

Exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo y desarrollo prenatal y neonatal: protocolo de investigación en el proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente)

Ana Espluques^{a,b} / Rosalía Fernández-Patier^c / Inma Aguilera^d / Carmen Iñiguez^a / Saúl García Dos Santos^c / Amelia Aquirre

ilar papers at core.ac.uk

Carlos III (ISCIII), Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Madrid, España; ^aInstitut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, España; ^bInstitut d'Investigacions Químiques i Ambientals, CSIC, Barcelona, España; ^cHospital Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, Granada, España; ^dDepartamento de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España; ^eAjuntament de Sabadell, Barcelona, España; ^fUniversidad de Oviedo, Asturias, España; ^gÀrea de Salut de Menorca, Islas Baleares, España; ^hSubdirección de Salud Pública de Guipúzcoa, España.

(Air pollutant exposure during pregnancy and fetal and early childhood development. Research protocol of the INMA [Childhood and Environment Project])

Resumen

Introducción: El proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente) es una red de investigación cooperativa que tiene como objetivos estudiar los efectos del medio ambiente y la dieta en el desarrollo fetal e infantil. El objetivo de este artículo es presentar el protocolo de exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo y desarrollo prenatal y neonatal en el proyecto INMA.

Métodos: La información para la evaluación de la exposición a contaminación atmosférica durante el embarazo se basa en mediciones de contaminantes atmosféricos en el exterior (dióxido de nitrógeno [NO₂], compuestos orgánicos volátiles [COV], ozono, partículas [PM₁₀, PM_{2.5}] y su composición [hidrocarburos aromáticos policíclicos]), medición de contaminantes de exposición individual (en el interior de la vivienda y captadores personales [COV y NO₂]), determinación de un marcador biológico de exposición a hidrocarburos (1-hidroxipireno), en información recogida mediante cuestionarios y en la utilización de sistemas de información geográfica. Esta información permite elaborar índices de exposición individual a contaminación atmosférica con los que analizar su posible relación con el desarrollo fetal y la salud del recién nacido.

Discusión: El protocolo que se presenta y el tipo de estudio permiten obtener una aproximación a la exposición individual a contaminantes atmosféricos. Por último, el elevado número

de participantes (n = 4.000), así como la heterogeneidad de las características ambientales y sociodemográficas, acrecienta el potencial del estudio.

Palabras clave: Contaminación atmosférica. Embarazo. Infancia. Desarrollo fetal. Estudio de cohortes. INMA.

Abstract

Introduction: The INMA (Infancia y Medio Ambiente [Spanish for Environment and Childhood]) project is a cooperative research network. This project aims to study the effects of environment and diet on fetal and early childhood development. This article aims to present the air pollutant exposure protocol during pregnancy and fetal and early childhood development of the INMA project.

Methods: The information to assess air pollutant exposure during pregnancy is based on outdoor measurement of air pollutants (nitrogen dioxide [NO₂], volatile organic compounds [VOC], ozone, particulate matter [PM₁₀, PM_{2.5}] and of their composition [polycyclic aromatic hydrocarbons]); measurement of indoor and personal exposure (VOC and NO₂); urinary measurement of a biological marker of hydrocarbon exposure (1-hydroxypyrene); and data gathered by questionnaires and geographic information systems. These data allow individual air pollutant exposure indexes to be developed, which can then be used to analyze the possible effects of exposure on fetal development and child health.

Conclusion: This protocol and the type of study allow an approximation to individual air pollutant exposure to be obtained. Finally, the large number of participants (N = 4,000), as well as their geographic and social diversity, increases the study's potential.

Key words: Air pollution. Pregnancy. Childhood. Fetal development. Cohort study. INMA.

Los miembros del proyecto INMA se muestran en el Anexo 1.

Correspondencia: Dr. Ferran Ballester Díez.
Escola Valenciana d'Estudis en Salut.
Joan de Garay, 21. 46017 València. España.
Correo electrónico: ballester_fer@gva.es

Recibido: 19 de diciembre de 2005.

Aceptado: 20 de marzo de 2006.

Introducción

Los fetos y los niños, en comparación con los adultos, presentan una vulnerabilidad especial a los tóxicos ambientales debido a su inmadurez fisiológica y más tiempo de vida después de la exposición. Además, para el caso de los contaminantes atmosféricos, hay que considerar que los niños inhalan un volumen de aire relativamente mayor que los adultos y suelen pasar más tiempo al aire libre^{1,2}.

En los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de las alteraciones en la salud del feto en relación con las exposiciones ambientales. Los efectos en el desarrollo fetal pueden tener consecuencias inmediatas, e incluso a largo plazo, en la salud de los individuos. Hasta hace relativamente poco tiempo había muy pocos estudios sobre el impacto de la exposición prenatal a contaminación atmosférica en la salud del feto y el neonato. Un hecho que refleja la producción científica reciente es la publicación, durante el año 2004, de 4 revisiones sistemáticas de la evidencia epidemiológica³⁻⁶.

La mortalidad intrauterina, perinatal o neonatal constituye el efecto más ampliamente estudiado. A principio de la década de 1990, Bobak y Leon^{7,8} llevaron a cabo un estudio geográfico en la República Checa en el que encontraron una asociación entre las concentraciones de dióxido de azufre (SO₂) y partículas en suspensión (TSP) con las tasas de mortalidad neonatal por distritos. En la actualidad se acepta que hay pruebas suficientes para inferir una relación de causa-efecto entre la contaminación atmosférica y el riesgo de morir durante el primer año de vida, especialmente por enfermedades respiratorias².

El estudio de la relación entre contaminación atmosférica y crecimiento fetal es un área emergente en la epidemiología actual. Al menos 16 estudios⁷⁻²² han evaluado la relación con el peso bajo al nacer (definido como peso en el momento del nacimiento < 2.500 g) y la mayoría de estudios muestran asociación. Sin embargo, a diferencia de lo comentado para la mortalidad en edades tempranas, las pruebas de dicha asociación, aunque indicativas de causalidad, no se consideran suficientes, por lo que se necesitan más estudios².

Además del efecto en salud descrito anteriormente, 4 estudios^{12,23-25} han evaluado la relación de la contaminación atmosférica con el retraso del crecimiento intrauterino (definido como el peso menor del esperado; operativamente, el peso al nacer por debajo del percentil 10 para un sexo y edad gestacional determinados). En general, los resultados muestran una asociación mayor que con el peso bajo al nacer, aunque 2 de estos estudios proceden de la misma área. Dejmeck et al²³ han estudiado en la República Checa la relación entre la exposición a determinados contaminantes del aire y el

retraso en el crecimiento intrauterino. Los resultados muestran una asociación con la exposición a partículas finas (PM_{2,5}) y también con las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). En este estudio, los autores observaron que las exposiciones registradas durante el primer mes del embarazo son las que se relacionan con el retraso del crecimiento.

En 10 estudios^{9,12,19,21,25-30} se ha incluido la evaluación de la relación de la contaminación atmosférica con el nacimiento pretérmino (< 37 semanas de gestación). Las asociaciones encontradas son, en general, menores que para peso al nacer, considerándose que la evidencia es insuficiente. Las diferencias en el cálculo de la edad gestacional pueden influir también en los resultados encontrados. Además, es difícil estudiar este efecto de manera separada al del peso en el nacimiento, y su interpretación es compleja.

La mayoría de estudios disponibles que analizan la relación de la contaminación atmosférica con el desarrollo fetal han utilizado como medida de la exposición datos procedentes de estaciones de control situadas en zonas más o menos representativas^{31,32} o la distancia entre la residencia y las vías con tráfico intenso²¹. Algunos pocos estudios se aproximan a la evaluación individual de la exposición, entre ellos el realizado por Perera et al²⁰ en Nueva York y el de Jedrychowski et al³³ en Polonia.

Los contaminantes más estudiados son los incluidos en las redes de vigilancia y control de la calidad del aire. Entre ellos se encuentran las partículas en suspensión, el dióxido de azufre (SO₂) y el monóxido de carbono (CO). Éstos provienen principalmente de fuentes de emisión, como los vehículos, las calefacciones de edificios y algunos procesos industriales. Entre las partículas en suspensión destacan las que tienen diámetro aerodinámico < 10 μ (partículas torácicas o PM₁₀) y las partículas finas < 2,5 μ (partículas respirables o PM_{2,5}), así como su contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)⁷, que podrían ser un mejor indicador de impacto sobre la salud. De hecho, los HAP, debido a su presión de vapor y a la temperatura ambiente, pueden ser adsorbidos por las partículas finas y podrían representar el componente tóxico más importante de las partículas de cara al daño fetal³⁴. En ambientes interiores adquieren importancia los compuestos orgánicos volátiles (COV), entre ellos el benceno. A los contaminantes anteriores se añaden otros, como los óxidos de nitrógeno (NO, NO₂), cuya fuente principal en ambientes exteriores en zonas urbanas son los vehículos de motor y, en menor medida, las emisiones industriales. También se ha estudiado los posibles efectos del ozono (O₃), un contaminante secundario que se forma por reacciones fotoquímicas a partir de la acción de las radiaciones solares sobre el NO₂ o los COV y que alcanza valores más elevados en las zonas periurbanas y rurales.

Proyecto INMA. Objetivos para evaluar la exposición y los efectos de la contaminación atmosférica

El Proyecto INMA «Infancia y Medio Ambiente» es una red de grupos de investigación que pretende, mediante una metodología en común, relacionar las exposiciones prenatales y posnatales a contaminantes ambientales, en el aire, el agua y los alimentos, con los posibles efectos en la salud de los niños, incluidos su crecimiento y desarrollo^{35,36}.

El proyecto consiste en un estudio de cohorte prospectivo de base poblacional con unos 4.000 pares mujeres-niños, a las que se realiza un seguimiento durante la gestación y a continuación a sus hijos. Las mujeres se seleccionan en varios lugares y forman un conjunto de cohortes, lo que permite tener representación de diferentes puntos de la geografía española. Las áreas que participan con cohortes de madres y niños son: Flix (Ribera de l'Ebre), Menorca, Granada, Valencia, Sabadell, Asturias y Gipuzkoa. De todas ellas, las 3 primeras ya se habían formado en el momento de iniciar la Red INMA (cohortes previas), mientras que el resto comenzó con posterioridad (cohortes nuevas).

Entre las exposiciones ambientales en estudio se encuentra la evaluación de la exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo. Los objetivos específicos que se pretende alcanzar son los siguientes:

1. Proveer a las distintas cohortes del estudio de un protocolo común para la medición de la exposición a contaminantes atmosféricos.

2. Determinar las concentraciones pico, los horarios y los diarios de contaminación atmosférica ambiental (PM₁₀, PM_{2,5}, ozono, SO₂, NO₂, CO) en las zonas y los períodos de estudio mediante la utilización de la información de las Redes de Vigilancia y Control de la Calidad del Aire (continuidad temporal).

3. Determinar las concentraciones de compuestos orgánicos volátiles (COV), NO₂ y O₃ mediante el uso de captadores pasivos en un enrejado de localizaciones y emplear estas medidas para estimar, con técnicas de geoestadística, la exposición en cualquier punto de las áreas en estudio (continuidad espacial).

4. Determinar las concentraciones de exposición a COV y NO₂ personales e intradomiciliarias en un subconjunto de las mujeres embarazadas en estudio mediante el uso de captadores pasivos.

5. Obtener y describir las concentraciones promedio de PM_{2,5} y PM₁₀ en las zonas de las áreas de estudio. Caracterizar su composición con especial interés en las concentraciones de metales y HAP que contienen.

6. Describir el patrón espacio-temporal de los contaminantes atmosféricos en las áreas de las cohortes de estudio.

7. Evaluar la asociación entre la exposición prenatal a los contaminantes atmosféricos y el desarrollo fetal, medido como retraso del crecimiento intrauterino, bajo peso y nacimiento pretérmino.

Métodos

En la tabla 1 se resumen las características de las cohortes participantes, incluidas las características de las zonas de estudio. La información para la evaluación de la exposición individual a contaminación atmosférica durante el embarazo se basa en mediciones de contaminantes atmosféricos en el exterior, medición de contaminantes de exposición individual (en el interior de la vivienda y captadores personales), determinación de un marcador biológico de exposición a hidrocarburos (1-hidroxipireno), en información recogida mediante cuestionarios y en la utilización de sistemas de información geográfica.

Contaminación atmosférica en exteriores

Esta información proviene de fuentes diversas, entre las que se incluyen mediciones realizadas con los propios medios de los investigadores e información de fuentes secundarias.

Se ha diseñado un protocolo para la medición de las concentraciones de NO₂, COV y O₃ en cada una de las áreas a estudio. Para ello se construye un enrejado de nodos con separación variable entre ellos en función de la población, la industrialización, etc. Esta separación es de entre 0,5 a 1 km en las zonas urbanas, de 1 a 3 km en las zonas metropolitanas, y de 3 a 5 km en las zonas semiurbanas. En las áreas con núcleos pequeños de población se ha instalado un captador en cada uno de ellos. El número de puntos del enrejado depende, obviamente, de la extensión y las características del área a estudio. Para la obtención de las concentraciones de contaminantes se utilizan captadores pasivos que permanecen durante 2 y 7 días en el ambiente. Se realizan, como mínimo, 2 campañas de medición en cada cohorte, una en verano y la otra en invierno. Los captadores se colocan en cada uno de los nodos del enrejado diseñado, en una farola o cualquier otro tipo de mobiliario urbano que permita su instalación. La colocación de los captadores debe cumplir una serie de criterios técnicos con el fin de homogeneizar la toma de muestras, como son la altura, la distancia a los bloques de edificios, rotondas y cruces, los semáforos o la existencia de otros focos contaminantes próximos. Las coordenadas geográficas de los puntos se obtienen mediante el Sistema Global de Posición (GPS) y se trasladan a un soporte informático.

Tabla 1. Cohortes en el estudio INMA (Infancia y Medio Ambiente)

	Población	Años de inclusión	Área de estudio	Población total del área ^a	Características de la zona	Número previsto de pares madre-niño
Cohortes previas ^b	Ribera d'Ebre	1997/99	Flix y 5 pueblos colindantes	8.681	Sector agrícola, industrial (energético) y servicios	92
	Menorca	1997/98	Menorca	69.070	Sector servicios, construcción, industria y agricultura	492
	Granada	2000/02	Granada capital y 52 pueblos de la provincia	274.479	Sector agrícola y de servicios	700
Cohortes nuevas ^c	Valencia	2003/05	Área de salud 5 (34 municipios) y una zona del área 6 (2 barrios de la ciudad de Valencia)	288.580	Sector servicios, industria, construcción y agricultura (regadío/secano)	800
	Sabadell	2004/05	Sabadell	194.000	Sector industrial (textil/metallurgia) y servicios	800
	Asturias	2004/05	Área de salud 3 de Avilés	165.201	Industria metalúrgica y fundición, química, alimentaria y fabricación de plásticos.	500
	Gipuzkoa	2006/07	Comarcas Urola y Goierri	88.265	Industria siderometalúrgica	600
				Total		3.984

^aPoblación obtenida de los registros en el año 2004.

^bCohorte previa: cohortes de embarazadas que ya se habían formado en el momento de iniciar la Red INMA.

^cCohortes nuevas: cohorte de embarazadas que comenzó con la Red INMA.

Las concentraciones diarias y el análisis de material particulado atmosférico (PM₁₀ y PM_{2,5}) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), y los metales pesados se estudian con captadores de referencia³⁷ de alto y bajo volumen en las zonas de las cohortes. Requiere un diseño previo de la red de muestreo. Los HAP se analizan a partir de las partículas PM₁₀ y PM_{2,5} recogidas en los captadores de alto y bajo volumen. La medición se realiza durante un intervalo de tiempo representativo del período en estudio.

Respecto a la información de fuentes secundarias se dispone de las concentraciones diarias de contaminantes atmosféricos exteriores (partículas, CO, SO₂, O₃, NO₂) en la zona de residencia de las mujeres de las cohortes. Dichos datos se obtienen de las estaciones de medida de la Red de Vigilancia y Control de la calidad del aire de cada zona participante.

Exposición individual. Medición personal y en los domicilios de las mujeres embarazadas

1. Concentraciones de NO₂ y COV en el interior y exterior de la vivienda. Se elige en cada cohorte una muestra de unas 40 (localizaciones-mujeres), teniendo en cuenta criterios geográficos (distancia, municipio) de las

participantes con el fin de que toda la zona de estudio quede representada. La medición se hace coincidiendo con la campaña de muestreo del enrejado y sirve para comparar las mediciones personales con las ambientales (enrejado). En la vivienda se colocan los captadores en el salón de la casa y en el exterior (ventana o balcón), uno de NO₂ y otro de COV en cada uno de los lugares. La duración del muestreo es de 48 h.

2. Exposición personal en la mujer embarazada. La participación de las mujeres de la submuestra, que se encuentran en su tercer trimestre de embarazo, consiste en llevar en la ropa, a la altura del pecho, un captador de COV durante 48 h, que coincide con el tiempo de muestreo en su domicilio. Al final de este tiempo se realiza un cuestionario sobre las actividades en esas 48 h. En el cuestionario (tabla 2) se incluyen preguntas sobre uso de estufas, cocina de gas, ventilación, comida frita o a la parrilla, limpieza y uso de productos químicos y exposición a humo de tabaco en la casa y en el trabajo, además de otro tipo de actividades (ir a una gasolinera, hacer una barbacoa, etc.). También se incluyen 2 preguntas sobre la molestia que le ha ocasionado en esos días la contaminación atmosférica exterior; la valoración se realiza mediante una escala en forma de termómetro. Finalmente, se obtiene un patrón de tiempo-actividad de las 48 h.

Tabla 2. Variables recogidas mediante entrevista personal en la semana 28-32 de gestación. Cuestionario de exposición ambiental y laboral

Características de la vivienda: localización, tipo de vivienda y antigüedad, piso, número de personas que viven en ella, número de habitaciones, metros cuadrados de la casa, ventanas exteriores o interiores; frecuencia con la que pasan coches y vehículos pesados por su casa, distancia a una calle con tráfico continuo, molestia por contaminación atmosférica y ruido, fuentes de ruido habituales; realización de obras en el domicilio; presencia de animales domésticos; tipo de combustible para cocinar y uso del extractor al cocinar; tipo de calefacción-aire acondicionado y su uso durante el embarazo; tiempo que se ventila la casa, frecuencia de uso de velas e incienso; proximidad de la casa a zonas con actividad industrial

Exposición a tabaco: consumo de tabaco por la embarazada (pasado y actual), consumo de tabaco por el padre del bebé y otros familiares/amigos en la casa, exposición a tabaco en el trabajo y otros lugares diferentes de la casa

Patrón tiempo-actividad y desplazamiento: tiempo que pasa habitualmente en el trabajo la embarazada (exterior-interior), en otros edificios, en el ambiente exterior, en casa (exterior-interior), y en otras casas. Tiempo al día desplazándose y medio de desplazamiento (caminando, bicicleta, motocicleta o ciclomotor, coche o taxi, autobús o tranvía, en tren o metro)

Trabajo: exposiciones laborales a tóxicos (disolventes/colas/pegamentos, benceno, etc.)

Tabla 3. Mediciones de contaminantes atmosféricos en cada una de las cohortes del estudio INMA

	Granada ^a	Valencia	Sabadell	Asturias	País Vasco
Aire exterior					
Campañas	3 (verano/invierno)	4 (1 por trimestre)	2 (verano/invierno)	2 (verano/invierno)	2 (verano/invierno)
Contaminantes y n.º de puntos					
NO ₂ COV	78 puntos	93 puntos	58 puntos	67 + 10 puntos	80 puntos ^b
O ₃ ^c	—	93 puntos	—	67 + 10 puntos	80 puntos ^b
PM ₁₀	—	4 puntos	1 punto	1 punto	7 puntos ^b
PM _{2,5}	—	6 puntos	1 punto	1 punto	7 puntos ^b
HAP	—	6 puntos	— ^b	—	7 puntos ^b
Casa interior/exterior					
Momento de la medición	—	Semana 32 de gestación	Semana 32 de la gestación	Semana 32 de gestación	Semana 32 de gestación
Contaminantes	—	NO ₂ , COV	NO ₂ , COV	NO ₂ , COV	NO ₂ , COV
N.º de casas	40 ^b	80	40	40	80
Personal					
Contaminantes	—	COV	NO ₂ , COV	NO ₂ , COV	NO ₂ , COV
N.º mujeres	—	80	40	40	80 ^b
Año	2003 y 2006	2004-2005	2005	2005	2006-2007

^aCohorte previa: cohorte de embarazadas que ya se habían formado en el momento de iniciar la Red INMA.

^bSólo verano.

Biomarcadores

Se determina la concentración del 1-hidroxipireno (1-OHP) en una muestra de orina recogida a primera hora de la mañana en la semana 12 de gestación.

Entrevistas personales

Mediante un cuestionario administrado por entrevista personal en la visita de la madre en el hospital en la semana 28-32 de gestación, se obtiene información respecto a la localización de la casa, el trabajo, las posibles fuentes de exposición en el exterior de la vivienda, el patrón tiempo-actividad de la madre y variables relevantes en cuanto a la exposición en el interior de su casa: exposición al humo del tabaco, calefacción, cocina (gas o

eléctrica), ventilación, número de personas que viven en la casa, utilización de productos químicos en la limpieza o lucha contra plagas, etc. El patrón tiempo-actividad se refiere a la distribución horaria habitual durante el embarazo, es decir, las horas que se permanece en el domicilio, en el trabajo, en los desplazamientos o en otros lugares, y si éstos son exteriores o interiores. También se obtiene información del modo de transporte y el tiempo que duran los desplazamientos.

Sistemas de información geográfica

A partir de sistemas de información geográfica (SIG) de diversos organismos públicos (ayuntamientos, comunidades autónomas, diputaciones) se obtienen datos de densidad de población, carreteras, ubicación

de gasolineras y fuentes puntuales de contaminación, así como de intensidad media diaria (IMD) de tráfico de vehículos y vehículos pesados por las principales vías de tránsito de las zonas a estudio. La georreferenciación (identificación de las coordenadas geográficas) de los domicilios de las mujeres, así como la de los centros de trabajo (si procede), se realizó también mediante SIG de uso público (Mapsonic®, Guía Campsa®).

Especificaciones técnicas de los captadores y determinaciones analíticas

En aire ambiente, en las casas y en la medición personal, tanto para la captación de NO₂ como para la captación de COV se han utilizado muestreadores pasivos de simetría radial. Estos muestreadores, mediante un filtro impregnado en una sustancia captadora, son capaces de retener un determinado gas presente en la atmósfera a través de difusión molecular. En concreto, el NO₂ se retiene en un cartucho que contiene trietanolamina en solución etanólica. Después de la exposición se extrae en el laboratorio por agitación en baño de ultrasonido con agua durante 30 min y se determina por espectrofotometría a 540 nm, utilizando el método Griess-Saltzman, con sulfanilamida y bicloruro de N-(1-naftil) etilenodiamina. Para la determinación de benceno y otros COV, el muestreador utilizado está relleno de carbón grafitizado, donde quedan retenidos los COV. Con posterioridad se desorben térmicamente y se analizan por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). El ozono es captado mediante el muestreador pasivo «ogawa» que contiene 2 filtros de fibra de vidrio de 14 mm de diámetro, impregnados en una solución de ion nitrito que, al reaccionar con el ozono, pasa a ion nitrato, que se determina por cromatografía iónica.

La toma de muestras de material particulado se realiza por medio de captadores que aspiran un caudal de aire fijo y están equipados con un cabezal de separación de partículas PM₁₀ o PM_{2.5} (tabla 3). La concentración de partículas se determina mediante medida gravimétrica de la masa. En cuanto a la composición de las partículas medidas, los HAP se analizan utilizando un sistema de extracción acelerada de los filtros, con hexano:acetona (50:50), concentración posterior y purificación del extracto obtenido. Los análisis de material particulado, HAP, NO₂, COV y ozono se realizan en el Instituto de Salud Carlos III.

Para la medida de marcadores biológicos en orina, fundamentalmente 1-hidroxipireno, las muestras se guardan a -20 °C. Para el análisis se ajusta el pH de la muestra a 5,0 y se tampona con tampón acetato 0,5 M pH 5,0. Después se añade β-glucuronidasa/aryl sulfatasa y se incuba 1 hora a 37 °C en agitación. Con poste-

rioridad se centrifuga y el sobrenadante se deposita sobre una columna RP-18 previamente acondicionada. Se eluye una primera fracción de agua, una segunda de hexano y una tercera con diclorometano, en donde se obtienen los hidroxipirenos. El volumen de esta fracción se reduce a cuasi sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisuelve con metanol. Los extractos se analizan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, en una columna analítica C₁₈ acoplada a una columna de protección C₁₈, y como detector un espectrofotómetro de fluorescencia ultravioleta (λ de excitación y emisión de 242 y 389 nm, respectivamente). El análisis se lleva a cabo en el departamento de química ambiental, del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC de Barcelona y en el Laboratorio de Salud Pública de Bizkaia.

Análisis de los datos

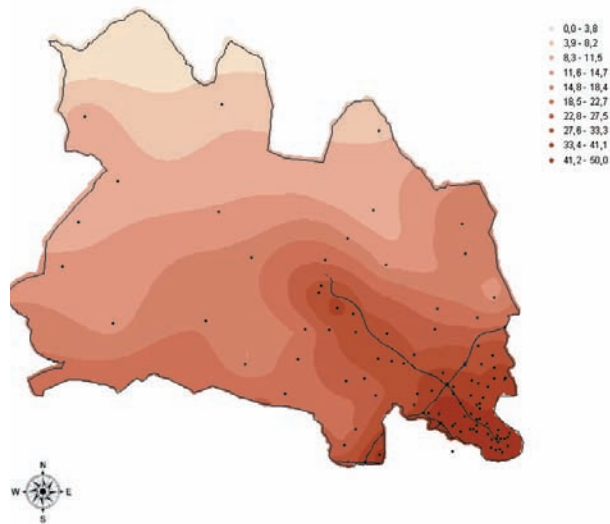
Tras la recogida de datos, la grabación y la depuración de las bases generadas, se procederá al análisis estadístico descriptivo con el fin de caracterizar las variables de exposición. Los objetivos principales del análisis de esta parte del proyecto INMA consisten en la elaboración de índices válidos de la exposición individual a contaminación atmosférica y en el análisis de su relación con el desarrollo fetal y la salud del recién nacido.

1. Para la elaboración de índices de exposición individual se dispone de diferentes fuentes.

– Contaminación exterior: se determinará mediante la distribución espacial de contaminantes NO₂, COV y ozono. Para ello se utilizarán, sobre las concentraciones obtenidas a partir del enrejado, técnicas de geoestadística que permiten obtener predicciones para NO₂, COV y ozono en el continuo del área de estudio. En nuestro caso utilizamos como interpolador el Kriging Universal. Este método tiene la ventaja de proporcionar el mejor estimador lineal insesgado de la superficie de contaminación y presenta la capacidad de incorporar tendencias en la superficie. Se han obtenido mapas de la distribución espacial de los contaminantes mediante el programa ArcView 8.1. En la figura 1 se muestra un ejemplo de los resultados que se obtienen a partir de las concentraciones medidas en el enrejado. En ella se indican los puntos de muestreo para las mediciones con captadores pasivos y se muestra la predicción obtenida en el área de estudio de Valencia con los datos obtenidos a partir del enrejado realizado en el mes de abril de 2004 para NO₂.

En la validación de la predicción se compara el valor predicho con el valor obtenido en la medición real en el exterior de la casa de las mujeres de la submuestra. Para una evaluación más precisa de las concentraciones exteriores de contaminación, los resultados de la suavización (*kriging*) se combinan con informa-

Figura 1. Concentraciones de dióxido de nitrógeno (medido en $\mu\text{g}/\text{m}^3$) estimadas a partir de las mediciones del enrejado de la campaña de abril de 2004. Área de estudio de Valencia.



ción secundaria de carácter espacial, relativa a tráfico, usos del suelo, altura de los edificios, etc. Para la evaluación de la exposición individual se combina el mapa de contaminación exterior con la información del patrón tiempo-actividad. Este proceso posibilita la elaboración de un índice ponderado o matriz individual de exposición a contaminación exterior para cada mujer.

Con respecto a la contaminación exterior por otros contaminantes, como las partículas, es decir, PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ e HAP, no se dispone de un enrejado, por lo que no se puede disponer de predicciones para todos los puntos del área a estudio. En este caso se asignarán a cada mujer las concentraciones del captador más representativo (por proximidad o características de la zona).

– Contaminación en interiores: la exposición a contaminantes interiores se obtiene principalmente a partir de la información recogida a través de cuestionarios. Por otro lado, los datos de concentraciones de NO_2 y COV en el interior de la casa se utilizan en modelos de predicción relacionados con las variables recogidas en el cuestionario ambiental (climatización, tabaco, cocina, ventilación, etc.) que pueden ser extrapolados al conjunto de las mujeres en el estudio.

– Contaminación individual: se evalúa mediante la combinación de los índices de exposición a contaminantes en el exterior y en el interior de las viviendas con el patrón de tiempo-actividad. Para los COV se ensayarán modelos de ajuste en la submuestra de mujeres que han llevado muestreadores pasivos, con el fin de poder predecir la exposición a estos contaminantes. Por otro lado, se dispondrá de las concentraciones de 1-OH-pireno, como indicador de la exposi-

ción individual a hidrocarburos. Se contrastará su relación con las concentraciones ambientales de partículas y de HAP, así como con las variables de exposición del cuestionario, en especial al tabaco.

2. Análisis de su relación con el desarrollo fetal y la salud del recién nacido.

Se analizará el efecto en salud medido como crecimiento fetal y efectos reproductivos, así como problemas de salud infantil. Las variables de efecto relacionadas con el desarrollo fetal serán las utilizadas en otros estudios el peso bajo al nacer ($< 2.500 \text{ g}$), el retardo en el crecimiento intrauterino (peso por debajo del percentil 10, ajustado por tiempo de gestación y sexo) y el parto pretérmino (antes de la semana 37 de gestación). Además, mediante la aplicación de modelos lineales de efectos mixtos se obtienen curvas de crecimiento fetal personalizadas a partir de la información de los parámetros biométricos (perímetro craneal, perímetro abdominal, diámetro biparietal y longitud del fémur) recogidos en las ecografías. Esto permite clasificar a los niños respecto a su desarrollo fetal teniendo en cuenta su potencial de crecimiento. En cuanto a los efectos relacionados con la salud infantil, se valora la existencia de asma, infecciones, alergias, respuesta inmunitaria y desarrollo neurológico. Estos efectos se miden al año y a los 4 años de vida del niño mediante exploración clínica y psicológica, pruebas funcionales (*prick test*) y cuestionario estandarizado basado en los estudios AMICS e ISAAC^{38,39}. En estos análisis se tendrá en cuenta la posible modificación del efecto por otras variables ambientales (alérgenos, tóxicos persistentes), nutricionales, u otras exposiciones o condiciones (tabaco, laboral, sociales).

Comentarios finales

Tal como se recoge en una reciente revisión de la OMS², los resultados de los estudios sobre exposición a contaminación atmosférica durante el embarazo y su relación con el desarrollo fetal y del niño pequeño, aunque indicativos de causalidad, no son concluyentes. Tanto en dicha revisión como en otros trabajos se concluye que se necesita más investigación en este campo²⁻⁶, y se indican prioridades como confirmación de efectos reproductivos, identificación del período más vulnerable de exposición, contribución de los distintos contaminantes, clarificación de los mecanismos biológicos involucrados y examen del posible efecto a largo plazo de las exposiciones durante el embarazo^{2,6}.

Entre las limitaciones más importantes de algunos de los estudios realizados se encuentran los problemas para asignar la exposición individual, la evaluación del crecimiento fetal y el control de los posibles factores de confusión y/o modificación de efecto. En el protocolo

de INMA se han incluido planteamientos diferentes para evitar dichas limitaciones; éstas permiten un diseño prospectivo, lo que constituye una ventaja evidente. Además, en el caso de las exposiciones durante el embarazo, su relación con el desarrollo fetal y perinatal se puede evaluar en un plazo no excesivamente largo.

El protocolo presentado permite una evaluación de la exposición individual en los sujetos a estudio. Así, las mediciones de contaminantes atmosféricos relevantes (partículas, HAP, NO₂, COV y ozono) se evalúan conjuntamente con la información de las concentraciones en ambientes interiores y del lugar de trabajo y se construyen matrices de exposición individual. El uso de información de SIG con datos obtenidos de manera continuada a lo largo del tiempo permite asignar diferentes indicadores de exposición según distintos momentos del embarazo, con el fin de identificar los momentos de mayor susceptibilidad.

La modelización del crecimiento fetal mediante el uso de la información de ecografías seriadas permite tener en cuenta el potencial de crecimiento de cada niño sobre la base de los factores fisiológicos que actúan en las distintas facetas del mismo. De ese modo, se puede distinguir entre los niños de bajo peso constitucionales de aquellos cuyo crecimiento ha presentado un retraso durante la etapa fetal.

En tercer lugar, el diseño utilizado permite la obtención de información individual necesaria para controlar distintos factores de confusión y/o de modificación de efecto que podrían distorsionar la relación observada entre contaminación y los efectos en el desarrollo fetal, en particular la exposición a otros tóxicos, el estado nutricional y los factores socioeconómicos y laborales.

Por otro lado, las diferentes cohortes que conforman el estudio INMA aportan un número razonable de participantes, con una potencia suficiente para el contraste de hipótesis comprobadas, así como una heterogeneidad en las características ambientales y sociodemográficas de las poblaciones a estudio.

Junto a las ventajas citadas nuestro estudio también presenta algunas limitaciones respecto a otros estudios. En la actualidad hay algunas cohortes que han establecido un protocolo muy completo para la evaluación de la exposición. Así, en algunas cohortes llevadas a cabo en Nueva York por la Universidad de Columbia (Estados Unidos)^{20,40} o en Polonia por Jedrychowski et al³³ se utilizan captadores personales para la determinación de la exposición individual a partículas finas (PM_{2.5}), medición que no hemos podido incluir en nuestro estudio. Además, algunas han utilizado biomarcadores específicos de exposición a HAP, como los aductos de ADN^{41,42}. Este tipo de marcadores se considera de elección para la exposición a HAP. La determinación de 1-hidroxipireno utilizada en nuestro estudio tiene la ventaja de realizarse en orina y, por tanto, no es invasiva,

pero la desventaja de ser un marcador válido únicamente para exposición reciente. Por último, queda por determinar si en nuestro estudio se podrán llevar a cabo técnicas para la determinación de marcadores de efecto, como el daño oxidativo, que se evalúan mediante la 8-oxodesoxiguanosina y el ensayo cometa⁴³.

Otra limitación de nuestro estudio puede derivarse del número de personas relativamente bajo en comparación con otros estudios. Esto podría ser importante para efectos raros, como malformaciones congénitas o cáncer (en principio no incluidos entre los objetivos) o asociaciones de magnitud baja. En efecto, hay otros estudios en marcha, como las cohortes Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC)⁴⁴, The Danish National Birth Cohort⁴⁵, etc. Sin embargo, a diferencia del estudio INMA, la evaluación de la exposición a contaminantes atmosféricos durante el embarazo se basa únicamente en la utilización de datos secundarios o en las respuestas del cuestionario. Para el futuro está prevista la puesta en marcha de cohortes numerosas, como la National Children Study en Estados Unidos⁴⁶ o la francesa, Etude longitudinale française depuis l'enfance (ELFE)⁴⁷. Esta última está en desventaja con nuestra cohorte, ya que no podrá evaluar directamente exposición en el embarazo, pues la selección de participantes comenzará con el nacimiento.

Un último aspecto, aún por concretar, se refiere a la determinación de marcadores genéticos que permitan evaluar la susceptibilidad genética. Éste y otros aspectos, como la colaboración con otras cohortes existentes en el ámbito internacional, son temas que cabe considerar en un futuro próximo. En definitiva, a pesar de algunas limitaciones ya comentadas, el proyecto INMA presenta ventajas sustanciales para la evaluación del impacto de exposición a contaminación atmosférica durante el embarazo y el desarrollo prenatal y neonatal. Por todo ello, este proyecto ofrece una oportunidad única para estudiar un factor ambiental que puede afectar a la salud de los niños. Sus resultados pueden ser de interés para la puesta en marcha de programas de prevención en salud pública.

Agradecimientos

La Red INMA recibe ayudas para la investigación del Instituto de Salud Carlos III (G03/176; ISCIII-FEDER) y del Fondo de Investigación Sanitaria FIS-FEDER 03/1615 para la cohorte de Valencia, FIS-FEDER 97/0588 y 00/0021-02 para la cohorte de Menorca, FIS-FEDER PI042018 para la cohorte de Asturias y otras ayudas FIS-FEDER PI041436, PI041509, PI041705, PI041666 y PI041931. El Estudio INMA ha recibido también ayudas de Fundació La Caixa para la cohorte de Ribera d'Ebre (97/009-00 and 00/077-00); de la Comisión de la Unión Europea (QLK4-1999-01422) y de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (SAS-202/04) para la cohorte

te de Granada; de la Comisión de la Unión Europea (QLK4-2000-00263) para la cohorte de Menorca; y del Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco (Exp.: 2005111093) para la Cohorte de Guipúzcoa.

Gracias muy especiales a todas las madres, y a sus hijas e hijos que están participando en el estudio INMA. A sus familias y a las matronas, los obstetras y los pediatras por su generosa cooperación. A los responsables de las redes de vigilancia y control de la contaminación atmosférica. A Xavier Querol y su equipo del Instituto Jaume Almera-CSIC Barcelona. A Enrique Mantilla y Caterina Coll, del Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. A todos los profesionales, instituciones y personas que colaboran con el desarrollo del proyecto.

Bibliografía

- Schwartz J. Air pollution and children's health. *Pediatrics*. 2004;113:1037-43.
- The effects of air pollution on children health and development. World Health Organization. Report, 2004. Disponible en: http://www.euro.who.int/childhealthenv/Risks/20050713_1
- Lacasana M, Esplugues A, Ballester F. Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. *Eur J Epidemiol*. 2005;20:183-99.
- Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. Particulate air pollution and fetal health. A systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology*. 2004;15:36-45.
- Maisonet M, Correa A, Misra D, Jaakkola JJ. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environ Res*. 2004;95:106-15.
- Sram RJ, Binkova B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect*. 2005;113:375-82.
- Bobak M, Leon DA. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986-8. *Occup Environ Med*. 1999;56:539-43.
- Vassilev ZP, Robson MG, Klotz JB. Outdoor exposure to airborne polycyclic organic matter and adverse reproductive outcomes: a pilot study. *Am J Ind Med*. 2001;40:255-262.
- Landgren K. Environmental pollution and delivery outcome in southern Sweden: a study with central registries. *Acta Paediatr*. 1996;63:1361-4.
- Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. *Environ Health Perspect*. 1997;105:514-520.
- Ritz B, Yu F. The effect of ambient carbon monoxide on low birth weight among children born in southern California between 1989 and 1993. *Environ Health Perspect*. 1999;107:17-25.
- Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect*. 2000;108:173-6.
- Rogers JF, Thompson SJ, Addy CL, McKeown RE, Cowen DJ, Decoufle P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particles. *Am J Epidemiol*. 2000;151:602-13.
- Maisonet M, Bush TJ, Correa A, Jaakkola JJ. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the northeastern United States. *Environ Health Perspect*. 2001;109:351-6.
- Lin MC, Yu HS, Tsai SS, Cheng BH, Hsu TY, Wu TN, et al. Adverse pregnancy outcome in a petrochemical polluted area in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2001;63:565-74.
- Ha EH, Hong YC, Lee BE, Woo BH, Schwartz J, Christiani DC. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology*. 2001;12:643-8.
- Dolk H, Pattenden S, Vrijheid M, Thakrar B, Armstrong B. Perinatal and Infant mortality and low birth weight among residents near coke Britain. *Arch Environ Health*. 2000;55:26-30.
- Bobak M, Richards M, Wadsworth M. Air Pollution and birth weight in Britain in 1946. *Epidemiology*. 2001;16:358-9.
- Maroziene L, Grazuleviciene R. Maternal exposure to low-level air pollution and pregnancy outcomes: a population-based study. *Environ Health*. 2002;1:6.
- Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, et al. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect*. 2003;111:201-6.
- Wilhelm M, Ritz B. Residential proximity to traffic and adverse birth outcomes in los angeles county, california, 1994-1996. *Environ Health Perspect*. 2003;111:207-16.
- Yang CY, Tseng YT, Chang CC. Effects of air pollution on birth weight among children born between 1995 and 1997 in Kaohsiung, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66:807-16.
- Dejmek J, Solansky I, Benes I, Lenicek J, Sram RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect*. 2000;108:1159-64.
- Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solansky I, Sram RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 1999;107:475-80.
- Lin MC, Chiu HF, Yu HS, Tsai SS. Increased risk of preterm delivery in areas with air pollution from a petroleum refinery plant in Taiwan. *J Toxicol Environ Health*. 2001;64:637-44.
- Xu X, Ding H, Wang X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Arch Environ Health*. 1995;50:407-15.
- Ritz B, Yu F, Chapa G, Fruin S. Effect of air pollution on preterm birth among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Epidemiology*. 2000;11:502-11.
- Yang CY, Chiu HF, Tsai SS, Chang CC, Chuang HY. Increased risk of preterm delivery in areas with cancer mortality problems from petrochemical complexes. *Environ Res*. 2002;89:195-200.
- Tsai SS, Yu HS, Liu CC, Yang CY. Increased incidence of preterm delivery in mothers residing in an industrialized area in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66:987-94.
- Woodruff TJ, Parker JD, Kyle AD, Schoendorf KC. Disparities in exposure to air pollution during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2003;111:942-6.
- Parker JD, Woodruff TJ, Basu R, Schoendorf KC. Air pollution and birth weight among term infant in California. *Pediatrics*. 2005;115:121-8.
- Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett RT. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1773-8.
- Jedrychowski W, Bendkowska I, Flak E, Penar A, Jacek R, Kaim I, et al. Estimated risk for altered fetal growth resulting from exposure to fine particles during pregnancy: an epidemiologic prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect*. 2004;12:1398-402.
- Dominici F, McDermott A, Daniels M, Zeger SI, Samet JM. Revised analyses of the National Morbidity, Mortality and Air Pollution Study: mortality among residents of 90 cities. *J Toxicol Environ Health A*. 2005;68:1071-92.
- Ramón RM, Ballester F, Rebagliato M, Ribas N, Torrent M, Fernández M, et al. La Red de Investigación «Infancia y Medio

- Ambiente» (Red INMA): protocolo de estudio. Rev Esp Salud Pública. 2005;79:203-220.
36. Infancia y Medio Ambiente [citado 6 Mar 2006]. Disponible en: <http://www.infanciaymedioambiente.org/>
 37. Calidad del aire. Determinación de la fracción PM₁₀ de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia. UNE-EN 12341; 1999.
 38. Sunyer J, Puig C, Torrent M, García-Algar O, Calico I, Muñoz-Ortiz L, et al. Nitrogen dioxide is not associated with respiratory infection during the first year of life. Int J Epidemiol. 2004;33:116-20.
 39. Carvajal-Ureña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suárez-Varela M, García de Andoín N, Batlles-Garrido J, et al. Geographic variation in the prevalence of asthma symptoms in spanish children and adolescents. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3, Spain. Arch Bronconeumol. 2005;41:659-66.
 40. Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tang D, Tsai WY, Bernert JT, et al. A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. Neurotoxicology. 2005;26:573-87.
 41. Perera F, Tang D, Whyatt R, Lederman SA, Jedrychowski W. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:709-14.
 42. Šram RJ, Binkova B, Rossner P, Rubes J, Topinka J, Dejmeš J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. Mutat Res. 1999;428:203-15.
 43. Sanderson E, Briggs D, Jantunen M, Forsberg B, Svartengren M, Šram R, et al. Human exposure to transport-related air pollution. En: Krzyzanowski M, Kuna-Dibbert B, Schneider J, editors. Health effects of transport-related air pollution. Copenhagen: WHO; 2003. p. 89-90.
 44. Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) [citado 6 Mar 2006]. Disponible en: <http://www.alspac.bristol.ac.uk/protocol/default>
 45. Olsen J, Melbye M, Olsen SF, Sorensen TIA, P Aaby, Nybo Andersen AM, The Danish National Birth Cohort: its background, structure and aim. Scand J Public Health. 2001;29:300-7.
 46. Nacional Children Study [citado 6 Mar 2006]. Disponible en: <http://www.nationalchildrensstudy.gov>
 47. Etude longitudinale française depuis l'enfance (ELFE) [consultado 6 Mar 2006]. Disponible en <http://www.elfe.ined.fr>

Anexo 1. Miembros del proyecto INMA

Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Barcelona. Jordi Sunyer, Inma Aguilera, Mar Álvarez, Carlos Ferrer, Sílvia Fochs, Raquel García, Jordi Julvez, Manolis Kogevinas, Maribel López, Laura Muñoz, Gemma Perelló, Miquel Porta, Núria Ribas-Fitó, Anna Sánchez, Cristina Villanueva.

Escola Valenciana d'Estudis en Salut (EVES)-CS-GV. Valencia. Ferran Ballester, Carmen Iñiguez, María Andreu, Ana Esplugues, Francisco García, Sabrina Llop, Alicia Moreno, Santiago Pérez-Hoyos, Ana M. García García (Universitat de València).

Hospital Universitario La Fe-CS-GV. Valencia. Alfredo Marco, Josep Ferris, José A. Ortega, M. Paz Rodríguez, Elena Crehuá, Esther Apolinar, Sandra Pérez, Marina Lacasaña, Amaya Urgal.

Cohorte Asturias. Universidad de Oviedo. Adonina Tardón, Esteban Ezama, Purificación Gil, Patricia González-Arriaga, M.ª Felicitas López-Cima, David Oterino, Antonio Menéndez-Piñón. Hospital San Agustín de Avilés. Concepción Solares, Carlos Pérez, Santiago Pintado, Isabel López Carrascosa, José I Suárez Tomás, Isolina Riaño, María Etelvina Suárez, María Ángeles Sánchez García.

Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals. CSIC. Joan O. Grimalt, Josep M. Bayona, Daniel Carrizo, Sergi Díez, Esther Marco, Eva Gallego.

Cohorte Sabadell: Departament de Salut. Ajuntament de Sabadell. Maria Sala; PASSIR-ICS: Ramon Espel, Montse Abella; Corporació Sanitària Parc Taulí. Àgueda Rodríguez, Yolanda Canet, Carles Foradada, Pepi Rivera, Carme Figaró, Mònica Domingo, Joan Badia, Montse Grau, Núria Pey.

Universidad Miguel Hernández, Departamento de Salud Pública: Marisa Rebagliato, Laura Asensio, Francisco Bolívar, Adela Castelló, Lorena Ivorra, Francisco Martín, Amparo Quiles, Joan Quiles, Gemma León, Rosa Ramón, Elena Romero, Jesús Vioque.

Hospital Universitario San Cecilio (SAS)-Universidad de Granada: Nicolás Olea, Marieta Fernández, Margarita Jiménez, M. Teresa Salvatierra, Rosa Ramos, Carmen Freire, José Manuel Molina, Cristina Campoy, Francisco Cruz, Miguel Pérez.

Instituto de Salud Carlos III. MADRID Centro Nacional de Salud Ambiental. Rosalía Fernández-Patier, Dolores Herce Garraleta, Teresa Bomboi Mingarro, Saul García Dos Santos, Amelia Aguirre Alfaro, Pablo Díez Hernández, María José Malo Ara, Ana M.ª Pérez Muñoz de la Cuerva, Gema Oporto Asenjo, Andrés Díez Esteban, Jesús Alonso Herreros, Laura Rubio Majano, Concepción Martín-Arribas. Instituto de Investigación de Enfermedades Raras Manuel Posada, Ignacio Abaitua; M. Concepción Martín-Arribas.

Àrea de Salut de Menorca. Maties Torrent, María Victoria Iturriaga Sorraín.

Cohorte de Guipuzkoa. Subdirección de Salud Pública de Gipuzkoa. Jesús Ibarluzea, Mikel Basterretxea, María Dolores Martínez, Mikel Ayerdi. Hospital de Zumarraga. Leonor Arranz, Elizabeth Blarduni. Laboratorio de S.P. de Bilbao: Mercedes Espada, Jon Iñaki Álvarez, Agurtzane Manrique. Laboratorio de S.P. de Vitoria: Xabier Aginagalde.
