

Matrius biològiques per a l'avaluació de l'exposició ambiental al tabac durant l'època prenatal i la infància

Esther Papaseit^{1,2}, Heura Llaquet^{1,2}, Simona Pichini³, Xavier Joya^{1,2}, Oriol Vall^{1,2}, Óscar García-Algar^{1,2}

¹ Unitat de Recerca Infància i Entorn, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)-Hospital del Mar. Barcelona

² Departament de Pediatria, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

³ Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità. Roma (Itàlia)

RESUM

Fonament. La nicotina i els seus metabòlits principals, cotinina i trans-3 hidroxicotinina, determinats en matrius convencionals i no convencionals, han estat utilitzats com a biomarcadors de l'exposició ambiental al tabac durant la infància. La presència d'aquestes substàncies en matrius com líquid amniòtic, meconi i cabells fetals, s'explica per l'exposició prenatal al fum del tabac durant les diferents etapes de l'embaràs.

Objectiu. La determinació de la nicotina i els seus metabòlits en sang de cordó, orina neonatal i llet materna és útil per detectar l'exposició al fum del tabac durant el període immediatament abans i després del naixement. La determinació en infants de cotinina en sang i orina, per una banda, i en cabells, per una altra, permet conèixer l'exposició aguda i crònica durant la infància, respectivament. No obstant això, per tal de monitorar i categoritzar l'exposició acumulada al fum del tabac durant la totalitat de la infància, incloent-hi el període prenatal, l'avaluació de nicotina en dents ha estat proposada com una prometedora prova no invasiva.

Resultats i conclusions. Aquest article revisa la utilitat de la determinació de nicotina i els seus metabòlits en diverses matrius biològiques fetals i pediàtriques, considerant la no-invasivitat de la recollida, la finestra de detecció i l'aplicació clínica en pediatria.

Paraules clau: Matrius biològiques. Biomarcadors. Exposició ambiental al tabac. Embaràs. Prenatal. Infància.

MATRICES BIOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL AL TABACO DURANTE LA EPOCA PRENATAL Y LA INFANCIA

Introducción. La nicotina y sus principales metabolitos, cotinina y trans-3 hidroxicotinina, determinadas en matrices convencionales y no convencionales, han sido utilizadas como biomarcadores de la exposición ambiental al tabaco durante la infancia. La presencia de estas sustancias en matrices como líquido amniótico, meconio y cabello fetal se explica por la exposición prenatal al humo de tabaco durante las diferentes etapas del embarazo.

Objetivo. La determinación de la nicotina y sus metabolitos en sangre de cordón, orina neonatal y leche materna es útil para detectar la exposición al humo del tabaco durante el período inmediatamente antes y después del nacimiento. La determinación en niños de cotinina en sangre y orina y en pelo permiten conocer la exposición aguda y crónica durante la infancia, respectivamente. Sin embargo, para la monitorización y categorización de la exposición acumulada al humo del tabaco durante la totalidad de la infancia, incluyendo el período prenatal, la evaluación de nicotina en dientes ha sido propuesta como una prometedora prueba no invasiva.

Resultado y conclusiones. Este artículo revisa la utilidad de la determinación de nicotina y sus metabolitos en diversas matrices biológicas fetales y pediátricas, considerando la no invasividad de su recogida, la ventana de detección y la aplicación clínica en pediatría.

Palabras clave: Matrices biológicas. Biomarcadores. Exposición ambiental a tabaco. Embarazo. Prenatal. Infancia.

BIOLOGICAL MATRICES FOR THE EVALUATION OF ENVIRONMENTAL TOBACCO EXPOSURE DURING PRENATAL LIFE AND CHILDHOOD

Background. Nicotine and its major metabolites, cotinine and trans-3-hydroxycotinine, have been used as biomarkers for determination of environmental tobacco exposure during childhood in conventional and non-conventional biological matrices. The presence of these substances in matrices such as amniotic fluid, meconium, and fetal hair can be explained by prenatal exposure to environmental tobacco smoke (ETS).

Objectives. The determination of nicotine and its metabolites in cord blood, neonatal urine, and maternal milk can be used to detect exposure to ETS during the period immediately before and after birth. Measurement of cotinine levels in blood and urine, and of cotinine and nicotine in hair may allow for the assessment of acute and chronic exposure, respectively. However, assessment of nicotine in teeth has been proposed as a promising, non-invasive method for the determination and monitoring of cumulative exposure to ETS during childhood.

Results and Conclusions. This paper reviews the usefulness of measuring nicotine and its metabolites in different fetal and childhood biological matrices, considering its non-invasive nature, the window for detection, and the clinical application in pediatrics.

Key words: Biological matrices. Biomarkers. Environmental tobacco smoke exposure. Pregnancy. Prenatal. Childhood.

Correspondència: Óscar García-Algar
Unitat de Recerca Infància i Entorn. IMIM-Hospital del Mar.
Pg. Marítim, 25-29. 08003 Barcelona.
90458@imas.imim.es

Treball rebut: 18.06.2009
Treball acceptat: 27.01.2010

Papaseit E, Llaquet H, Pichini S, Joya X, Vall O, García-Algar O.

Matrius biològiques per a l'avaluació de l'exposició ambiental al tabac durant l'època prenatal i la infància.

Pediatr Catalana 2010; 70: 12-17.

Introducció

El tabaquisme és, actualment, una de les causes més importants de morbiditat i mortalitat de la població en els països desenvolupats¹.

La població pediàtrica es troba significativament afectada, i una de les causes més importants de malaltia² és l'exposició passiva al tabac. En molts casos l'exposició s'inicia dins de l'úter i continua després del naixement i durant tota la infantesa.

Els darrers anys s'han dissenyat i avaluat diverses intervencions per afavorir l'abandonament del consum de tabac durant l'embaràs. Diferents estudis han demostrat la relació directa entre el tabac, una sèrie d'alteracions en la salut reproductiva de la dona i efectes adversos en la gestació, entre els quals s'inclouen l'avortament espontani, el trencament prematur de membranes, el baix pes en néixer i el part prematur. També s'ha descrit un augment de la mortalitat i la morbiditat perinatals i infantils, que inclou la síndrome d'abstinència neonatal a la nicotina³ i l'augment del risc de síndrome de mort sobtada del lactant (SMSL)⁴. Durant la infantesa s'ha observat que l'exposició al fum del tabac s'associa a un augment de les infeccions respiratòries, asma, otitis i sinusitis, etc.⁵

Com a primer intent per identificar l'exposició al fum del tabac i apreciar-ne la magnitud, s'han utilitzat qüestionaris materns/paterns. No obstant això, en la majoria de casos la informació obtinguda és imprecisa i/o inexacta⁶. De manera similar a altres substàncies d'abús, en les últimes dues dècades, diversos marcadors biològics alternatius específics per al tabac han estat utilitzats amb la intenció de detectar els biaixos descrits.

En aquest treball es presenta la situació actual de la nicotina i la cotinina com a marcadors de l'exposició al fum del tabac en diferents matrius biològiques en infants durant el període prenatal i postnatal. S'ha revisat la base de dades bibliogràfica del grup, que inclou diverses revisions de la literatura citada a PubMed i incorporades en treballs publicats prèviament.

Matrius biològiques utilitzades per a l'avaluació de l'exposició prenatal al fum del tabac

Sang de cordó

La determinació de les concentracions de nicotina i els seus metabòlits en sang de cordó és indicativa de l'intercanvi transplacentari durant l'embaràs. Tot i així, la sang de cordó té dos inconvenients importants: (1) indica només l'exposició fetal al tabac durant els dies o hores anteriors a la recollida i, per tant, no és útil com a marcador d'exposició durant tot l'embaràs; (2) l'orina neonatal i el meconi són considerades dues matrius

menys invasives i més fàcilment disponibles⁷. Per tal de diferenciar entre exposició i no-exposició al tabac ambiental s'ha establert com a xifra de tall 1 ng/ml sang⁸⁻¹⁰. Diferents estudis durant els últims 10 anys han treballat amb l'objectiu de quantificar la cotinina en sang de cordó. Recentment, Franchini et al.⁸ han utilitzat la cotinina en sang de cordó per tal d'identificar l'impacte i l'efectivitat de la implantació de la llei antitabac a Itàlia. Els últims estudis¹¹⁻¹² han comparat les concentracions plasmàtiques de cotinina durant l'embaràs i la concentració de cotinina en sang de cordó al naixement, i han observat una correlació significativa entre el patró d'elevades concentracions plasmàtiques de cotinina en embarassades (des del començament de l'embaràs fins al naixement) i els valors de cotinina en sang de cordó. També, diferents estudis¹³⁻¹⁴ han corroborat la relació entre les concentracions de nicotina en sang de cordó i plasma matern durant l'embaràs.

Orina neonatal

L'orina es comença a formar en el fetus a partir de la vuitena setmana de gestació, però fins a la setena setmana la producció d'orina no és suficient per explicar la formació de líquid amniòtic. Tradicionalment, l'orina ha estat considerada la mostra neonatal d'elecció per a la detecció de substàncies d'abús. En aquest cas, l'anàlisi de cotinina en orina neonatal és fàcil, ràpida i econòmica¹⁵, i només té com a únic desavantatge una breu finestra de detecció, de poques hores a dies abans del moment del part. D'altra banda, l'anàlisi d'orina neonatal pot donar falsos positius depenent no tan sols de l'última exposició de la mare, sinó també del temps transcorregut des del moment del part fins a la recollida de la mostra¹².

La determinació de cotinina en orina s'ha utilitzat com a biomarcador d'exposició a fum de tabac durant l'embaràs i ha estat comparada amb altres matrius biològiques com la llet materna o la sang de cordó.

Dahlstrom et al.¹⁶ i Curvall et al.¹⁷ van demostrar que les concentracions plasmàtiques de cotinina (però no les de nicotina) en dones embarassades, llet materna i orina neonatal eren reflex de l'hàbit tabàquic durant l'embaràs. No obstant això, en altres estudis aquesta correlació no es confirmava; així, Pichini et al.¹² no van observar diferències significatives entre mares exposades i no exposades al fum de tabac.

A més de la nicotina en orina neonatal, també s'han mesurat altres metabòlits del tabac: cotinina, i trans-3'-hidroxicotinina¹⁸.

Cabells neonatals

Els cabells neonatals són una matriu biològica sensible que defineix l'acumulació de l'exposició a substàncies durant l'últim trimestre de vida intrauterina. En el fetus,

els cabells comencen el creixement aproximadament als 6 mesos d'edat gestacional i arriben al cuir cabellut després d'aproximadament 3 setmanes. Els cabells neonatals tenen l'avantatge de poder ser recollits durant els primers 3 mesos de vida; després d'aquest temps són reemplaçats per cabells postnats⁷. No obstant això, algunes mares no donen el seu consentiment per tallar-los per raons culturals o estètiques. A més, el nounat pot no tenir prou cabells, ja que la mostra mínima per fer una extracció i anàlisi correctes és d'entre 20 i 50 mg de cabells¹⁹⁻²⁰.

Tant la nicotina com la cotinina són incorporades als cabells mitjançant difusió a través de la circulació sistèmica, de manera similar a altres xenobiòtics. S'han observat concentracions de nicotina més altes en els cabells pigmentats que en els no pigmentats¹⁹⁻²⁰.

Durant els anys noranta, diferents grups d'investigadors¹⁹⁻²⁵ van concloure que hi ha una correlació significativa entre les concentracions de nicotina i cotinina en cabells materns i neonatals. Jacqz-Aigrain et al.²⁶ van descriure, a més, que les concentracions de nicotina i cotinina estan associades amb el consum de tabac durant el tercer trimestre de l'embaràs.

Ungles neonatals

Les ungles es formen durant l'últim trimestre de gestació i reflecteixen l'exposició únicament en aquest període²⁷. Les ungles humanes creixen a una velocitat aproximada d'1 cm cada 9-12 mesos i, per tant, la detecció de nicotina en aquesta matriu és un indicador d'acumulació. La incorporació de substàncies a les ungles neonatals, de la mateixa manera que els cabells, és mediada per la sang fetal i el líquid amniòtic, però a diferència d'aquests, la recollida és més fàcil, ja que les ungles són sempre presents i es consideren com un material de rebuig.

Mari et al.²⁸ van utilitzar les ungles per monitorar per primer cop l'exposició neonatal a substàncies d'abús durant l'embaràs, en nadons abandonats immediatament després del naixement; els seus resultats donen suport a l'ús de les ungles per identificar l'exposició crònica a substàncies d'abús durant l'embaràs.

Líquid amniòtic

A les 20 setmanes de gestació, la secreció materna és el mecanisme més important de formació de líquid amniòtic, amb algun component de secreció fetal. Després d'aquest període, l'orina fetal i les secrecions pulmonars són les dues principals fonts de formació de líquid amniòtic amb una mínima absorció fetal i intramembranosa²⁹. A les 10 setmanes de gestació, el volum de líquid amniòtic és aproximadament de 30 ml i augmenta entre 8 a 10 ml a la setmana³⁰. Com que el líquid amniòtic ja està format en les primeres setmanes de gestació, la presència de substàncies d'abús pot

informar sobre l'exposició durant les primeres setmanes de gestació. Encara que l'extracció és invasiva, amb un moderat risc per al fetus, aquesta es pot fer en qualsevol moment de l'embaràs i, per tant, és un indicador d'exposició continuada a les substàncies detectades en la circulació materna. Tant la nicotina com els seus metabòlits han estat identificats en líquid amniòtic i s'ha establert la cotinina com el metabòlit més important de la nicotina³¹⁻³². Per primer cop l'any 1985, Luck et al.³³ van analitzar líquid amniòtic obtingut durant el segon trimestre de gestació, i teixit placentari i sèrum fetal al naixement, i van observar que les concentracions de nicotina en placenta, líquid amniòtic i sèrum fetal eren més elevades que en sèrum matern. D'acord amb aquests resultats, Jordanov et al.³⁴ van observar que la cotinina en líquid amniòtic era 8 vegades més elevada en fumadores actives respecte de les no exposades i 2,5 vegades més respecte de les fumadores passives. Janniaux et al.³⁵ van demostrar que la cotinina s'acumula en el compartiment fetal a partir de la setena setmana de gestació, tant en fumadores actives com passives.

Tot i que l'anàlisi de líquid amniòtic confirma l'exposició fetal a nicotina i cotinina, la determinació en aquest fluid biològic no s'utilitza per identificar l'exposició prenatal a causa de la invasivitat que comporta i del perill que representa de pèrdua de benestar fetal⁸.

Meconi

Recentment, el meconi ha esdevingut la matriu d'elecció per detectar l'exposició a substàncies d'abús en nounats. El meconi és la primera matèria fecal neonatal. Pot ser recollit entre el 1r el 5è dia posteriors al naixement, i la recol·lecció és fàcil i no invasiva. La concentració de substàncies d'abús és generalment més elevada en meconi que en orina, ja que la seva acumulació es produeix al llarg de mesos. Per aquestes raons, el meconi proporciona una informació més completa de l'exposició al tabac durant l'embaràs que l'anàlisi de l'orina neonatal i/o la sang de cordó. Ostrea et al.³⁶ van utilitzar la concentració de cotinina en meconi de nounats nascuts de mares fumadores categoritzant el grau de fumador, però els nivells obtinguts entre fumadores passives i fumadores actives van ser similars. Sherif et al.³⁷ van obtenir una correlació positiva significativa entre els nivells de cotinina en meconi i els valors de cotinina en orina i saliva materna. Recentment, Gray et al.³⁸⁻³⁹ van quantificar les concentracions de nicotina i 4 dels seus metabòlits (cotinina, trans-3'-hidroxicotinina, norcotinina i norcotinina) en meconi de nounats exposats al tabac i en altres de no exposats. Nicotina, cotinina i OH-cotinina van ser els biomarcadors de tabac més prevalents i abundants en meconi, amb concentracions més elevades en els nounats exposats al tabac. Les concentracions de nicotina, cotinina o trans-3'-hidroxicotinina en meconi > 10 ng/g discriminen amb precisió nounats no exposats, exposats passivament i exposats activament.

Matrius biològiques utilitzades per a l'avaluació de l'exposició postnatal al fum del tabac

Llet materna

La llet materna és un líquid complex que aporta simultàniament nutrients i components bioactius que faciliten l'adaptació fetal del nou-nat, l'establiment de la flora microbiana i el desenvolupament dels teixits limfoides associats. La llet materna està formada per vitamines, proteïnes, pèptids bioactius, oligosacàrids i àcids orgànics.

La raó principal de la determinació de substàncies en llet materna és calcular l'excreció de certs components i d'aquesta manera conèixer la quantitat ingerida pel nadó. Tant la nicotina com els seus metabòlits són excretats en llet materna encara que la concentració varia segons la dosi, la durada, la quantitat de llet excretada diàriament, la salut de la mare i el seu genotip. La vida mitjana de la nicotina en llet és d'aproximadament 2 hores, mentre que les concentracions de cotinina romanen constants durant un interval aproximat de 4 hores després de fumar, cosa per la qual la cotinina es considera el millor biomarcador⁴⁰.

Després de fumar, les concentracions de nicotina en llet materna són més elevades que en la sang (3:1), però només el 10% de la nicotina materna s'excreta en llet materna. La ràpida transferència de nicotina des del sèrum a la llet materna i la seva curta vida mitjana indica que les mares que no poden frenar el seu hàbit tabàquic durant la lactància materna han d'intentar prolongar el temps entre l'última cigarreta i la lactància per tal de minimitzar l'exposició del nadó als productes del tabac⁴¹.

Diferents estudis^{16, 42-44} han conclòs que les concentracions de cotinina en llet materna es correlacionen amb el nombre de cigarretes al dia. S'ha observat una correlació lineal entre cotinina i nicotina en sèrum i llet materna. Per tant, en nadons la llet materna és la major font d'exposició a nicotina, i l'exposició passiva al tabac passa a un segon lloc. Tenint en compte aquestes dades, Page-Sharch et al.⁴⁵ van utilitzar la mateixa metodologia per comprovar que els pegats de nicotina no aporten una influència important durant el període de lactància. Pellegrini et al.⁴⁶ van determinar en llet materna nicotina i els seus metabòlits principals, cotinina, trans-3'-hidroxicotinina i cotinina-N-òxid. En aquest estudi es va determinar nicotina només en la llet de les mares que havien declarat fumar immediatament abans de donar lactància en contraposició a la cotinina que es va obtenir en la llet de totes les mares fumadores. Poc després, Vagnarelli et al.⁴⁷ van descriure per primer cop la síndrome d'abstinència a nicotina en un infant alimentat amb lactància materna exclusiva per una mare fumadora.

Orina

Les concentracions de nicotina en orina aconsegueixen el nivell màxim al cap de 2 hores després de fumar i decreixen posteriorment, fins passades les 4 hores⁴⁸. La nicotina no és un marcador adequat per determinar exposició passiva, ja que té una curta vida mitjana. S'ha establert com a límit per a fumadors actius 100 ng nicotina/ml orina, mentre que una quantitat inferior a 5 ng/ml indica no-exposició al fum de tabac. Altres metabòlits de la nicotina que han estat estudiats per mesurar l'exposició al fum són la OH-cotinina i la suma de cotinina + OH-cotinina⁴⁹. Durant els anys noranta, diferents estudis van desenvolupar diversos mètodes d'anàlisi de nicotina i cotinina en orina, per tal d'estudiar l'exposició al fum de tabac en infants Recentment⁵⁰, la cotinina en orina ha estat utilitzada per mesurar l'exposició al fum de tabac.

Saliva

La saliva ha estat considerada un interessant biomarcador d'exposició al fum de tabac durant les hores prèvies a la recollida, menys invasiva i menys rendible que la sang. La transferència dels components del tabac i els seus metabòlits de la sang a la saliva es produeix principalment per difusió passiva. Malgrat que hi influeixen múltiples factors⁵¹, aquesta matriu ha estat utilitzada tradicionalment per correlacionar les concentracions de diverses substàncies d'abús en sang i saliva.

Des dels anys vuitanta, diferents articles han mostrat que la cotinina pot ser detectada en saliva d'infants si viuen en un ambient de fumadors⁵²⁻⁵³. Tant en fumadors com en no-fumadors, les concentracions de cotinina en saliva es correlacionen amb el nombre de cigarretes. L'any 1994, Ronchetti et al.⁵⁴ van descriure que les concentracions de cotinina en infants eren més fàcilment detectades a l'hivern, ja que augmentava l'exposició passiva al tabac a casa. En canvi, a la primavera, les concentracions de cotinina detectades eren atribuïbles a l'exposició activa al tabac. D'acord amb aquests treballs, l'equip de Jarvis et al.⁵⁵ va concloure que les concentracions de cotinina en infants presentaven una clara i significant relació amb l'exposició passiva al tabac provinent de l'entorn familiar. D'aquesta manera, les concentracions de cotinina es correlacionen amb el nombre diari total de cigarretes fumades pels dos progenitors, el nombre diari de cigarretes fumades a casa i el nombre de cigarretes fumades a casa durant les 24 hores prèvies a la recollida de la mostra.

Tot i així, encara que la saliva és una matriu d'exposició aguda (hores prèvies), és necessari repetir les determinacions per tal de confirmar una exposició repetida a qualsevol substància d'abús. Aquest fet ha condicionat que no s'utilitzi extensament per determinar l'exposició a substàncies d'abús.

Cabells

Els cabells són considerats la matriu d'exposició crònica «de referència» per determinar l'exposició al fum de tabac. L'avantatge més gran que presenten els cabells, enfront d'altres matrius, és que creix aproximadament 1 cm/mes i la cotinina s'hi va acumulant. Les determinacions de cotinina estan relacionades amb la longitud dels cabells i la distància des del cuir cabellut, i aquest paràmetre és el que hi té un paper més important. Pichini et al.⁵⁶ van mesurar per primera vegada les concentracions de nicotina en població pediàtrica amb l'objectiu d'utilitzar els cabells per classificar diferents nivells d'exposició passiva al fum del tabac.

Dents

Les dents són considerades una matriu de dipòsit exogen. L'any 2003 es va desenvolupar la tècnica d'anàlisi de nicotina i cotinina en dents⁵⁷, i García-Algar et al.⁵⁸ van descriure les dents com una matriu d'exposició al fum de tabac des del començament de la vida fetal fins a la part final del període d'infantesa. Posteriorment, en l'estudi AMICS (Asthma Multicenter Infant Cohort Study)⁵⁹, que associava biomarcadors d'exposició al tabac prenatal i postnatal, es va descriure que únicament les concentracions de nicotina diferenciaven els nens exposats dels no exposats.

Conclusió

Durant les últimes dècades s'han utilitzant diferents matrius biològiques per a l'avaluació prenatal de l'exposició al fum del tabac. Com a marcadors d'exposició aguda (últimes hores i/o dies abans del part) es disposa de la sang de cordó i l'orina. Entre els marcadors d'exposició crònica destaquen el líquid amniòtic, el meconi i els cabells neonatals. Encara que el líquid amniòtic comença la seva formació al començament de l'embaràs, la recollida és difícil i invasiva, motius que en dificulten l'ús en gran manera. El meconi, per contra, s'obté fàcilment i dona informació de l'exposició durant el segon i el tercer trimestres de l'embaràs, per això es converteix en una molt bona matriu per estudiar l'exposició al tabac durant la segona meitat de la vida fetal. Els cabells neonatals, formats en el tercer trimestre de gestació, són una valuosa matriu per estudiar l'exposició en l'últim tram de l'embaràs, encara que en alguns nounats és difícil aconseguir-ne una quantitat suficient. Idealment, s'haurien de recollir diferents matrius d'exposició per tal d'obtenir una informació acurada del període prenatal complet.

Respecte de l'exposició postnatal, l'anàlisi de la llet materna proporciona informació rellevant durant la lactància materna en mares fumadores, ja sigui quantificant el nombre de cigarretes com identificant el moment en què es transmet el mínim de substàncies tòxiques. Les dents ofereixen una valuosa informació sobre l'exposició prenatal i infantil i el seu ús com a matriu biològica alternativa hauria de ser considerat en un futur.

Bibliografia

1. Jha P, Ranson M, Nguyen S, Yach D. Estimates of global and regional smoking prevalence in 1995, by age and sex. *Am J Public Health* 2002; 92: 1.002-1.006.
2. DiFranza J, Aligne C, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 2004; 113: 1.007-1.015.
3. García-Algar O, Puig C, Méndez C, Vall O, Pacifici R, Pichini S. Neonatal nicotine withdrawal syndrome. *J Epidemiol Community Health* 2001; 55: 687-688.
4. Koren G. Fetal toxicology of environmental tobacco smoke. *Curr Opin Pediatr* 1995; 7: 128-131.
5. Samet JM. Involuntary smoking and children's health. *Future Child* 1994; 4: 94-114.
6. Wells A, English S, Posner L et al. Misclassification rates for current smokers classified as nonsmokers. *Am J Public Health* 1998; 88: 1.503-1.509.
7. Lozano J, García-Algar O, Vall O, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 711-734.
8. Franchini M, Caruso C, Perico A et al. Assessment of fetal exposure to cigarette smoke after recent implementations of smoke-free policy in Italy. *Acta Paediatr* 2008; 97: 546-550.
9. Bearer C, Emerson RK, O'Riordan MA, Roitman E, Shackleton C. Maternal tobacco exposure and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 202-206.
10. Chazeron I, Daval S, Ughetto S, et al. GC-MS determined cotinine in an epidemiological study on smoking status at delivery. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 485-488.
11. Perkins SL, Belcher JM, Livesey JF. A Canadian tertiary care centre study of maternal and umbilical cord cotinine levels as markers of smoking during pregnancy: relationship to neonatal effects. *Can J Public Health* 1997; 88: 232-237.
12. Perkins SL, Livesey JF, Escarot EA, Belcher JM, Dudley DK. High-performance liquid-chromatographic method compared with a modified radioimmunoassay of cotinine in plasma. *Clin Chem* 1991; 37: 1989-1993.
13. Puig C, García-Algar O, Monleon T, et al. A longitudinal study of environmental tobacco smoke exposure in children: parental self reports versus age dependent biomarkers. *BMC Public Health* 2008; 8: 47.
14. Pichini S, Basagaña XB, Pacifici R, et al. Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 1079-1083.
15. Wu FY, Chiu HT, Wu HD, Lin CJ, Lai JS, Kuo HW. Comparison of urinary and plasma cotinine levels during the three trimesters of pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 22: 296-301.
16. Kuo HW, Yang JS, Chiu MC. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 768: 297-303.
17. Mansi G, Raimondi F, Pichini S, et al. Neonatal urinary cotinine correlates with behavioral alterations in newborns prenatally exposed to tobacco smoke. *Pediatr Res* 2007; 61: 257-261.
18. Dahlström A, Lundell B, Curvall M, Thapper L. Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 142-147.
19. Curvall M, Kazemi-Vala E, Enzell CR. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma using capillary column chromatography with nitrogen sensitive detection. *J Chromatogr* 1982; 232: 283-293.
20. Köhler E, Bretschneider D, Rabsilber A, Weise W, Jorch G. Assessment of prenatal smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in maternal and neonatal urine. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20: 1-7.
21. Kintz P, Kieffer I, Messer J, Mangin P. Nicotine analysis in neonates' hair for measuring gestational exposure to tobacco. *J Forensic Sci* 1993; 38: 119-123.
22. Kintz P, Mangin P. Evidence of gestational heroin or nicotine exposure by analysis of fetal hair. *Forensic Sci Int* 1993; 63: 99-110.
23. Kintz P, Villain M, Cirimele V. Hair analysis for drug detection. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 442-446.
24. Kintz P, Mangin P. Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J Forensic Sci Soc* 1993; 33: 139-142.

23. Eliopoulos C, Klein J, Phan MK, et al. Hair concentrations of nicotine and cotinine in women and their newborn infants. *JAMA* 1994; 271: 621-623.
24. Eliopoulos C, Klein J, Chitayat D, Greenwald M, Koren G. Nicotine and cotinine in maternal and nuchal hair as markers of gestational smoking. *Clin Invest Med* 1996; 19: 231-242.
25. Klein J, Koren G. Hair analysis—a biological marker for passive smoking in pregnancy and childhood. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18: 279-282.
26. Jacqz-Aigrain E, Zhang D, Maillard G, Luton D, André J, Oury JF. Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair. *BJOG* 2002; 109: 909-911.
27. Palmeri A, Pichini S, Pacifici R, Zuccaro P, Lopez A. Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 95-110.
28. Mari F, Politi L, Bertol E. Nails of newborns in monitoring drug exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* 2008; 179: 176-180.
29. Langman J. *Langman's Medical Embriology*. Filadèlfia: Williams & Wilkins, 1990; 7: 106-123.
30. Pichini S, Altieri I, Zuccaro P, Pacifici R. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet* 1996; 130: 211-228.
31. Karmowski A, Sobiech KA, Dobek D, Terpilowski L, Pałczyński B, Miś-Michalek M. The concentration of cotinine in urine, colostrum and amniotic fluids within the system mother baby. *Ginek Pol* 1998; 69: 115-122.
32. Dobek D, Karmowski A, Sobiech KA, Terpilowski L, Miś-Michalek M. Average quantitative concentration of cotinine within the system pregnant woman-baby. *Arch Immunol Ther Exp* 1998; 46: 59-61.
33. Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Dev Pharmacol Ther* 1985; 8: 384-395.
34. Jordanov JS. Cotinine concentrations in amniotic fluid and urine of smoking, passive smoking and non smoking pregnant women at term and in the urine of their neonates on 1st day of life. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 734-737.
35. Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 25-29.
36. Ostrea EM Jr, Knapp DK, Romero A, Montes M, Ostrea AR. Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. *J Pediatr* 1994; 124: 471-476.
37. Sherif NA, Kamel SM, Al-Ashkar OS, Sharaki OA, Seif EA, Hegazy EA. Detection of cotinine in neonate meconium as a marker for nicotine exposure in utero. *East Mediterr Health J* 2004; 10: 96-105.
38. Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, norcotinine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 863: 107-114.
39. Gray TR, Magri R, Shakleya DM, Huestis MA. Meconium nicotine and metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: differentiation of passive and nonexposure and correlation with neonatal outcome measures. *Clin Chem* 2008; 54: 2.018-2.027.
40. Atkinson HC, Begg EJ, Darlow BA. Drugs in human milk. *Clinical pharmacokinetic considerations*. *Clin Pharmacokinet* 1988; 14: 217-240.
41. Steldinger R. Half lives of nicotine in milk of smoking mothers: implications for nursing. *J Perinat Med* 1988; 16: 261-262.
42. Schwartz-Bickenbach D, Schulte-Hobein B, Abt S, Plum C, Nau H. Smoking and passive smoking during pregnancy and early infancy: effects on birth weight, lactation period, and cotinine concentrations in mother's milk and infant's urine. *Toxicol Lett* 1987; 35: 73-81.
43. Becker AB, Manfreda J, Ferguson AC, Dimich-Ward H, Watson WT, Chan-Yeung M. Breast-feeding and environmental tobacco smoke exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 689-691.
44. Schulte-Hobein B, Schwartz-Bickenbach D, Abt S, Plum C, Nau H. Cigarette smoke exposure and development of infants throughout the first year of life: influence of passive smoking and nursing on cotinine levels in breast milk and infant's urine. *Acta Paediatr* 1992; 81: 550-557.
45. Ilett KF, Hale TW, Page-Sharp M, Kristensen JH, Kohan R, Hackett LP. Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 516-524.
46. Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21: 2.693-2.703.
47. Vagnarelli F, Amarri S, Scaravelli G, Pellegrini M, García-Algar O, Pichini S. TDM grand rounds: neonatal nicotine withdrawal syndrome in an infant prenatally and postnatally exposed to heavy cigarette smoke. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 585-588.
48. Kataoka H, Inoue R, Yagi K, Saito K. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49: 108-114.
49. Nafstad P, Botten G, Hagen JA, et al. Comparison of three methods for estimating environmental tobacco smoke exposure among children aged between 12 and 36 months. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 88-94.
50. Joseph DV, Jackson JA, Westaway J, Taub NA, Petersen SA, Wailoo MP. Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2007; 92: F484-488.
51. Cone EJ. Saliva testing for drugs of abuse. *Ann N Y Acad* 1993; 694: 91-127.
52. Stepan MB, Fuller SG. Measuring infant exposure to environmental tobacco smoke. *Clin Nurs Res* 1999; 8: 198-218.
53. Greenberg RA, Haley NJ, Etzel RA, Loda FA. Measuring the exposure of infants to tobacco smoke. Nicotine and cotinine in urine and saliva. *N Engl J Med* 1984; 310: 1.075-1.078.
54. Ronchetti R, Bonci E, de Castro G, et al. Relationship between cotinine levels, household and personal smoking habit and season in 9-14 year old children. *Eur Respir J* 1994; 7: 472-476.
55. Jarvis MJ, Russell MA, Feyerabend C, et al. Passive exposure to tobacco smoke: saliva cotinine concentrations in a representative population sample of non-smoking schoolchildren. *Br Med J* 1985; 291: 927-929.
56. Pichini S, Altieri I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci Int* 1997; 84: 243-252.
57. Pascual JA, Diaz D, Segura J, et al. A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2003; 17: 2.853-2.855.
58. García-Algar O, Vall O, Segura J, et al. Nicotine Concentrations in Deciduous Teeth and cumulative exposure to tobacco smoke during childhood. *JAMA* 2003; 290: 196-197.
59. Marchei E, Joya X, García-Algar O, Vall O, Pacifici R, Pichini S. Ultra-sensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by highperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 2.609-2.612.