

Valoración de la exposición pasiva a sustancias de abuso en población pediátrica mediante el uso de matrices biológicas no convencionales

Javier Joya Cecilia

TESIS DOCTORAL UAB / 2012

Directors

Oriol Vall Combelles (Departament de Pediatria, Ginecologia i Obstetrícia, Medicina Preventiva i Salut Pública)

Oscar Garcia Algar (Departament de Pediatria, Ginecologia i Obstetrícia, Medicina Preventiva i Salut Pública)

Programa en Neurociències

(IMIM, Institut de Recerca Parc de Salut Mar)

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB

Julio, 2012



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

Valoración de la exposición pasiva a sustancias de abuso en población pediátrica mediante el uso de matrices biológicas no convencionales.

Memoria presentada por Javier Joya Cecilia para optar al grado de doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo se ha realizado en la Unitat de Recerca Infància i Entorn del programa de Neurociències del IMIM – Institut de Recerca Hospital del Mar, bajo la dirección del Prof. Oriol Vall Combelles y el Dr. Oscar Garcia Algar y bajo la tutela del Dr. José Aguilera Ávila.

Prof. Oriol Vall
Combelles
(Director)

Dr. Oscar Garcia
Algar
(Director)

Dr. José Aguilera
Ávila
(Tutor)

Javier Joya Cecilia
(Candidato PhD)



Exp. ED

Sr. Javier Joya Cecilia
València, 68, 3-1
08015 Barcelona

Universitat Autònoma de Barcelona - Registre General Escola de Postgrau
Exhíde
014 NÚM. 201200007739 17/05/12 10:23:39

Vista la instància presentada per en/na Javier Joya Cecilia de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions,

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 2 de març de 2011),

RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de Javier Joya Cecilia com a compendi de publicacions amb els articles següents:

- Papaseit, E.; Joya, X. [et al.] "Hair analysis following chronic smoked-drugs-of-abuse exposure in adults and their toddler: a case report". A: *Journal of Medical Cases Reports* (2011, 5:570).
- Joya, X.; Pujadas, M. [et al.] "Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation". A: *Forensic Science International* (2010: 196, 38-42).

La Comissió d'Estudis de Postgrau,
Per delegació




Escola de Postgrau
Universitat Autònoma de Barcelona
Doctorat

Jaume FARRÉS VICÉN
Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 16 de maig de 2012

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alicada davant la Rectora Magnífica de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

PREFACIO Y AGRADECIMIENTOS

Para realizar una tesis doctoral se requieren tres ingredientes básicos. Estos ingredientes son la constancia, la paciencia y el entusiasmo, y además deben hallarse en las mismas proporciones. Quien lo ha vivido, sabe que es un proceso largo y arduo, pero sobre todo, sabe que no sería posible sin la ayuda de las personas que nos rodean. Gracias a los ánimos, los apoyos y la infinita paciencia a todas esas personas. Un pedacito de esta tesis es vuestra. Estas líneas van dirigidas a todas esas personas que me han ayudado, y han estado a mi lado en diferentes momentos de este periplo. ¡Gracias!

En primer lugar quisiera agradecer al doctor Oriol Vall el apoyo que me ha brindado durante estos 5 años. Gracias por confiar en un estudiante de bioquímica recién licenciado y que tan solo podía aportar ilusión por realizar bien su trabajo. Gracias por dejarme participar en proyectos tan innovadores y por mostrarme la cara más interesante de la ciencia. Gracias por formarme de forma holística y por hacerme entender que no tan sólo es importante ser experto en un único ámbito sino que es esencial formarse en otras disciplinas.

En segundo lugar, y no por ello menos importante (cómo se suele decir en estos casos) parte de esta tesis doctoral es gracias al doctor Oscar Garcia Algar. Quisiera agradecer el compromiso como director y supervisor de esta tesis. Siempre ha estado dispuesto a corregir cualquier cosa, incluso ha realizado correcciones de mis trabajos durante fines de semana. Eso refleja tu profesionalidad y tu compromiso como persona. Muchas gracias!

En tercer lugar, no puedo dejar pasar por alto el nombre de Simona Pichini. Muchas gracias Simona! Gracias por haber confiado en mí desde el primer momento. Gracias por haberme entusiasmado y porqué a tu lado (casi siempre virtual) he aprendido muchísimo, al menos eso creo... Gracias por

abrirme las puertas de tu casa cómo si fuera una persona más de tu familia y por hacer que Roma sea un lugar especial para mi y siempre ligado a tu persona. Muchas gracias!

Quiero agradecer a todos los colaboradores que han confiado en nuestro proyecto y han dedicado tiempo y esfuerzo para seguir adelante. En primer lugar, quisiera dar las gracias al doctor Rafael de la Torre por abrirme las puertas de su laboratorio y por responder todas mis dudas. A todo el grupo de “Farmaco” por hacerme sentir como uno más de su grupo, en especial a Mitona Pujadas y a Ester Civit. Por otro lado, también agradecer a todo el personal del grupo de investigación del doctor Piergiorgio Zuccaro del Istituto Superiore di Sanità (ISS) en Roma. Por hacerme sentir cómo en casa, cuando más lejos estaba... en especial a Emilia Marchei y Manuela Pellegrini. A la doctora María Falcón y Aurelio Luna, por colaborar e interesarse en todo momento por el estado del proyecto.

Y ahora a los compañeros de poyata... con los que he compartido tantas horas. Quisiera empezar con las primeras personas que me encontré el primer día de trabajo y que serían mis compañeros de fatigas unos cuantos años: Noelia y Dani. Gracias por haberme enseñado tantas técnicas y haberme encaminado durante esos primeros años. Gracias también a la gente de Dermatología por los buenos ratos pasados en el “dry lab”.

En este punto, también me gustaría agradecer a todo el personal de apoyo y dels Serveis Científico-tècnics del IMIM por hacernos la vida mucho más fácil. A la Institución, IMIM – Parc de Salut Mar por facilitarme la financiación en la impresión de esta tesis.

En siguiente lugar, me gustaría agradecer a todos los miembros de nuestro pequeño grupo: la URIE. En primer lugar a Carme Puig, por estar allí en un

primer momento cuando el grupo era muy pequeñito, gracias por tu amabilidad y tus comentarios siempre constructivos. En este sentido, también me gustaría nombrar a Esther Papaseit, por ser una gran compañera y aportar tanto al grupo durante mi primera etapa de tesis. A Bibiana y a Susana, por ser parte fundamental del grupo durante el nudo de esta historia. Gracias por vuestra amabilidad, generosidad y por arroparme en todo momento. También me gustaría mencionar a los miembros del grupo en esta última etapa. Empezando por Juan, por su sensatez y por ser un “buen escuchador” en los momentos más pesados del fin de tesis. A Sílvia Simó por aportar aire fresco en este último periodo y por transmitir buen rollo y nuevas iniciativas. A Sergi Clavé, que a pesar de llevar poco tiempo, ha sido un gran fichaje, no tan solo por lo trabajador que es sino por ser un gran tipo. Finalmente, también me gustaría resaltar la figura de Pau Aragonés. Su presencia en el día a día y su carácter optimista animan al personal. Gracias equipo!

Por otro lado, también me gustaría agradecer al equipo de volley “Volleyblots”, a todos los compañeros de equipo (Alba, Teresa, Oriol, Isra, Jetzi, Rita, Marçal, Sergi, Maria). Por el buen rato que hemos pasado y por haber planificado mil tácticas a la hora de comer. En este momento, todavía no lo sabemos, pero espero que levantemos una copa !!! Gracias además por los mil consejos en mil técnicas nuevas que he tenido que aprender. Muchas gracias!

No podría olvidarme de mis amigos más íntimos: Oscar, Jose, Barra, Albert y Esther y al pequeño Gerard que viene en camino y que supongo que estará entre nosotros el día que defienda esta tesis. Gracias por estar a mi lado. Por las timbitas, los *Panets* y los buenos momentos vividos, que por suerte empiezan a ser muchos. Sin olvidarme de Gerard y Mar que sé que en breve os encontrareis escribiendo líneas como estas. Ánimo cracks!!!

Quien me ha dado todo el apoyo durante estos años ha sido mi familia. A mis padres por haberme seguido de forma entusiasta todos estos años y por haberme dado lo que mejor que unos padres pueden dar: amor. A mi hermano Alberto, porque estoy muy unido a él y por soportar mis charlas de hermano mayor. Soy lo que soy gracias a vosotros! Hemos pasado momentos difíciles que han servido para unirnos más si cabe. Gracias por lo todo lo que me habeis dado y lo que me dais cada día.

En último lugar, me gustaría dedicar estas líneas a mi pareja, Anna. Tu has sido clave en todo esto, tu fuiste la que me animaste y me acompañaste a esta entrevista de trabajo, tu eres la que me ha aguantado y me ha dado alegrías en los momentos más difíciles. Gracias por ser como eres y por quererme. Esta tesis es tan tuya como mía y por ello esta especialmente dedicada a ti.

a mis padres
a mi hermano

a Anna

RESUMEN GLOBAL

El abuso de sustancias en los países occidentales ha acontecido un problema de salud pública. Lamentablemente, estas sustancias de abuso son además una carga para las personas que no las consumen, por ello, la población pediátrica es especialmente vulnerable. 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 (de aquí su nombre “fluidos y matrices no convencionales”) resultan ser mucho más atractivas. Por la no invasividad en la recolección de muestras e atorgar mayor información retrospectiva en el tiempo hacen de matrices biológicas como la placenta, el pelo y los dientes de leche, buenas matrices para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante diferentes etapas de la infancia.

Valoración de la exposición a sustancias de abuso durante el inicio de la gestación mediante el análisis de placenta. La determinación de sustancias de abuso en muestras de placenta obtenidas como material de descarte en mujeres que interrumpieron voluntariamente su embarazo sirvió para confirmar la transmisión de las drogas de abuso al feto durante el primer trimestre de gestación.

Exposición pasiva a drogas de abuso mediante el análisis de cabello. En este trabajo se ha utilizado el análisis de cabello con el fin de esclarecer la prevalencia insospechada de exposición a cocaína en niños de edad preescolar visitados en un servicio de urgencias pediátrico sin presentar signos indicativos de una exposición a sustancias de abuso. Las muestras de cabello de 21 niños (23.3%) fueron positivas para cocaína (COC) (rango de concentración: 0,3 – 5.96 ng/mg cabello) y además una de ellas fue positiva para 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y otra para opiáceos. En el

88% de los casos positivos, también se halló la presencia de COC en la muestra de cabello del padre que acompañaba a su hijo a la visita hospitalaria. En vista de los resultados obtenidos, abogamos por el cribado mediante el análisis de cabello para esclarecer la presencia de COC y otras sustancias de abuso en niños pertenecientes a ambientes de elevado riesgo de exposición a sustancias de abuso.

Valoración de la exposición pasiva a humo de tabaco mediante el análisis de dientes de leche. El uso de los dientes de leche, los cuales empiezan a formarse en la etapa prenatal puede informar acerca de la acumulación de nicotina (NIC) y otros metabolitos durante toda la infancia. Por ello, se ha desarrollado una metodología basada en la LC-MS-MS con el fin de poder detectar cantidades ínfimas de estos metabolitos en dientes de leche. Los resultados en 64 muestras de dientes mostraron que tan solo la NIC era capaz de discriminar estadísticamente entre los niños expuestos ambientalmente al humo de tabaco. Estos prometedores resultados abogan por la inclusión de la monitorización de los niveles de NIC en dientes en estudios epidemiológicos con el fin de categorizar la exposición acumulativa al humo de tabaco durante toda la infancia.

Matrices biológicas para la evaluación de la exposición al humo de tabaco ambiental durante la vida prenatal y postnatal.

Discusión y conclusiones. Esta tesis pone de manifiesto la alta exposición pasiva e insospechada a las principales sustancias de abuso tanto legal (tabaco) como ilegal (cocaína) gracias al empleo de biomarcadores detectados en matrices no convencionales como la placenta, el pelo y los dientes de leche en niños diferentes etapas de la infancia. En conclusión, con el fin de detectar la exposición a sustancias de abuso en las diferentes etapas de la infancia (incluyendo la etapa prenatal y la etapa postnatal) es recomendable utilizar diferentes matrices no convencionales (o alternativas) con el fin de minimizar la invasividad en la recogida de las muestras en comparación con las matrices utilizadas tradicionalmente (sangre y orina).

SUMMARY

The substance abuse in developed countries has become a public health problem. Unfortunately, these substances of abuse are also a burden for people who do not consume; therefore, the pediatric population is especially vulnerable. Since the eighties, the possible presence of a substance abuse in the body and its correlation with clinical effects and / or subjective effects has been assessed analyzing plasma or urine. However, the determination of these substances in biological fluids and matrices different than blood and urine (hence the name "non-conventional fluids and matrices") are much more attractive. For the non-invasiveness in the collection of the samples and the fact that can provide much more information about the exposure, biological matrices such as placenta, hair and teeth, are good matrices to assess chronic exposure to drugs of abuse during different stages of the childhood.

Assessment of the exposure to substances of abuse during early gestation by analysis of the placenta. The determination of drugs of abuse in samples of placenta obtained as discard material in women who voluntarily terminated their pregnancy served to confirm the transmission of drugs of abuse to the fetus during the first trimester of gestation.

Passive exposure to drugs of abuse using hair analysis. In this work we used hair analysis to clarify the unexpected prevalence of cocaine exposure in preschool children visited in the pediatric emergency department with no signs indicative of exposure to substances of abuse. Hair samples from 21 children (23.3%) were positive for cocaine (concentration range: 0.3 - 5.96 ng / mg of hair) and also one of them was positive for MDMA and another one for opiates. In 88% of positive cases, also found the presence of cocaine in the hair sample of the parent who accompanied his son to the hospital visit. In view of these results, we advocate screening by hair analysis to ascertain

the presence of cocaine and other substances of abuse in children from high-risk environments of exposure to substances of abuse.

Assessment of passive exposure to tobacco smoke by the analysis of deciduous teeth. We used deciduous teeth, which begin to form in the prenatal stage, to report the accumulation of nicotine (NIC) and other metabolites throughout childhood. Therefore, we have developed a methodology based on LC-MS-MS in order to detect minute amounts of these metabolites in deciduous teeth. The results obtained in 64 samples of teeth showed that only the NIC was able to discriminate statistically among children exposed to tobacco snuff environmentally. These promising results argue for the inclusion of monitoring NIC levels in teeth in epidemiological studies to categorize cumulative exposure to passive smoke throughout childhood.

Discussion and conclusions. This thesis reveals the unsuspected high passive exposures to the main substances of abuse both legal (tobacco) and illegal (cocaine) by the use of biomarkers detected in non-conventional matrices such as the placenta, hair and teeth in children different stages of childhood. In conclusion, in order to detect exposure to substances of abuse in different stages of childhood (including prenatal and postnatal) is recommended to use different non-conventional matrices (or alternatives) in order to minimize the invasiveness collecting samples as compared with traditionally used matrices (blood and urine).

ABREVIATURAS

6-MAM	6-monoacetilmorfina
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
AMICS	Asthma Multicenter Infant Cohort Study
AP	Anfetamina
ARE	Arecolina
ATP	Adenosin trifosfato
BE	Benzoilecgonina
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
COD	Codeína
COT	Cotina
Da	Dalton
Di-THC-OH	Beta, 11-dihidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
DGPNSD	Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas
EDADES	Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas
EDDP	2-Etilideno-1,5-Dimetil-3,3-Difenilpirrolidina
EEE	Ecgonina etil ester
EMCDDA	Centro Europeo para la Monitorización de las Drogas y la Drogadicción
EME	Ecgonina metil éster
EMIT	Ensayo inmunológico multiplicado por enzimas
EtG	Etil glucuronido
FAEE	Ésteres de etil de ácidos grasos
FASD	Fetal alcohol spectrum disorder
FPIA	Immunoensayo por detección de fluorescencia polarizada
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HER	Heroína

HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
LC/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M3G	Morfina-3-glucuronido
M6G	Morfina-6-glucuronido
MDA	Metanfetamina
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
MET	Metadona
MOR	Morfina
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSTFA	N-Metil-N-(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida
ND	No disponible
NCOC	Norcocaína
NENC	1'-N-etilnorcotinina
NIC	Nicotina
OED	Observatorio Español sobre Drogas
OH-BE	Hidroxibenzoilecgonina
OH-COT	Hidroxicotinina
PcP	Fenciclidina
RIA	Radioinmunoensayo
RSD	Desviación estándar relativa
SNC	Sistema nervioso central
SoHT	Society Hair Testing
SPE	Extracción en fase sólida
TDM	Therapeutic drug monitoring
THC	Tetrahidrocannabinol
THC-COOH	Ácido carboxílico 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
THC-OH	11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TMS	Derivados trimetilsilil

SUMARIO

Prefacio y Agradecimientos	VII
Resumen	XIII
Lista de Abreviaturas	XVII
Sumario	XIX
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. El consumo de sustancias de abuso en nuestro entorno	25
1.1.1. Prevalencia del consumo de drogas de abuso en población general.....	25
1.1.2. Prevalencia del consumo de sustancias de abuso durante el embarazo	29
1.1.3. Prevalencia de la exposición pasiva a sustancias de abuso durante la infancia	31
1.2. Distribución de las drogas en humanos: fluidos y matrices no convencionales	33
1.2.1. Principios farmacocinéticos en el embarazo	33
1.2.1.1. Compartimento materno	35
1.2.1.2. Compartimento placentario.....	36
1.2.1.3. Compartimento fetal.....	37
1.2.2. Modelos farmacocinéticos para la unidad materno- fetal	40
1.3. Matrices biológicas alternativas.....	43
1.3.1. Características principales de los fluidos y matrices no convencionales	43

1.3.2. Mecanismo para el traspaso de una droga a un fluido extravascular y a matrices	50
1.3.3. Sangre de cordón y líquido amniótico	53
1.3.4. Placenta.....	56
1.3.5 Meconio.....	59
1.3.6. Pelo.....	65
1.3.6.2. Pelo materno	72
1.3.6.1. Pelo neonatal.....	73
1.3.7. Fluido oral.....	76
1.3.8. Leche materna	78
1.3.9. Dientes.....	80
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	81
3. RESULTADOS	87
3.1. Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12 th week of gestation	89
3.2 Hair analysis following chronic smoked-drugs-of-abuse exposure in adults and their toddler: a case report	101
4. DISCUSION GLOBAL.....	113
5. CONCLUSIONES	119
6. PUBLICACIONES ANEXAS.....	123
6.1. Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: comparison with testing in placental and fetal remains.....	125
6.2. Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a mediterranean city detected by hair analysis	139

6.3. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.....	155
6.4. Acute heroin intoxication in a baby chronically exposed to cocaine and heroin: a case report.....	167
7. BIBLIOGRAFÍA.....	177
8. MATERIAL DERIVADO DEL TRABAJO DE TESIS	199
9. FINANCIACIÓN RECIBIDA POR LOS TRABAJOS DE TESIS.....	203

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CONSUMO DE SUSTANCIAS DE ABUSO EN NUESTRO ENTORNO

1.1.1. Prevalencia del consumo de drogas de abuso en población general

Según datos del Centro Europeo para la Monitorización de las Drogas y la Drogadicción (EMCDDA), en 2009, las sustancias psicoactivas más extendidas entre la población española dentro del rango de edad de 15 a 64 años fueron el alcohol y el tabaco. Entre las sustancias que se venden ilegalmente, las más consumidas fueron el cannabis y la cocaína (COC), con prevalencias de consumo en los últimos 12 meses de más del 2% (10,6% para el cannabis, el 2,6% de la cocaína). Además, el éxtasis presentó una prevalencia del consumo del 0,8% en los últimos 12 meses. El consumo de otras sustancias ilegales como la heroína (HER), los alucinógenos o las anfetaminas (AP) presentaron menores prevalencias en su uso. Por otro lado, la prevalencia del consumo de tranquilizantes con receta o sin receta fue del 5,5% y de somníferos del 3,6% en los últimos 12 meses, prevalencia sólo superadas por el alcohol, el tabaco y el cannabis (**Tabla 1.**).

Excepto en el caso de los hipnosedantes (tranquilizantes y/o somníferos), en 2007 en España, la extensión del uso de drogas en la población de 15-64 años fue bastante mayor entre los hombres que entre las mujeres, especialmente en el caso de las drogas de comercio ilegal, donde la prevalencia entre los hombres fue varias veces más elevada que entre las mujeres (**Tabla 2.**). Refiriéndonos al consumo en los últimos 12 meses destacan las diferencias en el uso de cannabis (13,6 en hombres y 6,6% en mujeres) y de cocaína (4,4% en hombres y 1,5% en mujeres) (**Tabla 2.**).

Introducción

En este sentido, no existe ningún informe emitido por una entidad estatal en el cual se constate el consumo de sustancias de abuso específicamente en la población de mujeres embarazadas.

Tabla 1. La prevalencia del consumo de drogas en algún momento de la vida entre la población de España dentro del rango de edad 15-64 años (%). España, 1995-2009.

	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007	2009
Tabaco	*	69,7	64,9	68,4	68,9	69,5	68,5	75,0
Alcohol	*	90,6	87,3	89,0	88,6	93,7	88,0	94,2
Cannabis	14,5	22,9	19,6	23,8	29,0	28,6	27,3	32,1
Éxtasis	2,0	2,5	2,4	4,0	4,6	4,4	4,3	4,9
Alucinógenos	2,1	2,9	1,9	2,8	3,0	3,4	3,8	3,7
Anfetaminas / speed	2,3	2,7	2,2	2,9	3,2	3,4	3,8	3,7
Crack	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	1,8	0,9
Cocaína	3,4	3,4	3,1	4,8	5,9	7,0	8,3	10,2
Heroína	0,8	0,6	0,5	0,6	0,9	0,7	0,8	0,6
Inhalantes volátiles	0,7	0,8	0,6	0,8	1,0	0,8	1,1	0,6
Tranquilizantes con/sin prescripción	*	*	*	*	*	7,0	13,0	11,0
Somníferos con/sin prescripción	*	*	*	*	*	4,6	6,0	6,3
Sedantes con/sin prescripción	*	*	*	*	*	8,7	15,4	13,4

* El ítem no está incluido en la Encuesta Domiciliaría sobre Alcohol y Drogas (EDADES).

Fuente: Delegación del Gobierno español para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España, 1995-2009

Introducción

Tabla 2. Prevalencia de consumo de drogas en los últimos 12 meses en la población de 15-64 años según sexo (%). España 1997-2007

	1997		1999		2001		2003		2005		2007	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Tabaco	55,0	38,7	50,3	39,2	51,5	40,5	53,0	42,6	47,2	37,5	46,0	37,6
Alcohol	86,4	70,5	83,2	67,2	85,2	70,9	84,5	68,4	84,0	69,2	80,4	66,4
Cannabis	10,7	4,7	9,6	4,3	13,0	5,5	16,2	6,3	15,7	6,6	13,6	6,6
Éxtasis	1,2	0,5	1,2	0,5	2,8	0,7	2,0	0,8	1,8	0,6	1,6	0,5
Alucinógenos	1,4	0,4	0,8	0,4	1,2	0,2	0,9	0,3	1,1	0,4	0,9	0,3
Anfetaminas / speed	1,4	0,4	1,0	0,4	1,6	0,6	1,1	0,5	1,4	0,5	1,3	0,3
Crack	0,2	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,7	0,1
Cocaína	2,6	0,6	2,3	0,8	3,8	1,3	4,1	1,2	4,6	1,3	4,4	1,5
Heroína	0,4	0,1	0,2	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0
Inhalantes volátiles	0,3	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
Tranquilizantes con/sin prescripción	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	5,2	4,7	9,1
Somníferos con/sin prescripción	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	4,3
Sedantes con/sin prescripción	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	0,9

Fuente: DGPNSD. Observatorio Español sobre Drogas (OED). Encuesta Domiciliaria sobre Abuso de Drogas en España (EDADES).

1.1.2. Prevalencia del consumo de sustancias de abuso durante el embarazo

La mayoría de trabajos que han evaluado la prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo han sido realizados en América del Norte (Estados Unidos y Canadá) (Bar-Oz et al., 2003; Birchfield et al., 1995; Gillogley et al., 1990; Ostrea et al., 1992). Las tasas de prevalencia que muestran estos estudios son muy variables y oscilan entre el 6% y el 40%.

En Europa, el consumo de drogas durante el embarazo ha sido prácticamente ignorado. En el Reino Unido, utilizando un examen toxicológico en orina se han realizado algunos estudios de prevalencia en el consumo de drogas durante el embarazo (Bosio et al., 1997; Farkas et al., 1995; Sanaullah et al., 2006; Sherwood et al., 1999). En tres de ellos se determinó la eventual presencia de drogas de abuso utilizando orina materna. Las prevalencias alcanzadas oscilaron entre el 10,6% y el 16,7% (Farkas et al., 1995; Sanaullah et al., 2006; Sherwood et al., 1999). El último de los estudios, determinó la prevalencia de consumo de cocaína mediante el análisis del meconio. Los resultados revelaron un 2.75% de exposición prenatal a cocaína (Bosio et al., 1997).

En el mismo periodo, en Italia en referencia a la prevalencia de exposición a drogas de abuso durante la gestación. Uno de ellos fue realizado en Roma y empleó vello púbico materno como matriz para la evaluación de la exposición prenatal (Chiarotti et al., 1996). La prevalencia del consumo materno que se determinó fue del 1.9%.

En España, según los datos publicados por el Observatorio Español sobre Drogas (OED), el 2.5% de mujeres en edad fértil (15 a 35 años) afirman haber consumido cocaína durante los últimos 12 meses. Sin embargo, más

Introducción

allá de las encuestas telefónicas a mujeres en edad fértil, sólo tres estudios han sido realizados en España acerca de la prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo (García-Algar et al., 2009; Martínez Crespo et al., 1994; Pichini et al., 2005b).

A mediados de los años noventa, Martínez Crespo y colaboradores, reflejaron la prevalencia del uso de cocaína 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 *screening* 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 et al., 1994).

El segundo y tercer estudio fueron realizados también en Barcelona y pertenecen al denominado “Proyecto Meconio”. El estudio fue realizado entre octubre de 2002 y febrero de 2004, incluyendo en el mismo a 1.209 parejas de madre-recién nacido. Los resultados preliminares de dicho proyecto fueron publicados en 2005 y fue realizado en el Hospital del Mar de Barcelona (Pichini et al., 2005b). El objetivo principal del proyecto fue estimar la prevalencia del consumo de las principales sustancias de uso recreacional (opiáceos, cocaína, cannabis y anfetaminas) en mujeres embarazadas y los efectos de la exposición crónica en el recién nacido.

El análisis de meconio reveló que el 10,9% de los fetos estaban expuestos a alguna de estas drogas de abuso. Además, dicho estudio puso de manifiesto la infradeclaración existente en los cuestionarios. Finalmente, este estudio asoció algunos parámetros antropométricos como el peso y la talla al nacer con la exposición prenatal a cocaína o en combinación con otras sustancias de abuso.

Recientemente, en 2007, se ha estudiado la incidencia del consumo de drogas de abuso en madres de niños recién nacidos en el hospital La Candelaria (Santa Cruz de Tenerife). Este estudio fue realizado analizando 347 muestras de pelo materno recogido en el momento del nacimiento. El estudio mostró la incidencia del consumo del 2.6% de cocaína (Joya et al., 2012).

1.1.3. Prevalencia de la exposición pasiva a sustancias de abuso durante la infancia

Este elevado consumo de sustancias de abuso por parte de los denominados adultos jóvenes causó en Barcelona un 4.5% de exposición prenatal a cocaína (Pichini et al., 2005b). Este consumo que ocurre durante la vida prenatal y puede extenderse y pueden existir padres consumidores de sustancias de abuso que expongas a sus hijos a estas sustancias durante los primeros años de vida (García-Algar et al., 2005a; Taguchi et al., 2007).

Además, los niños en esta etapa de la vida pasan muchas horas al día con sus padres en sus hogares y por ello pueden ser expuestos repetidamente a estas sustancias. Las vías de exposición a estas sustancias de abuso son variopintas ya que estas pueden ser consumida de forma fumada. La exposición puede ocurrir por inhalación del propio humo, por ingestión accidental o bien por la contaminación del mobiliario del hogar.

Existen pocos trabajos que hayan estudiado la exposición pasiva a drogas de abuso durante los primeros años de la infancia. Los pocos que se han realizado, se llevaron a cabo en Estados Unidos. Estos estudios se realizaron en servicios de urgencias de hospitales situados en zonas que atendían a población con alto riesgo de exclusión social. Estos estudios mostraron una prevalencia de exposición entre el 5% y el 36% (Lustbader et al., 1998; Rosenberg et al., 1991; Rosenberg et al., 1995).

1.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS DROGAS EN HUMANOS: FLUIDOS Y MATRICES NO CONVENCIONALES

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 and 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 and 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 and Valenzuela, 1998).

Introducción

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 and Valenzuela, 1998).

Cuando el consumo de 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 and 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 and 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 and 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 al encéfalo, en base a su liposolubilidad y fijación específica en sitios receptores fetales. Muchos receptores en el sistema nervioso central (SNC) 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 vaciamiento 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 et al., 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

Introducción

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 las agresiones químicas que le 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, marihuana y HER, entre otras, pueden atravesar la barrera placentaria. 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 et al., 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 et al., 1994). Por otra parte, la eliminación de sustancias psicoactivas en el compartimiento fetal se realiza por difusión hacia el compartimiento materno, pero muchos metabolitos quedan en la porción fetal hasta que el riñón adquiere capacidad para eliminar las drogas circulantes al líquido amniótico (Schuetze et al., 2007; Simone et al., 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 et al., 1994).

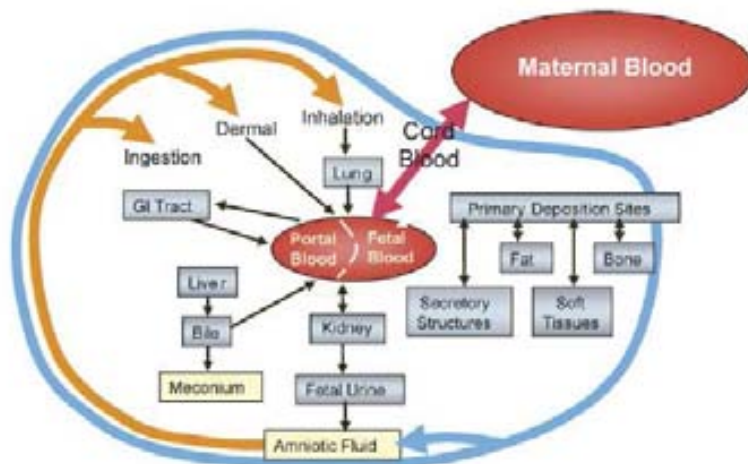
1.2.1.3. Compartimento fetal

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 and Valenzuela, 1998) (**Figura 1**).

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 and Valenzuela, 1998).

Introducción

Figura 1. 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 et al., 1979). La concentración de la glicoproteína ácida- α 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 et al., 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 posnatal, 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 et al., 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 et al., 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).

Introducción

1.2.2. Modelos farmacocinéticos para la unidad materno-fetal

Los modelos farmacocinéticos representan simplificaciones del modelo biológico real, facilitan la comprensión del fenómeno y permiten realizar predicciones exactas sobre la disposición del fármaco/droga en el organismo. Desde la perspectiva de la unidad materno-fetal, su diseño es particularmente importante debido a que los efectos de un fármaco en los tejidos fetales están, en gran parte, determinados por el tiempo de exposición, y éste, a su vez, por los procesos de distribución y excreción de los compartimentos materno y fetal.

Los fármacos, una vez dentro del organismo, tienden a desplazarse entre los distintos compartimentos corporales. El análisis del fenómeno comienza con el estudio de los cambios en la concentración del fármaco en un compartimento en función del tiempo, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{dC}{dt} = -KC_n$$

Ecuación 1. Cambio en la concentración del fármaco en un compartimento en función del tiempo.

En donde **dC/dt** representa el cambio en la concentración en relación al tiempo, y **-KC_n** se refiere a que la disminución en la concentración de un fármaco es una función de tipo exponencial.

Cuando n es igual a cero, el proceso es de orden cero y la velocidad de cambio es independiente de la concentración del fármaco:

$$\frac{dC}{dt} = -K$$

Ecuación 2. Cinética de orden cero.

Cuando el fármaco después de ingresar en el organismo se distribuye en un compartimento homogéneo y después se elimina siguiendo un proceso de primer orden, se considera un modelo abierto de un compartimento.

Cuando el sistema biológico está formado por un compartimento central en el que el fármaco se absorbe y se elimina, y un compartimento periférico comunicado con el anterior en donde la distribución del fármaco es un proceso reversible entre dos compartimentos, entonces se trata de un modelo abierto de dos compartimentos.

En la unidad materno-fetal, un fármaco administrado a la madre se transfiere de la placenta al feto vía la vena umbilical y regresa del feto a la placenta vía las arterias umbilicales. El modelo más simple para este fenómeno es el de dos compartimentos representados por la madre y el feto con distribución bidireccional entre ellos (**Figura 1.**) (Briggs et al., 1994). Existen dos modelos de este tipo:

1. El fármaco es eliminado sólo por la madre.
2. El fármaco es eliminado por la madre y el feto.

Introducción

Todos los procesos de distribución y eliminación siguen cinéticas de primer orden. La eliminación materna es el resultado tanto de la excreción del fármaco como de la distribución al feto y depende de la concentración del fármaco en el compartimento materno. En el caso de la eliminación fetal, ésta se deriva del proceso de biotransformación y de la transferencia feto-madre. La concentración fetal del fármaco será menor que la de la madre sólo si:

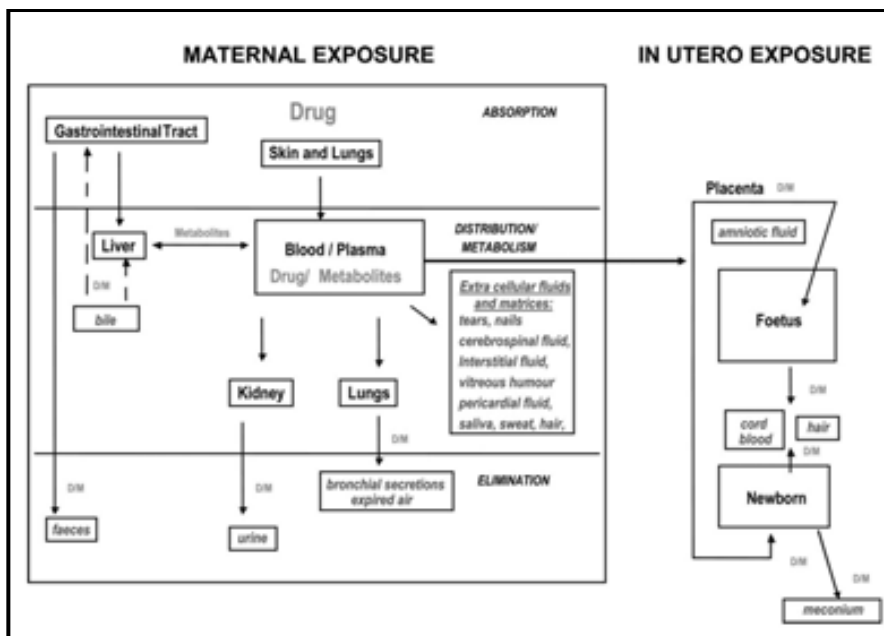
1. La velocidad de eliminación materna es mayor que la velocidad de transferencia materno-fetal.
2. La velocidad de transferencia feto-madre es mayor que la madre-feto.
3. El feto o la placenta biotransforman el fármaco.

1.3. MATRICES BIOLÓGICAS ALTERNATIVAS

1.3.1. Características principales de los fluidos y matrices no convencionales

Para producir sus efectos característicos, los fármacos y las sustancias de abuso deben estar presentes en unas determinadas concentraciones en su(s) centro(s) de acción. Aunque este hecho dependa en gran medida de la droga administrada, las concentraciones de las sustancias de abuso dependen del ciclo de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME) de dicha sustancia en el organismo. Este ciclo abarca la absorción de la droga o fármaco, su distribución en diferentes matrices y/o fluidos, su biotransformación y la propia excreción (**Figura 2**) (Rowland and Tozer, 1989).

Figura 2. Esquema de la distribución de las drogas en el cuerpo humano.



(D/M=droga/metabolito (s)) . Esquema extraído de (Lozano et al., 2007b)

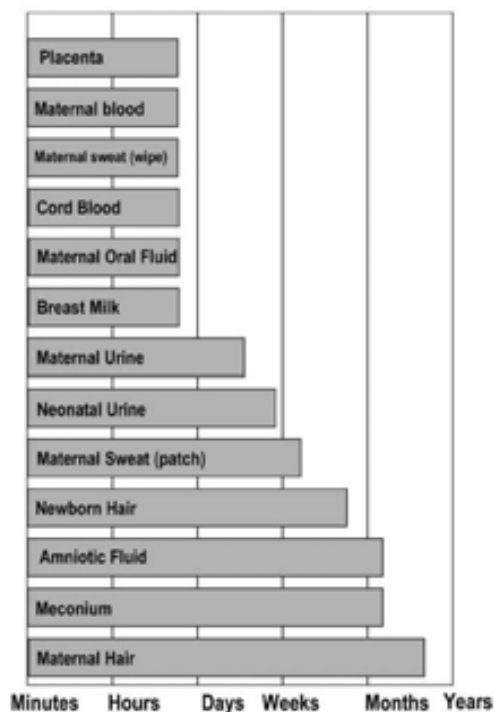
Introducción

Desde la década de los ochenta, la 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 (ya fuera por dificultad o invasividad a la hora de obtener la muestra) 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 (de aquí su nombre “fluidos y matrices no convencionales”) ha ido ganando importancia (Pichini et al., 1996). Por un lado, las mejoras tecnológicas como la no invasividad en la recolección de muestras, el empleo de nuevos dispositivos dedicados a la recogida de muestras, las 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: en primer lugar, tener la posibilidad de poder calcular los parámetros farmacocinéticos en el órgano diana; y en segundo lugar, y como aplicación más importante, la aplicación de la información obtenida en la toxicología forense y clínica.

Por ejemplo, la determinación de la concentración de sustancias de abuso (y sus metabolitos) en matrices como líquido cefalorraquídeo, secreciones bronquiales o líquido peritoneal son importantes porque son capaces de revelar la presencia de un tóxico en el órgano diana o en el centro de acción relacionados con eventuales cambios morfológicos o fisiológicos (Maurer, 1998; Pichini et al., 1996; Pragst et al., 1999). Otras matrices como la bilis o las heces proporcionan información de una ruta de excreción, en este sentido, acerca de la circulación entero-hepática de drogas y metabolitos diferente de la determinable en orina (Soriano et al., 2001).

Por otro lado, las matrices biológicas se pueden clasificar según su campo de aplicación. Según este punto de vista, matrices como el humor vítreo o el líquido pericárdico son habitualmente recogidas con una finalidad forense (Contreras et al., 2006; Drummer, 2004). En cambio, matrices como 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 o bien una causa secundaria de la muerte) o en casos clínicos (buscando la causa a un efecto clínico crónico) (Kintz et al., 2006; Palmeri et al., 2000). Finalmente, otros fluidos como el sudor y la saliva nos ofrecen información acerca de un consumo reciente y esta información puede ser asociada a unos efectos agudos a un fármaco o droga (Pichini et al., 2002; Pichini et al., 2003a)

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



Introducción

Algunos de estos fluidos y/o matrices pueden estar relacionadas con el periodo 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 del cordón umbilical así como en el líquido amniótico, el pelo fetal o el meconio (**Figura 3**).

Respecto a lo anteriormente mencionado, existen algunas matrices, con un área de aplicación muy específica y restrictiva, otras en cambio pueden aportar información útil para muchas aplicaciones en toxicología (**Tabla 3 y Tabla 4**). Además no debemos obviar otros aspectos no menos atractivos del uso de matrices biológicas alternativas como es el uso de materiales sencillos para recoger muestras (los cuales, a menudo, no requieren de un ambiente hospitalario para su recogida), el tratamiento de la muestra posteriormente, así como la posibilidad de realizar el análisis de resultados en el mismo lugar de la recogida.

Tabla 3. Adecuación de las matrices no convencionales en toxicología clínica y forense

Fluido / Matriz	Farmacología clínica / TDM	Toxicología Forense	Toxicología clínica	Correlación con niveles plasmáticos
Plasma	+++	+	+++	
Orina	+	+	+++	+/-
Lágrimas	+/-	-	-	-
Uñas	+/-	++	-	-
Líquido cefalorraquídeo	++	-	-	+
Secreciones bronquiales	+	-	+	-
Fluido intersticial	+	-	+	++
Fluido seminal	+	-	++	+/-
Bilis	+/-	+	-	+/-
Heces	+/-	-	-	-
Sangre de cordón umbilical	-	+	+	-
Líquido Amniótico	-	+	+	+/-
Leche materna	+	-	++	+
Humor vítreo	-	+++	-	+/-
Fluido pericárdico	-	+++	+	+/-
Saliva	+++	+	+++	++
Meconio	-	+	+	-

Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Introducción

Como muestra la **Tabla 3**, matrices biológicas como el meconio, la placenta, el pelo y los dientes de leche se han postulado como buenas matrices para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante diferentes etapas de la infancia. Estas matrices se caracterizan por presentar una baja invasividad a la hora de recoger las muestras hecho que es muy relevante cuando trabajamos con población pediátrica. Por este motivo, estas matrices serán descritas en profundidad en la siguiente sección, enfocando su interés en la composición, fisiología de su producción, ventajas, limitaciones y aplicaciones acerca de la información toxicológica que proporcionan en la toxicología clínica. Además, el resto de matrices y fluidos biológicos así como sus campos de aplicación serán brevemente descritos, conjuntamente con los mecanismos involucrados en la transferencia de estas sustancias desde la sangre hasta dichas matrices y fluidos no convencionales.

Tabla 4. Ventajas, limitaciones, ventana de detección y procedimientos analíticos seleccionados para monitorizar la exposición gestacional a sustancias de abuso en matrices y fluidos maternos

Matriz	Forma de recogida	Ventana de detección	Concentración de los analitos	Apuntes	Procedimientos analíticos
Orina	Fácil y no invasivo	1 – 3 días	ng/mL a µg/mL		Cocaína (Dams et al., 2003); cannabis (Weinmann et al., 2001); anfetaminas (Pirnay et al., 2006)
Pelo	Fácil y no invasivo	Meses - años	pg/mg a ng/mg	El análisis segmentario correlaciona con periodos específicos	Cocaína (Cone et al., 1991); Cannabis (Skender et al., 2002); Opiáceos y anfetaminas (Skender et al., 2002)
Fluido Oral	Fácil y no invasivo	0.5 – 36 h	pg/mg a ng/mg	La estimulación del flujo salival disminuye las concentraciones	Cocaína (Clauwaert et al., 2004); cannabis (Niedbala et al., 2004) ; anfetaminas (Wood et al., 2003)
Sangre / Plasma	Invasiva. Requiere entrenamiento o previo	1 – 3 días	ng/mg a µg/mg	No se pueden recoger muestras seriadas, riesgo anemia	Cocaína (Kolbrich et al., 2006); cannabis (Huestis et al., 2006); Anfetaminas (Peters et al., 2005)
Sudor	Fácil y no invasivo	3 – 5 días	pg/mg a ng/mg	Difícil de cuantificar la cantidad de sudor excretada	Cocaína (Kacinko et al., 2005); cannabis (Kintz et al., 2000); anfetaminas (Fay et al., 1996)

1.3.2. Mecanismo para el traspaso de una droga a un fluido extravascular y a matrices

El traspaso de un fármaco desde la sangre o el plasma a otro fluido (o matriz) ha sido ampliamente estudiado en algunas matrices no convencionales como la saliva, el líquido amniótico, el semen o la leche, pero es parcial o completamente desconocido para otras matrices (Rowland and Tozer, 1989)

En general, el traspaso de un fármaco o droga a un fluido (o matriz) ocurre por difusión pasiva y está regulado por las características físico-químicas de dicho fármaco o droga (**Tabla 5**). Estas variables són: el peso molecular, el volumen molecular, la constante de disociación del fármaco, la solubilidad lipídica y la unión a proteína. El proceso de difusión simple se trata de un proceso lento, cuya velocidad, según la Ley de Fick (**Ecuación 3.**), será mayor cuanto mayor sea el gradiente de concentración, menor sea el tamaño de la molécula y mayor sea su liposubilidad.

$$\text{velocidad de difusión} = \frac{D \cdot A \cdot \Delta C}{d}$$

Ecuación 3. Ecuación de Fick.

En donde **D** es la constante de difusión de la droga, **A** es el área a través de la que ocurre la transferencia, **ΔC** es la diferencia de concentración de la sustancia entre los dos compartimentos y finalmente **d** es el grosor de la membrana.

La constante de difusión D está determinada por las características de las drogas tales como su peso molecular, su pKa, la solubilidad lipídica, el estado de ionización y la unión a proteínas.

Tabla 5. Formas de paso de los fármacos o drogas a través de membranas biológicas

Forma	Mecanismo	Depende de:	
		Presión	Gradiente de concentración
Filtración	Paso por poros	Sí	Sí
Difusión	Dilución	-	Sí
Transporte Facilitado	Portador	-	Sí
Transporte Activo	Portador + ATP	-	No

Otras formas de absorción son:

- Fagocitosis en que una célula (fagocito) engloba una partícula sólida
- Pinocitosis, en que igualmente, por invaginación de la membrana, se introduce una gota de líquido externo (endocitosis, y al revés, exocitosis)

Adenosin trifosfato (ATP)

La liposubilidad depende del grado de ionización de la sustancia. Así, mientras la forma ionizada no difunde a través de la membrana, sí lo hace la forma no ionizada. La mayoría de fármacos son ácidos o bases débiles que se encuentran más o menos ionizados dependiendo del pH del medio y de su pKa. El pKa es el valor de pH en que se encuentra el 50% del fármaco en su forma ionizada. Según la fórmula de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

Para ácidos: $\text{pH} = \text{pKa} + \log (\text{ionizado} / \text{no ionizado})$

Para bases: $\text{pH} = \text{pKa} + \log (\text{no ionizado} / \text{ionizado})$

La forma no ionizada difundirá libremente hasta que se equilibre la concentración a ambos lados de la membrana, mientras que la forma

Introducción

ionizada, por su riqueza en grupos hidrófilos, no pasará. Cuando la membrana separa dos medios con distinto pH (p.ej. la sangre respecto a la luz intestinal, orina, leche materna o saliva), se producirá una acumulación del fármaco o la droga en el lado que existe mayor gradiente de ionización. A este fenómeno se le llama atrapamiento iónico ya que las bases quedan atrapadas en el medio ácido y los ácidos en el medio básico. En los procesos de absorción, el fármaco es constantemente captado por la sangre, que lo transporta al resto del organismo, por lo que no llega a alcanzarse un equilibrio y el proceso continúa hasta que la absorción es completa.

La evaluación de la exposición a sustancias de abuso en diferentes periodos de la infancia se puede realizar mediante el uso de matrices biológicas procedentes del feto o del recién nacido (cómo el meconio, el pelo neonatal o la orina neonatal). En segundo lugar, pueden ser matrices de origen materno (cómo el plasma, la orina, el pelo, la leche materna, el fluido oral o el sudor) o puede realizarse en matrices con origen común (cómo la placenta o el líquido amniótico).

Cada una de estas matrices tiene unas características diferentes y específicas: concentración de las sustancias y sus metabolitos en dicho tejido, ventanas de detección más o menos amplia, cantidad de muestra disponible, etc.). Las especificidades de cada matriz hacen que cada una de ellas se emplee en utilidades específicas.

1.3.3. Sangre de cordón y líquido amniótico

Los fármacos y sustancias de abuso administrados o consumidos por mujeres embarazadas tienen la posibilidad de atravesar la placenta y llegar al feto (Pacifci and Nottoli, 1995). Sin embargo, debido a que la recogida tanto de líquido amniótico como de sangre del feto son métodos suficientemente invasivos e incluso, nocivos para el feto, son matrices poco atractivas para su uso en estudios clínicos.

Al igual que la sangre, en general, la determinación de fármacos (o sustancias de abuso) en sangre de cordón umbilical solo aporta información acerca de las horas previas antes de la recogida y por lo tanto no permite evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante la gestación.

Por lo que se refiere a las drogas ilícitas, y sus metabolitos, se han hallado en sangre de cordón en un rango de concentraciones que varía desde los nanogramos hasta los miligramos por mililitro de sangre (Dempsey et al., 1998; Moore et al., 1993; Pichini et al., 2003c; Winecker et al., 1997) (**Tabla 6**). La mayoría de estudios que han utilizado la sangre de cordón como matriz para evaluar la presencia de sustancias de abuso han mostrado las limitaciones de esta matriz en cuanto a su capacidad de predecir la exposición prenatal a sustancias de abuso. Sin embargo, para el caso del tabaco, la determinación de cotinina (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/o la orina materna (Pichini et al., 2000; Tappin et al., 1995). En este sentido, un estudio reciente propuso 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 et al., 2006).

Introducción

Por otra parte, en relación al líquido amniótico, debido a que este empieza a formarse en las primeras semanas de embarazo, la presencia de sustancias de abuso en este fluido puede informar acerca de la exposición a sustancias de abuso durante las primeras fases del embarazo (Pacifci and Nottoli, 1995). Si bien es peligroso para el feto, el líquido amniótico puede ser recogido en cualquier momento del embarazo. Tanto drogas como sus respectivos metabolitos principales se han identificado en líquido amniótico con concentraciones en el rango de nanogramos por mililitro. Aunque en teoría no hay restricciones en cuanto a la cantidad de líquido que se muestrea, normalmente, solo unos pocos mililitros de líquido se recogen durante la prueba de amniocentesis. Aunque el líquido amniótico se ha utilizado para confirmar la exposición fetal a COC (Eyler et al., 2005; Jain et al., 1993; Ripple et al., 1992; Winecker et al., 1997) este fluido no ha ido ganando popularidad con el paso del tiempo como herramienta práctica para la identificación de la exposición prenatal a sustancias de abuso. La principal razón recae en la dificultad de recogida de muestras, ya que este procedimiento pone en peligro al feto, a menos que la recogida sea en el momento del parto.

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas usadas para la detección de las principales sustancias de abuso durante el embarazo en muestras de placenta, líquido amniótico y sangre de cordón umbilical

Droga	Rango de concentración	Método de extracción	Método de detección	LOD / LOQ	Referencia
Placenta					
Arecolina	ARE: 0.009 – 0.015 µg/g	Liq-Liq	LC/MS	LOQ: 0.004 µg/g	(Garcia-Algar et al., 2005b)
Líquido Amniótico					
Cocaína	(ng/mL) BE: 0 – 836 COC: 0 -24 EME: 0 -34 CE: trazas	SPE	FPIA / GC/MS	(ng/mL) LOD: 5 LOQ: 10	(Ripple et al., 1992)
	(ng/mL) COC: trazas – 250 BE: 400 – 5000	SPE	HPLC	ND	(Jain et al., 1993)
	ND	SPE	HPLC / GC/MS	LOD (ng/mL) 5	(Eyler et al., 2005; Winecker et al., 1997)
Sangre de cordón umbilical					
Cocaína	COC: ND BE: trazas	SPE	HPLC	ND	(Moore et al., 1993)
	(ng/mL) BE: 0 – 1237 EME: 0 – 52 EEE: ND NCOC: 0-172 CE: ND	SPE	HPLC / GC/MS	LOD (ng/mL) 2.5	(Winecker et al., 1997)
	(ng/mL) COC: 5 – 88 BE: 74-3880 CE: ND	Liq-Liq	GC-MS	LOQ (ng/mL) 5	(Dempsey et al., 1998; Samperiz et al., 1996)

Arecolina (ARE); benzoilecgonina (BE); cocaetileno (CE); ecgonina etil ester (EEE); ecgonina metil ester (EME); inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA); cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS); cromatografía líquida de alta presión (HPLC); cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS); límite de detección (LOD); límite de cuantificación (LOQ); no disponible (ND); norcocaína (NCOC); extracción en fase sólida (SPE)

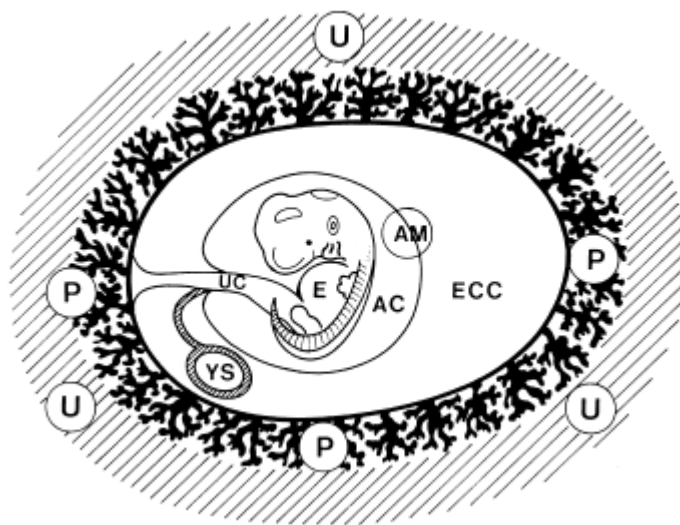
1.3.4. Placenta

La estructura básica de la placenta humana madura aproximadamente en la 4ª semana de gestación (**Figura 4**). Este tejido, fuente de circulación fetoplacentaria, constituye una interfaz de sangre fetal y materna que actúa como intercambiador de nutrientes y residuos del feto a la madre.

Durante mucho tiempo se habló de la barrera placentaria como un mecanismo de defensa que preservaría la integridad del feto en desarrollo frente a las agresiones químicas que le 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 (Olsen, 1995). Sin embargo, algunos biomarcadores sí pueden quedar retenidos en dicho tejido. En este sentido, los ésteres de etil de ácidos grasos o los ésteres de etil de ácidos grasos (FAEEs) procedentes de madres consumidoras de alcohol etílico 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 por la madre (Chan et al., 2004).

Además, las sustancias de abuso incluyendo las drogas, también pueden afectar a los sistemas de transporte de nutrientes de la placenta, así como a la modificación de la fisiología de la misma (Sastry, 1991).

Figura 4. Diagrama que muestra las diferentes barreras anatómicas en el primer trimestre de gestación



(U) Útero; (P) Placenta; (UC) Cordón Umbilical; (E) Embrión; (ECC) Cavidad exocelómica; (YS) Saco Yolk secundario; (AC) Cavidad Amniótica; (AM) Membrana Amniótica. Extraído de (Jauniaux and Gulbis, 2000)

También se han realizado estudios con el fin de evaluar la exposición crónica a sustancias y los posibles cambios morfológicos que puede padecer el tejido placentario así como las repercusiones de estos en el desarrollo fetal. Aunque no se concibe a la placenta como un órgano metabolizador, se han descrito cambios en las capacidades enzimáticas de placentas provenientes de madres fumadoras crónicas (Myllänen et al., 2005). En seis recién nacidos se detectó la presencia de arecolina (ARE), el principal alcaloide de la palma de areca (*Areca catechu*), la 4ª sustancia más utilizada en el mundo después del tabaco, el alcohol y la cafeína (García-Algar et al., 2005b; López-Vilchez et al., 2006). La presencia de ARE se encontró en cinco de las seis placentas. Además en dichas placentas se describieron cambios morfológicos observables

Introducción

macroscópicamente como la localización de centros de alta inflamación y la disminución en el diámetro de los vasos sanguíneos.

Recientemente, se han cuantificado los niveles de las principales sustancias de abuso en placenta obtenida en el momento del parto procedentes de madres consumidoras(Concheiro-Guisan et al., 2009; de Castro et al., 2009).

1.3.5 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 et al., 1994b).

Es generalmente aceptado que el meconio empieza a formarse a partir de la semana 12^a de gestación, porque es en este momento cuando empieza la deglución del líquido amniótico (Gareri et al., 2006). 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. 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 et al., 2003). Por estos factores, el análisis de meconio permite la detección del consumo (activo o pasivo) de drogas por la madre durante las últimas 20 semanas de gestación, y por lo tanto, aporta información acerca de la exposición fetal crónica a sustancias de abuso (Koren et al., 2002; Lozano et al., 2007b; Pichini et al., 1996).

En la misma línea, el análisis de drogas en meconio aporta mucha más información respecto a la exposición crónica a sustancias de abuso que el análisis de orina neonatal, el suero de sangre de cordón umbilical, o pelo neonatal (Ostrea et al., 2008).

Las sustancias de abuso en meconio están presentes en el rango de nanogramos a microgramos 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

Introducción

recomienda la congelación inmediata de las muestra de meconio momentos después de la recogida con el fin de no degradar la eventual presencia de drogas en dicha matriz. Habitualmente, las drogas en meconio se mantienen estables a una temperatura de -20°C , y así durante un período prolongado en el tiempo (Pichini et al., 2004) (**Tabla 7**).

El meconio es especialmente útil en la evaluación de la exposición in utero a sustancias de abuso (Gray and Huestis, 2007; Lozano et al., 2007a; Lozano et al., 2007b). 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 reveló que los metabolitos principales de las sustancias de abuso suelen hallarse de forma predominante o incluso en muchos casos de forma única en esta matriz biológica, así pues para la COC, no es extraño detectar los metabolitos m- y p-hidroxibenzoilecgonina (OH-BE) en detrimento de la droga principal (Pichini et al., 2005a) o para el caso del cannabis, se obtiene la máxima abundancia representada por el 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH) (ElSohly and Feng, 1998). Siguiendo en la misma línea, un metabolito habitualmente hallado en el plasma, orina y fluido oral de fumadores y en orina neonatal de recién nacidos expuestos al humo de tabaco, la hidroxicotinina (OH-COI), no fue detectado en meconio, mostrando así que los perfiles metabólicos de las diferentes matrices neonatales no tienen porque ser los mismos (Ostrea et al., 1994a).

Sin embargo, una desventaja del análisis de meconio es la elevada tasa de falsos positivos hallada en los métodos de detección por inmunoensayo. Normalmente, las técnicas de inmunoensayo diseñadas para el análisis en orina han sido modificadas para su uso en meconio, y lamentablemente, muchos de estos métodos carecen de una rigurosa validación del proceso

analítico y muchas veces no existe una posterior confirmación del resultado. Tomando como ejemplo el trabajo de Moore C en el 1995, en 535 muestras positivas por inmunoensayo a metabolitos de tetrahidrocannabinol (THC), COC y opiáceos, tan solo confirmó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) el 56-59% de las muestras (Moore et al., 1995). En conclusión, los resultados obtenidos por inmunoensayo deben ser confirmados por un método más específico como GC/MS, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) o espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Introducción

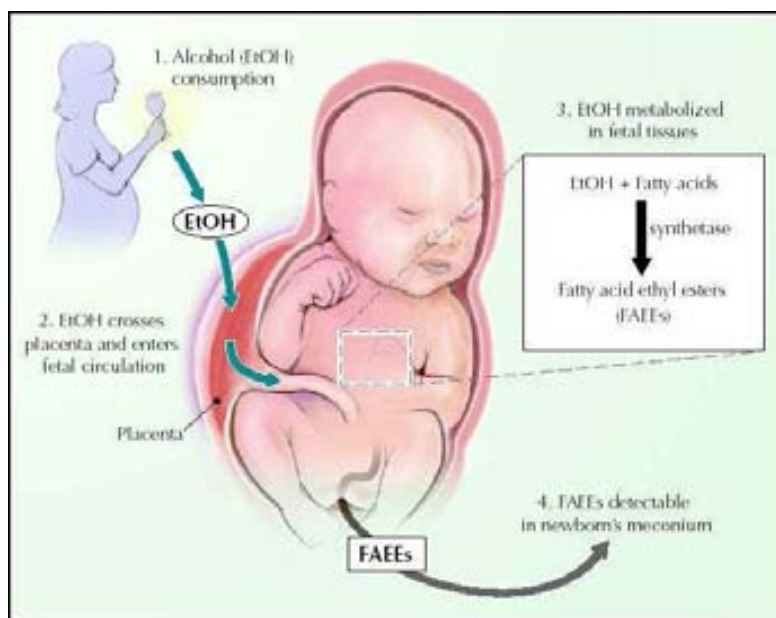
Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas usadas para la detección de las principales sustancias de abuso durante el embarazo en muestras de meconio

Droga	Rango de concentración ($\mu\text{g/g}$)	Método de extracción	Método de detección	LOD / LOQ (ng/mg)	Referencia
Meconio					
Cocaína	COC: 0.1 – 0.78	SPE	HPLC / GC-MS	ND	(Browne et al., 1992)
	COC: 0.24 - 0.78 NCOC: 0.1 - 0.56	SPE	HPLC / GC-MS	ND	(Browne et al., 1994)
	BE: 0.04 – 1.9	SPE	FPIA / GC/MS	Cut-off: 0.1 $\mu\text{g/mL}$	(Rosengren et al., 1993)
Opiáceos	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 et al., 2003b; Pichini et al., 2005b)
	MET: 127 – 10222 ng/g EDDP: 153 – 74336 ng/g	SPE	FPIA / HPLC	LOD MET: 99 ng/g EDDP: 113 ng/g	(Stolk et al., 1997)
	MET: 17 – 1843 ng/g EDDP: 992 – 9851 ng/g	Liq-Liq	FPIA- EMIT / GC-MS	Cut-off: 300 ng/g	(Vinner et al., 2003b)
	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: 2.5 ng/g THC-COOH: 2 ng/g	(ElSohly et al., 1999)
	MDMA	MDMA: 0.012	SPE	LC/MS	0.001 / 0.004 ng/g

6-monoacetilmorfina (6-MAM); benzoilecgonina (BE); cocaína (COC); codeína (COD); beta,11-dihidroxi- Δ^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- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH); 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH);

La evaluación de la exposición *in utero* a diferentes sustancias de abuso se ha realizado en meconio. Por ejemplo, para el tabaco se han identificado NIC y sus metabolitos en meconio y se ha hallado diferencias significativa 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 et al., 1994a). Por otra parte, la incidencia de mujeres que consumen alcohol durante el embarazo es en algunas poblaciones alarmante (García-Algar et al., 2008) a pesar de que ello pueda causar una serie de aspectos deletéreos sobre el niño causando lo que comúnmente conocemos como el síndrome alcohólico fetal (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*) (FASD) (Figura 5).

Figura 5. Formación de FAEEs por el embrión a causa de la exposición prenatal a alcohol etílico



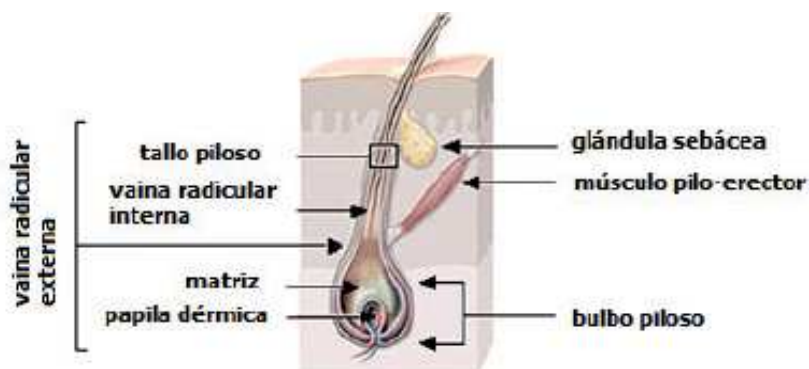
Introducción

Los FAEEs han sido propuestos como biomarcadores en meconio (Klein et al., 1999; Pichini et al., 2008). La suma de las diferentes concentraciones de FAEEs por encima del punto de corte de 2 nmol/g de meconio o 50 ng/g de meconio ha sido propuesta como evidencia de consumo abusivo de alcohol durante el embarazo (Chan et al., 2003; Moore et al., 2003). Recientemente, se ha hallado la presencia en meconio de etil glucuronido (EtG), un biomarcador de exposición crónica a etanol ya descrito en otras matrices biológicas (Morini et al., 2008)

1.3.6. Pelo

El pelo está formado aproximadamente por un 65 – 95% de proteínas, 1 – 9% de lípidos, pequeñas cantidades de oligoelementos, polisacáridos y agua (Harkey, 1993). Un rico sistema vascular envolvente que proporciona el material necesario para el crecimiento del cabello recubre al folículo piloso (Pragst and Balikova, 2006) (**Figura 6**).

Figura 6. Estructura anatómica del pelo humano



Se estima que el número de folículos pilosos de un adulto normal es de aproximadamente 5 millones. El cabello crece aproximadamente entre 0.6 y 1.4 cm. por mes, dependiendo del tipo de cabello y el lugar anatómico en que se encuentre. De hecho no tan solo 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 recolección del pelo del cuero cabelludo no es posible. Sin embargo, se debe tener cuidado en la interpretación de las concentraciones halladas en estos especímenes ya que diferentes estudios han relatado diferencias en las concentraciones comparando el vello púbico o el

Introducción

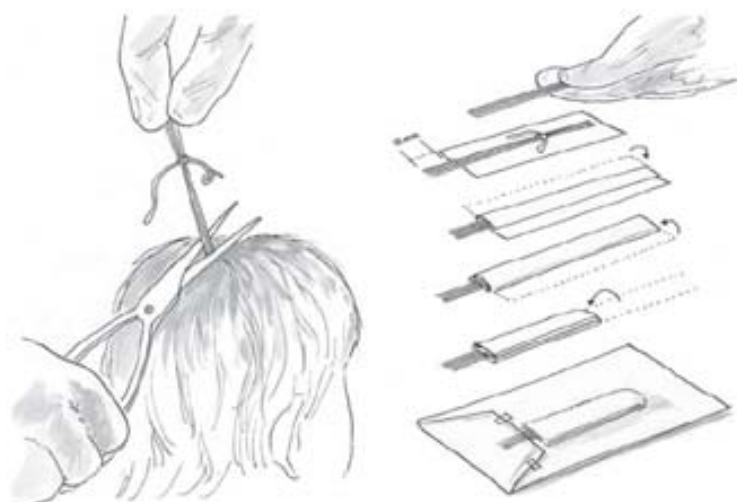
axilar respecto al del cuero cabelludo (Balabanova and Wolf, 1989; Han et al., 2005a; Offidani et al., 1993). De hecho, en dos estudios se han comparado las concentraciones de metadona ((MET) y metanfetamina (MDA) en diferentes tipos de cabello del organismo, concluyendo que los valores más elevados se hallaron en el pelo axilar, seguido del vello púbico y del cuero cabelludo (Han et al., 2005a; Offidani et al., 1993). De hecho, estas diferencias en las concentraciones de sustancias de abuso se pueden explicar no tan solo por la diferente tasa de crecimiento de los diferentes tipos de vello, sino también, por la mejor circulación sanguínea y la presencia de glándulas apocrinas en estas regiones respecto al cuero cabelludo.

Los mecanismos para la deposición de sustancias de abuso en el pelo están bien estudiados. Por lo general, se ha aceptado que las sustancias de abuso se pueden incorporar al pelo mediante 3 vías: (1) desde el torrente sanguíneo en el proceso de crecimiento del pelo; (2) desde el sudor y posterior recubrimiento por el sebo, esta fase tiene lugar en las zonas del pelo más externas de la piel 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 deposición de este en el sebo. Debido a este hecho, es prácticamente imposible distinguir el consumo real de sustancias de abuso basándonos en las dos últimas vías de incorporación de sustancias de abuso (Blank and Kidwell, 1993).

La captación de sustancias de abuso por el pelo depende fundamentalmente de tres 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. De hecho, 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 and Kruger, 2007).

Las muestras de cabello se suelen recoger de la zona posterior de la cabeza, en esta región es donde el pelo crece más uniformemente y donde la tasa de crecimiento es mayor y donde existe el mayor número de folículos pilosos activos. El pelo debe cortarse lo más cercanamente al cuero cabelludo mediante la ayuda de tijeras. Posteriormente, la zona proximal (es decir la zona más cercana a la raíz) deberá indicarse claramente si un análisis segmentario quiere llevarse a cabo. En ese momento, la muestra se puede almacenar a temperatura ambiente y protegido de luz directa (**Figura 7**).

Figura 7. Mecanismo habitualmente utilizado para recoger muestras de pelo para finalidades toxicológicas.



Es bien sabido, que las sustancias de abuso pueden ser incorporadas y permanecer de forma indefinida en el pelo (Kintz and Mangin, 1993b) pudiendo ser detectadas al cabo de años después de la recogida (Pragst and Balikova, 2006). El pelo suele estar expuesto a diferentes agentes que pueden afectar al análisis toxicológico como por ejemplo jabones, polvo, luz solar o la lluvia. De hecho, diferentes estudios han evaluado el efecto de los

Introducción

tratamientos cosméticos en la estabilidad de las sustancias de abuso en pelo. Tomando como ejemplo el trabajo de Martins y colaboradores (Martins et al., 2008) las concentraciones de los derivados anfetamínicos disminuían en los cabellos decolorados respecto a los que no se habían sometido a este tipo de tratamiento. Este mismo tipo de tratamiento del pelo afecta a la estabilidad y a las concentraciones de otras sustancias de abuso en el cabello (Potsch and Skopp, 1996; Yegles et al., 2000).

Como se indicó anteriormente, uno de los principales escollos de la detección de sustancias de abuso en pelo es la contaminación ambiental. Es más, si no se tiene en cuenta, el riesgo de presentar un informe con falsos positivos aumenta, lo cual es inaceptable, especialmente si de estos resultados se desprenden consecuencias jurídicas. Por lo tanto, para minimizar este riesgo se recomienda encarecidamente 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, jabones y hasta combinaciones de estos (Eser et al., 1997; Girod and Staub, 2000; Kintz, 1995; Schaffer et al., 2002; Skender et al., 2002; Villamor et al., 2005). No existe un consenso general en cuanto a los procedimientos de descontaminación de las muestras y se ha demostrado que la eliminación total de la contaminación externa no se consigue ni mediante los procesos más laboriosos de descontaminación (Schaffer et al., 2002; Tsanaclis and Wicks, 2008).

No tan solo la descontaminación del pelo antes del análisis es la única vía para hacer frente a la contaminación ambiental, la Society Hair Testing (SoHT) recomienda la detección de los metabolitos derivados de la exposición a sustancias de abuso además del uso de la relación existente entre la concentración del metabolito principal y la droga a la hora de reportar un

resultado positivo (SoHT, 2004). De hecho, como la contaminación ambiental no puede ser totalmente eliminada, solo la detección de los metabolitos de la droga, es decir, 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 drogas que pueden estar en el medio ambiente debido a la forma en que se consumen como por ejemplo el cannabis (en que el Ácido carboxílico 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) debe ser detectado) y la COC (en que al menos uno de sus metabolitos debe ser detectado y en una ratio respecto a la droga principal superior a 0.05) (SoHT, 2004).

La mayor ventaja práctica que nos ofrece el análisis toxicológico en pelo respecto al análisis efectuado en orina o 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 llamado análisis segmentario. Como se ha mencionado anteriormente, el pelo crece a un ritmo aproximado de 1 cm. por mes con lo cual es posible asociar patrones de distribución de drogas en el pasado teniendo en cuenta la tasa de crecimiento del pelo. Además, las drogas son muy estables en la matriz queratínica durante largos periodos de tiempo. Otra ventaja del análisis toxicológico del pelo respecto a la sangre o la orina es el procedimiento de recolección 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 una reclamación (cambio de muestras, fallo en el envío de muestras, etc.) es posible obtener una muestra idéntica. Obviamente, este último punto es de gran importancia en la toxicología forense.

Introducción

Sin embargo, el análisis de pelo tiene varias desventajas. El principal problema en este tipo de análisis es, una vez más, la posibilidad de obtener falsos positivos debido a la contaminación ambiental del cabello. El hecho de que se halle la presencia de un fármaco o droga en el pelo no implica necesariamente que se haya consumido activamente. Por lo tanto, las muestras de cabello deben ser descontaminadas antes de su análisis y además de buscar las principales sustancias de abuso también deberá buscarse la presencia de metabolitos específicos del consumo de estas sustancias de abuso. Los principales metabolitos encontrados en el pelo son básicamente las drogas no metabolizadas en lugar de sus metabolitos más polares, que generalmente predominan en sangre o orina (Kintz et al., 2006). Este hecho presenta un problema, normalmente, los metabolitos son más polares que las drogas y por lo tanto tienen menos afinidad para unirse a la matriz queratínica que forma el cabello. Este es el caso, por ejemplo, del THC-COOH (constituyente principal del cannabis), que se encuentra en el pelo en muy bajas concentraciones, generalmente a nivel de picogramos. Para detectar estas concentraciones, es necesario obligatoriamente disponer de MS, ya sea acoplada a GC o a LC.

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

Habitualmente, el análisis de pelo se inicia mediante una técnica de cribado mediante inmunoensayo seguida de una confirmación mediante técnicas cromatográficas. En la **Tabla 8** 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 periodos de tiempo como la derivatización. Sin embargo, antes del análisis cromatográfico, los analitos deben ser (1) extraídos del interior de la matriz; y (2) 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 (por ejemplo, 0.05 – 0.5 M de HCl), a fin de evitar la conversión de la HER o 6-monoacetilmorfina (6-MAM) a MOR o la COC a BE (Girod and Staub, 2000). Por otro lado, los compuestos anfetamínicos o cannabinoides pueden ser extraídos utilizando fuertes condiciones alcalinas (por ejemplo, 1 M de NaOH) (Quintela et al., 2000; Stanaszek and Piekoszewski, 2004; Villamor et al., 2005). Otros métodos de extracción están basados en el uso de disolventes o tampones de extracción (Scheidweiler and Huestis, 2004), o bien el uso de extracciones enzimáticas (Vincent et al., 1999).

Introducción

1.3.6.1. Pelo neonatal

El cabello neonatal es un marcador biológico altamente sensible capaz de informar acerca de la exposición acumulativa a sustancias de abuso durante el último trimestre de vida intrauterina (Klein et al., 2000; Lozano et al., 2007b; Pichini et al., 1996). En el feto, el pelo empieza a crecer durante los últimos 3 o 4 meses del embarazo. 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 et al., 2003). Sin embargo, las muestras de cabello que se pueden obtener en los recién nacidos es a menudo escasa, y la recogida en estos casos especiales puede ser considerada “casi” invasiva. Las muestras de pelo neonatal habitualmente están contaminadas por el líquido amniótico, sin embargo esta contaminación no se debe considerar en el contexto de una contaminación externa ya que se halla en el contexto de una exposición intrauterina a sustancias de abuso.

La principal droga de abuso que se ha estudiado mediante el uso de pelo neonatal ha sido la COC. De hecho, los primeros estudios se han centrado en confirmar la exposición prenatal en recién nacidos procedentes de madres con alta sospecha de consumo durante el embarazo. Tomando a modo de ejemplo, en 1995, Salle FR et al (Sallee et al., 1995) investigó la presencia de BE en muestras de pelo neonatal procedentes de madres que se les había detectado COC en orina. Además, se correlacionó un limitado crecimiento del perímetro craneal con la exposición prenatal a COC. No tan solo se ha descrito la COC en pelo neonatal, en 1996, Samperiz S y colaboradores (Samperiz et al., 1996) además de meconio analizó pelo neonatal y orina. Sus resultados sugirieron que tanto pelo neonatal como meconio eran buenas matrices para poder evaluar la exposición intrauterina a sustancias de abuso, en cambio, la orina no era una buena matriz biológica donde poder evaluar una exposición prenatal a sustancias de abuso. Sus resultados, basados en una

cohorte de 31 niños aportaron resultados positivos a opiáceos (MOR) cannabis (THC) y oxazepam.

Recientemente, se ha especulado sobre el poder del pelo neonatal frente al meconio para diagnosticar la exposición fetal a sustancias de abuso. Vinner E y cols. (Vinner et al., 2003a; Vinner et al., 2003b) y Bar-Oz B y cols. (Bar-Oz et al., 2003), ambos en 2003, realizaron la misma comparación. Si bien el análisis de meconio obtuvo los mejores resultados para predecir la exposición prenatal a sustancias de abuso, los niveles de diferentes sustancias de abuso en pelo neonatal fueron asociados con la presentación de síndromes de abstinencia prenatal.

1.3.6.2. Pelo materno

El análisis de pelo materno se ha considerado el “gold standard” para evaluar la exposición crónica a sustancias de abuso durante el embarazo ya que la recolección del pelo es no invasiva, permite muestrear una gran cantidad de muestra y obtener información respecto al consumo de drogas durante el primer trimestre de gestación es relativamente frecuente. Por otro lado, como ocurre con todas las matrices biológicas procedentes de la madre, el pelo materno aporta una información acerca de la exposición activa (o pasiva) de la madre, con lo cual tan solo se puede especular con una estimación indirecta de la exposición que puede llegar al feto. De igual manera que ocurre con el cabello neonatal, las drogas principales prevalecen en el pelo por delante de los metabolitos principales y de igual manera se encuentran en niveles de nanogramo por miligramo de pelo.

Introducción

Tabla 8. 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

Droga	Rango de concentración (ng/mg)	Método de extracción	Método de detección	LOD / LOQ (ng/mg)	Referencia
Pelo neonatal					
Cocaína	BE: 0.71–2.47	Liq-Liq	GC/MS	LOD: 0.1	(Kintz and Mangin, 1993a)
	BE: 0.72-5.44	Liq-Liq	RIA	LOD: 32	(Sallee et al., 1995)
	BE: 0-5.44	Liq-Liq	RIA / GC-MS	LOD: 5	(Katikaneni et al., 2002)
	COC: 2.5-4	Liq-Liq / SPE	RIA / GC-MS	Cut-off: 2	(Strano Rossi et al., 1998)
	BE: 4.37 ± 12.5	Liq-Liq	RIA	LOD: 0.25	(Ursitti et al., 1997)
	COC: < 2-83.5 EME: 2-8	ND	FPIA / EMIT / GC-MS	LOD: 1 LOQ: 2	(Pellegrini et al., 2006)
Opiáceos	MOR: 0.61-3.47	Liq-Liq	GC-MS	LOD: 0.1	(Kintz and Mangin, 1993a)
Anfetaminas	AP: 1.21	Liq-Liq	GC-MS	LOD: 0.1	(Kintz and Mangin, 1993a)
Benzodiacepinas	ND	Liq-Liq	EMIT / GC-MS	LOD: 200 µg/mL	(Samperiz et al., 1996)
Pelo materno					
Cocaína	COC: 38 ±37.2	Liq-Liq	RIA	ND	(Marques et al., 1993)
	BE: 0.8-2.3	Liq-Liq	RIA	ND	(Potter et al., 1994)
	BE: 2.38-23.7	Liq-Liq	RIA / GC-MS	LOD: 5	(Katikaneni et al., 2002)

6-monoacetilmorfina (6-MAM); 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); límite de cuantificación (LOQ); límite de detección (LOD); morfina (MOR); no disponible (ND); radioinmunoensayo (RIA); extracción en fase sólida (SPE);

La primera vez que se utilizó el pelo materno con el fin de evaluar la exposición prenatal fue a finales de la década de los ochenta. Graham K analizó el pelo de siete mujeres embarazadas que buscaban consejo en el programa Motherisk de Toronto, Canadá (Graham et al., 1989).

Sin embargo, un factor que debe tenerse en cuenta al correlacionar las concentraciones en pelo materno y el pelo neonatal es la variabilidad en la retención de sustancias durante el paso transplacentario en general y en particular para el caso de la COC. Además, la variabilidad en el metabolismo fetal de las drogas y la deposición en el cabello de estas debe ser un factor tenido en cuenta. En apoyo a esta declaración, Potter y colaboradores (Potter et al., 1994), en 1994, informó por primera una falta de exposición a COC en pelo fetal, mientras que en pelo materno se detectaron altos niveles de COC. Además la BE se halló en diferentes segmentos del cabello materno correspondiente a los diferentes trimestres y sin embargo en el pelo fetal no se halló. Estos datos sugirieron que el modo de uso de la COC y las diferencias individuales en la retención de sustancias por la placenta puede proteger a algunos fetos y por ello abogar por la necesidad de interpretar esta variedad interindividual (Eyler et al., 2005; Marques et al., 1993).

Introducción

1.3.7. 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 por las encías. Como la excreción de este producto es una mezcla de líquidos, el término “fluido oral” es más adecuado para designar a esta mezcla de sustancias. El agua (99%) es el principal constituyente del fluido oral así como también proteínas (enzimáticas y mucinas) y una pequeña proporción de sales minerales. Su pH es de 6.8 en situación de reposo, pero por un aumento del flujo salival se convierte en más básica (aproximándose al pH del plasma) como resultado de una mayor osmolaridad (Kintz et al., 2000). El volumen total producido por un adulto puede ser de 1000 mL/día a un flujo aproximado de 0.05 mL/min aunque este hecho viene determinado por el ritmo circadiano de cada individuo, así pues durante la noche se alcanzará un ritmo de 0.5mL/min o durante la ingesta, en el proceso de masticación, se alcanzará una tasa de 1-3 mL/min (Crouch, 2005).

Existen diferentes vías de incorporación de drogas a la saliva o fluido oral. Aún así, la mayoría de drogas que se incorporan al fluido oral lo hacen mediante el proceso de difusión pasiva, el cual es dependiente 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 drogas en plasma. De hecho, la fracción de sustancias de abuso en saliva se puede predecir conociendo su valor de pKa y pH mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach.

Existe una gran variedad de métodos de recolección de muestras de fluido oral, aunque habitualmente se utilizan métodos mecánicos de estimulación para la formación de saliva. De esta manera, se utilizan métodos como el uso

de ácido cítrico para producir un estímulo gustativo para la producción de saliva. 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 et al., 2005). Una gran variedad de dispositivos comerciales existen en el mercado. En general, estos dispositivos consisten en un material absorbente que se satura en la boca del donante y posteriormente de quedar impregnado se recupera mediante centrifugación o por presión.

Una de las ventajas que proporciona el análisis de saliva es que la muestra se recoge mediante supervisión directa. En consecuencia, el riesgo de obtener una muestra no válida por adulteración o falsificación de la muestra es relativamente pequeño. Por otro lado, las drogas que se ingieren oralmente o se administran de forma fumada adquieren altas concentraciones en fluido oral al cabo de pocos minutos u horas después de la ingesta, debido a que restos de la droga permanecen en la cavidad oral.

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, otro de los inconvenientes del análisis de fluido oral es la incapacidad de poder obtener resultados en el lugar en que se ha realizado el muestreo. Además, como la concentración de sustancias de abuso depende directamente de las concentraciones plasmáticas y estas presentan una corta semivida en plasma, se eliminan rápidamente del organismo y por lo tanto tan solo son detectables en fluido oral por un corto período de tiempo, representando este hecho una clara desventaja respecto a matrices como el pelo. De hecho, la saliva juntamente con la sangre son las matrices biológicas que ofrecen una menor ventana de detección.

Introducción

Debido a las ventajas anteriormente mencionadas, el análisis de fluido oral es un instrumento de análisis utilizado para el control de la monitorización farmacológica de diferentes fármacos (Quintela et al., 2005), estudios farmacocinéticos (Drummer, 2005; Huestis and Cone, 2004) y en la detección de sustancias de abuso en controles de circulación (Concheiro et al., 2007; Samyn et al., 2002). No cabe duda que una de las aplicaciones más impactantes del análisis de fluido oral es la detección de sustancias de abuso en controles de circulación favorecido no tan solo por la aparición de métodos de recolección de la muestra en el lugar de los hechos sino porque además posibilita una recolección simple y no invasiva. Además, como las concentraciones de las sustancias de abuso en fluido oral correlacionan con las concentraciones plasmáticas, estos resultados pueden utilizarse para evaluar el grado de afectación por las drogas de un individuo.

1.3.8. Leche materna

La principal razón para investigar la presencia de sustancias de abuso en leche materna es para calcular la tasa de excreción de diferentes compuestos en este fluido y como consecuencia, calcular la dosis aproximada de ingesta de estos compuestos mediante la lactancia (Atkinson et al., 1988). Esta información no tan solo es importante para proteger a los lactantes de los efectos indeseados del consumo materno de drogas legales o ilegales sino que además es beneficioso para calcular el tratamiento farmacológico de las madres durante la lactancia.

Para muchos medicamentos, el porcentaje de dosis de fármaco recibido es inferior al 1% o entre el 1% y el 10% de la dosis materna. Sin embargo, hay algunos en que la dosis supera el 50% de la dosis materna (por ejemplo, teofilina o fenobarbital) (Pichini et al., 1996). Algunas sustancias de abuso, (por ejemplo, COC, MOR, fenciclidina (PcP) y AP) que son bases débiles han

sido halladas como producto de excreción de la leche materna debido a su carácter ácido respecto al plasma (Pichini et al., 1996; Pons et al., 1994; Robieux et al., 1990; Steiner et al., 1984; Winecker et al., 2001) además entre otros compuestos básicos también se ha hallado la presencia de NIC, cafeína y ARE, tres de las cuatro sustancias psicoactivos más consumidas en el mundo (Pellegrini et al., 2007).

1.3.9. Dientes

Recientemente, los dientes se han postulado como matriz biológica capaz de depositar sustancias exógenas, las cuales pueden depositarse tanto en la pulpa como en el tejido calcificado (Haustein et al., 1994). De hecho, respecto a las sustancias de abuso, algunos autores han podido identificar opiáceos (COD y MOR) y/o COC en dientes de personas que habían fallecido como consecuencia de un sobredosis por heroína (Cattaneo et al., 2003). Estas evidencias apoyan el papel de los dientes desde un punto de vista toxicológico. Por primera vez, Pascual JA. y colaboradores desarrollaron y validaron un procedimiento para determinar NIC y su metabolito principal, COT en dientes de leche (Pascual et al., 2003). Este método fue aplicado por García-Algar O 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 et al., 2003). Dichos resultados apoyaron 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).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El consumo de sustancias de abuso en los países occidentales ha acontecido un problema de salud pública en los últimos años. Concretamente, en los países mediterráneos, la COC es la droga de abuso con mayor índice de crecimiento en el consumo durante la última década y concretamente, España muestra el mayor porcentaje de consumo en la Comunidad Europea con un 3% de individuos que admiten haber consumido dicha droga alguna vez durante el último año en población adulta general (15-64 años). Otros datos que apoyan esta argumentación son los aportados por el Plan Nacional Sobre Drogas. Así pues, el abuso de COC es especialmente elevado en población adulta joven (15-34 años) mostrando una prevalencia en el consumo de 5.1% de individuos que en los últimos 12 meses han declarado consumir COC alguna vez durante el último año. Además, a parte de las sustancias de abuso ilegales, la adicción al tabaco es un gran problema de salud pública mundial. Los riesgos del hábito de fumar sobre la salud están bien documentados en la literatura científica. A pesar de la gran mayoría de los fumadores conoce los riesgos asociados del consumo de tabaco, más del 25% de la población mundial fuma, haciendo del fumar una de las mayores causas evitables de morbilidad y la mortalidad asociada a este hábito.

Lamentablemente, las sustancias de abuso son una carga para las personas que no las consumen ya sea por exposición prenatal o bien porque se consumen de forma fumada. Por ello, la población pediátrica, incluyendo la vida prenatal son una población de riesgo de exposición pasiva a sustancias de abuso. Por lo que refiere a la tasa de prevalencia de exposición prenatal a sustancias de abuso durante la gestación se limita a los estudios que se han realizado en diferentes poblaciones. Las tasas de prevalencia oscilan entre el 6 y el 40%, pero estos datos no reflejan la realidad. Por otro lado, las tasas de prevalencia de exposición pasiva a estas sustancias durante la infancia es prácticamente desconocida.

Justificación y objetivos

Históricamente la evaluación del consumo de drogas se ha realizado mediante entrevistas. Con el tiempo se ha demostrado que los cuestionarios que recogen la exposición a sustancias de abuso frecuentemente son imprecisos debido a que los padres suelen ocultar o infradeclarar sus hábitos por presión social, culpabilidad o bien por vergüenza. La exposición pasiva a sustancias de abuso puede producirse durante la etapa prenatal, continuar después del nacimiento y seguir durante la infancia y es necesario el uso de biomarcadores objetivos para esclarecer dicha exposición.

Históricamente 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, estas matrices tan solo pueden aportar información acerca de las últimas 24 – 48 horas antes de la exposición. El uso de matrices no convencionales (diferentes a la sangre o la orina) como por ejemplo la placenta, el pelo o los dientes de leche pueden aportar más información retrospectiva en el tiempo que las matrices convencionales.

Estas matrices biológicas no convencionales se caracterizan por la no invasividad en la recolección de muestras. Este hecho en población pediátrica es muy importante en el uso de estas matrices alternativas. Además, la determinación de sustancias de abuso y sus metabolitos puede ser útil para: en primer lugar, tener la posibilidad de poder calcular los parámetros farmacocinéticos en el órgano diana; y en segundo lugar, la aplicación de la información obtenida en la toxicología forense y clínica.

Objetivos

1. Desarrollar y validar metodologías analíticas basadas en la espectrometría de masas para determinar y cuantificar las principales sustancias de abuso y sus metabolitos principales en las matrices no convencionales: placenta, cabello materno y dientes de leche.
2. Conocer la utilidad de las matrices alternativas: cabello materno y placenta en la detección de la exposición prenatal y postnatal a sustancias de abuso, con la finalidad de valorar su uso como herramienta de detección y cribado.
3. Estudiar la utilidad de la determinación de biomarcadores de sustancias de abuso en matrices biológicas alternativas para estimar la prevalencia de consumo por parte de las mujeres embarazadas y la prevalencia y la incidencia de la exposición pasiva en niños.

Justificación de la unidad temática de la tesis

La tesis que se presenta está basada en la publicación de dos artículos relacionados directamente con el título de la misma y con los objetivos de investigación. Estos trabajos han sido aceptados para la presentación de la tesis por compendio de publicaciones.

En el primero de ellos [Joya X, Pujadas M, Falcón M, Civit E, Garcia-Algar O, Vall O, Pichini S, Luna A, de la Torre R. *Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. Forensic Sci Int. 2010 Mar 20;196(1-3):38-42. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20056364*] por primera vez se ha desarrollado un método basado en la GC/MS que detecta y cuantifica los niveles de las principales sustancias de abuso en placenta obtenida en el primer trimestre de gestación cómo material de descarte.

Justificación y objetivos

En el segundo trabajo [Papaseit E, Joya X, Velasco M, Civit E, Mota P, Bertran M, Vall O, Garcia-Algar O. *Hair analysis following chronic smoked-drugs-of-abuse exposure in adults and their toddler: a case report.* J Med Case Rep. 2011 Dec 10;5(1):570. PubMed PMID: 22152522; PubMed Central PMCID: PMC3251699] se refiere el caso de una intoxicación por drogas de abuso en una niña de 2 años de edad cómo consecuencia del consumo de estas sustancias en el ambiente familiar. El estudio se justifica mediante el análisis toxicológico realizado en pelo de los padres y de la propia niña.

Además, se aportan otras 4 publicaciones en las cuales el doctorando ha participado como coautor, y que completan el sentido de la línea de investigación pero que no forman parte del compendio de publicaciones para la tesis doctoral (1) [Falcon M, Pichini S, Joya J, Pujadas M, Sanchez A, Vall O, García Algar O, Luna A, de la Torre R, Rotolo MC, Pellegrini M. *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. 2012 May 10;218(1-3):92-6. Epub 2011 Oct 27. PubMed PMID: 22036306.] (2) Joya X, Papaseit E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, Garcia-Algar O, Scaravelli G, Pichini S. *Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis.* Ther Drug Monit. 2009 Jun;31(3):391-5. PubMed PMID: 19333147. (3) Marchei E, Joya X, Garcia-Algar O, Vall O, Pacifici R, Pichini S. *Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* Rapid Commun Mass Spectrom. 2008 Aug;22(16):2609-12. PubMed PMID: 18646249. (4) [Joya X, Fríguls B, Simó M, Civit E, de la Torre R, Palomeque A, Vall O, Pichini S, Garcia-Algar O. *Acute heroin intoxication in a baby chronically exposed to cocaine and heroin: a case report.* J Med Case Rep. 2011 Jul 5;5:288. PubMed PMID: 21729296; PubMed Central PMCID: PMC3141724.]

3. RESULTADOS

ARTÍCULO 1

**GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY
ASSAY FOR THE SIMULTANEOUS
QUANTIFICATION OF DRUGS OF ABUSE IN
HUMAN PLACENTA AT 12TH WEEK OF GESTATION**

Xavier Joya, Mitona Pujadas, María Falcón, Ester Civit, Oscar Garcia-
Algar, Oriol Vall, Simona Pichini, Aurelio Luna, Rafael de la Torre

Forensic Science International. 2010 Mar 20; 196(1-3):38-42.

Resumen

Objetivos: El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de las principales sustancias de abuso en placenta humana mediante GC/MS. Además, el método desarrollado se aplicó para comprobar el paso transplacentario de las sustancias de abuso en mujeres embarazadas que voluntariamente interrumpieron su embarazo durante el primer trimestre de gestación.

Material y métodos: Las muestras de placenta humana fueron recogidas en un hospital privado de Murcia y fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis. De forma breve, las muestras (1 gr.) fueron cortadas finamente y mezcladas con 5 mL HClO₄ al 0.1% y sonicadas durante 45 min. En este momento, se añadieron tanto a muestras, como calibradores o controles de calidad los controles internos deuterados (50 µg de MDMA-d₅, anfetamina-d₅, metanfetamina-d₈, cocaína-d₃, benzoilecgonina-d₃, morfina-d₃, Δ⁹-THC-COOH-d₃, nicotina-d₄ y cotinina-d₃). Los extractos fueron extraídos mediante extracción en fase sólida utilizando resinas catiónicas de ácido fuerte. Para eluir los componentes ácidos y neutros se utilizó metanol y para los componentes básicos se usó la mezcla de isopropanol al 5% de hidróxido de amonio. Este extracto se evaporó lentamente a 23 °C y 10 psi de presión. La muestra se derivatizó con N-Metil-N-(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida (MSTFA) en un baño seco a 60 °C durante 30 min. con el fin formar los derivados trimetilsilil. El análisis fue realizado utilizando el instrumento 6890 Series Plus gas chromatograph equipado con un Agilent 7683 autosampler y acoplado a un 5973 N mass selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Las muestras fueron inyectadas en modo splitless y la separación de los compuestos fue realizada utilizando una columna capilar 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano (ZB-5, 15 m x 0,25 mm i.d., 0.25 mm de espesor, Phenomenex, Inc.). El programa de temperatura programado fue 70

Resultados

°C (2 min.), seguido de un aumento de 30 °C/min. hasta alcanzar los 160 °C, 5 °C/min. hasta 170 °C, 20 °C/min. hasta 220 °C y finalmente un aumento de 30 °C/min. hasta los 300 °C y sostenido durante 3 min. El helio fue utilizado como gas portador a una tasa de 0.8 mL/min. La separación de todos los compuestos se consiguió realizar en 16.2 min. Los iones seleccionados para la detección y cuantificación de las sustancias quedan recogidos en la **Tabla 9**.

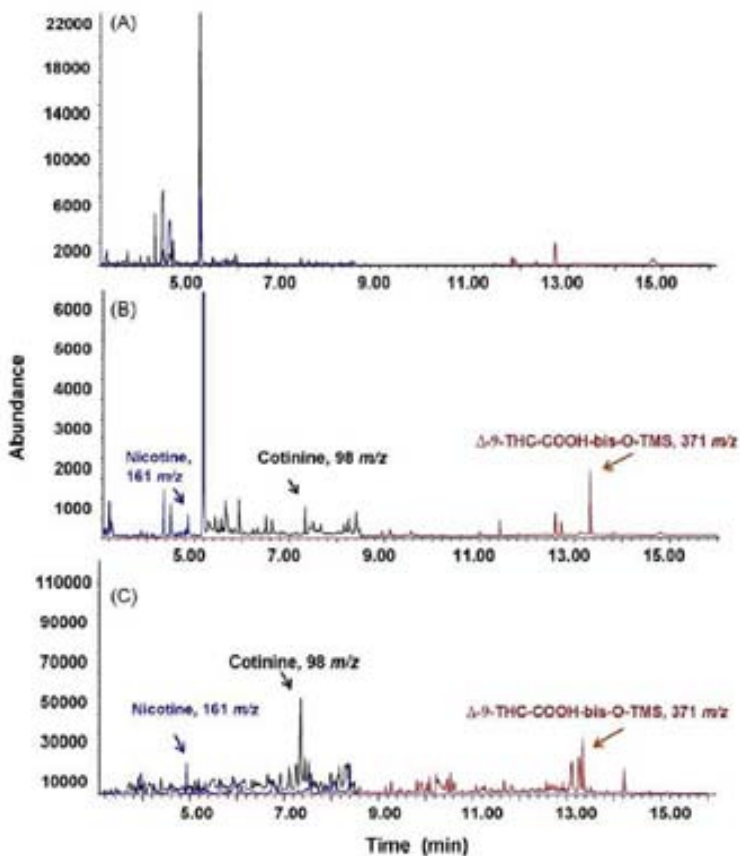
Tabla 9. Iones seleccionados para la identificación y la cuantificación de las sustancias de abuso. Los iones subrayados son los que fueron seleccionados para la cuantificación.

Componente	Tiempo de retención (min.)	Iones diana
[² H ₃]MOR-bis-O-TMS	12.59	<i>m/z</i> <u>432</u> , 417, 404
MOR-bis-O-TMS	12.61	<i>m/z</i> <u>429</u> , 414, 401
Metadona	10.85	<i>m/z</i> <u>294</u> , 178, 85
[² H ₃]-COC	11.22	<i>m/z</i> <u>185</u> , 306, 275
COC	11.22	<i>m/z</i> <u>182</u> , 303, 272
Cocaetileno	11.53	<i>m/z</i> <u>196</u> , 317, 82
[² H ₃]-BE-O-TMS	11.58	<i>m/z</i> <u>243</u> , 85, 364
BEC-O-TMS	11.60	<i>m/z</i> <u>240</u> , 82, 361
[² H ₃] Δ-9-THC-COOH-bis-O-TMS	13.32	<i>m/z</i> <u>374</u> , 476, 491
Δ-9-THC-COOH-bis-O-TMS	13.32	<i>m/z</i> <u>371</u> , 473, 488
[² H ₅]-AP-N-TMS	4.61	<i>m/z</i> <u>119</u> , 91, 197
AP-N-TMS	4.63	<i>m/z</i> <u>116</u> , 91, 192
[² H ₈]-MDA-N-TMS	5.08	<i>m/z</i> <u>136</u> , 91, 213
MA-N-TMS	5.08	<i>m/z</i> <u>130</u> , 91, 206
[² H ₅]MDMA-N-TMS	7.41	<i>m/z</i> <u>134</u> , 255, 104
MDMA-N-TMS	7.40	<i>m/z</i> <u>130</u> , 250, 100
[² H ₄]-NIC	4.87	<i>m/z</i> <u>164</u> , 87, 136
NIC	4.87	<i>m/z</i> <u>161</u> , 84, 133
[² H ₃]-COT	7.38	<i>m/z</i> <u>101</u> , 179, 118
COT	7.38	<i>m/z</i> <u>98</u> , 176, 118

Morfina (MOR); cocaine (COC); benzoilecgonina (BE); 11-nor-9-carboxi-Δ-9-tetrahydrocannabinol, anfetamina (AP), metanfetamina (MDA); 3,4-metilendioxitetanfetamina (MDMA); nicotina (NIC); cotinina (COT); derivados trimetilsilil (TMS)

Resultados: A continuación se muestran los cromatogramas para: (A) un extracto de placenta humana libre de drogas de abuso; (B) un extracto de placenta libre de sustancias de abuso en la cual se han añadido los analitos a investigar; (C) una muestra de placenta positiva para THC-COOH, nicotina y cotinina (**Figura 8**).

Figura 8. Cromatogramas de: (A) un extracto de placenta libre de drogas de abuso; (B) un extracto de placenta libre de sustancias de abuso en la cual se han añadido los analitos a investigar; (C) una muestra de placenta que contiene 123.2 ng/g de THC-COOH, 119.5 ng/g de nicotina y 179.9 ng/g de cotinina.



Resultados

En cuanto a la validación del método, los parámetros de validación evaluados están resumidos en el artículo que se muestra a continuación (página 81). Las curvas de calibración obtenidas para cada compuestos presentaron un coeficiente de regresión (r^2) superior al 0.99. Los límites de detección y cuantificación obtenidos, así como la precisión y la exactitud del método fueron consideradas adecuadas. Finalmente, no se hallaron interferencias potenciales con otras sustancias de abuso (o sus metabolitos). El proceso de validación se llevó a cabo con 41 muestras de placenta libre de drogas. Para definir una muestra como libre de drogas nos basamos en los cuestionarios remitidos por la paciente y por el análisis toxicológico en pelo.

Finalmente, el método aquí presentado se utilizó para conocer la prevalencia en el consumo de sustancias de abuso en mujeres gestantes durante el primer trimestre de embarazo. De las 64 muestras analizadas, una muestra fue positiva a COC (BE = 37.8 ng/g) y otra positiva a cannabis (Δ -9-THC-COOH = 123.2 ng/g). Por otro lado, 21 muestras (32.8%) fueron positivas a la COT y en algunos casos la NIC también estuvo presente. El rango de concentraciones de NIC fue 32.5 – 119.5 ng/g con un valor medio de 61.2 ng/g. En cambio para la COT el rango fue de 24.7 – 189.6 ng/g con un valor medio de 80.4 ng/g.

Discusión y conclusiones: por primera vez se ha desarrollado un método basado en la GC/MS que detecta y cuantifica los niveles de las principales sustancias de abuso en placenta obtenida en el primer trimestre de gestación como material de descarte. Las principales características del método aquí presentado son: el simple y rápido procedimiento de extracción y análisis cromatográfico para cuantificar una amplia gama de compuestos pertenecientes a las drogas de abuso.



Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation

Xavier Joya^{a,b,c,*}, Mitona Pujadas^{d,e}, María Falcón^f, Ester Civit^d, Oscar Garcia-Algar^{a,c,g}, Oriol Vall^{a,c,g}, Simona Pichini^h, Aurelio Luna^f, Rafael de la Torre^{d,e,i}

^a Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica - Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^b Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Red de Salud Materno-Infantil y del Desarrollo (SAMB), Instituto Carlos III, Spain

^d Grup de Recerca en Farmacologia Humana i Neurociències, Institut Municipal d'Investigació Mèdica-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^e CIBER Fisopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto Carlos III, Spain

^f Departamento de Medicina Forense, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

^g Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^h Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

ⁱ Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2009

Accepted 15 September 2009

Available online 6 January 2010

Keywords:

Placenta

Prenatal exposure

Drugs of abuse

Interruption of pregnancy

Gas chromatography–mass spectrometry

ABSTRACT

We describe the development and validation of a method for the quantification of drugs of abuse, using gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), in human placenta. Concentration ranges covered were 5–500 ng/g for amphetamine, methamphetamine, MDMA, methadone, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, morphine, 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol, nicotine, and cotinine. Intra-assay and inter-assay imprecisions were less than 15.7% for lower quality control samples and less than 14.9% for medium and high quality control samples. Recovery range was 36.2–83.7%. Placenta samples were kept at -80°C until analysis; analytes were stable after three freeze–thaw cycles (samples stored at -20°C). This accurate and precise assay has sufficient sensitivity and specificity for the analysis of specimens collected from women who voluntarily terminated their pregnancy at 12th week of gestation. The method has proven to be robust and accurate for the quantification of the principal recreational drugs of abuse in this period of the prenatal life. This is the first report that highlights the presence of drugs of abuse during the first trimester of gestation.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biological matrices, alternative to urine and plasma, have recently been introduced for assessing *in utero* drug exposure [1,2]. Such is the case of fetal hair and meconium which have been extensively and successfully used to assess prior exposure to drugs

of abuse. These matrices are believed to reflect chronic drug usage from the second [3,4] and third trimester of pregnancy [1,5], respectively. Up to now, no biological matrix from both the foetus and the mother has been characterized to evaluate prenatal exposure in early pregnancy. In this context, placenta could also be an alternative to urine for drugs of abuse testing during the first trimester of gestation. The advantage of placenta tissue, obtained as a discarded material of pregnancy interruption, over traditional matrices such as urine and blood, is that collection is almost non-invasive and relatively easy to perform.

The formation of the human placenta is complete at 4 weeks of gestation [1]. Some *in vitro* experiments suggest that placental tissue could act as a depot for drugs, depending on the affinity of the analytes for this tissue [6,7], and could efflux chemicals from the fetal to the maternal side, thus protecting the foetus from high xenobiotic concentrations [8]. As a result, fatty acid ethyl esters (FAEEs), the biomarkers of ethanol intake during pregnancy originating from alcoholic mothers, are not transferred to the foetus because they are taken up and degraded extensively by the human placenta [9].

Abbreviation: MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; AP, amphetamine; BEC, benzoylecgonine; BUP, buprenorphine; COC, cocaine; COT, cotinine; Δ -9-THC-COOH, 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol; EI, electron-impact; FAEEs, fatty acid ethyl esters; GC/MS, gas chromatography–mass spectrometry; ISTDs, internal standards; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LC/MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; MA, methamphetamine; MOR, morphine; NIC, nicotine; MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl)tri-fluoroacetamide; NBP-Gluc, norbuprenorphine glucuronide; QC, quality control; SIM, selected-ion-monitoring; SPE, solid phase extraction; SD, standard deviation.

* Corresponding author at: Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM - Hospital del Mar, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB), C/Dr. Aiguader, 88 (08003), Barcelona, Spain. Tel.: +34 933160414.

E-mail address: joya@imim.es (X. Joya).

With respect to the disposition of drugs of abuse in human placenta there are few data on the expected concentrations. Furthermore, the possible window of drug detection remains unknown. Luck et al. [10] measured nicotine and cotinine concentrations in placenta, and amniotic fluid from tobacco-smoking mothers, and compared them to concentrations in maternal and fetal serum which showed a linear correlation. Moreover, similar concentrations of arecoline (the main alkaloid of the areca nut) were found in placenta and meconium; arecoline was detected in placenta and showed a range concentration of 9–14 ng/g of tissue and the respective meconium specimens showed a range between 8 and 17 ng/g [11]. Garcia-Algar et al. reported the detection of similar concentrations of alprazolam and α -hydroxyalprazolam in placenta and meconium after alprazolam doses of 1.5 mg/day [12]. In addition, Martin et al. described neonatal withdrawal syndrome after maternal consumption of mate during pregnancy, and reported the presence of caffeine and theobromine in placenta and other neonatal matrices [13]. Methadone, and its metabolites (EDDP and EMDP), have been quantified in human placenta [14]. Recently, a LC/MS method was developed for the determination of buprenorphine (BUP) and its metabolites in human placenta. The method was applied in the analysis of a placenta specimen from a woman treated with up to 18 mg/day BUP. The cumulative dose over this period was 1.850 mg. It is of interest that whilst BUP was not detected, metabolite concentrations were norbuprenorphine glucuronide (NBUP-Gluc) 46.6 ng/g, norbuprenorphine (NBUP) 15.7 ng/g, and buprenorphine glucuronide (BUP Gluc) 3.2 ng/g [15].

The aim of this study was to develop and validate an analytical method for the simultaneous quantification of the principal drugs of abuse in human placenta by GC/MS. The method was applied to assess the transplacental drug passage in pregnant women who voluntarily interrupted their pregnancy during the first trimester of gestation.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Amphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), methamphetamine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, 11-nor-9-carboxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC-COOH), methadone, Δ -9-THC-COOH- d_8 , amphetamine- d_8 , methamphetamine- d_8 , cocaine- d_8 , benzoylecgonine- d_8 , cotinine- d_8 , nicotine- d_8 and MDMA- d_8 were supplied by Cerilliant (Austin, TX, USA). Morphine and morphine- d_8 were purchased from Lipomed Inc. (Cambridge, MA, USA). Nicotine and cotinine were supplied by Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

StrataTM-X-C Polymeric Solid Phase Extraction (SPE) columns were obtained by Phenomenex, Inc. (Torrance, CA, USA). Gas chromatography grade *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)tri-fluoroacetamide (MSTFA) was purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Ultra pure water was obtained using a Milli-Q purification system (Milli-pore, Molsheim, France). All other reagent grade chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Preparation of standard solutions

Separate stock solutions (1 mg/mL) of each compound were prepared in HPLC-grade methanol by duplicate and stored at -20 °C. One solution was used for the preparation of calibration curves at 10 and 1 μ g/mL, and the second one for the preparation of quality control (QC) samples. Internal standards (ISTDs) (MDMA- d_8 , amphetamine- d_8 , methamphetamine- d_8 , benzoylecgonine- d_8 , Δ -9-THC-COOH- d_8 , nicotine- d_8 , and cotinine- d_8) were used as internal standard for their analogous compounds. Morphine- d_8 was used as internal standard for methadone and morphine and cocaine- d_8 for cocaethylene and cocaine) were diluted in methanol to give a working solution of 1 μ g/mL stored at -20 °C.

Daily calibration curves were obtained by analyzing pre-checked blank placenta pooled samples spiked with 5, 125, 250, 375, and 500 ng of each drug per g of placental tissue. Quality control (QC) samples (6, 200, 425 ng/g placental tissue) were included in each analytical batch for calculation of validation parameters. Calibration and quality control samples were treated and processed as unknown samples.

2.3. Placenta samples

Samples analyzed in the present study were obtained from women who had voluntarily interrupted their pregnancy. These women were attended at a private hospital in Murcia, Spain. They were asked to provide a placental tissue sample obtained as discarded material. The study protocol was approved by the Local Ethics Committees of the participating hospital and a signed consent was obtained from all participating individuals.

Placental tissue samples were collected as discarded material from pregnancy termination. Once obtained, the samples were transferred to a plastic tube and stored at -80 °C. Within the following days, the tubes were sent to the analytical laboratory prior to analysis.

2.4. Sample preparation and extraction

The placental tissue was weighed (1 g), finely cut and mixed with 5 mL HCO₂ 0.1% and sonicated for 45 min. Samples, calibration and quality control samples were combined with 50 μ L of 1 μ g/mL MDMA- d_8 , amphetamine- d_8 , methamphetamine- d_8 , cocaine- d_8 , benzoylecgonine- d_8 , morphine- d_8 , Δ -9-THC-COOH- d_8 , nicotine- d_8 and cotinine- d_8 as ISTDs. Reconstituted extracts underwent a SPE procedure with strong cation exchange and reverse phase STRATATM-X-C columns.

Columns were preconditioned with 2 mL methanol and equilibrated with 2 mL of H₂O. Specimens (mixed with H₂PO₄ 2%) were applied at 1 mL/min to SPE columns. Columns were rinsed with 2 mL HCl 0.1% and dried under negative pressure (vacuum) to the column outlet for 5 min. Acidic and neutral compounds were eluted with 4 mL of methanol at 1 mL/min, followed by a second elution step with 2 mL of 5% ammonium hydroxide/isopropanol for basic compounds at 1 mL/min. These extracts were pooled and evaporated under nitrogen stream at 23 °C (c.a. 10 psi pressure). Trimethylsilyl derivatives were formed by reaction with 50 μ L MSTFA as derivatization agent in a dry bath at 60 °C for 30 min.

2.5. GC-MS conditions

GC-MS analyses were carried out on a 6890 Series Plus gas chromatograph equipped with an Agilent 7683 autosampler and coupled to a 5973 N mass selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Data acquisition and analysis were performed using standard software supplied by the manufacturer (Agilent Chemstation). Samples were injected in splitless mode and analyses separation was achieved on a 5%-phenyl-95%-dimethylpolysiloxane capillary column (ZF-5, 15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, Phenomenex, Inc.). The oven temperature was programmed at 70 °C (2 min), followed by a 30 °C/min rate to 160 °C, 5 °C/min to 170 °C, 20 °C/min to 200 °C, 10 °C/min to 220 °C, and finally increased from 30 °C/min rate to 300 °C and held for 3 min. The injector and the interface were operated at 280 °C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 0.8 mL/min. The chromatographic separation of all compounds tested was achieved in 16.2 min.

The mass spectrometer was operated in electron-impact ionization mode at 70 eV. The electron-impact (EI) mass spectra of the analyte and ISTDs were recorded

Table 1

m/z ions selected for substances identification and quantification and retention times. The underlined ions were used for quantification. (MOR = morphine, COC = cocaine, BEC = benzoylecgonine, Δ -9-THC-COOH = 11-nor-9-carboxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol, AP = amphetamine, MA = methamphetamine, MDMA = 3,4-methylenedioxyamphetamine, NIC = nicotine, COT = cotinine, TMS = trimethylsilyl derivatives).

Compound	Retention time (min)	Target ion and qualifiers
[² H] ₃ MOR-bis-O-TMS	12.59	<i>m/z</i> <u>432</u> , 417, 404
MOR-bis-O-TMS	12.61	<i>m/z</i> <u>429</u> , 414, 401
Methadone	10.85	<i>m/z</i> <u>294</u> , 178, 85
[² H] ₃ -COC	11.22	<i>m/z</i> <u>185</u> , 306, 275
COC	11.22	<i>m/z</i> <u>182</u> , 303, 272
Cocaethylene	11.53	<i>m/z</i> <u>196</u> , 317, 82
[² H] ₃ -BEC-O-TMS	11.58	<i>m/z</i> <u>243</u> , 85, 364
BEC-O-TMS	11.60	<i>m/z</i> <u>240</u> , 82, 361
[² H] ₃ Δ -9-THC-COOH-bis-O-TMS	13.32	<i>m/z</i> <u>374</u> , 476, 491
Δ -9-THC-COOH-bis-O-TMS	13.32	<i>m/z</i> <u>371</u> , 473, 488
[² H] ₃ -AP-N-TMS	4.61	<i>m/z</i> <u>119</u> , 91, 197
AP-N-TMS	4.63	<i>m/z</i> <u>116</u> , 91, 192
[² H] ₃ -MA-N-TMS	5.08	<i>m/z</i> <u>136</u> , 91, 213
MA-N-TMS	5.08	<i>m/z</i> <u>133</u> , 91, 206
[² H] ₃ MDMA-N-TMS	7.41	<i>m/z</i> <u>134</u> , 255, 104
MDMA-N-TMS	7.40	<i>m/z</i> <u>130</u> , 250, 100
[² H] ₃ -NIC	4.87	<i>m/z</i> <u>164</u> , 87, 136
NIC	4.87	<i>m/z</i> <u>161</u> , 84, 133
[² H] ₃ -COT	7.38	<i>m/z</i> <u>191</u> , 179, 118
COT	7.38	<i>m/z</i> <u>188</u> , 176, 118

in scan mode (scan range 40–550 m/z) to determine retention times and characteristic mass fragments. For routine analysis, three characteristic mass fragments were monitored in the selected-ion-monitoring (SIM). The ions selected for substance identification and quantification are shown in Table 1. Ion ratio acceptance criterion was a deviation $\leq 20\%$ ion ratio mean from all the calibrators, quality control samples and placenta samples.

3. Results and discussion

3.1. GC/MS

Representative chromatograms obtained following the extraction of: drug-free placenta (A), drug-free placenta samples spiked with all the analytes under investigation (B) and for a real sample (C) are shown in Fig. 1.

No additional peaks due to endogenous substances that could have interfered with the detection of compound of interest were observed. None of the drugs of abuse other than the analytes under investigation, carried throughout the entire procedure, interfered with the assay. Blank samples injected after the highest point of the calibration curve did not present any traces of carryover. Nonetheless, an injection of methanol was introduced between each injection of study.

The analytical procedure described was specifically designed for the analysis of placenta samples from the first trimester. Placental tissues in the first trimester and at delivery are structurally different. We tested both placental sources of tissue and the results, in terms of performance of the analytical method, were not the same.

3.2. Validation of results

Due to the fact that it was difficult to obtain enough drug-free placenta samples, the method was validated using extracted calibration curves prepared in drug-free pooled placenta and in water. Table 2 summarizes the method validation data. Linear calibration curves were obtained for the compounds of interest with a coefficient of determination (r^2) higher than 0.99 in all cases. The absolute analytical recoveries (mean \pm SD) obtained after SPE extraction at different concentration levels showed that they were independent from the concentration tested (recoveries of the deuterated analogues used as ISTDs were the same as those from the non-deuterated substances listed in Table 2). Limits of detection and quantification, intra-assay and inter-assay precision and accuracy were considered adequate for the purposes of the present study. Coefficients of variation for precision and accuracy at LOQ were consistently lower than 20%. With reference to the freeze/thaw stability assays for quality control samples, no relevant degradation was observed after any of the three freeze/thaw cycles (samples stored at -20°C), with differences from the initial concentration less than 10%. The results obtained for intra- and inter-assay precisions and accuracy satisfactorily met the internationally established acceptance criteria [16,17].

Potential interferences from drugs of abuse (and/or metabolites) other than those included in the present study such as psychostimulant drugs (3,4-methylenedioxiamphetamine-MDA, 3,4-methylenedioxyethyl amphetamine-MDEA, phentermine), cocaine metabolites (ecgonine methyl ester), cannabinoids

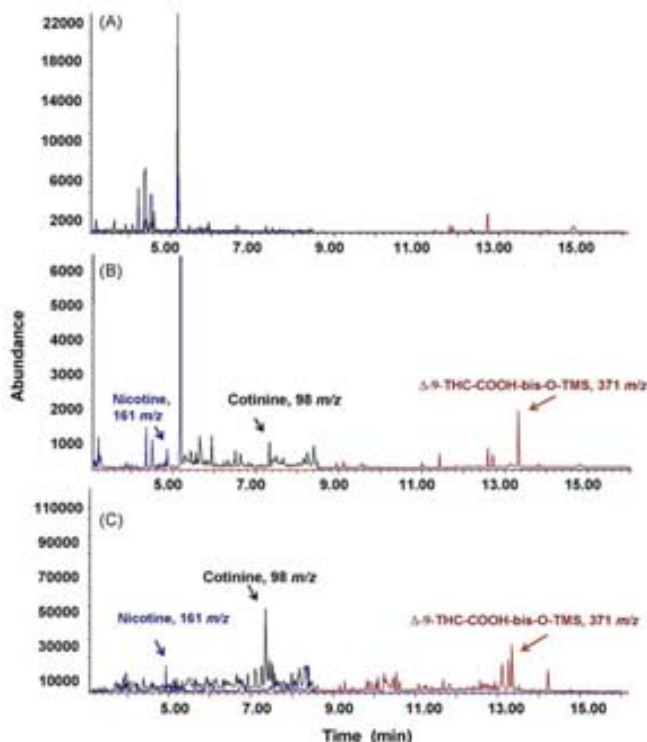


Fig. 1. Total ion current chromatograms obtained following the extraction of: (A) a drug-free placenta; (B) a drug-free placenta sample spiked with analytes under investigation at a concentration of 5 ng/g; (C) a real sample containing 123.2 ng/g of THC-COOH, 119.5 ng/g of nicotine and 179.9 ng/g of cotinine.

Table 2

Method validation data. Intra- (n=4) and inter-assay (n=12) precision and accuracy obtained from analytes under investigation. (MOR= morphine, COC= cocaine, BEC= benzoylcegonine, Δ -9-THC-COOH= 11-nor-9-carboxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol, AP= amphetamine, MA= methamphetamine, MDMA= 3,4-methylenedioxy-methamphetamine, NIC= nicotine, COT= cotinine).

Analyte	Limit of detection (LOD) (ng/mL), n=4	Limit of quantification (LOQ) (ng/mL), n=4	Analytical recovery (mean \pm SD, n=4) ^a	Correlation coefficient (r ²), n=4	Intra-assay						Inter-assay					
					Imprecision (RSD %)			Bias (error %)			Imprecision (RSD %)			Bias (error %)		
					Concentration (ng/mL)		Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)		Bias (error %)	Concentration (ng/mL)		Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)		Bias (error %)
					6	200	425	6	200	425	6	200	425	6	200	425
MOR	2.4	7.3	48.3 \pm 9.3	0.9937 \pm 0.0027	15.7	12.2	5.3	10.5	9.3	3.8	15.7	13.6	10.7	10.5	11.3	9.7
COC	0.7	2.2	83.7 \pm 6.9	0.9941 \pm 0.0030	2.1	3.5	8.2	1.7	5.9	6.1	15.0	13.0	14.7	10.2	13.4	14.0
BEC	2.7	8.3	43.8 \pm 0.0	0.9966 \pm 0.0019	1.5	2.1	0.5	8.4	1.5	6.0	14.3	9.0	6.6	8.2	5.6	4.9
Cocaine	0.2	0.5	79.4 \pm 8.9	0.9952 \pm 0.0029	7.3	6.4	4.3	10.1	6.6	3.1	6.3	6.3	2.7	8.4	6.4	7.2
Methadone	6.1	18.6	36.2 \pm 4.6	0.9936 \pm 0.0012	4.8	5.1	3.7	3.3	6.1	5.4	12.9	5.1	3.7	8.0	6.1	5.4
Δ -9-THC-COOH	1.3	3.9	53.1 \pm 13.0	0.9963 \pm 0.0014	4.0	2.1	6.8	6.2	3.5	13.9	12.3	13.3	10.0	12.0	11.5	14.7
AP	1.1	3.4	42.3 \pm 6.1	0.9931 \pm 0.0027	5.9	2.3	0.8	6.2	5.5	6.9	7.4	9.0	9.1	5.8	7.8	7.9
MA	0.7	2.2	51.7 \pm 4.3	0.9919 \pm 0.0030	6.7	2.5	6.7	12.9	12.4	11.6	11.9	4.6	6.3	9.8	14.5	14.8
MDMA	2.2	6.5	44.5 \pm 12.5	0.9961 \pm 0.0046	16.5	3.3	1.5	12.2	4.1	6.9	11.1	3.3	1.5	14.3	4.1	7.9
NIC	4.6	13.9	70.0 \pm 8.1	0.9936 \pm 0.0030	7.7	10.9	9.9	7.3	8.0	7.0	7.7	9.9	8.8	7.3	7.9	6.8
COT	0.7	2.1	50.0 \pm 10.2	0.9943 \pm 0.0013	3.8	4.6	12.1	14.3	11.9	9.4	14.4	11.3	14.9	12.3	8.9	9.6

^a SD: standard deviation.

(Δ -9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol), opiates/opioids (6-monoacetylmorphine and codeine, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine-EDDP, buprenorphine, norbuprenorphine) were evaluated spiking 800 ng/g of placenta blank spiked with 15–5 ng/g of the substances under investigation and carried throughout the entire procedure. No interferences were observed. Selectivity of the method was also checked in 41 drug-free placenta samples. Definition of drug-free placenta was based on questionnaires and hair testing of the women participating in the study.

3.3. Method application

The validated method presented here has been applied to the placenta specimens collected as discarded material from the women who voluntarily interrupted their pregnancy in the first trimester of gestation. Up to 64 samples have been analyzed to date with only one case positive for cocaine (BZE = 37.8 ng/g placenta) and another one positive for cannabis (Δ -9-THC-COOH = 123.2 ng/g placenta). On the other hand, 21 samples (32.8%) were positive for COT and in some cases NIC was also present. Nicotine concentration range in placenta was 32.5–119.5 ng/g with a median value of 61.2 ng/g, and the range for cotinine 24.7–189.6 ng/g with a median value of 80.4 ng/g. Different studies have indicated that COT accumulates in the fetal compartment, for example in amniotic fluid or cord blood, at as early as 7 weeks of gestation in both active and passive smokers [2]. In 1999, Jauniaux et al. measured COT levels in amniotic fluid from 85 women requesting an abortion for psychosocial reasons between the 7th and 11th weeks of gestation. COT showed a range of concentrations between 25 and 250 ng/mL [18]. On the other hand, with respect to cord blood, different studies have used cord serum COT for the assessment of fetal exposure to smoking at the end of pregnancy. Pichini et al. measured cotinine in cord serum in 429 mothers and their newborn. Cotinine in cord serum presented a range of concentrations of 1.45–325 ng/mL [19].

Although these data are preliminary, and the number of analyzed samples does not allow any definitive conclusion or a statistical evaluation, it seems that amount of substances found in placenta related to a consumption of a certain drug depends on the chemical nature of the parent drug and its metabolites. The determination of drugs of abuse in placenta from women who

voluntarily interrupted their pregnancy at the 12th week of gestation can provide information about early *in utero* drug exposure. In this sense, the placenta appears to be a tissue of drug passage for the consumed illicit drugs which enter the placenta from blood vessels. Studies with a higher number of samples ought to be able to clarify the eventual lack of accumulation or degradation of different drugs (false negative results) and whether a correlation with cumulative exposure to drugs could be postulated as was the case of tobacco smoke. The analysis of placenta samples in women who terminate pregnancy at the 12th week of gestation is not associated with a clear clinical outcome (e.g. lower weight at birth). Nevertheless in future studies it is foreseen to associate drug exposure at this early stage of pregnancy with epigenetic changes. Some pioneering studies have already shown the first evidence that *in utero* environmental exposures such as tobacco smoke may be associated with such genomic modifications [20].

4. Conclusions

For the first time a GC/MS method simultaneously quantifies the principal recreational drugs of abuse in human placenta obtained as discarded material from the first trimester of gestation.

The main characteristics of the assay are the rapid and simple extraction procedure and GC/MS analysis for the simultaneous measurement of several drugs of abuse in human placenta. Owing to the minimum handling, total time required, and unequivocal detection of substances, this procedure can also be routinely applied in the analytical laboratories of hospital emergency rooms.

The present analytical methodology, as previously discussed, has been designed to evaluate the impact of the consumption of drugs of abuse in women who voluntarily interrupted their pregnancy at the 12th week of gestation. The use of placenta as a non-conventional matrix can provide information about early *in utero* exposure to drugs of abuse.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Programa Nacional de Investigación 2008–2010 (SAF 2007-64535) from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), intramural funding of the Neuropsychopharmacology Program at IMIM-Hospital del Mar

and partially supported by Generalitat de Catalunya (Spain) (2009 SGR 718 and 2009 SGR 1388).

References

- [1] J. Lozano, et al., Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse, *Ther. Drug Monit.* 29 (6) (2007) 711–734.
- [2] H. Llaquet, et al., Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood, *Anal. Bioanal. Chem.* (2009).
- [3] E.M. Ostrea Jr., et al., Drug screening of meconium in infants of drug-dependent mothers: an alternative to urine testing, *J. Pediatr.* 115 (3) (1989) 474–477.
- [4] C. Moore, A. Negrusz, D. Lewis, Determination of drugs of abuse in meconium, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 713 (1) (1998) 137–146.
- [5] J. Klein, T. Karasikov, G. Koren, Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience, *Forensic Sci. Int.* 107 (1–3) (2000) 281–288.
- [6] T. Nanovskaya, et al., Transplacental transfer and metabolism of buprenorphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (1) (2002) 26–33.
- [7] M.R. Syme, J.W. Paxton, J.A. Keelan, Drug transfer and metabolism by the human placenta, *Clin. Pharmacokinet.* 43 (8) (2004) 487–514.
- [8] L.M. Aleksunes, Y. Cui, C.D. Klaassen, Prominent expression of xenobiotic efflux transporters in mouse extraembryonic fetal membranes compared with placenta, *Drug Metab. Dispos.* 36 (9) (2008) 1960–1970.
- [9] D. Chan, et al., Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (1) (2004) 75–82.
- [10] W. Luck, et al., Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers, *Dev. Pharmacol. Ther.* 8 (6) (1985) 384–395.
- [11] O. Garcia-Algar, et al., Prenatal exposure to arecoline (areca nut alkaloid) and birth outcomes, *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 90 (3) (2005) F276–F277.
- [12] O. Garcia-Algar, et al., Confirmation of gestational exposure to alprazolam by analysis of biological matrices in a newborn with neonatal sepsis, *Clin. Toxicol. (Phila.)* 45 (3) (2007) 295–298.
- [13] I. Martin, et al., Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal drinking of mate, *Ther. Drug Monit.* 29 (1) (2007) 127–129.
- [14] T.N. Nanovskaya, et al., Methadone metabolism by human placenta, *Biochem. Pharmacol.* 68 (3) (2004) 583–591.
- [15] M. Concheiro-Guisan, D.M. Shakfeya, M.A. Huestis, Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine glucuronide, and norbuprenorphine glucuronide in human placenta by liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2) (2009) 513–522.
- [16] Guidance for Industry, B.M.v., US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, July 2009, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- [17] B.L.T.Q., Validation of Analytical Procedures: Methodology, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, November 1996, <http://www.emea.eu.int/humans/ich/quality/ich/q1a.htm>.
- [18] E. Jasniaux, et al., Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 93 (1) (1999) 25–29.
- [19] S. Pichini, et al., Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy, *Environ. Health Perspect.* 108 (11) (2000) 1079–1083.
- [20] C.V. Breton, et al., Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (5) (2009) 462–467.

ARTÍCULO 2

**HAIR ANALYSIS FOLLOWING CHRONIC SMOKED-
DRUGS-OF-ABUSE EXPOSURE IN ADULTS AND
THEIR TODDLER: A CASE REPORT**

Esther Papaseit, **Xavier Joya**, Marta Velasco, Ester Civit, Pau Mota,
Marta Bertran, Oriol Vall, Oscar Garcia-Algar

Journal of Medical Case Reports 2011 Dec 10;5(1):570.

Objetivos: desde mediados de la década de los noventa, la COC es la segunda droga ilegal más consumida en Europa después del cannabis (Skender et al., 2002). Como ocurre con otras sustancias de abuso, la COC puede ser administrada de diferentes maneras: oralmente, fumada o masticada, administrada de forma parenteral y, de forma mayoritaria, inhalada. En los últimos 20 años, de forma paralela también han aumentado las técnicas analíticas para detectar el consumo de drogas de abuso, y en este sentido, el pelo se ha estipulado cómo la matriz más importante para obtener información toxicológica. En la actualidad, el análisis toxicológico en pelo es la técnica recomendada para monitorizar la exposición ambiental a drogas de abuso (Karacic and Skender, 2003). En la población pediátrica, el cribado en pelo se ha utilizado para determinar la exposición gestacional a la COC (Callahan et al., 1992; Graham et al., 1989), o para detectar la exposición insospechada a COC en niños (García-Bournissen et al., 2007; Joya et al., 2009) y para confirmar la exposición crónica en casos de intoxicación aguda a drogas de abuso (Klein et al., 2000). En adultos el análisis toxicológico de COC se utiliza de forma rutinaria en medicina forense, en controles de tráfico o en la medicina del trabajo (Karacic and Skender, 2003).

A nuestro entender, no existen publicaciones previas que reporten los valores de estos biomarcadores en el pelo de niños expuestos de forma crónica al humo de la COC base. En el presente trabajo presentamos el caso de una niña de dos años de edad expuesta de forma crónica a la inhalación de la COC base.

Presentación del caso: debido a la sospecha de exposición a drogas de abuso, se solicitó un cribado toxicológico en orina basado en un inmunoensayo (CEDIA, Microgenics, Barcelona). El test fue positivo para la COC, la BE no pudo ser cuantificada. En ese momento, se obtuvo información referente al historial en el consumo de crack en el hogar por

Resultados

parte de los padres en presencia de los niños los días previos al ingreso hospitalario. Los padres negaron la posible ingesta de COC por parte del niño u otra posible exposición pasiva. A pesar de eso, por análisis de pelo en los padres se comprobó el consumo repetido de COC realizando un análisis segmentario en pelo (**Tabla 14**). Posteriormente, se recogieron muestras de pelo de la niña y de sus padres para realizar un estudio toxicológico completo (AP, MDMA, COC, opiáceos y cannabis) utilizando en primer lugar un método de cribado (VMA/DRI®). Las muestras de pelo fueron recogidas desde la raíz y en los casos posibles se dividió en segmentos de 3 cm., de forma que cada uno representó el consumo durante 3 meses. Para descartar la contaminación externa, las muestras se lavaron por triplicado antes del análisis. El test fue positivo para COC, BE y cannabis en las tres muestras. El análisis cuantitativo confirmó la presencia de BE en el pelo de la niña a una concentración de 1.9 ng/mg. Además la BE se halló en las muestras materna y paterna a las concentraciones de 7.88 ng/mg y 6.39 ng/mg respectivamente. Los opiáceos fueron hallados en la muestra materna. No se hallaron trazas del consumo de anfetaminas y MDMA.

Discusión y conclusiones: la información referente a la exposición pasiva y postnatal de COC es limitada. En nuestro hospital, el ensayo toxicológico en pelo en niños sin evidencia de estar expuestos a COC reveló una prevalencia de exposición del 23.3% (Joya et al., 2009). Existen algunos casos que reportan los niveles de BE en pelo de niños de padres que consumen COC y que puede ocasionar intoxicaciones fatales.

En este artículo se presentó el caso de una intoxicación aguda a COC que fue confirmada por los resultados obtenidos por el inmunoensayo realizado en orina de la niña y por la declaración de los padres que admitían el consumo de COC los días previos.

Dadas estas circunstancias, se optó por realizar un análisis toxicológico completo en las muestras de pelo de los tres implicados. Se hallaron niveles detectables de BE en los extremos distal y proximal del grupo de pacientes, hecho que confirmaba la exposición repetida y la presencia habitual de la COC en este ambiente. Las concentraciones de BE en el pelo de la niña fueron proporcionalmente igual de elevadas que las presenten en las muestras de sus padres. Considerando la edad de la paciente, los resultados alcanzados sugirieron que podían haber sido letales dada la inmadura capacidad metabólica de la niña.

Tabla 14. Concentraciones de las drogas de abuso en los segmentos de pelo en la niña y sus padres utilizando VMA / DRI.

Segmento de pelo	Drogas de abuso y metabolitos en pelo (cut-offs)		
	BE (ng/mg)	Cannabis (ng/mg)	Opiáceos (ng/mg)
Segmento del niño			
0 a 3 cm.	1.9	0.3	ND
3 cm. a 6 cm.	7.04	0.7	ND
Segmento materno			
0 a 3 cm.	7.88	0.92	13.88
3 cm. a 6 cm.	6.39	0.94	3.15
Segmento paterno			
0 a 3 cm.	13.06	0.28	ND
> 3 cm.	12.97	0.86	ND

Benzoilecgonina (BE); no detectable (ND)

La principal conclusión del estudio es que la exposición pasiva a COC fumada debe evitarse estrictamente en lactantes y niños en edad preescolar. En análisis en matrices convencionales como la orina y la sangre y en no convencionales como el pelo de forma rutinaria en todos los niños que presentan síntomas de estar expuestos a drogas de abuso en su ambiente. Una vez más, el análisis toxicológico en pelo demostró que este puede ser una herramienta útil para sacar a la luz exposiciones crónicas a las drogas de

Resultados

abuso. Además, la determinación de drogas en pelo de forma periódica puede aportar información muy valiosa para proteger a estos niños de ambiente desfavorable.

CASE REPORT**Open Access**

Hair analysis following chronic smoked-drugs-of-abuse exposure in adults and their toddler: a case report

Esther Papaseit^{1,2,3}, Xavier Joya^{1,2,3}, Marta Velasco³, Ester Civit¹, Pau Mota³, Marta Bertran³, Oriol Vall^{1,2,3} and Oscar Garcia-Algar^{1,2,3*}

Abstract

Introduction: Over the past two decades, the study of chronic cocaine and crack cocaine exposure in the pediatric population has been focused on the potential adverse effects, especially in the prenatal period and early childhood. Non-invasive biological matrices have become an essential tool for the assessment of a long-term history of drug of abuse exposure.

Case report: We analyze the significance of different biomarker values in hair after chronic crack exposure in a two-year-old Caucasian girl and her parents, who are self-reported crack smokers. The level of benzoylecgonine, the principal metabolite of cocaine, was determined in segmented hair samples (0 cm to 3 cm from the scalp, and > 3 cm from the scalp) following washing to exclude external contamination. Benzoylecgonine was detectable in high concentrations in the child's hair, at 1.9 ng/mg and 7.04 ng/mg, respectively. Benzoylecgonine was also present in the maternal and paternal hair samples at 7.88 ng/mg and 6.39 ng/mg, and 13.06 ng/mg and 12.97 ng/mg, respectively.

Conclusion: Based on the data from this case and from previously published poisoning cases, as well as on the experience of our research group, we conclude that, using similar matrices for the study of chronic drug exposure, children present with a higher cocaine concentration in hair and they experience more serious deleterious acute effects, probably due to a different and slower cocaine metabolism. Consequently, children must be not exposed to secondhand crack smoke under any circumstance.

Introduction

Since the mid-1990s, cocaine has been the second most popular illegal recreational drug in Europe among young adults and adolescents, the first being cannabis [1]. Similar to other illicit drugs, cocaine is commonly used by different routes of administration: orally, by smoking or chewing; parenterally; as a suppository; and, mainly, by snorting or inhalation of crack cocaine smoke. Free-base crack cocaine is a potent form of cocaine rapidly absorbed through the pulmonary circulation and reaching the central nervous system within seconds, which results in rapid and striking stimulant effects [2]. Its pharmacological action by smoking is

responsible for many of the reported neurological and pulmonary toxic effects [3,4]. Over the last 20 years, parallel to the advances in laboratory techniques for detecting recent drug use, hair analysis has emerged as the most important non-invasive biomarker used to provide long-term information on an individual's drug use [5-8]. Decontamination of hair samples by washing before analysis, detection of the relevant metabolites and use of adequate cut-off levels have been the main considerations in testing for drugs in hair [9]. The differentiation between systemic exposure and external contamination has been a controversial topic and one of the limitations of cocaine testing in hair [10-12]. In fact, hair exposed to crack cocaine by external contamination, where the individual does not actively consume the drug but traces may be deposited on the hair, must be carefully considered [13]. At present, hair analysis is

* Correspondence: 90458@hospitaldelmar.cat

¹Programa de Recerca en Neurociències, IMM (Institut de Recerca, Hospital del Mar), Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

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



used to monitor for drugs of abuse and environmental exposure to drugs of abuse [14]. In the pediatric population, hair screening has been used to determine gestational cocaine exposure [15,16], detect unsuspected exposure to cocaine in children [17,18] and confirm chronic cocaine exposure in cases of acute intoxication or high suspicion [19]. Similarly, in adults, cocaine hair screening is routinely applied to detect drug abuse in forensic cases, occupational and traffic medicine and clinical toxicology [14], including monitoring of cocaine-abusing households by child welfare agencies in child custody cases.

To the best of our knowledge, there are no previous publications reporting on biomarker values in children's hair after chronic exposure to crack smoke and active abuse and exposure in adults. Here, we present a case of chronic exposure to cocaine through passive inhalation of crack cocaine smoke in a two-year-old girl as result of suspicion of environmental exposure to this drug of abuse by a pediatrician.

Case presentation

A two-year-old Caucasian girl was brought to our Pediatric Emergency Department, referred from a pediatric outpatient center for unclear reasons after presenting with respiratory symptoms for two weeks. Her medical records showed that she had been diagnosed with neonatal withdrawal syndrome, which required long term treatment with phenobarbital. At the outpatient center, she had been diagnosed with repeated bronchiolitis and she needed health care services from a pediatric pulmonologist, who prescribed treatment with fluticasone. She had no other relevant medical or pathological background.

Medical records informed us that the child's mother had a medical history of substance-related disorders and she was receiving treatment for heroin dependence with methadone. No other pharmacological treatment was prescribed for cannabis and tobacco abuse.

When attending our department, the mother presented an unhealthy aspect and abnormal behavior. A physical examination of the child showed a minor asthma attack with respiratory difficulties and clinical features refractory to the outpatient bronchodilator treatment (salbutamol) over the past 15 days. The examination also revealed use of her accessory muscles for respiration, wheezing and bilateral hypoventilation. Her blood oxygen saturation level was 98% and cyanosis was not observed. Her vital signs revealed tachycardia and tachypnea without fever (her heart rate was 148 beats per minute, her respiratory rate, 60 breaths per minute and temperature 36°C). A neurological examination did not show a focal neurological deficit (15/15 Glasgow Score Scale) and the remainder of the physical

examination was normal. The child received respiratory support and pharmacological treatment with gradual clinical improvement. Her blood cell count and serum biochemistry were normal. Under suspicion of exposure to drugs of abuse, urinary toxicology screening for commonly used drugs of abuse by cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA, Microgenics, Barcelona, Spain) was done. Repeated urinary tests were positive for cocaine. Since urine toxicology was done in a pediatric emergency ward and speed was of paramount importance, the level of benzoylecgonine (BZG) in her urine was not quantified.

Information concerning the environment where the child had been living was obtained from the mother, who confirmed a history of crack smoking by both parents in the presence of the child during the days previous to her hospital admission. She denied that her child had ingested cocaine by any other route than passive inhalation. Chronic exposure to cocaine in an environment where drugs of abuse were being used by the parents was verified by hair analysis for the child and her parents (Table 1).

After 48 hours, our patient recovered completely without any respiratory difficulties. She was discharged from the hospital and the proper authorities were alerted in order to evaluate the child's home conditions.

In the present case, a quantitative analysis of cocaine, opiates, amphetamines, cannabis and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in her hair was performed according to forensic standards using an immunoassay (VMA/DRI[®]) on the available length of hair. The child's and her parent's hair samples (as an entire strand) were cut close to the scalp at the vertex region using stainless steel scissors. Whenever possible (hair shaft length more than 3 cm), the hair strands were divided into subsequent 3 cm segments, each representing hair growth in subsequent three-month periods. To exclude external contamination, the samples were washed before testing.

A comprehensive toxicological screening was performed on the collected hair samples. The test was positive for BZG, the main metabolite of cocaine, and cannabis in the entire hair samples. Quantitative analysis confirmed that BZG was present in the child's hair at a concentration of 1.9 ng/mg and 7.04 ng/mg. BZG concentrations found in her mother's and father's hair were 7.88 ng/mg and 6.39 ng/mg, and 13.06 ng/mg and 12.97 ng/mg, respectively. Opiates were detected in her mother's hair. Amphetamines and MDMA were not detected.

Discussion

The information regarding passive postnatal toxic exposure to cocaine in children is limited. At our hospital, hair analysis in preschool children without signs

Table 1 Hair segment concentration of drugs of abuse from the child and her parents using VMA/DRI®.

Hair segments	Drugs of abuse and metabolites in hair (cut off values)		
	BZG (0.50 ng/mg)	Cannabis (0.10 ng/mg)	Opiates (0.50 ng/mg)
Child's hair			
0 cm to 3 cm	1.9	0.3	ND
> 3 cm	7.04	0.7	ND
Mother's hair			
0 cm to 3 cm	7.88	0.92	13.68
> 3 cm	6.39	0.94	3.15
Father's hair			
0 cm to 3 cm	13.06	0.28	ND
> 3 cm	12.97	0.86	ND

BZG: benzoylcegonine; ND: none detected

or symptoms suggestive of exposure revealed an estimated prevalence of exposure of 23.3% [17]. There are several clinical case reports detailing concentrations of BZG in the hair of children with parents using cocaine who are exposed to a contaminated

environment, with considerable clinical findings (neurological and respiratory abnormalities), fatal poisonings by active ingestion (by hand-to-mouth activity) of powder residues [20,21] or passive crack smoke inhalation [22-24].

Table 2 Cases reports of acute intoxication in children exposed passively to cocaine and confirmed by hair analysis.

Age	Chronic exposure	Benzoylcegonine in hair determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (ng/mg)
[25] 11 months	Cocaine	Infant's hair 1 cm to 4 cm: 0.4 4 cm to 8 cm: 10.5 Mother's hair 1 cm to 10 cm: negative for any illicit substance (bleached hair)
[26] 15 months	Cocaine	Infant's hair 1 cm to 2 cm: 2.2 2 cm to 7 cm: 7.6 Sister's hair 1 cm to 2 cm: negative 2 cm to 7 cm: 0.5 7 cm to 20 cm: 1.2 Mother's hair 1 cm to 2 cm: 8.2 2 cm to 7 cm: 5.3 7 cm to 20 cm: 10.6 Father's hair 1 cm to 2 cm: 3.0
[27] 24 months		Infant's hair 0 cm to 1 cm: 1.9 1 cm to 15 cm: 17.2*
[28] 13 months	Cocaine	Infant's hair 0.6
[29] One month	Cocaine	Infant's hair 2.2 Mother's hair 3.4 Father's hair 1.7

*Mean concentration.

In this case report the appearance of the family and their medical records, in addition to the clinical features presented by the child, suggested the possibility of an unhealthy environment and consequently intoxication with drugs of abuse. Her exposure to cocaine in the days preceding her admission was confirmed by an initial positive urinary immunoassay, in addition to symptoms suggesting recent exposure to crack cocaine smoke.

Under the circumstances, analysis of the child's and parent's hair was performed in order to assess previous and chronic exposure to cocaine and other illicit drugs (the clinical consequences of a polyexposure can be very serious). The BZG concentrations found in the proximal and distal extremities of our patient's hair demonstrated repeated exposure to environmental cocaine at least during the last three months. Therefore, the need to be admitted at the pediatric emergency, the medical background of the child and the presence of BZG in her hair can be all explained by a systematic passive exposure to crack cocaine smoke. The BZG concentration in her hair was proportionally higher than the BZG concentration in her parent's hair, who actively smoked crack cocaine. Considering this child's age, the results suggest that passive environmental exposure in young children may have highly toxic, even potential lethal, effects, probably due to their immature metabolizing capacity. In fact, previous cases of symptomatic chronic intoxication by cocaine have been described, but with lower concentration of cocaine in hair in comparison with adult hair concentrations [25-29].

Based on the data from this case and other poisoning cases published by our group and other groups (Table 2) [25-29], we conclude that parental use of cocaine can be reflected in a non-negligible exposure of their progeny, and children show higher concentrations of cocaine in hair and they experience more serious deleterious acute effects, perhaps due to different and slower cocaine metabolism.

Conclusion

We conclude that passive exposure to smoked cocaine must be strictly avoided in infants and children. In addition, drug testing in conventional (urine and blood) and non-conventional (hair) matrices should be used routinely in all the children who present with specific or suspicious symptoms of acute and/or chronic exposure to illicit drugs, particularly with suspected drug-using parents, frequently polyusers. Once again, hair analysis proved to be a useful tool in disclosing chronic exposure to drugs of abuse. Furthermore, hair analysis offers the opportunity to periodically examine drug exposure in order to protect these children from significant health and social risks. We advocate hair analysis in all cases of newborns, toddlers and children from risky environments.

Consent

Written informed consent was obtained from our patient's parents (her legal guardians) for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Author details

¹Programa de Recerca en Neurociències, IMIM (Institut de Recerca, Hospital del Mar), Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain. ²Grup de Recerca i Entorn (GRE), Institut de Recerca, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain. ³Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Authors' contributions

EP was the main contributor in writing the manuscript. XJ was an important laboratory technician in biomarkers analyses, and contributed in writing the manuscript. MV analyzed the mother-infant data, reviewed the literature and the final manuscript, and contributed in writing the manuscript. EC was the main laboratory technician in biomarkers analyses. FM analyzed the mother-infant data, and was a contributor in writing the manuscript. MB analyzed the mother-infant data, and was the statistical expert. OV was the pediatrician responsible for coordination of data, and contributed in writing the manuscript. OGA analyzed the mother-infant data, reviewed the literature, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 August 2011 Accepted: 10 December 2011

Published: 10 December 2011

References

- Smart RG: Crack cocaine use: a review of prevalence and adverse effects. *Am J Drug Alcohol Abuse* 1991, **17**:13-26.
- Haim DY, Lippmann ML, Goldberg SK, Walkenstein MD: The pulmonary complications of crack cocaine. A comprehensive review. *Chest* 1995, **107**:233-240.
- Hirche TO, Lambrecht E, Wagner TO: Crack-syndrome: the pulmonary complications of inhaled cocaine. A review a propos a case report. *Pneumologie* 2002, **56**:684-688. [in German].
- Porper JA, van Thiel DH: Respiratory complications of cocaine abuse. *Recent Dev Alcohol* 1992, **10**:363-377.
- Beroso M, Gallardo E, Queiroz JA: Bioanalytical methods for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples. *Bioanalysis* 2009, **1**:977-1000.
- Kintz P, Villain M, Crimelle V: Hair analysis for drug detection. *The Drug Abuse* 2006, **28**:442-446.
- Fragst F, Balikova MA: State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 2006, **370**:17-49.
- García-Algar O, Papaseit E, Velasco M, López N, Martínez L, Luaces C, Vall O: Drugs of abuse acute intoxication in paediatric emergencies. *An Pediatr (Barc)* 2011, **74**:413-416.
- Tsanackis L, Wicko JF: Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Sci Int* 2008, **176**:19-22.
- Koren G, Klein J, Forman R, Graham K: Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J Clin Pharmacol* 1992, **32**:671-675.
- Mieczkowski T: Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci Int* 1997, **84**:87-111.
- Romano G, Barbera N, Lombardo L: Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Sci Int* 2001, **123**:119-129.
- Bourne VA, Ziarou KS, Vougiouklakis T: Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 2006, **25**:143-163.

14. Karack V, Skender L: **Hair testing for drugs of abuse.** *Col Antropol* 2003, **27**:263-269.
15. Graham K, Koren G, Klein J, Schvedeman J, Greenwald M: **Determination of gestational cocaine exposure by hair analysis.** *JAMA* 1989; **262**:3328-3330.
16. Callahan CM, Grant TM, Phipps P, Clark G, Nowack AH, Streissguth AP, Raiys VA: **Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine.** *J Pediatr* 1992, **120**:763-768.
17. Joya X, Papaseit E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, Garcia-Algar O, Scaravelli G, Pichini S: **Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis.** *Ther Drug Monit* 2009, **31**:391-395.
18. Garcia-Bourmissen F, Nesterenko M, Karasikov T, Koren G: **Passive environmental exposure to cocaine in Canadian children.** *Pediatric Drugs* 2009, **11**:30-32.
19. Klein J, Karasikov T, Koren G: **Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience.** *Forensic Sci Int* 2000, **107**:281-288.
20. Press S: **Crack and fatal child abuse.** *JAMA* 1988, **260**:3132.
21. Bateman DA, Heagarty MC: **Passive freebase cocaine ('crack') inhalation by infants and toddlers.** *Am J Dis Child* 1989, **143**:25-27.
22. Schwartz RH: **Passive inhalation of marijuana, phencyclidine, and freebase cocaine ('crack') by infants.** *Am J Dis Child* 1989, **143**:644.
23. Heidemann SM, Goetting MG: **Passive inhalation of cocaine by infants.** *Henry Ford Hosp Med J* 1990, **38**:252-254.
24. Mirchandani HG, Mirchandani RH, Hellman F, English-Rider R, Rosen S, Laposta EA: **Passive inhalation of free-base cocaine ('crack') smoke by infants.** *Arch Pathol Lab Med* 1991, **115**:494-498.
25. Garcia-Algar O, López N, Bories M, Pellegrini M, Marchel E, Pichini S: **3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) intoxication in an infant chronically exposed to cocaine.** *Ther Drug Monit* 2005, **27**:409-411.
26. Garcia-Algar O, López-Vilchez MA, Pacifico R, Pichini S: **Acute poisoning and chronic exposure to cocaine in a child.** *Med Clin (Barc)* 2005, **125**:436-437. [in Spanish].
27. Taguchi N, Mian M, Shoultice M, Karasikov T, Gareri J, Nulman I, Verjee ZH, Koren G: **Chronic cocaine exposure in a toddler revealed by hair test.** *Clin Pediatr (Phila)* 2007, **46**:272-275.
28. Papaseit E, Corrales E, Stramesi C, Vall O, Palomeque A, Garcia-Algar O: **Postnatal methadone withdrawal syndrome: hair analysis for detecting chronic exposure.** *Acta Paediatr* 2010, **99**:162-163.
29. Joya X, Friguls B, Simó M, Civit E, de la Torre R, Palomeque A, Vall O, Pichini S, Garcia-Algar O: **Acute opioid intoxication in an infant chronically exposed to cocaine and heroin.** *J Med Case Reports* 2011, **5**:288.

doi:10.1186/1752-1947-5-570

Cite this article as: Papaseit et al.: Hair analysis following chronic smoked-drugs-of-abuse exposure in adults and their toddler: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2011, **5**:570.

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



4. DISCUSIÓN GLOBAL

Este trabajo pone de manifiesto la elevada exposición pasiva insospechada a las principales sustancias de abuso tanto legales (tabaco) como ilegales (cocaína, cannabis, etc.) gracias al empleo de biomarcadores presenten en matrices no convencionales como son la placenta, el pelo y los dientes de leche en recién nacidos y niños en la ciudad de Barcelona.

La elevada prevalencia oculta de exposición pasiva a sustancias de abuso mediante matrices alternativas permite conocer la existencia de niños de poblaciones de alto riesgo que de otro modo no podrían ser identificados ya que la clínica podría pasar desapercibida y un análisis rutinario para sustancias de abuso en orina podría resultar negativo.

Los recién nacidos y los niños en edad preescolar son candidatos, por su tamaño y su baja masa corporal, a tener mayores efectos deletéreos después de su exposición a sustancias de abuso, a pesar de que pocos trabajos hayan demostrado este hecho. La exposición activa (por ejemplo, por ingesta de restos de la sustancia) o pasiva (por ejemplo, por inhalación pasiva del humo derivado del consumo fumado de la misma) está vinculada a un posible riesgo de envenenamiento. Además, la intoxicación aguda grave en niños puede producirse a concentraciones más bajas que en adultos (en los que suelen dar lugar a los efectos fisiológicos deseados tras su consumo activo) debido al metabolismo inmaduro de estos niños.

En el mismo entorno geográfico, hace 5 años, se alertó sobre una exposición prenatal del 4,4% a cocaína en recién nacidos, junto a un 5,3% y un 8,7% a cannabis y opiáceos respectivamente, mediante análisis de meconio (García-Algar et al., 2009; Lozano et al., 2007a; Pichini et al., 2005b). En conjunto, estos resultados demuestran la magnitud del problema de la exposición pasiva a cocaína en los niños en este entorno. Dichos datos apoyan los resultados ya revelados por el Plan Nacional Sobre Drogas en el cual España

Discusión global

muestra el mayor porcentaje en el consumo de cocaína, mostrando un 3% de prevalencia en el consumo durante el último año en población general (15–64 años). 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.

Aunque es difícil relacionar los efectos de una exposición prenatal o postnatal a la cocaína y otras sustancias de abuso, diferentes trabajos apoyan la teoría de que existen alteraciones sanitarias, educativas y sociales en los niños que en diferentes etapas de la vida han estado expuestos a sustancias de abuso. Por ello, una intervención específica desde un punto de vista social y de la 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, esta estrategia también debería estar enfocada desde un punto educativo hacia los padres con el fin de asesorar acerca de los efectos adversos del consumo de sustancias de abuso en el hogar, incluso si éstas no son consumidas en presencia de los niños, ya que el contacto y la absorción de la sustancia se producen por inhalación de humo cuando se consumen de forma fumada o de partículas, y además por contacto con superficies contaminadas en el hogar (mobiliario, suelo, etc.) o la cara de los padres que manipulan e inhalan la sustancia, o finalmente por ingesta accidental. Estas vías de captación son especialmente importantes en la población en edad preescolar, ya que es fácil que se lleven objetos o las manos a la boca y además pasan la mayoría del tiempo en sus hogares, que pueden estar contaminados.

Por otro lado, por lo que se refiere al empleo de matrices alternativas, 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, especialmente si es un niño. 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.

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.

En conclusión, con el fin de detectar la exposición a sustancias de abuso en las diferentes etapas de la infancia (incluyendo la etapa prenatal y la etapa

Discusión global

postnatal) es recomendable utilizar diferentes matrices no convencionales (o alternativas): 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, cabello o dientes.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico basado en la GC/MS que detecta y cuantifica la presencia de las principales sustancias de abuso en placenta obtenida en el primer trimestre de gestación como material de descarte.
2. Los métodos desarrollados han permitido tener herramientas analíticas para la detección y el cribado.
3. Se ha aclarado la toxicocinética en la disposición y distribución de las principales sustancias de abuso en los tejidos fetales.
4. Se ha determinado la incidencia en el consumo de las principales sustancias de abuso en una cohorte de mujeres embarazadas que interrumpieron su embarazo durante el primer trimestre de gestación.
5. Para la detección de la exposición prenatal a sustancias de abuso es recomendable la utilización de la determinación de biomarcadores en matrices no convencionales (o alternativas), como el pelo materno, para lo cual se dispone de un sistema de recogida no invasivo, una metodología analítica validada y un precio razonable.

6. PUBLICACIONES ANEXAS

ARTÍCULO ANEXO 1

**MATERNAL HAIR TESTING FOR THE
ASSESSMENT OF FETAL EXPOSURE TO DRUG OF
ABUSE DURING EARLY PREGNANCY:
COMPARISON WITH TESTING IN PLACENTAL
AND FETAL REMAINS**

María Falcón, Simona Pichini, **Xavier Joya**, Mitona Pujadas, Oriol
Vall, Oscar Garcia-Algar, Aurelio Luna, Rafael de la Torre, Maria
Concetta Rotolo, Manuella Pellegrini

Forensic Science International. 2012 May 10;218(1-3):92-6

Objetivos: determinar la incidencia en el consumo de las principales sustancias de abuso en una cohorte de mujeres embarazadas que interrumpieron su embarazo durante el primer trimestre de gestación. En segundo lugar, esclarecer la toxicocinética en la disposición de las drogas de abuso en los tejidos fetales.

Material y métodos: El reclutamiento fue realizado desde septiembre de 2007 y marzo del 2010 en un centro autorizado para realizar interrupciones del embarazo en Murcia. En el momento del ingreso a cada participante se le realizó una entrevista en la que se recogieron datos acerca del consumo de alcohol, tabaco y otras sustancias de abuso. Además se recogió una muestra de pelo de cada participante y se almacenó a temperatura ambiente. Por otro lado, los restos fetales y placentarios fueron almacenados hasta su análisis a -80 °C. Las muestras de pelo, placenta y restos fetales fueron analizadas mediante GC/MS.

Resultados: Un total de 280 mujeres fueron incluidas en el estudio pero solo se seleccionaron los casos positivos para alguna de las sustancias de abuso. 80 casos fueron positivos para alguna droga de abuso. Concretamente, 60 casos fueron positivos cannabis (74.1%), 28 a cocaína (34.6%), 7 a opiáceos (8.6%) y positivas 3 a MDMA (3.7%). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**. Los casos positivos observados en pelo fueron confirmados en 10 de 60 casos para el cannabis (16.6%); 7 de 28 muestras para la cocaína (25%); y para los opiáceos y la MDMA no se obtuvo correlación.

Las concentraciones medias, las desviaciones estándares y los rangos de concentración de las drogas de abuso y sus metabolitos están resumidos en la **Tabla 11**. No se obtuvo correlación estadísticamente significativa para las

Publicaciones anexas

concentraciones de los metabolitos y las drogas principales en las matrices estudiadas.

Tabla 10. Resultados cualitativos obtenidos en pelo, placenta y restos fetales

Pelo	Placenta	Restos fetales	n
Cannabis	-	-	35
Cannabis	-	Cocaína	1
Cannabis	Cannabis	-	1
Cannabis	Cannabis	Cannabis	7
Cannabis	Cocaína	-	1
Cannabis	Cocaína	Cocaína	2
Cocaína	-	-	10
Cocaína	-	Cocaína	1
Cocaína	Cocaína	Cocaína	5
Opiáceos	-	-	1
Opiáceos	-	Cannabis	1
MDMA	-	-	1
Cannabis + Cocaína	-	-	7
Cannabis + Cocaína	Cannabis	-	1
Cannabis + Cocaína	Cannabis + Cocaína	Cannabis + Cocaína	1
Cannabis + Opiáceos	-	-	2
Cannabis + MDMA	-	-	1
Cocaína + Opiáceos	-	-	1
Cannabis + MDMA	-	-	1
Cocaína + Opiáceos	-	-	1
Cannabis + Cocaína + Opiáceos	-	-	1
Cocaína + Opiáceos + MDMA	-	-	1

Discusión y conclusiones: Aquí se presentan los resultados para el consumo y el traspaso de sustancias de abuso más frecuentemente utilizadas en mujeres que interrumpen su gestación. A pesar de la gran importancia que tienen los resultados obtenidos en este estudio estos son difíciles de interpretar. Las concentraciones de las sustancias de abuso y sus metabolitos en el feto y su relación con la placenta y las matrices maternas halladas son altamente variables.

La elevada prevalencia de consumo de drogas de abuso en nuestra población (28.9%), puede ser debida a las características especiales de estas personas que solicitan una interrupción voluntaria del embarazo. Muchas mujeres embarazadas antes de conocer que están embarazadas consumen sustancias de abuso y después de la noticias cesan en su consumo, pero nuestra población, la cual decide poner fin a su embarazo, no renuncian a consumir drogas de abuso. Además, también se ha descrito que los embarazos no deseados son más probables en mujeres que consumían una amplia gama de sustancias potencialmente tóxicas, cómo las drogas de uso recreativo (Dott et al., 2010; Han et al., 2005b; Than et al., 2005). Además, nuestro estudio también pone de manifiesto la baja correlación entre la recogida de hábitos en el consumo mediante cuestionarios y el análisis de sustancias de abuso en pelo (Ostrea et al., 2001; Pichini et al., 2005b) .

La baja correlación entre las 3 matrices respecto a la presencia de drogas de abuso puede ser debido a a la estrecha ventana de exposición entre la placenta y el feto en comparación con la ventana más amplia de detección del pelo y en parte también debido a la variabilidad interindividual en placenta y el metabolismo fetal. Nuestros hallazgos sugieren que la placenta y los tejidos fetales durante las primeras semanas de gestación pueden ser materiales no suficientemente sensibles para evaluar la exposición al fármaco. Otros estudios sugieren resultados similares a los obtenidos. Es decir, la placenta tan solo puede aportar una ventana de detección corta para biomonitorizar la exposición prenatal a sustancias de abuso (Concheiro et al., 2010; de Castro et al., 2009).

Las sustancias de abuso en el pelo de mujeres embarazadas puede ser utilizado como biomarcadores para evaluar el consumo de drogas de abuso en el pasado (tanto repetitivo cómo esporádico) a pesar de que estos rastros

Publicaciones anexas

en el consumo no se correlacionen con los resultados obtenidos en placenta y restos fetales. En nuestro estudio, en placenta sólo se confirmaron entre el 16.7 – 25% de los casos positivos para cannabis y cocaína en pelo materno.

La importancia de este estudio recae en el hecho de que por primera vez, utilizando métodos directos y objetivos, se ha evaluado el traspaso transplacentario de drogas ilícitas durante las primeras semanas de gestación. Por otro lado, se ha demostrado que el pelo ofrece la ventaja de ser una muestra poco invasiva en la recogida y permite obtener un registro histórico de la exposición materna a sustancias de abuso.

Tabla 11. Concentraciones medias (\bar{X}), desviaciones estandaradas y rangos de concentración en todas las matrices analizadas

	Hair ng/mg			Placenta ng/g			Restos fetales ng/g		
	<i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	Rango	<i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	Rango	<i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	Rango
THC	60	2.7 ± 3.4	0.1 – 14.1	10	196.8 ± 110.1	101.1 – 432.8	9	118.5 ± 97.9	3.9 – 281.7
THC-COOH	53	0.09 ± 0.12	0.001 – 0.7	-	-	-	1	0.4	0.4
COC	28	10.9 ± 9.9	0.5 – 48.1	8	97.8 ± 31.5	58.9 – 149.8	10	71.3 ± 35.1	28.7 – 132.4
BE	28	3.9 ± 4.1	0.2 – 15.5	9	231.7 ± 137.5	37.8 – 531.9	10	149.8 ± 53.5	78.5 – 244.3
MDMA	3	1.2 ± 1.2	0.2 - 2.5	-	-	-	-	-	-
MOR	6	1.1 ± 1.2	0.5 ± 1.3	-	-	-	-	-	-
6-MAM	6	11.3 ± 13.3	0.7 -12.2	-	-	-	-	-	-



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensint

Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains[☆]

M. Falcon^{a,*}, S. Pichini^b, J. Joya^c, M. Pujadas^c, A. Sanchez^a, O. Vall^{c,d}, O. García Algar^{c,d}, A. Luna^a, R. de la Torre^c, M.C. Rotolo^b, M. Pellegrini^b

^a Universidad de Murcia, Murcia, Spain

^b Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

^c Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^d Red SAMID, Instituto Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2011

Accepted 14 June 2011

Available online 27 October 2011

Keywords:

Drug abuse

Maternal hair

Placenta

Fetal and first trimester

ABSTRACT

Drug use by pregnant women in the first trimester of pregnancy and subsequent fetal exposure during early gestation can be assessed only by repetitive/systematic maternal blood/urine analysis or segmental hair analysis. No evidence of any relationship between maternal/fetal exposure during this specific period of gestation has been demonstrated to date in a human model.

Methods: To clarify drugs toxicokinetics and transplacental passage during early pregnancy, the presence of the most widely used recreational drugs of abuse and metabolites was investigated in the proximal 4 cm hair segments of women undergoing voluntary termination of pregnancy ($n = 280$) during the 12th week of gestation and the results were compared to those from placenta and fetal tissue samples in order to verify whether maternal hair testing can reflect fetal exposure and, if so, to what extent. Hair, placenta and fetal remains were analyzed by validated gas chromatography mass spectrometry assays.

Results: Eighty one positive hair samples were identified: 60 were positive for cannabis (74.1%), 28 for cocaine (34.6%), 7 for opiates (8.6%), 3 for MDMA (3.7%) and 18.5% were positive for more than one drug. The positive hair test results were confirmed in placenta/fetal tissues in 10 cases out of 60 for cannabis (16.7%); in 7 out of 28 for cocaine (25%); and none for the 6 opiates positive cases and 3 MDMA cases, respectively.

Conclusion: Drugs/metabolites in hair of pregnant women can be used as biomarkers of past drug use (repetitive or sporadic), although the use is not always reflected in fetal/placental tissues. There are several possible hypotheses to explain the results: (1) the use occurred before the start of pregnancy; (2) past sporadic consumption which could be measured in hair but not in fetal and placental remains because of the narrow window of drug detection in placental/fetal tissues; (3) the sensitivity of the analytical methods was not high enough for the detection of the minute amount of drugs of abuse and metabolites which reached these tissues (4) there is a large variability in the transplacental passage of drugs of abuse and in the placenta's metabolizing capacity.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

[☆] This paper is part of the special issue entitled: Selected papers from the Chamonix 2011 Society of Hair Testing Meeting, Guest-edited by Pascal Kintz.

Abbreviations: CYP450, cytochrome P450; MAM, 6-monoacetylmorphine; MOR, morphine; COC, cocaine; BEG, benzoylecgonine; MDMA, 3,4-methylenedioxy-methamphetamine; MA, methamphetamine; THC, delta-9-tetrahydrocannabinol; THCCOOH, 11-nor-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid; GC/MS, gas chromatography-mass spectrometry; n, number of cases; X, mean; SD, standard deviation.

* Corresponding author at: Department of Legal Medicine, Universidad de Murcia, Campus Espinardo, 30100 Murcia, Spain. Tel.: +34 868 88 7583; fax: +34 868 88 4335.

E-mail address: falcon@um.es (M. Falcon).

1. Introduction

Several studies have shown the association between prenatal exposure to drugs of abuse and the risk of spontaneous abortion as well as a wide variety of diseases in the exposed newborns [1]. Detecting drugs of abuse consumption as soon as possible during pregnancy may help to prevent future maternal drug use, child disabilities and to assure adequate health and social care for both mother and child.

Since maternal interviews and self-report questionnaires have been shown to be very weak tools for identifying illegal drug abuse during pregnancy [2,3], objective biomarkers have been established in different maternal/fetal matrices [4,5]. Maternal and

neonatal matrices reflect exposure in specific time period and each of them has different advantages and disadvantages in terms of accuracy, time window of exposure and cost/benefit ratio. Drug concentrations in maternal blood, saliva, urine or cord blood and neonatal urine account for recent acute maternal or neonatal exposure; neonatal hair and meconium reflect chronic drug exposure during 2nd and 3rd trimester and finally maternal hair, if long enough, could reflect exposure during the entire gestation [4].

Hair testing for the assessment of drugs of abuse consumption is a well recognized method for forensic, legal and clinical purposes [6,7]. Maternal hair analysis has been used to detect prenatally exposed babies; the method has been validated using meconium, neonatal hair and urine [2,8,9]. These studies endorse maternal hair test as a tool for assessing exposure to drugs of abuse in late pregnancy but the validity of maternal hair testing to assess fetal exposure to drugs of abuse during the first trimester of pregnancy has not been much investigated.

Early pregnancy is a very vulnerable period when the embryo/fetus is more susceptible to teratogenic events [10] and drug exposure may be more frequent than in other periods of gestation because some women may not be aware that they are pregnant very early into pregnancy and may continue to use drugs of abuse [11].

The maternal–fetal unit is a complex dynamic system where the placenta is the primary demarcation between mother and fetus. Transplacental transfer of drugs of abuse and the amount that enters into the fetal circulation is determined by at least three processes: simple diffusion, efflux transporters, and biotransformation by metabolic enzymes [12]. Both, the placenta and the fetus are equipped with independent enzyme systems of 1st and 2nd phase substrate metabolism, such as esterases, CYP450, glucuronyltransferase or sulphatase; these enzymes are present at levels which may fluctuate throughout gestation [13]. In addition, some *in vitro* experiments suggest that placental tissue could act as a depot for drugs of abuse, depending on the affinity of the respective drugs for this tissue [14,15], and could also efflux chemicals from fetal to maternal side, thus protecting the fetus from high xenobiotic concentrations [16].

In the framework of a research project carried out in a cohort of Spanish pregnant women who interrupted their pregnancy voluntarily during the first trimester, we analyzed drugs/metabolites in maternal hair and abortion tissues to investigate drug disposition and toxicokinetics in the early gestation period. Our study aimed to evaluate transplacental passage of the drugs during this period, fetal exposure to drugs of abuse during the first trimester in fetal remains and to critically assess the usefulness of maternal hair analysis in identifying fetal exposure to drugs of abuse in early pregnancy.

2. Methods

2.1. Subjects

The study was conducted between September 2007 and March 2010 in an obstetric clinic authorised to perform induced abortions in Murcia (Mediterranean city in south east of Spain). Women at 12-week gestation who requested voluntary termination of pregnancy were included in a transversal observational study. This study was approved by the Ethics and Research committee of Murcia University. After explaining the purpose of the study, informed consent to participate was obtained from all participants. At the first visit, a structured questionnaire on alcohol, tobacco and illegal drug use in the previous 3 months was administered to the participants. Four centimetres of proximal scalp hair was collected from the vertex region and stored at ambient temperature in a paper bag. Placental and fetal tissue samples were collected as discarded material from pregnancy terminations, transferred to a plastic tube and stored at -80°C . Within the next few days, the tubes were sent to the analytical laboratory.

A total of 280 women with a median age of 26 ± 3.49 years (range: 14–43 years) and gestational age of 12 weeks were included. Demographic and obstetric data were also collected. Self-reported data regarding alcohol, tobacco and illegal drug use was available only for 175 cases summarized as follows: 35.2% of the women declared being active smokers, 65.2% of the women reported being teetotalers and 79.9% in the

alcohol using group declared to drink less than 4 drinks per month. With respect to drug use, three women admitted sporadic cannabis consumption, one reported cocaine use 1 month before abortion and another woman admitted sporadic use of cocaine and cannabis.

2.2. Determination of drugs of abuse in placenta, fetal tissues and hair samples

To minimize the risk of detecting passive exposure, the hair samples underwent a decontamination procedure by three consecutive washes with dichloromethane for 15 min in an ultrasonic bath. Subsequently, the hair strands were cut into small pieces and digested in either acid or alkaline condition, in function of the investigated analytes.

GC–MS assays for hair testing of drugs of abuse revalidated *in-house* to include all the relevant psychotropic drugs and metabolites (MAM, MOR, and codeine for opiates; COC, BEG and cocaethylene for cocaine; amphetamine, MA, MDA, MDMA, for amphetamines and methylenedioxyderivatives and THC, THC–COOH for cannabinoids) were used [17,18]. Limits of quantification, in hair were: 0.2 ng/mg for MAM, MOR, codeine; 0.5 ng/mg for COC, BEG and cocaethylene; 0.2 ng/mg for amphetamine, MA, MDA, MDMA and 0.1 ng/mg for THC and 0.002 ng/mg for THC–COOH when 40 mg of hair per assay was used.

A GC–MS method previously described for placental tissue was revalidated and adapted for fetal remains [19]. The concentration range covered was 5–500 ng/g for amphetamine, MA, MDA, MDMA, COC, BEG, cocaethylene, MOR, THC and THC–COOH.

2.3. Statistical analysis

Quantitative data showed a normal distribution according to the Kolmogorov–Smirnov test, and Pearson correlation analysis was used to assess the relationships between parent drugs/metabolite concentration in hair, placenta and fetal tissues. A statistical probability (*p*) value < 0.05 was considered significant.

3. Results

A total of 280 women were included in the project and for the purpose of this study only the cases with positive hair test results were selected. Eighty one positive hair samples were identified: 60 were positive for cannabis (74.1%), 28 for cocaine (34.6%), 7 for opiates (8.6%), 3 for MDMA (3.7%) and 18.5% of them were positive for more than one drug. Eighteen of the 81 hair positive cases had also positive results for placenta testing: 9 were positive for cannabis, 8 for cocaine and 1 for cocaine and cannabis. The analysis of fetal remains indicated 8 being positive for cannabis, 9 for cocaine and 1 for cocaine and cannabis.

Qualitative results for hair, placenta and fetal remains are reported in Table 1. Positive hair cases were confirmed in placenta/fetal remains in 10 out of 60 for cannabis (16.6%); 7 out of 28 for cocaine (25%); 0 out of 6 for opiates and 0 out of 3 MDMA.

Mean concentration values, standard deviations and concentration ranges for the parent drugs and metabolites in the different

Table 1
Qualitative results in hair, placenta and fetal remains analysis.

Hair	Placenta	Fetal remains	n
Cannabis	–	–	35
Cannabis	–	Cocaine	1
Cannabis	Cannabis	–	1
Cannabis	Cannabis	Cannabis	7
Cannabis	Cocaine	–	1
Cannabis	Cocaine	Cocaine	2
Cocaine	–	–	10
Cocaine	–	Cocaine	1
Cocaine	Cocaine	Cocaine	5
Opiates	–	–	1
Opiates	–	Cannabis	1
MDMA	–	–	1
Cannabis + cocaine	–	–	7
Cannabis + cocaine	Cannabis	–	1
Cannabis + cocaine	Cannabis + Cocaine	Cannabis + Cocaine	1
Cannabis + opiates	–	–	2
Cannabis + MDMA	–	–	1
Cocaine + opiates	–	–	1
Cannabis + cocaine + opiates	–	–	1
Cocaine + opiates + MDMA	–	–	1

Table 2

Mean drugs and metabolites concentration values (X), standard deviations (SD), and concentration ranges in all the matrices analyzed.

	Hair, ng/mg			Placenta, ng/g			Fetal remains, ng/g		
	n	X ± SD	Range	n	X ± SD	Range	n	X ± SD	Range
THC	60	2.7 ± 3.4	0.1–14.1	10	196.8 ± 110.1	101.1–432.8	9	118.5 ± 97.9	3.9–281.7
THC-COOH	53	0.09 ± 0.12	0.001–0.7	–	–	–	1	0.4	0.4
COC	28	10.9 ± 9.9	0.5–48.1	8	97.8 ± 31.5	58.9–149.8	10	71.3 ± 35.1	28.7–132.4
BEG	28	3.9 ± 4.1	0.2–15.5	9	231.7 ± 137.5	37.8–531.9	10	149.8 ± 53.5	78.5–244.3
MDMA	3	1.2 ± 1.2	0.2–2.5	–	–	–	–	–	–
MOR	6	1.1 ± 1.2	0.5–1.3	–	–	–	–	–	–
MAM	6	11.3 ± 13.3	0.7–12.2	–	–	–	–	–	–

biological matrices are summarized in Table 2. No significant statistical correlations were found between parent drug and/or metabolite concentrations in the three different biological matrices. Finally, quantitative values for the matched positive cases are detailed in Table 3. Contrasting the results with self-reported answers to questionnaires, we noticed that the woman who reported sporadic use of cocaine and cannabinoids in the past, had cocaine in her hair but not in placental or fetal tissues. In the sample analysis from the 3 women who reported occasional cannabis exposure, the drug was detected in the hair of one of those women, while in the hair of the other two, both, cocaine and cannabis were detected. No drug was detected in any of the placental/fetal tissues. A fifth woman who admitted a single cocaine exposure 1 month before sampling had negative results for cocaine in all the tested samples but her hair tested positive for cannabis.

4. Discussion

Although proof of fetal drug exposure can be obtained after delivery by measuring the drug of abuse and/or its metabolites in maternal and fetal matrices, these data are difficult to interpret. The concentration of drugs of abuse and their metabolites in the fetus and their relationship with the placenta and maternal matrices have been found to be highly variable [9,20–23]. The early pregnancy events are even more difficult to assess because the distribution, biotransformation of drugs in placenta and fetal drug metabolism during this period are still not well characterized processes in humans.

In this context we present our findings for the presence of the most frequently used illicit drugs of abuse in maternal hair, placenta and fetal remains from women who interrupt their pregnancies on the 12th week of gestation and our critical assessment of the possibility of maternal hair testing results being indicative of fetal exposure.

The high prevalence of drug exposure in our population (28.9%), may be due to the special characteristics of these pregnancies ending in a voluntary abortion. Many pregnant women who consume illicit drugs prior to recognition of pregnancy discontinue such habits once they realize they are pregnant [24], however, those who are drug users and who decide to terminate the pregnancy, may not give up on drug consumption. It was also described before that in unplanned pregnancies women are more likely to be exposed to a wide range of potentially toxic substances, such as recreational drugs [11,25,26]. In our study the analytical results are in contrast with the reports from the structured questionnaires and confirm the findings of previous studies, namely the low reliability of self reports on maternal illicit drug use during pregnancy [2,3].

The low correlation between the 3 different matrices regarding the presence of drugs of abuse may be due to the narrow window of exposure in the placenta and the fetus compared with the wider window of detection in hair, and because of a possible inter individual variability in placental/fetal metabolism. Our findings suggest that the placenta/fetal tissues in early pregnancy, may not be sensitive enough to indicate fetal drug exposure and are in agreement with the conclusions of the other few studies in which placenta was

Table 3

Quantitative results in matched hair, placenta and fetal tissue analysis.

Case	Hair, ng/mg						Placenta, ng/g			Fetal remains, ng/g			
	THC	THC-COOH	COC	BEG	MOR	MAM	THC	COCA	BEG	THC	THC-COOH	COC	BEG
1	3.15	0.08					101.1			128.2			
2	1.20	0.03	2.20	0.80			117.7	128.5	219.5	4.7		132.4	244.3
3	2.96	0.06					120.4						
4	0.85	0.18	18.1	11.4			121.2						
5	2.15	0.07					139.1			156.4			
6	1.40	0.008					143.4			11.5			
7	8.18	0.05					199			211.9			
8	8.24	0.06					273			164.3			
9	6.79	0.12					318.5			281.7			
10	4.41	0.09					432.8			103.5			
11			1.2	0.5				58.9	118.6			54.7	144.5
12			0.5	0.5				60.2	209.6			47.9	128.2
13	0.14	0.01						80.5	225.3			114	182.1
14	3.78	0.04						97.9	218.6			105.8	229.1
15			11.5	4.0				102.4	198.3			28.7	104.7
16			11.4	0.9				103.9	531.9			76.1	114.4
17			1.2	0.5				149.8	326.1			67.6	146.5
18			14.5	4.5								38	78.5
19	0.21	0.16										47.9	125.6
20	0.22	0.02							37.85				
21					0.5	0.7					3.9	0.4	

found to have a short detection window when considered as a possible matrix for biomonitoring fetal exposure [21,22] and with those presenting differences between fetal/maternal matrices for assessing prenatal exposure [4,23,27].

5. Cannabis

We found 60 THC hair positive cases, 10 of them confirmed in placenta/fetal remains (16.7%). There was no correlation between the THC levels in placenta and fetal remains. Cannabis toxicokinetics was recently reviewed by Huestis [28] and current knowledge related to transplacental cannabis transport was summarized; THC crosses the placenta rapidly, while THC-COOH crosses it much less efficiently. This is in accordance with our results (THC-COOH was present only in one fetal sample) and with a fetal monkey study where no THC-COOH was detected in fetal plasma and remains, indicating a lack of transfer across the placenta, and a lack of metabolism of THC [29]. Blackard and Tennes [30] reported that THC transfer to the fetus was greater in early pregnancy and it was also proved that placental glucuronidation is greater in this period and enhanced in alcohol-using and smoking mothers [31].

In this context, Rada et al. [32] reported on a case study of newborn twins where cannabis was undetectable in one twin while positive in the other by means of fetal hair analysis, and suggested that the key factor in modulating the amount of drug reaching the fetus is the placenta. Similar conclusions were reached by Wang et al. [23] in another dizygotic twin case report where different cannabinoid concentrations were detected in meconium.

In our study, the maternal hair THC and THC-COOH levels (0.1–14.06 and 0.001–0.7 ng/mg) were slightly higher than those described in other countries but in accordance with studies reporting drugs/metabolites concentration in hair samples from Spanish populations [8,33,34] and were not correlated with fetal/placenta tissue concentrations. This is not an unexpected finding since cannabis biomarkers of exposure are very difficult to correlate and interpret. Moreover, as it was reported before [2], cannabinoid toxicokinetics in heavy users may be different from those in occasional users and it has to be taken in consideration that in this study none of the women reported chronic or recent acute cannabis use.

6. Cocaine

Seven out of 28 cocaine positive hair cases were confirmed in placenta/fetal remains (25%). Placenta and fetal cocaine levels (Table 2) are in the same concentration range and are similar to the single positive term placenta analysis results reported by de Castro et al. [22] (BEG 458 and COC 7.3 ng/g). No correlation was found between COC and BEG concentrations in the two matrices. This is in accordance with other studies analyzing cocaine toxicokinetics during pregnancy [22,27,32,35] and acknowledging the large variability in the rate of cocaine transplacental passage and in the ability of term placenta to metabolize cocaine [36].

In our study, hair biomarker levels (COC 0.5–48.1 and BEG 0.2–15.5 ng/mg) were in agreement with those observed by other authors [8,9,34,35] but did not correlate with the fetal matrices. This finding and the absence of placenta/fetal biomarkers in the majority of the positive hair cases may be due to the differences in the window of detection in these matrices. Concheiro et al. [21] suggested that the window of detection in terms placenta is less than 1 week while both COC and BEG could be detected in hair of former drug users for several months after cessation of drug use [37].

In the few cases where positive results were found in fetal placental remains with negative maternal hair ($n = 5$, one for

cannabinoids and 4 for cocaine) a recent, occasional drug use can be suspected since the hair test is a highly sensitive and specific method for identifying past drug use but not acute-recent exposure.

7. Conclusions

Drugs/metabolites in hair of pregnant women can be used as biomarkers of past drug use (repetitive or sporadic), although it is not always reflected in fetal/placental remains. In our study population, the positive hair results were confirmed in placenta/fetal tissue in 16.7–25% of cases involving cannabis and cocaine use. More than one hypothesis can be postulated for the absence of these drugs in the abortion remains of the other positive hair cases:

- Since we analyzed 4 cm of hair (to cover ± 3 months exposure) it is possible that drug use occurred before the start of pregnancy and did not continue once the woman realized that she was pregnant.
- Past sporadic drug use which could be measured in hair but not in fetal and placental remains due to the narrower window of drug detection in placental/fetal remains; it is feasible that many women refrained from using drugs in the days immediately prior to pregnancy termination, since they had to undergo surgery and were hospitalized.
- Although it is clear that drugs do cross the placenta, this organ can also act as a barrier that, to some extent, could restrict the amount of drugs and metabolites reaching the fetal remains, by protein binding, placental metabolism and active placental transport, therefore being able to influence fetal drug exposure.

For the first time, using direct and objective methods, the transplacental passage of illicit drugs during the early weeks of pregnancy when the initial formation of the embryo and its change into fetus takes place as well as drug exposure in first trimester fetuses were demonstrated in the present study.

Maternal hair has the advantage of non-invasive collection and providing a long-term historical record of maternal exposure (active or passive) to drugs of abuse. Our study also highlighted its usefulness in identifying and estimating the amount of drugs reaching the fetus during early gestation.

Acknowledgement

This study was supported by a grant of the Programa Nacional de Investigación 2008–2010 [SAF 2007-64535] from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

References

- [1] M.A. Huestis, R.E. Choo, Drug abuse's smallest victims: in utero drug exposure, *Forensic Sci. Int.* 128 (1) (2002) 20–30.
- [2] E.M. Ostrea Jr., et al., Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis, *J. Pediatr.* 138 (8) (2001) 344–348.
- [3] S. Pichini, et al., Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the Meconium Project, *Forensic Sci. Int.* 153 (1) (2005) 59–65.
- [4] J. Iacono, et al., Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse, *Ther. Drug Monit.* 29 (6) (2007) 711–734.
- [5] H. Llaquet, et al., Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (1) (2010) 379–399.
- [6] Society of Hair Testing, www.soht.org.
- [7] J. Klein, T. Karanov, G. Korem, Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience, *Forensic Sci. Int.* 107 (1–3) (2000) 281–288.
- [8] F. Musshoff, et al., Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests, *Forensic Sci. Int.* 156 (2–3) (2006) 118–123.
- [9] F. Garcia-Bourmissen, et al., Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology, *Ther. Drug Monit.* 29 (1) (2007) 71–76.
- [10] B.V.R. Sastry, Placental toxicology: tobacco smoke abused drugs, multiple chemical interactions and placental function, *Reprod. Fertil.* 3 (1991) 355–372.

- [11] J.Y. Han, A.A. Nava-Ocampo, G. Koren, Unintended pregnancies and exposure to potential human teratogens, *Birth Defects Res. A: Clin. Mol. Teratol.* 73 (2005) 245–248.
- [12] K. Vähäkangas, P. Myllynen, Drug transporters in the human blood-placental barrier, *Br. J. Pharmacol.* 158 (3) (2009) 665–678.
- [13] P. Myllynen, et al., Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and embryonic tissues, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5 (12) (2009) 1483–1499.
- [14] T. Narovskaya, et al., Transplacental transfer and metabolism of buprenorphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (1) (2002) 26–33.
- [15] M.K. Syme, J.W. Paxton, J.A. Kralan, Drug transfer and metabolism by the human placenta, *Clin. Pharmacokinet.* 43 (8) (2004) 487–514.
- [16] L.M. Aleksunes, Y. Cai, C.D. Klaassen, Prominent expression of xenobiotic efflux transporters in mouse extraembryonic fetal membranes compared with placenta, *Drug Metab. Dispos.* 36 (9) (2008) 1960–1970.
- [17] M. Pujadas, et al., Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 798 (2003) 249–255.
- [18] C. Jurado, et al., Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair, *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 165–174.
- [19] X. Joya, et al., 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 (1–3) (2010) 38–42.
- [20] D.B. Baer, A. Bishop, L.L. Needham, Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit, *Reprod. Toxicol.* 23 (3) (2007) 260–266.
- [21] M. Concheiro, et al., Maternal buprenorphine dose, placenta buprenorphine, and metabolite concentrations and neonatal outcomes, *Ther. Drug Monit.* 32 (2) (2010) 206–215.
- [22] A. de Castro, et al., Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 33 (5) (2009) 243–252.
- [23] P. Wang, et al., In utero drugs of abuse exposure testing for newborn twins, *J. Clin. Pathol.* 63 (2010) 259–261.
- [24] S.H. Elshahin, J. Gfroerer, Pregnancy-related substance use in the United States during 1996–1998, *Obstet. Gynecol.* 101 (2003) 374–379.
- [25] M. Dott, S.A. Rasmussen, C.J. Hogue, J. Reefhuis, National Birth Defects Prevention Study, Association between pregnancy intention and reproductive-health related behaviors before and after pregnancy recognition, national birth defects prevention study 1997–2002, *Matern. Child Health J.* (2009).
- [26] L.C. Than, M.A. Honein, M.L. Watkins, P.W. Yoon, K.L. Daniel, A. Correa, Intent to become pregnant as a predictor of exposures during pregnancy: is there a relation? *J. Reprod. Med.* 50 (2005) 389–396.
- [27] S. Potter, et al., Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure, *J. Pediatr.* 125 (4) (1994) 652–654.
- [28] M.A. Huestis, Human cannabinoid pharmacokinetics, *Chem. Biodivers.* 4 (8) (2007) 1770–1804.
- [29] J.R. Bailey Jr., et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90 (1987) 315.
- [30] C. Blackard, K. Terres, Human placental transfer of cannabinoids, *N. Engl. J. Med.* 311 (1984) 797.
- [31] A.C. Collier, et al., Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption, *Hum. Reprod.* 17 (10) (2002) 2564–2572.
- [32] B. Rada, et al., The role of the placenta in variability of fetal exposure to cocaine and cannabinoids: a twin study, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79 (11) (2001) 942–945.
- [33] C. Jurado, et al., Hair testing for cannabis in Spain and France: is there a difference in consumption? *J. Anal. Toxicol.* 20 (2) (1996) 111–115.
- [34] L. Tsoucalis, F.C. John, Wicks Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 121–128.
- [35] I.D. Katikaneni, F.R. Salfe, T.C. Holsey, Neonatal hair analysis for benzoylecgonine: a sensitive and semiquantitative biological marker for chronic gestational cocaine exposure, *Biol. Neonat.* 81 (1) (2002) 29–37.
- [36] C. Simson, et al., Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the human term placenta: implications for fetal cocaine exposure, *J. Lab. Clin. Med.* 123 (3) (1994) 400–406.
- [37] F. Garcia-Bourmissen, et al., Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use, *Forensic Sci. Int.* 189 (2009) 24–27.

ARTÍCULO ANEXO 2

**UNSUSPECTED EXPOSURE TO COCAINE IN
PRESCHOOL CHILDREN FROM A
MEDITERRANEAN CITY DETECTED BY HAIR
ANALYSIS**

Xavier Joya, Esther Papaseit, Ester Civit, Manuella Pellegrini, Oriol
Vall, Oscar Garcia-Algar, Giulia Scaravelli, Simona Pichini

Therapeutic Drug Monitoring 2009 Jun;31(3):391-5.

Objetivos: El objetivo de este estudio fue esclarecer la prevalencia oculta y desconocida hasta la fecha de exposición pasiva a cocaína en un servicio de urgencias pediátricas.

Material y métodos: El estudio fue realizado en el servicio de urgencias del servicio de pediatría del Hospital del Mar (Barcelona) entre febrero y marzo del 2008. El hospital está localizado en un área con un elevado porcentaje de inmigrantes (40%) y bajo nivel socioeconómico. Las muestras de pelo fueron obtenidas de niños de entre 18 meses y 5 años que eran atendidos en urgencias y que no presentaban ningún síntoma asociado con la intoxicación por drogas de abuso. Los niños menores de 18 meses fueron excluidos del estudio debido a que podían presentar un resultado positivo a cocaína fruto de una exposición prenatal. Además, de cada niño que fue reclutado en el estudio, si éste iba acompañado de alguno de sus padres, también se les pidió una muestra de pelo. Además se recogieron datos antropométricos y sociodemográficos para cada caso.

La cocaína y su principal metabolito, la benzoilecgonina, fueron determinados y cuantificados en las muestras de pelo utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Además, en dicho procedimiento también se determinó la presencia de opiáceos, anfetaminas y MDMA. (Montagna et al., 2002).

Resultados: Se obtuvieron muestras de 90 niños que fueron atendidos al servicio de urgencias pediátricas y en 85 de 90 casos fue posible tener muestras de alguno de los padres (en 10 casos se obtuvo muestras de pelo de ambos padres). De las 90 muestras de pelo obtenidas, 21 casos (23.3%) presentaron niveles detectables de cocaína y su metabolito, la benzoilecgonina, la cual siempre estuvo presente en las muestras. La edad media de los niños expuestos a cocaína versus los no expuestos fue similar

Publicaciones anexas

(2.62 años para ambos grupos). El rango de concentraciones de cocaína fue de de 0.3 y 6.0 ng/mg con un valor medio de 1.6 ng/mg y para la benzoilecgonina fue de 0.2 a 1.4 ng/mg con un valor medio de 0.9 ng/mg. En un 88% de los casos positivos para COC en niños también se obtuvo un resultado positivo en alguno de los padres que acompañaban a sus hijos a urgencias.

En 4 de las 21 muestras positivas, se obtuvo muestra suficiente para realizar un análisis segmentario de 0 – 3 cm. y de 3 a 6 cm. para confirmar la exposición a cocaína en diferentes periodos. En los cuatros casos, concentraciones similares de COC y BE se obtuvieron en los segmentos consecutivos.

La etnia no se asoció con el consumo de cocaína y la subsecuente exposición a sus hijos. Tampoco se asoció con el status socioeconómico de los padres. Sin embargo, si que se observó una tendencia a ser español ($P = 0.059$) y a tener un trabajo poco cualificado ($P = 0.054$) en las madres de los niños expuestos a cocaína. Por otro lado, los padres de los niños expuestos a cocaína admitían fumar un número significativamente mayor de cigarrillos y también admitían ser consumidores de cannabis. También se asoció el consumo de benzodiazepinas y antidepresivos con los resultados positivos de cocaína en pelo (**Tabla 12**).

Los niños expuestos a cocaína presentaron una somatometría normal al nacimiento. Basándonos en los cuestionarios respondidos por los padres, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de infecciones postnatales ni el uso de antibióticos ni para el número de admisiones hospitalarias (**Tabla 13**). Sin embargo, si que se detectó un porcentaje significativamente elevado de niños expuestos a cocaína que

presentaban un peso por debajo del percentil 10 en el momento en que se realizó el estudio.

Discusión y conclusiones: Este estudio pone de manifiesto la elevada incidencia de exposición insospechada a cocaína utilizando el análisis toxicológico en pelo en niños preescolares de una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona.

En este contexto y de forma contraria a los estudios previos, el *screening* en orina no se utilizó para comparar los resultados obtenidos en el análisis de pelo ya que el objetivo del estudio fue comprobar la exposición repetida a cocaína en niños que eran atendidos en el servicio de urgencias por diferentes tipos de causas y sin que presentaran síntomas de una intoxicación aguda por sustancias de abuso.

En este punto, cabe recalcar que en teoría, una única exposición a cocaína pueda dar lugar a un resultado positivo en pelo ya que esto se ha observado en un experimento realizado en adultos después de la administración controlada de cocaína (Henderson et al., 1996). Este estudio no se ha realizado en niños. Sin embargo, el resultado obtenido en 4 muestras en que se pudo realizar el análisis segmentario, se demostró que existía una exposición continuada en el tiempo.

Tabla 12. Características sociodemográficas paternas según la exposición de los niños a cocaína mediante análisis de pelo.

	Niños de edad preescolar no expuestos a cocaína (<i>n</i> =69)	Niños de edad preescolar expuestos a cocaína (<i>n</i> =21)
Características sociodemográficas		
Nacionalidad materna (%)		
Española	59.4	75.0
No española	40.6	25.0
Nacionalidad paterna (%)		
Española	60.3	68.4
No española	39.7	31.6
Tiene empleo la madre (sí/no) (%)		
No	25.4	45.0
Profesión materna (%)		
Directivos y profesionales	18.5	10.0
Profesiones cualificadas parcialmente	40	30.0
Profesiones no cualificadas	41.5	60.0
Tiene empleo el padre (sí/no) (%)		
No	0	0
Profesión paterna (%)		
Directivos y profesionales	20.6	10.5
Profesiones cualificadas parcialmente	28.6	31.7
Profesiones no cualificadas	50.8	57.8
Consumo de sustancias de abuso		
Consumo de tabaco		
Madre (%)	29.0	47.6
Número medio de cigarrillos, media (SD)	2.4 (5.8)	4.7 (9.5)
Padre (%)	39.7	45.0
Número medio de cigarrillos, media (SD)	3.8 (6.3)	7.7 (9.6) *
Consumo de alcohol		
Madre (%)	27.5	19.0
Número de unidades standards de alcohol, media (SD)	2.5 (4.9)	3.2 (8.2)
Padre (%)	29.0	19.0
Número de unidades standards de alcohol, media (SD)	3.0 (5.2)	1.2 (2.8)
Consumo de cannabis		
Madre (%)	5.8	23.8 *
Padre (%)	7.2	28.6 *

	Niños de edad preescolar no expuestos a cocaína (n=69)	Niños de edad preescolar expuestos a cocaína (n=21)
Consumo de cocaína y opiáceos		
Madre (%)	0	0
Padre (%)	0	0
Consumo de Benzodiazepinas o antidepresivos		
Madre (%)	1.4	23.8 *
Padre (%)	2.9	4.8
* $P < 0.05$ en relación con el pelo positivo para cocaína		

Los efectos a largo plazo de la repetida exposición a cocaína no han sido clarificados hasta la fecha. Sin embargo, la exposición aguda a cocaína durante la infancia se ha asociado con manifestaciones neurológicas como ataques focales o generalizados en niños de 8 años y más pequeños, y otras manifestaciones como delirium y coma en niños mayores (Mott et al., 1994). Incluso la muerte se ha descrito en casos de intoxicación oral (García-Algar et al., 2005a).

Según algunos estudios, la exposición prenatal a COC causa efectos negativos sobre el desarrollo neurológico del bebé y el comportamiento intelectual y emocional como consecuencia del efecto de la droga en el sistema monoaminérgico (Bennett et al., 2002; Mayes et al., 1998; Singer et al., 2002), sin embargo, otros estudios no apoyan estos hallazgos (Hurt et al., 1997; Singer et al., 2004). Sin embargo, está bien demostrado que existen factores de riesgo ambientales como el maltrato, la baja atención en el cuidado del bebé o síntomas depresivos de la madre han sido asociados con un peor desarrollo en los niños expuestos prenatalmente (Linares et al., 2006).

Tabla 13. Características antropométricas e incidencia de infecciones según la exposición de los niños a cocaína mediante análisis de pelo.

	Niños de edad preescolar no expuestos a cocaína (<i>n</i> =69)	Niños de edad preescolar expuestos a cocaína (<i>n</i> =21)
Características de los niños al nacer		
Edad gestacional (años), media (SD)	39 (2.1)	38 (1.8)
Peso al nacer (gr.), media (SD)	3273 (446)	3149 (637)
Talla al nacer (cm.), media (SD)	49.6 (3.5)	48.9 (4.5)
Sexo (% varones)	47.0	33.3
Lactancia durante el primer año de vida (sí/no) (%)		
Sí	87	66.7 *
Número de meses de lactancia, media (percentil 25 – 75)	7.0 (1.0 - 12.0)	6.0 (0 – 11.0)
Características antropométricas e incidencia de infecciones		
Edad en el momento de la visita, media (SD)	2.8 (1.4)	2.2 (1.3)
Peso en el momento de la visita, (%) por encima del 10º percentil	1.6	11.8 *
Infecciones respiratorias de vías altas por año, media (percentil 25 – 75)	3.0 (1.0 – 5.0)	3.0 (0 – 4.0)
Infecciones respiratorias de vías bajas por año, media (percentil 25 – 75)	2.0 (0 – 4.0)	1.0 (0 – 2.0)
Otro tipo de infecciones (sí/no) (%)		
Sí	50.7	66.7
Número de episodios durante toda la infancia, media (percentil 25 – 75)	1.0 (1.0 – 2.0)	1.0 (0 – 1.0)
Uso de antibióticos (sí/no) (%)		
Sí	76.8	76.2
Número de veces que ha usado antibiótico durante la vida, media (percentil 25 – 75)	1.0 (0 – 2.0)	1.0 (0 – 3.0)
Admisiones hospitalarias (sí/no) (%)		
Sí	40.6	30.0
Número de admisiones hospitalarias durante la infancia, media (percentil 25 – 75)	0 (0 – 1.0)	0 (0 – 1.0)

* *P* < 0.05 en relación con el pelo positivo para cocaína

En la misma línea que estas observaciones, nuestro estudio muestra que los padres de estos niños expuestos a cocaína presentan, en su mayoría, patrones de conducta con efectos potencialmente perjudiciales para la salud de sus hijos (cómo fumar tabaco, consumir cannabis y/o benzodiazepinas y el uso de antidepresivos y realizar un periodo de lactancia más corto). Por otro lado, a pesar de que no se obtuvo diferencias en cuanto a la incidencia de infecciones y el consecuente uso de antibióticos en los niños expuestos postnatalmente a COC respecto a los no expuestos, un elevado porcentaje de estos niños (11.8%) mostraron retraso en el crecimiento. A pesar de que es difícil identificar un núcleo de problemas físicos, cognitivos o en cuanto al comportamiento que sean directamente atribuibles a la exposición postnatal (o prenatal y postnatal) a cocaína, es bien sabido que la exposición a drogas de abuso está íntimamente relacionada con un pobre cuidado del bebé.

Este estudio pone en evidencia que los niños en edad preescolar, que por ser pequeños y presentar un bajo peso, pueden ser expuestos a las drogas de abuso porque estas se encuentren en su hogar. Independientemente de la rutas de exposición a la cocaína (ingesta accidental, por contacto con superficies del hogar contaminadas, o bien llevándose a la boca objetos utilizados en el suministro de la droga) es probable que esta exposición esté ligada al consumo activo de sus padres, y esta puede ser una fuente de riesgo capaz de generar intoxicaciones severas.

Curiosamente, en el mismo ambiente, cuatro años antes, publicamos una elevada exposición prenatal a cocaína (4.4%) en recién nacidos, juntamente con un 5.3% y 8.7% para cannabis y opiáceos, respectivamente. Tomando en cuenta todos estos datos, se pone de manifiesto el problema existente con la COC en este entorno.

En conclusión, esta prevalencia alarmante de niños expuestos a COC pertenecientes a una población de bajo nivel socioeconómico apoya la teoría

Publicaciones anexas

de abogar por un cribaje en pelo para identificar niños pertenecientes a estos ambientes deprimidos que de otra forma no podrían ser identificados. Finalmente, sería recomendable diseñar guías que proporcionen esta información a los profesionales acerca de la exposición asintomática de COC en niños preescolares.

SHORT COMMUNICATION

Unsuspected Exposure to Cocaine in Preschool Children From a Mediterranean City Detected by Hair Analysis

X. Joya,*† E. Papaseit,*† E. Civit,‡ M. Pellegrini,§ O. Vall,*† O. Garcia-Algar,*† G. Scaravelli,¶ and Simonia Pichini, PhD§

Abstract: We used hair testing to investigate the prevalence of unsuspected exposure to cocaine in a group of preschool children presenting to an urban pediatric emergency department without signs or symptoms suggestive of exposure. Hair samples were obtained from 90 children between 18 months and 5 years of age attending the emergency room of Hospital del Mar in Barcelona, Spain. In 85 cases, hair samples from the accompanying parent were also provided. The samples were analyzed for the presence of cocaine and benzoylcegonine by gas chromatography-mass spectrometry, which also determined opiates and amphetamines. Parental sociodemographics, possible drug history, and information on the child's features were recorded. Hair samples from 21 children (23.3%) were positive for cocaine (concentration range 0.3–5.96 ng/mg of hair) with 1 sample also positive for 3,4-methylenedioxymethamphetamine and another for opiates. In 88% of the positive cases, cocaine was also found in the hair of the accompanying parent (15 of 17 matched parent-child hair samples). Parental sociodemographics were associated neither with children's exposure to cocaine nor with somatometry of children at birth. However, the behavioral patterns with potential harmful effects for the child's health (eg, tobacco smoking, cannabis, benzodiazepines and/or antidepressants use, and shorter breast-feeding time) were significantly higher in the parents of exposed children. A statistically higher percentage of exposed children were in the lower weight percentile group compared with the nonexposed children. In the light of these results, we advocate general hair screening to disclose exposure to cocaine and other drugs of abuse in children from risky environments, which could provide the basis for specific social and health interventions.

Key Words: cocaine, hair testing, preschool children

(*Ther Drug Monit* 2009;0:000–000)

Received for publication June 13, 2008; accepted January 13, 2009.

From the *Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica-Hospital del Mar; †Departament de Pediatria—Universitat Autònoma; ‡Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica—Hospital del Mar, Barcelona, Spain; §Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità; and ¶National Centre for Epidemiology, Surveillance and Health Promotion, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

Correspondence: Simonia Pichini, PhD, Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, Rome 00161, Italy (e-mail: simonia.pichini@iss.it).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

INTRODUCTION

In the Mediterranean countries, cocaine is the drug of abuse with the highest increase in consumption during the last decade.¹

Compared with data from other European Union member states, Spain showed the highest percentage of cocaine consumption: 6.4% lifetime prevalence, 3% annual prevalence in the general population (15–64 years), and for the first time cocaine use exceeded those reported from the United States.^{1,2} The Spanish National Survey on Drug Abuse showed that cocaine consumption was especially high in young adults (15–34 years): 9.6% admitted use at least once in their lifetime and 5.1% in the previous 12 months.²

This alarming consumption, which caused a 4.5% prenatal exposure in newborns from a Barcelona (Spain) cohort,^{3,4} can also result in repeated exposure of infants and preschool children living in a domestic environment of cocaine abusers.^{5–8} Indeed, infants and preschool children who spend bulk of their days and nights with their parents or caregivers in the household may be repeatedly exposed to cocaine by secondhand smoke, accidental ingestion, physical contact with the users, or with contaminated house surfaces.

There is a small number of reports on the identification of cocaine exposure in young children. During the 1990s, a few studies from North America investigated the prevalence of acute exposure to cocaine in young children and infants younger than 1 year from high-risk populations attending emergency departments of local hospitals. A prevalence of around 5% among young urban children and 36% in infants from a high-risk population was reported.^{9–12}

These studies had the limitation of detecting only acute exposure to cocaine in the previous 24–48 hours by urinalysis.¹¹ Therefore, the prevalence rate of a longer time window exposure to cocaine in preschool children remains unknown, and estimates of such prevalence are based solely on parental self-reporting, which have consistently been proven to be unreliable.

In recent years, there has been a growing interest in using hair testing during childhood to assess postnatal exposure to cocaine. The rationale for this approach, used mainly in North America, has been the objective assessment of chronic exposure in child custody cases, when 1 parent may be accused of exposing the child passively and/or actively to the drug, or the disclosure of repeated exposure to the drug in cases of acute severe intoxication by cocaine itself or with other illicit drugs.^{14,15}

Concerns regarding the health effects of exposure to cocaine in childhood, and the general increase in cocaine abuse

in Spain, prompted some investigators to introduce hair testing for cocaine and other drugs of abuse to all the children attending the emergency department whenever a high index of suspicion was perceived by the physician.^{4,6,7}

In the light of the results obtained, hair analysis has also been used to establish the incidence of unsuspected exposure to cocaine in preschool children without signs or symptoms suggestive of exposure, attending the Pediatric Emergency Department of the Hospital del Mar in Barcelona, during a 2-month period.

METHODS

Subjects and Samples

This study was conducted in the Pediatric Emergency Department of the Hospital del Mar of Barcelona, Spain, between February and March 2008. The hospital is located in an urban area with low socioeconomic status (SES) and a high percentage (more than 40%) of immigrants. Hair samples, cut at the scalp, were collected from all the children between 18 months and 5 years of age, admitted to the Emergency Department for a variety of general medical complaints. Because hair grows at a rate of approximately 1 cm/mo, to document possible repeated exposure, a minimum of 4 cm hair was required. Children younger than 18 months were excluded to avoid the possibility that a positive result of cocaine (and/or other drugs of abuse) in hair samples could be partly due to prenatal exposure.

Children older than 5 years were excluded because the study was limited to preschool children. In Spain, it is not customary to send the children to nursery school, especially among immigrant and low socioeconomic class populations. Subsequently, these children spend the majority of their days and nights at home.

When children attending emergency rooms were accompanied by 1 or 2 of their parents, they were asked to donate hair samples, as well. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (CEIC-IMAS) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; signed informed consent was obtained from the accompanying parent. Parental sociodemographics and possible toxic habits, child anthropometric characteristics at birth and at the time of the visit, and incidence of lifetime infections were recorded. Results from the clinical examination of the children were available from medical records.

Determination of Cocaine and Benzoyllecgonine in Hair Samples

Cocaine and its principal metabolite, benzoyllecgonine, were quantified in hair samples by gas chromatography–mass spectrometry, using a slight modification of a validated assay, which also determined hair opiates and methylenedioxy derivatives of amphetamines.¹⁰

Because collected hair strands were longer than 6 cm in the majority of cases (93%), it was decided to examine a 6-cm hair segment, and in the remaining 7% of cases, the entire hair shaft (shorter than 6 cm) was examined.

Briefly, after 3 dichloromethane washings, 20 mg of hair was cut into small pieces, added to the internal standards (2 ng/mg deuterated cocaine and 1 ng/mg deuterated benzoyllecgonine), and subjected to acidic digestion and solid-phase extraction by Bond-Elut Certify columns, following the instructions of the manufacturer.

After elution and evaporation of the organic layer, the analytes were derivatized with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltri-fluoroacetamide/trimethylchlorosilane, and the derivatives were separated by gas chromatography on a 95% dimethyl–5% diphenyl polysiloxane fused silica capillary column (25 m × 0.20 mm inner diameter, film thickness 0.33 μm) using helium as a carrier gas at a flow rate of 0.6 mL/min. The injector was maintained at 280°C and operated for 0.70 minute in splitless mode. The column temperature was initially programmed from 80°C to 260°C, at 40°C/min, initial time being 0.70 minute and final time being 0.50 minute, then from 260°C to 290°C, at 3°C/min, with 10 minutes final time. The transfer line temperature was 280°C. Analytes were detected using a mass analyzer operated by electron impact (70 eV) in selected ion monitoring acquisition mode. The limit of quantification was 0.2 ng/mg hair.

Statistical Analysis

Statistical analysis for the continuous variables was performed with the Student *t* test for 2 groups and analysis of variance for 3 or more groups. The Fisher exact test was used for the comparison of categorical data. For the analysis of individual percentages of exposed versus unexposed infants, the binomial test was used. Multifactorial analysis of variance was performed to assess the relationship between exposure to cocaine and the characteristics of a child at birth and at the time of clinical examination at the emergency department. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Hair samples were obtained from 90 preschool children younger than 5 years with minimum hair length of 4 cm (84 with hair longer than 6 cm and 6 with 4- to 5-cm-long hair) attending the Emergency Department of the hospital during the study period.

Hair samples were also obtained from 85 accompanying parents (both parents in 10 cases). For the other 5 children, parents were not present at the Emergency Department, so hair collection was not possible.

Of the 90 hair samples from children examined, 21 (23.3%) were positive for cocaine, with benzoyllecgonine always present in the positive samples. The median age of children exposed to cocaine versus the nonexposed was the same (median 2.62 years for both groups). Cocaine concentration in hair ranged between 0.3 and 6.0 ng/mg with a median value 1.6 ng/mg and that of benzoyllecgonine ranged between 0.2 and 1.4 ng/mg with a median value of 0.9 ng/mg. Benzoyllecgonine/cocaine ratios ranged between 0.05 and 1.1 with a median value of 0.2. One hair sample was also positive for 3,4-methylenedioxymethamphetamine and MDA and another for 6-MAM and morphine.

In 4 of the 21 positive samples, there was enough hair to be reanalyzed as 0- to 3- and 3- to 6-cm hair segments to confirm repeated exposure to cocaine in different periods. In all 4 cases, similar cocaine and benzoylecgonine concentrations were found in the 2 subsequent segments.

In 88% of the positive cases, cocaine and benzoylecgonine were also found in the hair of an accompanying parent (15 of 17 matched parent-child hair samples). In parents, the hair cocaine concentration ranged between 0.3 and 24.3 ng/mg with a median value of 1.0 ng/mg and that of benzoylecgonine ranged between 0.3 and 2.7 ng/mg with a median value of 0.8 ng/mg). A paternal hair sample positive for 3,4-methylenedioxymethamphetamine and MDA and a maternal one positive to 6-MAM and morphine matched the positive results found for these drugs in the hair of their children.

Parental ethnicity was not associated with cocaine use and subsequent exposure to the drug in children, nor was associated with maternal or paternal socioeconomic status. Nonetheless, a trend toward being Spanish ($P = 0.059$) and with an unskilled job ($P = 0.054$) was observed in mothers of exposed children. On the other hand, the children's exposure to cocaine was associated with a significantly higher number of cigarettes smoked by the father, a higher percentage of cannabis consumption by both parents, and higher maternal use of benzodiazepines and/or antidepressants (Table 1). Interestingly, none of the parents declared any consumption of cocaine or opiates at any time in their life.

Children exposed to cocaine presented a normal somatometry at birth, but they were breast-fed for a significantly shorter time during the first year of life compared with nonexposed children (Table 2). Based on parental self-reports, there were no significant differences in the number of any type of postnatal infections between children exposed and nonexposed to cocaine and, subsequently, lifetime antibiotic use and hospital admissions. However, it is worth noting that a significantly higher percentage of children exposed to cocaine presented with a weight under the 10th percentile at the time of the study.

DISCUSSION

Our study highlighted a high incidence of unsuspected exposure to cocaine using hair testing in preschool children from a low SES cohort in a Mediterranean city.

In this context, and contrary to previous studies, traditional urine screening was not used to compare with the findings of hair analysis. The goal of the study was to assess the possible repeated exposure to cocaine in young children who attended emergency rooms for a variety of reasons, without presenting symptoms of acute drug intoxication. Even if a urine screening result had matched the result of hair analysis, only the latter analysis could be considered indicative of chronic exposure to the drug.

It has to be mentioned that, in theory, a single exposure to cocaine could also have led to a positive result in hair analysis. However, although this occurrence has been demonstrated in 1 experiment in adults after the administration of intravenous/intranasal cocaine,¹⁷ the same has never been observed in the case of children exposed to a drug. Moreover,

TABLE 1. Parental Sociodemographics and Drug Consumption for the 90 Preschool Children According to Hair Analysis

	Preschool Children Not Exposed to Cocaine (n = 69)	Preschool Children Exposed to Cocaine (n = 21)
Parental sociodemographics		
Mother's nationality (%)		
Spanish	59.4	75.0
Non-Spanish	40.6	25.0
Father's nationality (%)		
Spanish	60.3	68.4
Non-Spanish	39.7	31.6
Employed mother (yes/no) (%)		
No	25.4	45.0
Mother's profession (%)		
Managerial, professional, and skilled (nonmanual)	18.5	10.0
Skilled (manual) and partly skilled	40	30
Unskilled	41.5	60
Employed father (yes/no) (%)		
No	0	0
Father's profession (%)		
Managerial, professional, and skilled (nonmanual)	20.6	10.5
Skilled (manual) and partly skilled	28.6	31.7
Unskilled	50.8	57.8
Parental drug consumption at the visit		
Tobacco smoking		
Mother (%)	29	47.6
Number of daily cigarettes, mean (SD)	2.4 (5.8)	4.7 (9.5)
Father (%)	39.7	45
Number of daily cigarettes, mean (SD)	3.8 (6.3)	7.7 (9.6)*
Alcohol consumption		
Mother (%)	27.5	19
Number of standard units of alcohol, mean (SD)	2.5 (4.9)	3.2 (8.2)
Father (%)	29	19
Number of standard units of alcohol, mean (SD)	3 (5.2)	1.2 (2.8)
Cannabis use		
Mother (%)	5.8	23.8*
Father (%)	7.2	28.6*
Opiates and cocaine use		
Mother (%)	0.0	0.0
Use during pregnancy (%)	0.0	0.0
Father (%)	0.0	0.0
Benzodiazepines or antidepressant use		
Mother (%)	1.4	23.8*
Father (%)	2.9	4.8

the analysis of 2 subsequent hair segments performed in 4 of 21 cases supported the hypothesis of repeated exposure. In addition, it is unlikely that a single exposure could have occurred in children whose parents in the majority of cases

TABLE 2. Anthropometric Characteristics and Incidence of Infections in the 90 Preschool Children According to Hair Analysis

	Preschool Children's Hair Negative for Cocaine (n = 79)	Preschool Children's Hair Positive for Cocaine (n = 21)
Children characteristics at birth		
Gestational age (yrs), mean (SD)	39 (2.1)	38 (1.8)
Weight at birth, mean (SD)	3273 (446)	3149 (637)
Length at birth, mean (SD)	49.6 (3.5)	48.9 (4.5)
Infant's sex (% of males)	47	33.3
Breast-feeding during the first year of life (yes/no) (%)		
Yes	87	66.7*
Number of months of breast-feeding, median (percentile 25th–75th)	7.0 (1.0–12.0)	6.0 (0–11.0)
Anthropometric characteristics and incidence of infections		
Age at the time of the visit, mean (SD)	2.8 (1.4)	2.2 (1.3)
Percentile weight at the time of the visit, <10th percentile (%)	1.6	11.8*
Upper tract respiratory infections [†] per year, median (percentile 25th–75th)	3.0 (1.0–5.0)	3.0 (0–4.0)
Lower tract respiratory infections [‡] in the lifetime median (percentile 25th–75th)	2.0 (0–4.0)	1.0 (0–2.0)
Other type of infections (yes/no) (%)		
Yes	50.7	66.7
Number of other type of infections [§] in the lifetime, median (percentile 25th–75th)	1.0 (1.0–2.0)	1.0 (0–1.0)
Antibiotic use (yes/no) (%)		
Yes	76.8	76.2
Number of lifetime antibiotic use, median (percentile 25th–75th)	1.0 (0–2.0)	1.0 (0–3.0)
Hospital admissions (yes/no) (%)		
Yes	40.6	30
Number of lifetime hospital admissions, median (percentile 25th–75th)	0 (0–1.0)	0 (0–1.0)

* $P < 0.05$ in relation to hair positive to cocaine.

†Common cold, rhinitis, influenza, otitis, pharyngitis, and tonsillitis.

‡Bronchiolitis, laryngotracheobronchitis, bronchitis, and pneumonia.

§Urinary tract infections, gastrointestinal infections, dermatological infections, conjunctivitis, pox, and impetigo.

were actively (or passively) exposed to cocaine, as was shown by hair testing. Finally, even in the case of a hypothetical single exposure, a high possibility of subsequent exposures has to be postulated due to the parental contact with the drug and the contaminated living environment of these children.

The long-term effects of a repeated postnatal exposure to cocaine have not been clarified yet. However, acute exposure to cocaine during childhood is associated with neurologic manifestations, such as focal and generalized seizures in children aged 8 years and younger, and alterations in mental status, including delirium stupor and coma in older children.¹⁸ Even death has been reported in cases of oral or inhaled routes of intoxication.⁷

According to some studies, prenatal exposure to cocaine seems to have a negative effect on the child's neurologic development and intellectual and emotional behavior, as a consequence of drug effect on the monoaminergic system.^{19–21} Other studies have disagreed with this finding.^{22–24} However, it is well documented that ongoing maternal and environmental risk factors (eg, drug abuse, violence, poor child care, and maternal depressive symptoms) have been associated with worse developmental outcomes in prenatally exposed children.^{25–28}

In line with those observations, our study showed that parents of cocaine-exposed children present, to a significantly higher extent, behavioral patterns with potential harmful effects for the child's health (eg, tobacco smoking, cannabis

use, benzodiazepines and/or antidepressant use, and shorter breast-feeding time). Indeed, although on the basis of parental self-reporting children exposed to cocaine did not show a higher incidence of infections and subsequent antibiotic use during their life, a high percentage of these children (11.8%) show a failure to thrive, which would require nutritional assessment and follow-up. Even if it is difficult to identify a core set of physical, cognitive, or behavioral problems that can be directly attributed to postnatal (or prenatal and postnatal) exposure to cocaine, it is well known that exposure to the drug is frequently associated with poor child care by the caregiver.

Our study shows evidence that preschool children, who are small and with a low body mass, can be exposed to the drug from environmental sources. Independent of the routes of cocaine exposure (eg, parental consumption in the household, contact with cocaine-contaminated surroundings, crawling and putting contaminated objects in the mouth, and accidental ingestion),²⁹ which is probably linked to parental active or passive exposure, there is a possible risk of subsequent severe intoxications.

The intoxications may take place at lower cocaine concentrations than those producing these effects in the adult-user population because of possibly different metabolism.^{6–8}

In addition, it is possible that these children receive poor attention within their homes because, in Spain, drug-exposed

children are not protected by any specific law promoting foster care or programmed social intervention.

Interestingly, in the same environment, 4 years ago, we reported on a hidden prenatal exposure to cocaine in 4.4% newborns, together with 5.3% and 8.7% exposure to cannabis and opiates, respectively.⁴ Taken together, these 2 outcomes demonstrate the magnitude of the problem of cocaine exposure among children in this environment.

In conclusion, the alarming prevalence of unsuspected cocaine exposure in children from low SES in our Mediterranean city supports our intention to advocate for a general hair screening for drugs of abuse to identify children from deprived environments, who might otherwise not be identified. Specific social and health interventions toward exposed children and their families may help in preventing and treating possible intellectual, emotional-behavioral, and neurologic disorders in the exposed children. This strategy could also lead to educating and counseling parents on potentially deleterious effects of cocaine available and consumed at home, even if it is not ingested in the presence of the children.

Finally, uniform guidelines should be provided for health and social service professionals to be followed when confronted with documented cocaine exposure in asymptomatic children.

REFERENCES

- UNODC. Annual Reports Questionnaire Data. Available at: http://www.unodc.org/pdf/research/wdr07/WDR_2007.pdf. Accessed April 2008.
- Observatorio Español sobre Drogas (OED). Encuesta Domiciliaria sobre Abuso de Drogas en España (EDADES). Available at: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/domiciliaria2003.pdf>. Accessed April 2008.
- Lester BM, ElSohly M, Wright LL, et al. The Maternal Lifestyle Study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics*. 2001;107:309-317.
- Pichini S, Puig C, Zuccaro P, 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.
- Taguchi N, Mian M, Shoukice M, et al. Chronic cocaine exposure in a toddler revealed by hair test. *Clin Pediatr*. 2007;46:272-275.
- García-Algar O, López N, Bonet M, et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) intoxication in an infant chronically exposed to cocaine. *The Drug Monit*. 2005;27:409-411.
- García-Algar O, López-Vilchez MA, Pacifici R, et al. Acute poisoning and chronic exposure to cocaine in a child. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:436-437.
- De Giorgio F, Rossi SS, Raitio J, et al. Cocaine found in a child's hair due to environmental exposure? *Int J Legal Med*. 2004;118:310-312.
- Rosenberg NM, Meert KL, Knazik SR, et al. Occult cocaine exposure in children. *Am J Dis Child*. 1991;145:1430-1432.
- Rosenberg NM, Meert KL, Marino D, et al. Occult cocaine and opiate exposure in children and associated physical findings. *Pediatr Emerg Care*. 1995;11:167-169.
- Rosenberg NM, Marino D, Meert KL, et al. Comparison of cocaine and opiate exposure between young urban and suburban children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1995;149:1362-1364.
- Lustbader AS, Mayes LC, McGee BA, et al. Incidence of passive exposure to crack/cocaine and clinical findings in infants seen in an outpatient service. *Pediatrics*. 1998;102:e5.
- Pichini S, Altieri L, Zuccaro P, et al. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:211-228.
- Lewis D, Moore C, Morrissey P, et al. Determination of drug exposure using hair: application to child protective cases. *Forensic Sci Int*. 1997;84:123-128.
- Klein J, Karasik T, Koten G. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse—the Canadian experience. *Forensic Sci Int*. 2000;107:281.
- Montagna M, Pöletti A, Stramesi C, et al. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int*. 2002;128:79-83.
- Henderson L, Harkey MR, Zhou C, et al. Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. dose-response relationships. *J Anal Toxicol*. 1996;20:1-12.
- Mott SH, Packer RJ, Soblin SJ. Neurologic manifestations of cocaine exposure in childhood. *Pediatrics*. 1994;93:557-560.
- Mayes LC, Grillon C, Granger R, et al. Regulation of arousal and attention in preschool children exposed to cocaine prenatally. *Ann NY Acad Sci*. 1998;846:126-143.
- Bennett DS, Bendersky 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;38:648-658.
- Singer LT, Arendt R, Minnes S, et al. Cognitive and motor outcomes of cocaine-exposed infants. *JAMA*. 2002;287:1952-1960.
- Hart H, Mahmud E, Betancourt L, et al. Children with in utero cocaine exposure do not differ from control subjects on intelligence testing. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;151:1237-1241.
- Frank DA, Rose-Jacobs R, Beeghly M, et al. Level of prenatal cocaine exposure and 48-month IQ: importance of preschool enrichment. *Neurotoxicol Teratol*. 2005;27:15-28.
- Singer LT, Minnes S, Short E, et al. Cognitive outcomes of preschool children with prenatal cocaine exposure. *JAMA*. 2004;291:2448-2456.
- Linares TJ, Singer LT, Kitchner HL, et al. Mental health outcomes of cocaine-exposed children at years of age. *J Pediatr Psychology*. 2006;31:85-97.
- Shuler ME, Nair P, Kettinger L. Drug-exposed infants and development outcome. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157:133-138.
- Accornero VH, Morrow CE, Bandura ES, et al. Behavioral outcome of preschoolers exposed prenatally to cocaine: role of maternal behavioral health. *J Pediatr Psychology*. 2002;27:259-269.
- Bada HS, Das A, Bauer CR, et al. Impact of prenatal cocaine on child behavior problems through school age. *Pediatrics*. 2007;119:e348-e359.
- Miczekowski T. Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci Int*. 1997;84:87-111.

ARTÍCULO ANEXO 3

**ULTRASENSITIVE DETECTION OF NICOTINE AND
COTININE IN TEETH BY HIGH-PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS
SPECTROMETRY**

Emilia Marchei, **Xavier Joya**, Oscar Garcia-Algar, Oriol Vall, Roberta
Pacifci, Simona Pichini

Rapid Communications Mass Spectrometry 2008 Aug;22(16):2609-12.

Antecedentes y objetivos: En 2003, nuestro grupo desarrolló una técnica basada en la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas para determinar los niveles de NIC y su metabolito principal: COT en dientes (Pascual et al., 2003). Los resultados obtenidos entonces sirvieron para proponer a los dientes de leche como una prometedora matriz en la cual evaluar y categorizar los diferentes tipos de exposición al humo de tabaco durante toda la infancia. Los dientes tiene la característica de que empiezan a formarse durante la vida fetal y duran toda la infancia (en general, estos se pierden a los 6 – 8 años de edad). En efecto, la COT en fluidos biológicos (por ejemplo la orina, la sangre o el fluido oral) representa el biomarcador más adecuado para reflejar la exposición al tabaco durante un periodo corto (días). Sin embargo se ha comprobado que la NIC en pelo aporta una mayor sensibilidad a la hora de asesorar acerca de la exposición a tabaco durante meses. Sin embargo, para los dientes, se han hallado niveles suficientemente elevados de ambos metabolitos (Garcia-Algar et al., 2003; Puig et al., 2008).

La mayor limitación de la GC/MS para analizar NIC y COT en dientes es la insuficiente sensibilidad para detectar y cuantificar estos metabolitos en estos dientes que son pequeños y que por lo tanto se parte de una baja cantidad de muestra. Por ello, para obtener el límite de detección de 2 ng. De NIC y COT es necesario partir de una cantidad de muestra de 80 – 150 mg. de dientes para poder hallar los niveles medios que se encuentran en este material, el cual suele rondar los 15 – 40 pg/mg (Garcia-Algar et al., 2003).

El ánimo de este estudio es medir la exposición acumulativa al humo del tabaco en niños pertenecientes a una cohorte en la que se intentar determinar el efecto de diferentes determinantes ambientales (entre ellos el humo de tabaco) sobre la aparición de asma y atopía (Asthma Multicenter Infant Cohort Study, AMICS). Más de la mitad de las muestras que se consiguieron pesaron menos de 70 mg., por lo que un diseñar un método mucho más

Publicaciones anexas

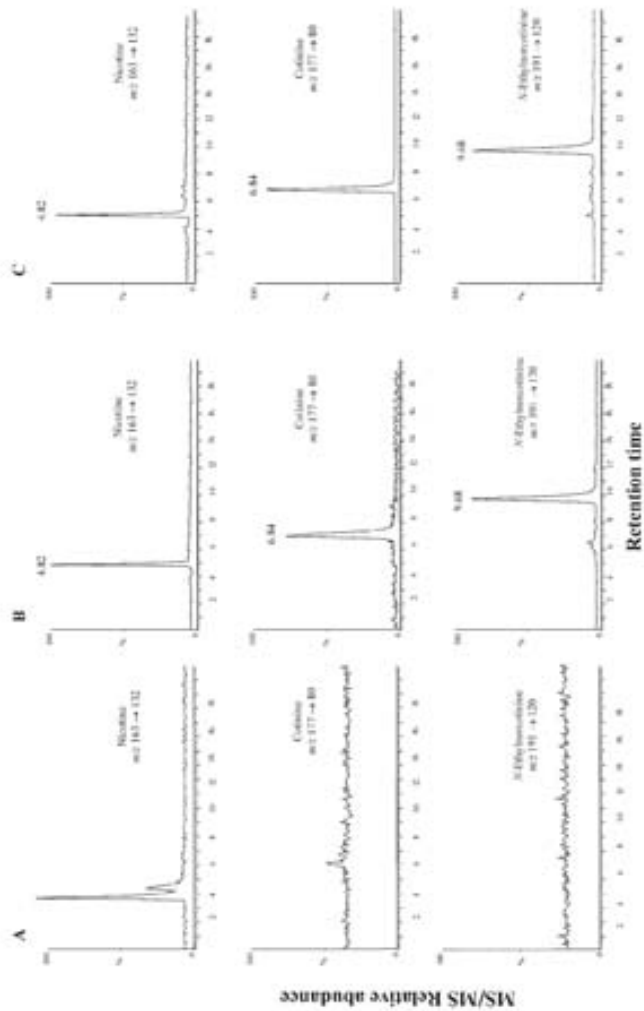
sensible era necesario. Por ello, este trabajo muestra el desarrollo y la validación de un método basado en la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem para la cuantificación simultánea de NIC y COT en dientes de leche.

Material y métodos: Las muestras fueron donadas por niños del estudio AMICS. En modo de resumen, en primer lugar, las muestras fueron descontaminadas por triplicado con cloruro de metileno para eliminar la contaminación externa. Seguidamente, los dientes fueron pulverizados utilizando un molino de bolas durante 3.5 min. A una muestra de 20 mg del extracto dental se le añadió 1 ng. de 1'-N-etilnorcotinina (NENC) (Sigma – Aldrich, Milán, Italia) como estándar interno. Todo ello se incubó con 1 mL de NaOH 1 N a 80 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó la muestra y se ajustó el pH a 6.0. La mezcla acuosa se extrajo mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando columnas Isolute HXC que fueron acondicionadas con metanol, agua desionizada y ácido acético 2 M. Acto seguido, se añadió la muestra y se lavó la columna con agua desionizada, HCl 0.1 M y metanol. La NIC y la COT se eluyeron usando una mezcla de cloruro de metileno y isopropanol (80:20 *v/v*) al 2% de amoníaco. La fase orgánica se evaporó a temperatura ambiente (para evitar la pérdida de NIC a elevadas temperaturas) y se disolvió en 100 µL de fase móvil (0.01% ácido fórmico/metanol/acetonitrilo (73:36:2 *v/v/v*)). Un volumen de 30 µL se inyectó en el LC-MS/MS. La separación cromatográfica tuvo lugar utilizando una columna XDB-C8 (100 x 3.0 mm, 3.5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) con un flujo de fase móvil de 0.3 mL/min.

Resultados: A continuación se muestra: (A) un extracto de una muestra libre de droga, (B) un extracto libre de droga que contiene 10 pg/mg de NIC, 5 pg/mg de COT y 100 pg/mg de NENC y (C) un extracto de 20 mg

de diente que contiene 13.69 pg/mg de NIC y 20.32 pg/mg de COT (Figura 9).

Figura 9. (A) un extracto de una muestra libre de droga, (B) un extracto libre de droga que contiene 10 pg/mg de NIC, 5 pg/mg de COT y 100 pg/mg de NENC y (C) un extracto de 20 mg de diente que contiene 13.69 pg/mg de NIC y 20.32 pg/mg de COT



Publicaciones anexas

Antes de la aplicación de las muestras reales, el método fue testado en un protocolo de validación estandarizado. Debido a que fue difícil obtener suficiente muestra de dientes de leche sin NIC y COT, el método fue probado utilizando curvas de calibración preparadas en dientes libres de NIC y COT y en agua. La correlación existente entre las curvas preparadas en diente y en agua fue chequeada para comprobar el efecto matriz. Estas curvas se prepararon utilizando 10, 50, 100, 200, 250 pg/mg de NIC y 5, 10, 100, 200, 250 pg/mg de COT en 20 mg de dientes y en 100 µL de agua. Los controles de calidad fueron de 225 pg/mg para la NIC y la COT (para el control alto), 150 pg/mg (para el control medio) y 15 pg/mg para la NIC y la COT (para el control bajo). Los controles de calidad preparados en agua fueron cuantificados utilizando ambas curvas de calibración y los resultados que se obtuvieron fueron idénticos.

La recuperación absoluta de los analitos (media, SD) de las cinco réplicas de cada uno de los niveles del control de calidad fueron 75.1% (2.1) a 78.0% (3.2) para la NIC y 87.1% (3.5) a 88.0% (1.2) para la COT. El método mostró una excelente linealidad a través de todo el rango estudiado. Los datos de la validación obtenidos están recogidos en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Precisión y exactitud intra-ensayo ($n=5$) e inter-ensayo ($n=25$) para el análisis de nicotina y cotinina en dientes mediante LC-MS/MS

Compuestos	Concentración pg/mg en diente	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
		Precisión (RSD)*	Exactitud (% Error) **	Precisión (RSD)*	Exactitud (% Error) **
Nicotina	15	13.8	14.2	14.9	14.5
	150	0.7	14.4	14.5	10.9
	225	10.7	7.6	12.0	10.7
Cotinina	15	10.6	10.9	9.5	13.9
	150	8.0	7.0	5.1	6.0
	250	9.4	7.2	6.7	4.6

* RSD: desviación estándar relativa de las concentraciones calculadas para los controles de calidad

** Error relativo de las concentraciones calculadas

Las diferencias estimadas en los CQ en ambas curvas de calibración (dientes y agua) no mostraron sesgos ($p > 0.05$), siendo siempre inferiores al 4.1% para la NIC y 4.5% para la COT. El límite de detección y el límite de cuantificación fue de 3.3 y 10 pg/mg de dientes para la NIC y 1.6 pg/mg y 5.0 pg/mg para la COT. Los LOQ testados para la precisión y la exactitud del método mostraron siempre coeficientes de variación inferiores al 20%. Los valores de precisión y exactitud intraensayo e interensayo fueron aceptables y siempre inferiores al 15%, según criterios internacionalmente establecidos (**Tabla 15**).

El método validado se aplicó para determinar los niveles de NIC y COT en dientes de leche donados por niños pertenecientes a la cohorte AMICS. Los resultados obtenidos se reflejan en la **Tabla 16**. Estos prometedores resultados apoyan la teoría de incluir la determinación de NIC en dientes de leche para monitorizar y categorizar la exposición acumulativa al humo de tabaco ambiental durante los primeros años de vida.

Tabla 16. Asociación entre la declaración por cuestionario de los padres referente al consumo de tabaco y exposición y los niveles de nicotina y cotinina determinados en dientes de leche

Características	No	Nicotina		Cotinina	
		Concentración media, pg/mg *	Valor <i>p</i>	Concentración media, pg/mg *	Valor <i>p</i>
Tipo de fumador por cuestionario					
Padres no fumadores	25	14.11		8.76	
Padre o madre fumador	23	22.51	0.006 †	11.25	0.169 †
Padre y madre fumadores	16	27.49	0.001 †	11.57	0.167 †
Otros fumadores en el ambiente					
No	57	18.28		9.75	
Sí	7	36.56	0.003 †	15.68	0.047 †

* Expresado como media geométrica

† En comparación con la primera categoría

RCM

Letter to the Editor

To the Editor-in-Chief
Sir,

Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry

In 2003, we developed and validated a gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) assay to measure nicotine (NIC) and its principal metabolite cotinine (COT) in teeth.¹ The method was applied to the analysis of these two compounds in deciduous teeth from children of both non-smoking and smoking parents. The results obtained supported NIC analysis in teeth as a promising non-invasive tool for monitoring and categorizing cumulative exposure to environmental tobacco smoke (ETS) from fetal life (when tooth formation starts) to the entire childhood (deciduous teeth are generally lost between 6–8 years of age).² Indeed, whereas COT in body fluids (e.g. urine, blood and oral fluid) represents an adequate biomarker to assess exposure to ETS in children during a short period of time (days), and hair NIC proved useful to assess infant exposure to ETS over longer time periods (months), NIC and COT in teeth account for the entire childhood.^{2,3}

The major drawback of the GC/MS method for teeth NIC and COT analysis was the insufficient sensitivity to detect and quantify NIC and COT in low weight teeth. Indeed, the lower limit of quantification of 2 ng for both NIC and COT required a minimum of 80–150 mg pulverized tooth material to quantify both substances, which were present in the range of 15–40 pg/mg tooth.²

Since we aimed to measure cumulative exposure to ETS in children from a cohort study on the effects of environmental exposures in the inception of atopy and asthma (Asthma

Multicenter Infant Cohort Study, AMICS),³ and more than 50% of the collected deciduous teeth weighed less than 70 mg, we needed an ultrasensitive method to detect NIC and COT in teeth of low weight.

Analytical methodologies involving liquid chromatography (LC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) as detector are the best choice to detect and separate minute amounts of components of different hydrophilicity contained in complex biological matrices.⁴ In the light of this evidence, we developed an LC electrospray ionization (ESI-MS/MS) method for simultaneous determination of NIC and COT in teeth.

Teeth, donated by children from the AMICS cohort, were decontaminated three times with 2 mL methylene chloride. Organic washings were analyzed to identify any NIC deposited by external contamination. Subsequently, each tooth was pulverized by a ball mill (mixer mill MM 200; Retsch, GmbH & Co., Haan, Germany) for 3.5 min at 30 amplitude units. A sample of 20 mg of the powdered tooth, to which 1 ng 1'-N-ethylnicotinine (NENC, Sigma-Aldrich, Milano, Italy) was added as internal standard, was incubated in 1 mL 1 N NaOH at 80 °C for 30 min. After incubation, the alkaline mixture was centrifuged at 3000 rpm for 3 min and the pH was adjusted to 6.0 using 60 µL concentrated acetic acid. The aqueous mixture, diluted with 1 mL of deionized water, underwent a solid-phase extraction procedure. Isolate HClX extraction columns were conditioned with 3 mL methanol, 3 mL deionized water and 1 mL 2 M concentrated acetic acid. The mixture was added to the column that was then washed with 3 mL deionized water, 1 mL 0.1 M HCl and 3 mL methanol. NIC and COT were eluted from the cartridges using 3 mL methylene chloride/isopropyl alcohol (80:20, v/v) with 2% ammonium hydroxide. The organic phase was evaporated under a nitrogen stream at ambient temperature (to prevent NIC loss at higher temperatures) and redissolved in 100 µL LC mobile phase (0.01% formic acid/methanol/acetonitrile, 73:25:2, v/v/v). A 30 µL volume was injected into the LC/MS/MS system.

The LC/MS/MS analyses were performed using an Alliance HPLC system (Waters, Eiten-Leur, The Netherlands) interfaced to a Micromass Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an ESI probe. Chromatographic separation was achieved using an Eclipse XDB-C8 column (100 × 3.0 mm, 3.5 µm; Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA) with a mobile phase flow rate of 0.3 mL/min. MS/MS characterization of the compounds under investigation was achieved using the triple quadrupole using an ESI probe. The analytes dissolved in methanol at a concentration of 10 mg/L were infused through an integrated syringe pump into the ESI probe at a rate of 10 µL/min for tuning the mass spectrometer and optimizing the acquisition parameters. The following optimized conditions were used: collision energy at 15 eV for NIC, at 18 eV for COT and 20 eV for NENC; capillary voltage at 3.0 kV, cone voltage at 25 V, source temperature at 120 °C, and desolvation temperature at 400 °C. The cone and desolvation gas flows were set at 50 and 400 L/h, respectively. The collision gas was argon at a collision cell pressure of 0.25 Pa (2.5 × 10⁻³ mbar). The transitions chosen for each compounds were: *m/z* 163 → 132, 163 → 120 and 163 → 106 for nicotine, *m/z* 177 → 80, 177 → 146 and 177 → 98 for cotinine and *m/z* 191 → 120, 191 → 148 and 191 → 80 for NENC. The transitions shown in bold face were used for compound quantification.

Chromatograms of an extract of a drug-free tooth sample, an extract of a drug-free tooth spiked with 10 pg/mg NIC, 5 pg/mg COT and 100 pg/mg NENC, (C) an extract of 20 mg tooth sample containing 13.69 pg/mg NIC and 20.32 pg/mg COT are shown in Figs. 1(A)–(C), respectively.

Prior to application to real samples, the method was tested in a validation protocol following the accepted criteria for bioanalytical method validation.^{5,6} Selectivity, carryover, matrix effect, recovery, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and stability were determined.

Because it was difficult to obtain enough deciduous teeth free of NIC and COT, the method was validated using extracted

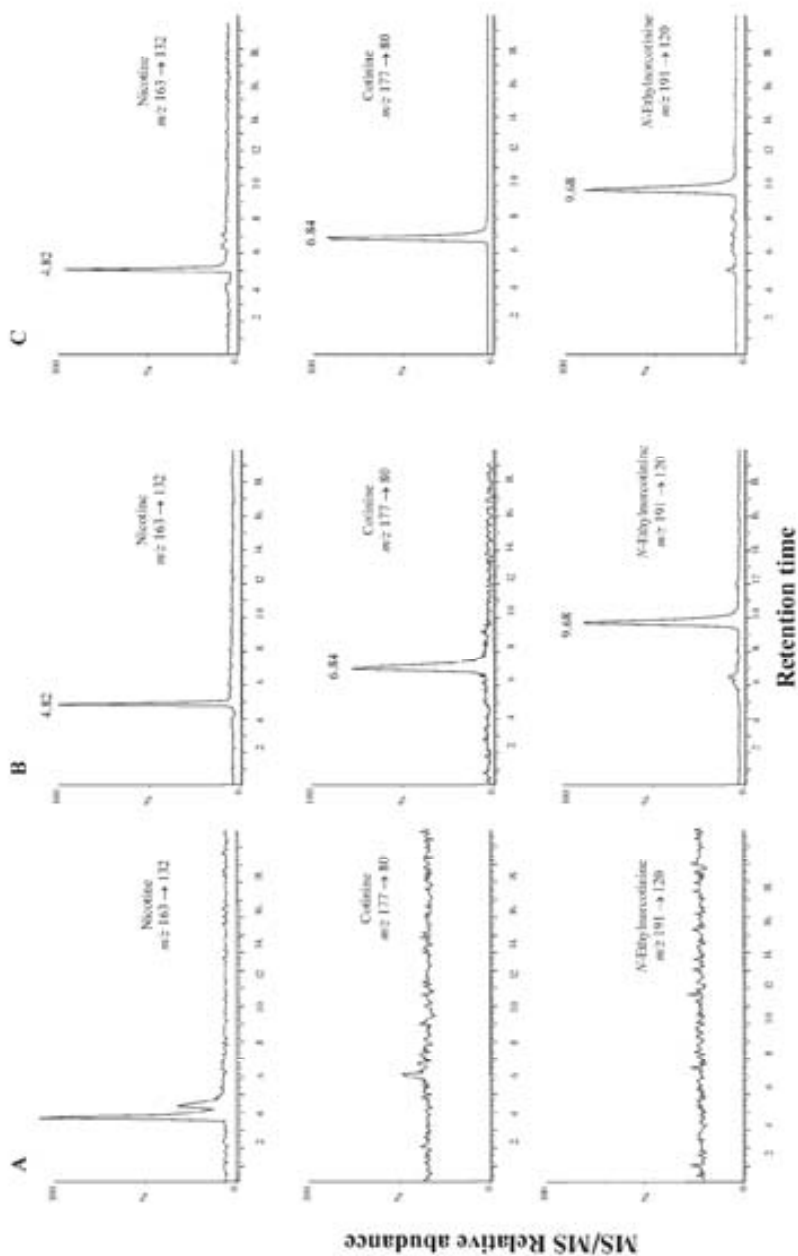


Figure 1. (A) An extract of a drug-free tooth sample, (B) an extract of a drug-free tooth sample containing 10 pg/mg NIC, 5 pg/mg COT and 100 pg/mg NENC, and (C) an extract of 20 mg tooth sample containing 13.69 pg/mg NIC and 20.32 pg/mg COT.

Table 1. Intra- ($n = 5$) and inter-assay ($n = 25$) precision and accuracy for the LC/MS/MS analysis of nicotine and cotinine

Compounds	Concentration pg/mg teeth	Intra-assay		Inter-assay	
		Precision (RSD) ^a	Accuracy (Error %) ^b	Precision (RSD) ^a	Accuracy (Error %) ^b
Nicotine	15	13.8	14.2	14.9	14.5
	150	0.7	14.4	14.5	10.9
	225	10.7	7.6	12.0	10.7
Cotinine	15	10.6	10.9	9.5	13.9
	150	8.0	7.0	5.1	6.0
	225	9.4	7.2	6.7	4.6

^aRSD: Relative standard deviation of concentrations calculated for quality control samples.

^bRelative error of the calculated concentrations.

calibration curves prepared in NIC- and COT-free pooled teeth and in water. The correlation between calibration curves extracted from pulverized teeth or water solutions was tested in order to check for the matrix effect and validate if water could be used instead of teeth samples for the preparation of calibration and control samples. Calibration standards containing 10, 50, 100, 200, 250 pg/mg NIC and 5, 10, 100, 200, 250 pg/mg for COT were prepared in both, 20 mg drug-free (blank) teeth and 100 μ L water. Quality control (QC) samples of 225 pg/mg NIC and COT (high control), 150 pg/mg NIC and COT (medium control) and 15 pg/mg NIC and COT (low control) and samples at the limit of quantification (LOQ) of each analyte, prepared in drug-free teeth and water, were stored at -20° C. To ascertain the differences between water and drug-free teeth for the preparation of calibration curves, the corresponding slopes and intercepts were compared using Student's *t*-tests. Furthermore, QC samples prepared in water were quantified by using both calibration curves to ascertain that results obtained were identical. Peak area ratios between

the respective analytes and internal standard were used for calculations. Validation parameters were determined as previously reported.⁷

The additional peaks observed on the chromatogram, due to endogenous substances or drugs of abuse spiked in blank teeth and carried through the entire procedure, did not interfere with the assay. Blank samples injected after the highest point of the calibration curve did not present any traces of carryover. The comparison between peak areas of analytes spiked in extracted blank pooled teeth versus those of pure diluted standards showed less than 10% analytical signal suppression due to matrix effect. Absolute analytical recoveries (mean \pm standard deviation (SD) of five replicates of the three QC samples) ranged from 75.1 ± 2.1 to $78.0 \pm 3.2\%$ for NIC and from 87.1 ± 3.5 to $88.0 \pm 1.2\%$ for COT.

The method exhibited excellent linearity along the calibration range studied. Mean calibration curves ($n = 5$) in blank pooled teeth for NIC and COT were: slope 0.013, intercept 0.246, determination coefficient r^2 0.992 and slope 0.088, intercept 0.173, determination coefficient r^2 0.995, respectively.

Calibration curves prepared in water or deciduous teeth for both NIC and COT were not statistically different with respect to slope and intercept ($p > 0.05$). Differences in QC concentrations estimated using both calibration curves showed no bias ($p > 0.05$), being always below 4.1% for NIC and below 4.5% for COT. Limit of detection and limit of quantification, calculated from the SD of the mean noise level over the retention time window of each analyte ($n = 5$), were 3.3 and 10 pg/mg teeth for NIC and 1.6 and 5 pg/mg teeth for COT. Limits of quantification tested for precision and accuracy had coefficients of variations less than 20%. The intra-assay and inter-assay precision and accuracy values, always better than 15%, were within the internationally established acceptance criteria^{8,9} (Table 1).

The validated assay has been applied to the NIC and COT analysis in deciduous teeth of children from the AMICS cohort study, which associates biomarkers of pre- and post-natal exposure to ETS with the inception of atopy and asthma. Preliminary results on 64 deciduous teeth confirmed the fact that only teeth NIC statistically

Table 2. Association between self-reported parental smoking habit and child's exposure to ETS measured by teeth nicotine and cotinine

Characteristic	No	Nicotine		Cotinine	
		Mean concentration, pg/mg of tooth ^a	<i>p</i> value	Mean concentration, pg/mg of tooth	<i>p</i> value
Parental smoking by questionnaire					
Non-smoking parents	25	14.11		8.76	
Father or mother	23	22.51	0.006 ^b	11.25	0.169 ^b
Both parents smokers	16	27.49	0.001 ^b	11.57	0.167 ^b
Other smokers in environment					
No	57	18.28		9.75	
Yes	7	36.56	0.003 ^b	15.68	0.047 ^b

^aExpressed as geometric mean.

^bIn comparison with the first category.

discriminated between children exposed and non-exposed to parental smoking and to that of other smokers present in child environment, as measured by questionnaire, (Table 2). These promising results support the inclusion of teeth NIC in epidemiological studies for monitoring and categorizing cumulative exposure to environmental tobacco smoke during the entire child life.

Emilia Marchei¹, Xavier Jover^{2,3},
Oscar Garcia-Algar^{2,3}, Oriol Vall^{1,2,3},
Roberta Pacifici¹, and Simona Pichini^{1,2}
¹Department of Therapeutic Research
and Medicines Evaluation, Istituto
Superiore di Sanità, Rome, Italy
²Unitat de Recerca Infància i Entorn
(URIE), Institut Municipal
d'Investigació Mèdica-Hospital del
Mar, Barcelona, Spain

³Departament de Pediatria, Universitat
Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

*Correspondence to: S. Pichini, Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy.
E-mail: simona.pichini@iss.it

REFERENCES

- Pascual JA, Diaz D, Segura J, Garcia-Algar O, Vall O, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 2853.
- Garcia-Algar O, Vall O, Segura J, Pascual JA, Diaz D, Muñoz L, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S. *J. Am. Med. Assn.* 2003; **290**: 196.
- Puig C, Garcia-Algar O, Monleon T, Pacifici R, Zuccaro P, Sanyer J, Figueras C, Pichini S, Vall O. *BMC Public Health* 2008; **8**: 47.
- Manquet P. *Ther. Drug Monit.* 2002; **24**: 255.
- Guidance for Industry, Bioanalytical of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001. Available: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252nl.htm>
- ICH-Topic Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 1996.
- Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, Vagnarelli F, Durgbanshi A, Garcia-algar O, Vall O, Pichini S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; **21**: 2693.
- Morini L, Marchei E, Pellegrini M, Groppi A, Stramesi C, Vagnarelli F, Garcia-algar O, Pacifici R, Pichini S. *Ther. Drug Monit.* 2008; in press.

Received 23 May 2008

Revised 12 June 2008

Accepted 14 June 2008

ARTÍCULO ANEXO 4

**ACUTE HEROIN INTOXICATION IN A BABY
CHRONICALLY
EXPOSED TO COCAINE AND HEROIN: A CASE
REPORT**

Xavier Joya, Bibiana Fríguls, Marta Simó, Ester Civit, Rafael de la
Torre, Antonio Palomeque, Oriol Vall, Simona Pichini, Oscar Garcia-
Algar

Journal of Medical Case Reports 2011, 5:288

Antecedentes y objetivos: Durante las últimas dos décadas, ha aumentado de forma sustancial el consumo de sustancias ilícitas en Europa, particularmente este aumento en el consumo se ha observado en países mediterráneos, cómo es el caso de España. Además, también se ha demostrado que los cuestionarios distan mucho de ser la mejor herramienta para detectar el consumo a sustancias de abuso (García-Algar et al., 2009). Por este motivo, además de los cuestionarios, es recomendable utilizar marcadores biológicos que sean sensibles a la detección del consumo de sustancias de abuso y que aporten información retrospectiva en el tiempo (Kintz et al., 2006). El análisis de drogas en pelo es especialmente útil para el asesoramiento de exposiciones prenatales y postnatales a sustancias de abuso (Joya et al., 2009; Klein et al., 2000). La razón de la escritura de este manuscrito es la necesidad de evaluar de forma objetiva la exposición a largo plazo de un niño en un caso de custodia tutelar y mostrar que en los casos de intoxicación aguda por drogas de abuso, suele ser habitual encontrar una exposición pasiva y repetida a lo largo del tiempo.

Presentación del caso: un lactante de un mes de edad, de raza caucásica fue ingresado en el servicio de urgencias pediátricas con dificultad respiratoria. En el examen físico, el paciente mostró cianosis generalizada, hipotonía muscular y insuficiencia respiratoria. La madre, admitió haber consumido cannabis y bebidas alcohólicas la noche anterior. El recuento celular y la bioquímica fueron normales pero la gasometría venosa demostró una acidosis respiratoria. Acto seguido, se realizó un test rápido para drogas de abuso en orina (CEDIA; Microgenics, Barcelona, España) reveló un resultado positivo para opiáceos. El resultado obtenido fue analizando mediante GC/MS confirmado la presencia de metabolitos derivados de la heroína (MOR = 312 ng/mL y COD = 26 ng/mL).

Publicaciones anexas

A las 48h el paciente se recuperó completamente, abandonó el hospital y fue separado de sus padres- Debido a la elevada sospecha de exposición repetida a sustancias de abuso, se solicitó el análisis en pelo de las principales drogas de abuso mediante GC/MS. Las tres muestras recogidas (12 cm. de la madre, 3 cm. del padre y 2 cm. del paciente) fueron analizadas para la determinación de cocaína, benzoilecgonina, Δ -9-tetrahidrocannabinol, 6-monoacetilmorfina, morfina y codeína (Pichini et al., 1999). En el pelo materno se pudo realizar un análisis segmentario, obteniéndose así 4 segmentos de 3 cm. cada uno. Los resultados del test demostraron el consumo paterno y materno de COC y HER, hecho que explicaría la exposición del lactante (**Tabla 17**). Tanto el paciente cómo sus padres presentaban niveles elevados del metabolito principal de la HER, el 6-MAM.

Tabla 17. Hallazgos toxicológicos en las muestras de pelo del paciente y sus padres

Muestras	Longitud del pelo (cm.)	COC (ng/mg)	BE (ng/mg)	MOR (ng/mg)	6-MAM (ng/mg)	COD (ng/mg)
Paciente	2	17.5	2.2	2.4	8.1	0.4
Padre	3	11.8	1.7	6.4	8.0	1.8
Madre	12					
	0 – 3	2.5	1.6	0.4	0.8	0.1
	3 – 6	3.7	2.1	0.2	0.6	0.1
	6 – 9	4.4	4.3	0.2	0.7	0.05
	9 – 12	3.0	5.5	0.3	0.7	0.1

6-monoacetilmorfina (6-MAM); Benzoilecgonina (BE); Cocaine (COC); Codeína (COD); Morfina (MOR)

Discusión y conclusiones: En contraste con el análisis toxicológico en matrices convencionales, las cuales aportan información muy preciada para el asesoramiento de la exposición aguda, la determinación de estas mismas sustancias en pelo aporta información muy valiosa de la exposición pasada a estos tóxicos. El asesoramiento de la exposición aguda y repetida mediante biomarcadores objetivos proporciona herramientas muy valiosas para el seguimiento de estos niños que viven en ambientes de elevado riesgo de exposición a drogas.

CASE REPORT

Open Access

Acute heroin intoxication in a baby chronically exposed to cocaine and heroin: a case report

Xavier Joya¹, Bibiana Friguls¹, Marta Simó², Ester Civit³, Rafael de la Torre³, Antonio Palomeque², Oriol Valli¹, Simona Pichini⁴ and Oscar Garcia-Algar^{1*}

Abstract

Introduction: Acute intoxication with drugs of abuse in children is often only the tip of the iceberg, actually hiding chronic exposure. Analysis using non-conventional matrices such as hair can provide long-term information about exposure to recreational drugs.

Case presentation: We report the case of a one-month-old Caucasian boy admitted to our pediatric emergency unit with respiratory distress and neurological abnormalities. A routine urine test was positive for opiates, suggesting an acute opiate ingestion. No other drugs of misuse, such as cocaine, cannabis, amphetamines or derivatives, were detected in the baby's urine. Subsequently, hair samples from the baby and the parents were collected to evaluate the possibility of chronic exposure to drug misuse by segmental analysis. Opiates and cocaine metabolites were detected in hair samples from the baby boy and his parents.

Conclusions: In light of these and previous results, we recommend hair analysis in babies and children from risky environments to detect exposure to heroin and other drug misuse, which could provide the basis for specific social and health interventions.

Introduction

During the past two decades, there has been a substantial increase in illicit drug consumption in Europe, particularly in Mediterranean areas such as Spain [1]. It has been proven repeatedly that questionnaires with respect to drug use are far from being accurate [2]. For this reason, in addition to questionnaires, it is advisable to use an objective biological marker that maintains its sensitivity for at least a few days after the end of the exposure and that may yield a cumulative picture of repeated exposure to drug misuse. Hair, a well established matrix for this purpose, allows a relatively long retrospective identification of a large number of substances that usually disappear quickly from blood and urine [3].

Hair testing is especially useful in the case of newborns and children for the assessment of both pre-natal and post-natal exposure to drug misuse [4,5]. The rationale for the approach of this manuscript is the need for objective assessment of long-term exposure in child

custody cases, possible parent prosecution for exposing children passively or actively to drug misuse, and for the disclosure of repeated exposure to cocaine in cases of severe acute intoxication with cocaine alone or together with other illicit drugs. Hair is a biological matrix that permits a relatively long retrospective identification of substances; this long window of detection includes months to years, and the growth rate according to the Society of Hair Testing is 1 cm per month.

Case presentation

A one-month-old Caucasian breastfed baby was admitted to the emergency department (ED) with respiratory distress. The parents mentioned that the baby showed superficial breathing with pauses during the past hour. On physical examination, our patient presented with generalized cyanosis, fixed and constricted pupils, muscular hypotony and respiratory failure. The mother admitted consumption of cannabis and beer the night before followed by breastfeeding of the baby afterward. A blood cell count and serum biochemistry were unremarkable, but the venous gasometrical results showed respiratory acidosis. At that point, the mother

* Correspondence: 90458@imasimim.es

¹Unitat de Recerca Infància i Entorn (UIRE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)-Hospital del Mar, Barcelona, Spain
 Full list of author information is available at the end of the article

mentioned the possible ingestion of acetaminophen-codeine tablets. A screening for principal misused drugs (opiates, cocaine, cannabis, amphetamine) in urine was performed by a cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA; Microgenics, Barcelona, Spain), and a positive result for opiates was obtained. Subsequently, a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) urine analysis [6] confirmed the presence of heroin metabolites (free and conjugate morphine for a total of 312 ng/mL and codeine at 26 ng/mL).

In the ED, our patient experienced a not-limited breathing pause, so he was intubated and mechanically ventilated. He was transferred to the pediatric intensive care unit with fentanyl infusion. Analysis of his cerebrospinal fluid was normal, and central nervous system culture results were negative. Also, nasopharyngeal swab results were negative for common respiratory viruses. An ultrasound examination of the brain through the anterior fontanel was unremarkable, and echocardiography showed only a patent oval foramen. After 48 hours, our patient had correct respiratory response, and mechanical ventilation was discontinued. Our patient recovered completely without any neurological impairment and was discharged from the hospital and held by the authorities to keep him away from his parents. There was a strong suspicion that our patient had been in an environment of drug misuse by the mother or by other caregivers. To verify the suspicion, a GC-MS hair analysis for our patient and his parents was suggested. The parents agreed to the analysis, and hair was cut from the vertex region of the scalp.

All three hair samples (12 cm from the mother, 3 cm from the father and 2 cm from our patient) were analyzed for cocaine, benzoylecgonine, δ -9-tetrahydrocannabinol, 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine [7]. In addition, the mother's hair was also submitted to segmental analysis corresponding approximately to the lifetime of the child, including pre-natal life. For the segmental analysis, the hair sample was divided into four segments of 3 cm each. After a standardized washing procedure, the samples were tested using a GC-MS assay [7]. The mother's hair appeared unbleached and

not treated with any aggressive cosmetics such as straighteners. The results of the hair testing suggested parental cocaine and heroin consumption and a likely pre-natal and post-natal exposure of the baby to these drugs (Table 1). Our patient and his father had higher concentrations of the principal metabolite, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), than the mother's hair.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first case reported in the literature describing heroin intoxication in a baby chronically exposed to heroin and cocaine, probably caused by the combined effect of chronic exposure through the placenta (pre-natal), breast milk and skin (post-natal) and acute exposure through smoke and breast milk.

The results of our patient's urine test revealed acute heroin intoxication. The mother's declaration regarding the possible ingestion of acetaminophen-codeine by our patient proved to be false because urine analysis revealed the main presence of free and conjugated morphine and a lower proportion of codeine. This first result suggests an acute intoxication through breast milk or passive exposure by environmental inhalation of smoked heroin. The mother refused breast milk sampling and denied personal use of opiates and cocaine, as well as the contact of the child with other drug users or the presence of illicit substances in the household.

A second relevant result in this case was that hair testing disclosed parental repeated consumption of heroin (indeed, its principal metabolite, 6-MAM, was always identified in all the hair samples) and cocaine and the subsequent repeated passive exposure of our patient to these two misused drugs.

Because our patient was only 1 month old, the high concentration of opiates and cocaine in his hair could not be attributed unequivocally to pre-natal or post-natal exposure to these misused drugs. These concentrations could be explained by any of these scenarios: permanent fetoplacental contact with a drug-consuming mother during intra-uterine life, passive inhalation or forced drug misuse, or by our patient putting contaminated

Table 1 Toxicological findings in hair from our patient and his parents

Specimens	Length of hair (cm)	Cocaine (ng/mg)	Benzoylecgonine (ng/mg)	Morphine (ng/mg)	6-MAM (ng/mg)	Codeine (ng/mg)
Patient's hair	2	17.5	2.2	2.4	8.1	0.4
Father's hair	3	11.8	1.7	6.4	8.0	1.8
Mother's hair	12 (total)					
	0-3	2.5	1.6	0.4	0.8	0.1
	3-6	3.7	2.1	0.2	0.6	0.1
	6-9	4.4	4.3	0.2	0.7	0.05
	9-12	3.0	5.5	0.3	0.7	0.1

6-MAM = 6-monoacetylmorphine.

objects in his mouth [8,9]. In fact, the source and exact timing of exposure are of little consequence; the case report shows that repeated exposure of our patient to cocaine and heroin was objectively highlighted by testing in two different biological matrices accounting for different time windows of exposure [10].

In Spain, heroin and cocaine are usually consumed together by smoking, and it must be recommended not to use them in areas where newborns and babies may reside or be present.

Conclusions

In contrast to drug testing in conventional matrices, which can account for acute exposure, testing in non-conventional matrices can shed light on past and possibly repeated exposure and can disclose the possibility of a baby living in an unsafe and high-risk environment in which exposure to drug misuse takes place. The accurate assessment of both acute and repeated exposure of a child to drug misuse by the use of objective biomarkers is of major importance because it provides the basis for appropriate immediate treatment, adequate medical follow-up and social intervention. Finally, in cases of acute exposure to drug misuse, we suggest further investigation of the possibility of chronic exposure as well.

Consent

Written informed consent was obtained from our patient's next-of-kin for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Author details

¹Unitat de Recerca Infància i Entorn (UIRE), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)-Hospital del Mar, Barcelona, Spain. ²Departament de Pediatría, Hospital San Joan de Déu, Barcelona, Spain. ³Unitat de Recerca en Farmacologia Humana i Neurociències, Institut Municipal d'Investigació Mèdica-Hospital del Mar, Barcelona, Spain. ⁴Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

Authors' contributions

XJ analyzed patient data, reviewed the literature and was a major contributor to writing the manuscript. BF analyzed patient data and was a major contributor to writing the manuscript. MS was the clinician in charge of the child and contributed to writing the manuscript. EC was an important laboratory technician in biomarkers analyses and contributed to writing the manuscript. RT was the head of the laboratory responsible and contributed to writing the manuscript. AP was the other clinician in charge of our patient and contributed to writing the manuscript. OV was the pediatrician responsible for coordination of data and sample flow and contributed to writing the manuscript. SP was the major expert in laboratory analysis of biomarkers in alternative matrices and contributed to writing the manuscript. OGA analyzed patient data, reviewed the literature and the final manuscript and was the main contributor to writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

Received: 7 July 2010 Accepted: 5 July 2011 Published: 5 July 2011

References

- UNODC Annual Reports Questionnaire Data (http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2010/World_Drug_Report_2010_lo-res.pdf).
- García-Algar O, Vall Combelles O, Puig Solà C, Mur Serra A, Scatavelli G, Pacifico R, Morleón Getino T, Pichini S: 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**:151-1518.
- Kintz P, Villan M, Cirmele V: Hair analysis for drug detection. *The Drug Monitor* 2006, **28**: 443-446.
- Kein J, Karakov T, Koren G: Clinical applications of hair testing for drugs of abuse-the Canadian experience. *Forensic Sci Int* 2000, **107**:281-288.
- Joya X, Papasset E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, García-Algar O, Scatavelli G, Pichini S: Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis. *The Drug Monitor* 2009, **31**:391-395.
- Marchei E, Colone P, Nestasi GG, Calabrò C, Pellegrini M, Pacifico R, Zuccaro P, Pichini S: On-site screening and GC-MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-packers urine. *J Pharm Biomed Anal* 2008, **48**:385-387.
- Pichini S, Pacifico R, Alberti L, Pellegrini M, Zuccaro P: Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999, **23**:343-348.
- García-Algar O, Lopez N, Bonet M, Pellegrini M, Marchei E, Pichini S: 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) intoxication in an infant chronically exposed to cocaine. *The Drug Monitor* 2005, **27**:409-411.
- Smith FP, Kidwell DA: Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine users' children. *Forensic Sci Int* 1996, **83**:179-89.
- Moller M, Koren G: Unsuspected prenatal opioid exposure: long-term detection by alternative matrices. *The Drug Monitor* 2010, **32**:1-2.

doi:10.1186/1752-1947-5-288

Cite this article as: Joya et al.: Acute heroin intoxication in a baby chronically exposed to cocaine and heroin: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2011 **5**:288.

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



7. BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, H. C., Begg, E. J., and Darlow, B. A. (1988). Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 14, 217-240.
- Balabanova, S., and Wolf, H. U. (1989). Methadone concentrations in human hair of the head, axillary and pubic hair. *Z Rechtsmed* 102, 293-296.
- Bar-Oz, B., Klein, J., Karaskov, T., and 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.
- Bennett, D. S., Bendersky, M., and Lewis, M. (2002). Children's intellectual and emotional-behavioral adjustment at 4 years as a function of cocaine exposure, maternal characteristics, and environmental risk. *Dev Psychol* 38, 648-658.
- Birchfield, M., Scully, J., and Handler, A. (1995). Perinatal screening for illicit drugs: policies in hospitals in a large metropolitan area. *J Perinatol* 15, 208-214.
- Blank, D. L., and Kidwell, D. A. (1993). External contamination of hair by cocaine: an issue in forensic interpretation. *Forensic Sci Int* 63, 145-156; discussion 157-160.
- Bosio, P., Keenan, E., Gleeson, R., Dorman, A., Clarke, T., Darling, M., and O'Connor, J. (1997). The prevalence of chemical substance and alcohol abuse in an obstetric population in Dublin. *Ir Med J* 90, 149-150.
- Briggs, G. G., Freeman, R. K., and Yaffe, S. J. (1994). *Drugs in pregnancy and lactation.*, (Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins).
- Brody, T. M., Larner, J., and Minneman, K. P. (1993). *Human pharmacology: molecular to clinical,* (San Luis, Mosby).
- Browne, S., Moore, C., Negrusz, A., Tebbett, I., Covert, R., and Dusick, A. (1994). Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. *J Forensic Sci* 39, 1515-1519.

Bibliografia

Browne, S. P., Tebbett, I. R., Moore, C. M., Dusick, A., Covert, R., and 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., and Hume, R. (1989). Development of human liver UDP-glucuronosyltransferases. *Dev Pharmacol Ther* 13, 70-77.

Callahan, C. M., Grant, T. M., Phipps, P., Clark, G., Novack, A. H., Streissguth, A. P., and Raisys, V. A. (1992). Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine. *J Pediatr* 120, 763-768.

Cattaneo, C., Gigli, F., Lodi, F., and 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.

Clauwaert, K., Decaestecker, T., Mortier, K., Lambert, W., Deforce, D., Van Peteghem, C., and Van Bocxlaer, J. (2004). The determination of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 28, 655-659.

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

Cone, E. J., Welch, P., Mitchell, J. M., and Paul, B. D. (1991). Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. *J Anal Toxicol* 15, 1-7.

Contreras, M. T., Hernandez, A. F., Gonzalez, M., Gonzalez, S., Ventura, R., Pla, A., Valverde, J. L., Segura, J., and 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.

Crouch, D. J., Walsh, J. M., Flegel, R., Cangianelli, L., Baudys, J., and Atkins, R. (2005). An evaluation of selected oral fluid point-of-collection drug-testing devices. *J Anal Toxicol* 29, 244-248.

Chan, D., Bar-Oz, B., Pellerin, B., Paciorek, C., Klein, J., Kapur, B., Farine, D., and 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., and Koren, G. (2004). Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 75-82.

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

Dams, R., Murphy, C. M., Lambert, W. E., and Huestis, M. A. (2003). Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 1665-1670.

de Castro, A., Concheiro, M., Shakleya, D. M., and 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.

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

Dott, M., Rasmussen, S. A., Hogue, C. J., and Reefhuis, J. (2010). Association between pregnancy intention and reproductive-health related

Bibliografia

behaviors before and after pregnancy recognition, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002. *Matern Child Health J* 14, 373-381.

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., and 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.

ElSohly, M. A., and 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.

ElSohly, M. A., Stanford, D. F., Murphy, T. P., Lester, B. M., Wright, L. L., Smeriglio, V. L., Verter, J., Bauer, C. R., Shankaran, S., Bada, H. S., and Walls, H. C. (1999). Immunoassay and GC-MS procedures for the analysis of drugs of abuse in meconium. *J Anal Toxicol* 23, 436-445.

Eser, H. P., Potsch, L., Skopp, G., and 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., and Tebbett, I. (2005). Relative ability of biologic specimens and interviews to detect prenatal cocaine use. *Neurotoxicol Teratol* 27, 677-687.

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

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

Fay, J., Fogerson, R., Schoendorfer, D., Niedbala, R. S., and Spiehler, V. (1996). Detection of methamphetamine in sweat by EIA and GC-MS. *J Anal Toxicol* 20, 398-403.

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

Garcia-Algar, O., Lopez-Vilchez, M. A., Pacifici, R., and Pichini, S. (2005a). [Acute poisoning and chronic exposure to cocaine in a child]. *Med Clin (Barc)* 125, 436-437.

Garcia-Algar, O., Vall Combelles, O., Puig Sola, C., Mur Sierra, A., Scaravelli, G., Pacifici, R., Monleon Getino, T., and Pichini, S. (2009). [Prenatal exposure to drugs of abuse using meconium analysis in a low socioeconomic population in Barcelona]. *An Pediatr (Barc)* 70, 151-158.

Garcia-Algar, O., Vall, O., Alameda, F., Puig, C., Pellegrini, M., Pacifici, R., and Pichini, S. (2005b). Prenatal exposure to arecoline (areca nut alkaloid) and birth outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90, F276-277.

Garcia-Algar, O., Vall, O., Segura, J., Pascual, J. A., Diaz, D., Mutnoz, L., Zuccaro, P., Pacifici, R., and 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., and Koren, G. (2007). Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology. *Ther Drug Monit* 29, 71-76.

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

Gillogley, K. M., Evans, A. T., Hansen, R. L., Samuels, S. J., and 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., and 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.

Bibliografía

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

Graham, K., Koren, G., Klein, J., Schneiderman, J., and Greenwald, M. (1989). Determination of gestational cocaine exposure by hair analysis. *Jama* *262*, 3328-3330.

Gray, T., and Huestis, M. (2007). Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Anal Bioanal Chem* *388*, 1455-1465.

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

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

Han, J. Y., Nava-Ocampo, A. A., and Koren, G. (2005b). Unintended pregnancies and exposure to potential human teratogens. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* *73*, 245-248.

Hartwig, S., Auwarter, V., and Pragst, F. (2003). Fatty Acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol* *38*, 163-167.

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

Henderson, G. L., Harkey, M. R., Zhou, C., Jones, R. T., and Jacob, P., 3rd (1996). Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. dose-response relationships. *J Anal Toxicol* *20*, 1-12.

Huestis, M. A., and 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.

Huestis, M. A., Elsohly, M., Nebro, W., Barnes, A., Gustafson, R. A., and Smith, M. L. (2006). Estimating time of last oral ingestion of cannabis from

plasma THC and THCCOOH concentrations. *Ther Drug Monit* 28, 540-544.

Hurt, H., Malmud, E., Betancourt, L., Braitman, L. E., Brodsky, N. L., and Giannetta, J. (1997). Children with in utero cocaine exposure do not differ from control subjects on intelligence testing. *Arch Pediatr Adolesc Med* 151, 1237-1241.

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

Jauniaux, E., and Gulbis, B. (2000). In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92, 45-49.

Joya, X., Gomez-Culebras, M., Callejon, A., Friguls, B., Puig, C., Ortigosa, S., Morini, L., Garcia-Algar, O., and Vall, O. (2012). Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* 12, 2.

Joya, X., Papaseit, E., Civit, E., Pellegrini, M., Vall, O., Garcia-Algar, O., Scaravelli, G., and Pichini, S. (2009). Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis. *Ther Drug Monit* 31, 391-395.

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

Kacinko, S. L., Barnes, A. J., Schwilke, E. W., Cone, E. J., Moolchan, E. T., and Huestis, M. A. (2005). Disposition of cocaine and its metabolites in human sweat after controlled cocaine administration. *Clin Chem* 51, 2085-2094.

Karacic, V., and Skender, L. (2003). Hair testing for drugs of abuse. *Coll Antropol* 27, 263-269.

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

Bibliografía

Kidwell, D. A., Blanco, M. A., and 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. (1995). Interlaboratory comparison of quantitative determinations of drug in hair samples. *Forensic Sci Int* 70, 105-109.

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

Kintz, P., and Mangin, P. (1993b). Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J Forensic Sci* 38, 657-662.

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

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

Klein, J., Karaskov, T., and Koren, G. (1999). Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. *Ther Drug Monit* 21, 644-646.

Kolbrich, E. A., Barnes, A. J., Gorelick, D. A., Boyd, S. J., Cone, E. J., and Huestis, M. A. (2006). Major and minor metabolites of cocaine in human plasma following controlled subcutaneous cocaine administration. *J Anal Toxicol* 30, 501-510.

Koren, G., Chan, D., Klein, J., and Karaskov, T. (2002). Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol. *Ther Drug Monit* 24, 23-25.

Krauer, B., Dayer, P., and 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.

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

Lopez-Vilchez, M. A., Seidel, V., Farre, M., Garcia-Algar, O., Pichini, S., and Mur, A. (2006). Areca-nut abuse and neonatal withdrawal syndrome. *Pediatrics* *117*, e129-131.

Lozano, J., Garcia-Algar, O., Marchei, E., Vall, O., Monleon, T., Giovannandrea, R. D., and 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., and Pichini, S. (2007b). Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* *29*, 711-734.

Lustbader, A. S., Mayes, L. C., McGee, B. A., Jatlow, P., and Roberts, W. L. (1998). Incidence of passive exposure to crack/cocaine and clinical findings in infants seen in an outpatient service. *Pediatrics* *102*, e5.

Marques, P. R., Tippetts, A. S., and 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., and 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., and 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. (1998). Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* *713*, 3-25.

Bibliografia

Mayes, L. C., Grillon, C., Granger, R., and Schottenfeld, R. (1998). Regulation of arousal and attention in preschool children exposed to cocaine prenatally. *Ann N Y Acad Sci* *846*, 126-143.

Mieczkowski, T., and 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.

Montagna, M., Poletini, A., Stramesi, C., Groppi, A., and Vignali, C. (2002). Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int* *128*, 79-83.

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

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

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

Moore, C. M., Brown, S., Negrusz, A., Tebbett, I., Meyer, W., and 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.

Morini, L., Marchei, E., Pellegrini, M., Groppi, A., Stramesi, C., Vagnarelli, F., Garcia-Algar, O., Pacifici, R., and 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.

Mott, S. H., Packer, R. J., and Soldin, S. J. (1994). Neurologic manifestations of cocaine exposure in childhood. *Pediatrics* *93*, 557-560.

Myllynen, P., Pienimäki, P., and Vahakangas, K. (2005). Human placental perfusion method in the assessment of transplacental passage of antiepileptic drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* *207*, 489-494.

Niedbala, S., Kardos, K., Salamone, S., Fritch, D., Bronsgeest, M., and Cone, E. J. (2004). Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing. *J Anal Toxicol* 28, 546-552.

Offidani, C., Strano Rossi, S., and 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.

Ostrea, E. M., Jr., Brady, M., Gause, S., Raymundo, A. L., and 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., and 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, D. K., Tannenbaum, L., Ostrea, A. R., Romero, A., Salari, V., and 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., and Utarnachitt, R. B. (1994b). Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: clinical implications. *J Pediatr* 124, 477-479.

Ostrea, E. M., Jr., Villanueva-Uy, E., Ngercham, S., Punnakanta, L., Batilando, M. J., Agarwal, P., Pensler, E., Corrion, M., Ramos, E. F., Romero, J., and Thomas, R. L. (2008). An epidemiologic study comparing fetal exposure to tobacco smoke in three Southeast Asian countries. *Int J Occup Environ Health* 14, 257-262.

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

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

Bibliografia

Pascual, J. A., Diaz, D., Segura, J., Garcia-Algar, O., Vall, O., Zuccaro, P., Pacifici, R., and 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., and 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., and 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.

Peters, F. T., Samyn, N., Lamers, C. T., Riedel, W. J., Kraemer, T., de Boeck, G., and Maurer, H. H. (2005). Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for enantioselective measurement of the designer drugs MDEA, MDMA, and MDA and its application to samples from a controlled study with MDMA. *Clin Chem* *51*, 1811-1822.

Pichini, S., Altieri, I., Zuccaro, P., and 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., and 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., and Garcia-Algar, O. (2005a). Application of a validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoyllecgonine 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., and 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., Navarro, M., Pacifici, R., Zuccaro, P., Ortuno, J., Farre, M., Roset, P. N., Segura, J., and de la Torre, R. (2003a). Usefulness of sweat testing for the detection of MDMA after a single-dose administration. *J Anal Toxicol* 27, 294-303.

Pichini, S., Pacifici, R., Altieri, I., Pellegrini, M., and Zuccaro, P. (1999). Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23, 343-348.

Pichini, S., Pacifici, R., Pellegrini, M., Marchei, E., Lozano, J., Murillo, J., Vall, O., and Garcia-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, 2124-2132.

Pichini, S., Pacifici, R., Pellegrini, M., Marchei, E., Perez-Alarcon, E., Puig, C., Vall, O., and Garcia-Algar, O. (2003b). 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., Pellegrini, M., Gareri, J., Koren, G., Garcia-Algar, O., Vall, O., Vagnarelli, F., Zuccaro, P., and 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., Pellegrini, M., Pacifici, R., Marchei, E., Murillo, J., Puig, C., Vall, O., and Garcia-Algar, O. (2003c). Quantification of arecoline (areca nut alkaloid) in neonatal biological matrices by high-performance liquid chromatography/electrospray quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 1958-1964.

Pichini, S., Puig, C., Zuccaro, P., Marchei, E., Pellegrini, M., Murillo, J., Vall, O., Pacifici, R., and Garcia-Algar, O. (2005b). Assessment of exposure to

Bibliografía

opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 153, 59-65.

Pirnay, S. O., Abraham, T. T., and Huestis, M. A. (2006). Sensitive gas chromatography-mass spectrometry method for simultaneous measurement of MDEA, MDMA, and metabolites HMA, MDA, and HMMA in human urine. *Clin Chem* 52, 1728-1734.

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

Potsch, L., and 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., and Zelazo, P. R. (1994). Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure. *J Pediatr* 125, 652-654.

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

Pragst, F., Spiegel, K., Leuschner, U., and Hager, A. (1999). Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid--comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J Anal Toxicol* 23, 168-172.

Puig, C., Garcia-Algar, O., Monleon, T., Pacifici, R., Zuccaro, P., Sunyer, J., Figueroa, C., Pichini, S., and Vall, O. (2008). A longitudinal study of environmental tobacco smoke exposure in children: parental self reports versus age dependent biomarkers. *BMC Public Health* 8, 47.

Quintela, O., Bermejo, A. M., Taberner, M. J., Strano-Rossi, S., Chiarotti, M., and 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., and 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.

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

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

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

Rosenberg, N. M., Meert, K. L., Knazik, S. R., Yee, H., and Kauffman, R. E. (1991). Occult cocaine exposure in children. *Am J Dis Child* 145, 1430-1432.

Rosenberg, N. M., Meert, K. L., Marino, D., Yee, H., and Kauffman, R. E. (1995). Occult cocaine and opiate exposure in children and associated physical findings. *Pediatr Emerg Care* 11, 167-169.

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

Rowland, M., and Tozer, T. N. (1989). *Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications: Lea & Febiger (Philadelphia)*.

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

Sallee, F. R., Katikaneni, L. P., McArthur, P. D., Ibrahim, H. M., Nesbitt, L., and 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., and 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.

Bibliografia

Samyn, N., De Boeck, G., and 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., and 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. I., Wang, W. L., and 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., and Huestis, M. A. (2004). Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 76, 4358-4363.

Schuetze, P., Eiden, R. D., and 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.

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

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

Singer, L. T., Arendt, R., Minnes, S., Farkas, K., Salvator, A., Kirchner, H. L., and Kliegman, R. (2002). Cognitive and motor outcomes of cocaine-exposed infants. *Jama* 287, 1952-1960.

Singer, L. T., Minnes, S., Short, E., Arendt, R., Farkas, K., Lewis, B., Klein, N., Russ, S., Min, M. O., and Kirchner, H. L. (2004). Cognitive outcomes of preschool children with prenatal cocaine exposure. *Jama* 291, 2448-2456.

Skender, L., Karacic, V., Brcic, I., and 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, S. H. T. (2004). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 145, 83-84.

Soriano, T., Jurado, C., Menendez, M., and Repetto, M. (2001). Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol* 25, 137-143.

Stanaszek, R., and 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., and Rane, A. (1984). Amphetamine secretion in breast milk. *Eur J Clin Pharmacol* 27, 123-124.

Stolk, L. M., Coenradie, S. M., Smit, B. J., and 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., and Chiarotti, M. (1998). Application of hair analysis to document coercive heroin administration to a child. *J Anal Toxicol* 22, 75-77.

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

Taguchi, N., Mian, M., Shouldice, M., Karaskov, T., Gareri, J., Nulman, I., Verjee, Z. H., and Koren, G. (2007). Chronic cocaine exposure in a toddler revealed by hair test. *Clin Pediatr (Phila)* 46, 272-275.

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

Than, L. C., Honein, M. A., Watkins, M. L., Yoon, P. W., Daniel, K. L., and Correa, A. (2005). Intent to become pregnant as a predictor of exposures during pregnancy: is there a relation? *J Reprod Med* 50, 389-396.

Bibliografía

Tsanaclis, L., and 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.

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

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

Villamor, J. L., Bermejo, A. M., Fernandez, P., and Taberero, 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., and Valenzuela, F. (1998). [Pharmacological principles in pregnancy]. *Gac Med Mex* 134, 575-582.

Vincent, F., Bessard, J., Vacheron, J., Mallaret, M., and 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., and 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., and 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.

Weinmann, W., Goerner, M., Vogt, S., Goerke, R., and Pollak, S. (2001). Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Sci Int* 121, 103-107.

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

Wood, M., De Boeck, G., Samyn, N., Morris, M., Cooper, D. P., Maes, R. A., and De Bruijn, E. A. (2003). Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 27, 78-87.

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

8. MATERIAL DERIVADO DEL TRABAJO DE TESIS

Comunicaciones en congresos internacionales

Nombre del congreso: 46th International meeting of The International Association of Forensic Scientist (TIAFT) & Society of Hair Testing (SoHT).

Organizador: TIAFT y SoHT

Tipo de comunicación: Comunicación oral. "Assessment of passive exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city by hair testing"

Lugar y fecha: Schoelcher, Martinique, French West Indies; 2 to 8 of June, 2008

Publicación del resumen de la comunicación.

Joya X, Civit E, Vall O, García-Algar O, Pacifici R, Pichini S, Scaravelli G, de la Torre R. Assessment of passive exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city by hair testing. 46th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists Conference. Martinique. 2008. Ann Toxicol Anal. 2008;20(51):18.

**9. FINANCIACIÓN
RECIBIDA POR LOS
TRABAJOS DE TESIS**

Los trabajos que componen esta tesis titulada “Valoración de la exposición pasiva a sustancias de abuso en población pediátrica mediante el uso de matrices biológicas no convencionales” han tenido el apoyo de las siguientes becas y/o ayudas:

- Proyecto del FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias). Valoración de la exposición aguda y crónica en recién nacidos de madres consumidoras de drogas de abuso mediante su determinación en matrices alternativas. García-Algar O, Vall O, Pichini S, Pujades M, López MA, Monleón A, Méndez C. 2006-2008. (06/1221)
- Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud. RETIC Samid. Vall O, García-Algar O. 2009-2011. Ministerio de Sanidad y Consumo. (RD08/0072/0027)
- Unitat de Recerca Infància i Entorn (URIE): Grup de Recerca Consolidat (GRC) reconegut i finançat per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). Generalitat de Catalunya. 2009-2013. (2009SGR-1388)
- Proyecto del FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias). Consumo materno de alcohol durante el embarazo: diagnóstico de la exposición prenatal, cribado neonatal y seguimiento postnatal. García-Algar O, Pichini S, Pastor A, Joya X, Méndez C, Jané M, Segura L. (2011-2013) (10/02593)
- Ajut a la finalització de la tesi doctoral de la Fundació IMIM.

