2008). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47, 254-263.

Gray T. R. (2009). Identification of prenatal amphetamines exposure by maternal interview and meconium toxicology in the Infant Development, Environment and Lifestyle (IDEAL) study. *Therapeutic Drug Monitoring* 31, 769-775.



Green T. P., O'Dea R. F., Mirkin B. L. (1979). Determinants of drug disposition and effect in the fetus. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19, 285-322.

Gundogan F., Elwood G., Longato L., Tong M., Feijoo A., Carlson R. I., Wands J. R., De la Monte S. M. (2008). Impaired placentation in fetal alcohol syndrome. *Placenta* 29,148-157.

Han E., Yang W., Lee J., Park Y., Kim E., Lim M., Chung H. (2005). Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair. *Forensic Sci Int* 147, 21-24.

Hartwig S., Auwarter V., Pragst, F. (2003). Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 131, 90-97.

Haustein K. O., Thiele G., Stangel U. (1994). Transport of various substances through human enamel and dentine. *Int J Clin Pharmacol Ther* 32, 483-487.

Hollstedt C., Dahlgren L., Rydberg U. (1983). Outcome of pregnancy in women treated at an alcohol clinic. *Acta Psychiatr.Scand* 67, 236-248.

Huestis M. A., Choo R. E. (2002). Drug abuse's smallest victims: in utero drug exposure. *Forensic Sci Int* 128, 20-30.

Huestis M. A., Cone E. J. (2004). Relationship of Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol* 28, 394-399.

Hulse G. K., Milne E., English D. R., Holman C. D. (1997). Assessing the relationship between maternal cocaine use and abruptio placentae. *Addiction* 92, 1547-1551.

Jain L., Meyer W., Moore C., Tebbett I., Gauthier D., Vidyasagar D. (1993). Detection of fetal cocaine exposure by analysis of amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 81, 787-790.

Jauniaux E., Burton G.J. (2007). Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Hum Dev* 83, 699-706.

Joya X., Pujadas M., Falcon M., Civit E., Garcia-Algar O., Vall O., Pichini S., Luna A., de la Torre R. (2010). Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Sci Int* 196, 38-42.

Jurado C., Menendez M., Repetto M., Kintz P., Cirimele V., Mangin P. (1996). Hair testing for cannabis in Spain and France: is there a difference in consumption? *J Anal Toxicol* 20, 111-115.

Kain Z. N., Rimar S., Barash P. G. (1993). Cocaine abuse in the parturient and effects on the fetus and neonate. *Anesth Analg* 77, 835-845.

Kaminski M., Rumeau C., Schwartz D. (1978). Alcohol consumption in pregnant women and the outcome of pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res* 2, 155-163.

Karila L., Cazas O., Danel T., Reynaud M. (2006). *J Gynecol Obstet boil Reprod (Paris)* 35, 62-70

Katikaneni, L. D., Salle, F. R., Hulsey, T. C. (2002). Neonatal hair analysis for benzoylecgonine: a sensitive and semiquantitative biological marker for chronic gestational cocaine exposure. *Biol Neonate* 81, 29-37.

Kidwell D. A., Blanco M. A., Smith F. P. (1997). Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Sci Int* 84, 75-86.

Kintz P., Bundeli P., Brenneisen R., Ludes B. (1998). Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program. *J Anal Toxicol* 22, 231-236.

Kintz P., Cirimele V., Ludes B. (2000). Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *J Anal Toxicol* 24, 557-561.

Kintz P., Cirimele V., Tracqui A., Mangin P. (1995). Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 670, 162-166.

Kintz P., Mangin P. (1993). Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J Forensic Sci Soc* 33, 139-142.

Kintz P., Villain M, Cirimele V. (2006). Hair analysis for drug detection. *Ther Drug Monit* 28, 442-446.

Kintz P., Villain M., Concheiro M., Cirimele V. (2005). Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 150, 213-220.

Klein J., Karaskov T., Koren G. (2000). Clinical applications of hair testing for drugs of abuse--the Canadian experience. *Forensic Sci Int* 107, 281-288.

Kopp W., Vogel M. (1982). Histologic and morphometric findings in placentas of heroin addicts. *Z Geburtshilfe Perinatol* 186,37-40.

Koren G., Chan D., Klein J., Karaskov T. Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol. *Ther Drug Monit* 24, 23-25.

Krauer B., Dayer P., Anner R. (1984). Changes in serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein concentrations during pregnancy: an analysis of fetal-maternal pairs. *Br J Obstet Gynaecol* 91, 875-881.

Kuczkowski K. M. (2007). The effects of drug abuse on pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19, 578-585.

Lester B. M., ElSohly M., Wright L. L., Smeriglio V. L., Verter J., Bauer C. R., Shankaran S., Bada H. S., Walls H. H., Huestis M. A., Finnegan L. P., Maza P. L. (2001). The Maternal Lifestyle Study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 107, 309-317.

Levy M., Koren G. (1990). Obstetric and neonatal effects of drugs of abuse. *Emerg Med Clin North Am* 8, 633-652.

Linares T. J., Singer L. T., Short E. J., Min M. O, Hussey P, Minnes S. (2006). Mental health outcomes of cocaine-exposed children at 6 years of age 31, 85-97.

Lozano J., Garcia-AlgarO., Marchei E., Vall O., Monleon T., Giovannandrea R. D., Pichini S. (2007a). Prevalence of gestational exposure to cannabis in a Mediterranean city by meconium analysis. *Acta Paediatr* 96, 1734-1737.

Lozano J., Garcia-Algar O., Vall O., de la Torre R., Scaravelli G., Pichini S. (2007b). Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* 29, 711-734.

Manich A, Velasco M, Joya X, Garcia-Lara NR, Pichini S, Vall O, Garcia-Algar O. (2011). Validez del cuestionario de consumo materno de alcohol para detectar la exposición prenatal. *An Pediatr (Barc)* 76, 324-328.

Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Palmi I., Lozano J., Garcia-Algar O., Pichini S. (2006). Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the "meconium project". *Ther Drug Monit* 28, 700-706.

Marques P. R., Tippetts A. S., Branch D. G. (1993). Cocaine in the hair of mother-infant pairs: quantitative analysis and correlations with urine measures and self-report. *Am J Drug Alcohol Abuse* 19, 159-175.

Martinez Crespo, J. M., Antolin, E., Comas, C., Coll, O., Marques, J. M., Gual, A., Fortuny, A. (1994). The prevalence of cocaine abuse during pregnancy in Barcelona. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56, 165-167.

Martins L. F., Yegles M., Thieme D., Wennig, R. (2008). Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type stimulants in hair. *Forensic Sci Int* 176, 38-41.

Maurer H. H. (2010). *Analytical toxicology*. EXS 100,317-337.

Mayers L. C., Grillon C., Granger R., Schottenfield R. (1998). Regulation of arousal and attention in preschool children exposed to cocaine prenatally.

Messiah S. E., Miller T. L., Lipshultz S. E., Brandstra E. S. (2011). Potential latent effects of prenatal cocaine exposure on growth and the risk of cardiovascular and metabolic disease in childhood. *Prog Pediatr Cardiol* 31, 59-65.

Mieczkowski T., Kruger M. (2007). Interpreting the color effect of melanin on cocaine and benzoylecgonine assays for hair analysis: brown and black samples compared. *J Forensic Leg Med* 14, 7-15.

Montgomery D., Plate C., Alder S. C., Jones M., Jones J., Christensen R. D. (2006). Testing for fetal exposure to illicit drugs using umbilical cord tissue vs meconium. *J Perinatol* 26, 11-14.

Mooney E. E., Boggess K. A., Herbert W. N., Layfield L. J. (1998). Placental pathology in patients using cocaine: an observational study. *Obstet Gynecol* 91,925-929.

Moore C. M., Brown S., Negrusz, A., Tebbett I., Meyer W., Jain L. (1993). Determination of cocaine and its major metabolite, benzoylecgonine, in amniotic fluid, umbilical cord blood, umbilical cord tissue, and neonatal urine: a case study. *J Anal Toxicol* 17, 62.

Moore C., Jones J., Lewis, D., Buchi K. (2003). Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* 49, 133-136.

Moore C., Lewis D., Leikin J. (1995). False-positive and false-negative rates in meconium drug testing. *Clin Chem* 41, 1614-1616.

Morini L., Groppi A., Marchei E., Vagnarelli F., Garcia O., Zuccaro P., Pichini S. (2010a). Population baseline of meconium ethyl glucuronide of nondrinking women in 2 mediterranean cohorts. *Ther Drug Monit* [Epub ahead of print].

Morini L., Marchei E., Pellegrini M., Groppi A., Stramesi C., Vagnarelli F., Garcia-Algar O., Pacifici R., Pichini S. (2008). Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure? *Ther Drug Monit* 30, 725-732.

Morini L., Marchei E., Vagnarelli F., Garcia O., Groppi A., Mastrobattista L., Pichini S. (2010b). Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-pontential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* 196, 74-77.

Nakahara Y, Ochiai T., Kikura R. (1992). Hair analysis for drugs of abuse. V. The facility in incorporation of cocaine into hair over its major metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. *Arch Toxicol* 66, 446-449.

OED 2011. Observatorio Español de la droga y las toxicomanías. Informe 2011. [monografía internet]. Madrid: Ministerio de sanidad y consumo. Delegación del gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. [Acceso 01 de septiembre 2012]. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/oed2011.pdf>

Offidani C., Strano Rossi S., Chiarotti M. (1993). Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci Int* 63, 105-108.

Olsen G. D. (1995). Placental permeability for drugs of abuse and their metabolites. *NIDA Res Monogr* 154, 152-162.

Ortigosa Gómez S., López-Vilchez M. A., Díaz Ledo F., Castejón Ponce E., Caballero Rabasco A., Carreras collado R., Mur Sierra A.

(2011). Consumo de drogas durante la gestación y su repercusión neonatal. Análisis de los períodos 1982-1988 y 2002-2008. *Med Clin (Barc)* 136, 423-430.

Ostrea E. M. Jr., Bielawski D. M., Posecion N. C., Jr., Corrion M., Villanueva-Uy E., Jin Y., Janisse J. J., Ager J. W. (2008). A comparison of infant hair, cord blood and meconium analysis to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ Res* 106, 277-283.

Ostrea E. M. Jr., Brady M., Gause S., Raymundo, A. L., Stevens, M. (1992). Drug screening of newborns by meconium analysis: a large-scale, prospective, epidemiologic study. *Pediatrics* 89, 107-113.

Ostrea E. M. Jr., Knapp D. K., Romero A., Montes M., Ostrea A. R. (1994a). Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. *J Pediatr* 124, 471-476.

Ostrea E. M. Jr., Knapp DK, Tannenbaum L, Ostrea AR, Romero A, Salari V, Ager J. (2001). Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *J Pediatr* 138, 344-348.

Ostrea E. M., Jr., Romero A., Knapp D. K., Ostrea A. R., Lucena J. E., Utarnachitt, R. B. (1994b). Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: clinical implications. *J Pediatr* 124, 477-479.

Pacifici G. M., Nottoli, R. (1995). Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet* 28, 235-269.

Palmeri A., Pichini S., Pacifici R., Zuccaro P., Lopez A. (2000). Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin Pharmacokinet* 38, 95-110.

Pascual J. A., Diaz D., Segura J., Garcia-Algar, O., Vall O., Zuccaro P., Pacifici R., Pichini S. (2003). A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 2853-2855.

Pelkonen O. (1980). Biotransformation of xenobiotics in the fetus. *Pharmacol Ther* 10, 261-281.

Pellegrini, M., Casa, A., Marchei, E., Pacifici, R., Mayne, R., Barbero, V., Garcia-Algar, O., Pichini, S. (2006). Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth. *J Pharm Biomed Anal* 40, 662-668.

Pellegrini M., Marchei E., Rossi S., Vagnarelli F., Durgbanshi A., Garcia-Algar O., Vall O., Pichini S. (2007). Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 2693-2703.

Pichini S., Altieri I., Zuccaro P., Pacifici R. (1996). Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet* 30, 211-228.

Pichini S., Basagana X. B., Pacifici R., Garcia, O., Puig C., Vall O., Harris J., Zuccaro P., Segura J., Sunyer J. (2000). Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environ Health Perspect* 108, 1079-1083.

Pichini S., Marchei E., Pacifici R., Pellegrini M., Lozano J., Garcia-Algar O. (2005a). Application of a validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoylecgonine in meconium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 820, 151-156.

Pichini S., Navarro M., Farre M., Ortuno J., Roset P. N., Pacifici R., Zuccaro, P., Segura J., de la Torre R. (2002). On-site testing of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in saliva with Drugwipe and Drugread: a controlled study in recreational users. *Clin Chem* 48, 174-176.

Pichini S, Pacifici R, Pellegrini M, Marchei E, Lozano J, Murillo J, Vall O., García-Algar O. (2004). Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for



determination of amphetamine, methamphetamine, and methylenedioxy derivatives in meconium. *Anal Chem* 76, 2124-32.

Pichini S., Pellegrini M., Gareri J., Koren G., Garcia-Algar O., Vall O., Vagnarelli, F., Zuccaro P., Marchei E. (2008). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. *J Pharm Biomed Anal* 48, 927-933.

Pichini, S., Pacifici, R., Pellegrini, M., Marchei, E., Perez-Alarcon, E., Puig, C., Vall, O., Garcia-Algar, O. (2003). Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794, 281-292.

Pichini S., Puig C., Zuccaro P., Marchei E., Pellegrini M., Murillo J., Vall O., Pacifici R., Garcia-Algar O. (2005b). Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 153, 59-65.

Plessinger M. A., Woods J. R. Jr. (1993). Maternal, placental, and fetal pathophysiology of cocaine exposure during pregnancy. *Clin.Obstet.Gynecol* 36, 267-78.

Pons G., Rey E., Matheson I. (1994). Excretion of psychoactive drugs into breast milk. Pharmacokinetic principles and recommendations. *Clin Pharmacokinet* 27, 270-289.

Potsch L., Skopp G. (1996). Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci Int* 81, 95-102.

Potter S., Klein J., Valiante G., Stack D. M., Papageorgiou A., Stott W., Lewis D., Koren G., Zelazo P. R. (1994). Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure. *J Pediatr* 125, 652-654.

Pragst F., Balikova M. A. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370, 17-49.

Quintela O., Bermejo A. M., Taberbero M. J., Strano-Rossi S., Chiarotti M., Lucas A. C. (2000). Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Sci Int* 107, 273-279.

Quintela O., Cruz A., Castro A., Concheiro M., Lopez-Rivadulla M. (2005). Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 825, 63-71.

Ripple M. G., Goldberger B. A., Caplan Y. H., Blitzer M. G., Schwartz S. (1992). Detection of cocaine and its metabolites in human amniotic fluid. *J Anal Toxicol* 16, 328-331.

Ricossa M. C., Bernini M., DE Ferrari F. (2000). Hair analysis for driving licence in cocaine and heroin users. An epidemiological study. *Forensic Sci Int* 107, 301-308.

Robieux I., Koren G., Vandenberg H., Schneiderman J. (1990). Morphine excretion in breast milk and resultant exposure of a nursing infant. *J Toxicol Clin Toxicol* 28, 365-370.

Rosengren, S. S., Longobucco, D. B., Bernstein, B. A., Fishman, S., Cooke, E., Bactor, F., Lewis, S. C. (1993). Meconium testing for cocaine metabolite: prevalence, perceptions, and pitfalls. *Am J Obstet Gynecol* 168, 1449-1456.

Rowland M., Tozer T. (1989). *Clinical Pharmacokinetics: concepts and applications* Philadelphia: Lee and Febiger

Rudolph A. M. (1995). Pharmacodynamics in the maternal-fetal-placental unit. *NIDA Res Monogr* 154, 163-174.

Russell M., Martier S. S., Sokol R. J., Mudar P., Jacobson S., Jacobson J. (1996). Detecting risk drinking during pregnancy: a comparison of four screening questionnaires.

Sallee F. R., Katikaneni L. P., McArthur P. D., Ibrahim H. M., Nesbitt L., Sethuraman G. (1995). Head growth in cocaine-exposed infants: relationship to neonate hair level. *J Dev Behav Pediatr* 16, 77-81.

Samperiz S., Millet V., Arditti J., Lacroze V., Masset D., Bourdon H., Jouglard J., Unal, D. (1996). [Value of toxicological research in newborn infants of addicted mothers by the study of several samples (urine, meconium, hair)]. *Arch Pediatr* 3, 440-444.

Samyn N., De Boeck G., Verstraete A. G. (2002). The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. *J Forensic Sci* 47, 1380-1387.

Sanaullah F., Gillian M., Lavin T. (2006). Screening of substance misuse during early pregnancy in Blyth: an anonymous unlinked study. *J Obstet Gynaecol* 26, 187-190.

Sastry B. V. (1991). Placental toxicology: tobacco smoke, abused drugs, multiple chemical interactions, and placental function. *Reprod Fertil Dev* 3, 355-372.

Schaffer M., Hill V., Cairns T. (2005). Hair analysis for cocaine: the requirement for effective wash procedures and effects of drug concentration and hair porosity in contamination and decontamination. *J Anal Toxicol* 29, 319-326.

Schaffer M. I., Wang W. L., Irving J. (2002). An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. *J Anal Toxicol* 26, 485-488.

Scheidweiler K. B., Huestis M. A. (2004). Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 76, 4358-4363.

Schempf A. H. (2007). Illicit drug use and neonatal outcomes: a critical review. *Obstet Gynecol Surv* 62, 749-57.

Schuetze P., Eiden R. D., Coles C. D. (2007). Prenatal cocaine and other substance exposure: effects on infant autonomic regulation at 7 months of age. *Dev Psychobiol* 49, 276-289.

Shankaran S., Lester B. M., Das A., Bauer C. R., Bada H. S., Lagasse L., Higgins R. (2007). Impact of maternal substance use during pregnancy on childhood outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 12, 143-150.

Sherwood R. A., Keating J., Kavvadia V., Greenough A., Peters T. J. (1999). Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158, 488-492.

Shor S., Nulman I., Kulaga V., Koren G. (2010). Heavy in utero ethanol exposure is associated with the use of other drugs of abuse in a high-risk population. *Alcohol* 44, 623-627.

Simone C., Derewlany L. O., Oskamp M., Knie B., Koren G. (1994). Transfer of cocaine and benzoylecgonine across the perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1404-1410.

Skender L., Karacic V., Brcic I., Bagaric A. (2002). Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125, 120-126.

SoHT (2004). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 145, 83-84.

Sokol R. J., Miller S. I., Reed G. (1980). Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiologic study. *Alcohol Clin Exp Res* 4, 135-145.

Sokol R. J., Delaney-Black V., Nordstrom B. (2003). Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA* 290, 2996-2999.

Stanaszek R., Piekoszewski W. (2004). Simultaneous determination of eight underivatized amphetamines in hair by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-APCI-MS). *J Anal Toxicol* 28, 77-85.

Steiner E., Villen T., Hallberg M., Rane A. (1984). Amphetamine secretion in breast milk. *Eur J Clin Pharmacol* 27, 123-124.

Stolk, L. M., Coenradie, S. M., Smit, B. J., van As, H. L. (1997). Analysis of methadone and its primary metabolite in meconium. *J Anal Toxicol* 21, 154-159.

Strano Rossi S., Offidani C., Chiarotti M. (1998). Application of hair analysis to document coercive heroin administration to a child. *J Anal Toxicol* 22, 75-77.

SAMHSA (2010). Substance Abuse Mental health Services Administration. Office of Applied studies. Results from the 2010: National Survey on Drug Use and Health: National Findings [monografía internet]. Substance Abuse Mental health Services Administration. Office of Applied studies. [Acceso 01 de septiembre 2010] Disponible en: <http://www.samhsa.gov/data/NSDUH/2k10ResultsRev/NSDUHresultsRev2010.pdf>

Szeto H. H. (1995). Maternal-fetal pharmacokinetics: summary and future directions. *NIDA Res Monogr* 154, 203-217.

Tappin D. M., Ford R. P., Wild C. J. (1995). Smoking at the end of pregnancy measured by cord blood cotinine assay. *N Z Med J* 108, 108-109.

Thaithumyanon P., Limpongsanurak S., Praisuwanna P., Punnahitanon S. (2005). Perinatal effects of amphetamine and her,1506-153.

Tsanaclis L., Wicks J. F. (2008). Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Sci Int* 176, 19-22.

Tsanaclis L., Wicks J. F. (2007). Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample. *Forensic Sci Int* 170, 121-128.

Ursitti F., Klein J., Koren G. (1997). Clinical utilization of the neonatal hair test for cocaine: a four-year experience in Toronto. *Biol Neonate* 72, 345-351.

Vähäkangas K., Myllynen P. (2006). Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents, *Mutat Res* 608, 129-135.

Van Baar A. L., Soepatmi S., Gunning W.B., Akkerhuis G.W. (1994). Development after prenatal exposure to cocaine, heroin and methadone. *Acta Paediatr* 404, 40-46.

van der Veen F., Fox H. (1982). The effects of cigarette smoking on the human placenta: a light and electron microscopic study. *Placenta* 3,243-256.

Vavrinkova B., Binder T., Vitkova I., Zivny J. (2001). Placental and umbilical cord changes in drug-addicted women. *Ceska Gynekol* 66:345-349.

Villamor J. L., Bermejo A. M., Fernandez, P., Tabernero M. J. (2005). A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. *J Anal Toxicol* 29, 135-139.

Villanueva L. A., Valenzuela F. (1998). [Pharmacological principles in pregnancy]. *Gac Med Mex* 134, 575-582.

Vincent F., Bessard, J., Vacheron J., Mallaret M., Bessard G. (1999). Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in urine and hair by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23, 270-279.

Vinner E., Vignau, J., Thibault D., Codaccioni X., Brassart C., Humbert L., Lhermitte M. (2003a). Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* 133, 57-62.

Vinner E., Vignau J., Thibault D., Codaccioni X., Brassart C., Humbert L., Lhermitte M. (2003b). Neonatal hair analysis

contribution to establishing a gestational drug exposure profile and predicting a withdrawal syndrome. *Ther Drug Monit* 25, 421-432.

Vogt Isaksen C. (2004). Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatr Dev Pathol* 7:433-442.

Vucinovic M., Roje D., Vucinovic Z., Capkun V., Bucat M., Banovic I. (2008). Maternal and neonatal effects of substance abuse during pregnancy: our ten-year experience. *Yonsei Med J* 49:705-13.

Winecker R. E., Goldberger B. A., Tebbett, I., Behnke M., Eyler F. D., Conlon M., Wobie K., Karlix, J., Bertholf R. L. (1997). Detection of cocaine and its metabolites in amniotic fluid and umbilical cord tissue. *J Anal Toxicol* 21, 97-104.

Winecker R. E., Goldberger B. A., Tebbett I. R., Behnke M., Eyler F. D., Karlix J. L., Wobie K., Conlon M., Phillips D., Bertholf R. L. (2001). Detection of cocaine and its metabolites in breast milk. *J Forensic Sci* 46, 1221-1223.

Winklbaaur B., Jung E., Fischer G. (2008). Opioid dependence and pregnancy. *Curr Opin Psychiatry* 21, 255-259.

Woods J. R., Jr. (1996). Adverse consequences of prenatal illicit drug exposure. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 8, 403-411.

Yegles M., Marson Y., Wennig R. (2000). Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci Int* 107, 87-92.

Zammit S., Thomas K., Thompson A., Horwood J., Menezes P., Gunnell d., Hollis C., Wolke D., Lewis G., Harrison G. (2009). Maternal tobacco, cannabis and alcohol use during pregnancy and riskof adolescent psychotic symptoms in offspring. *Br J Psychiatry* 195, 294-300.

Zdravkovic T., Genbacev O., McMaster M. T., Fisher S. J. (2005). The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta* 26, 81-86.