

Exposición prenatal a plomo y problemas de comportamiento durante la infancia

Alumno: Manuel Lozano Relaño

Máster en Bioinformática y Bioestadística

Nombre Consultora: Nuria Pérez Álvarez

Nombre Consultora Empresa: Sabrina Llop González

Nombre Profesor responsable de la asignatura: Carles ventura Royo

Fecha Entrega: 06/2022



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-
NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	Exposición prenatal a plomo y problemas de comportamiento durante la infancia.
Nombre del autor:	Manuel Lozano Relaño
Nombre del consultor/a:	Nuria Pérez Álvarez Sabrina Llop González
Nombre del PRA:	Carles Ventura Royo
Fecha de entrega:	06/2022
Titulación:	Máster en Bioinformática y Bioestadística
Área del Trabajo Final:	Trabajo Fin de Máster
Idioma del trabajo:	Castellano
Número de créditos:	15
Palabras clave	Plomo, trastornos del comportamiento, análisis multivariante, modelos de interacción
Resumen del Trabajo	
<p>La población general está regularmente expuesta al plomo (Pb), el cual puede atravesar la barrera placentaria y provocar efectos adversos en el feto en desarrollo. Nuestro objetivo fue estudiar la asociación entre la exposición materna al Pb durante la gestación y el comportamiento de los niños a los 9 años de edad. Se consideraron variables sociodemográficas, ambientales y dietéticas, así como polimorfismos (SNP) en genes relacionados con el desarrollo cerebral o la toxicidad relacionada con el Pb. La muestra del estudio estuvo formada por pares madre-hijo de las cohortes INMA (INfancia y Medio Ambiente) pertenecientes en las regiones de Valencia, Sabadell y Gipuzkoa (n=1027). El Pb se midió en muestras de orina recogidas durante el primer y tercer trimestre del embarazo. La conducta infantil se evaluó a los 9 años mediante el Child Behavior Checklist (CBCL) compuesto por tres escalas: trastornos internalizantes, externalizantes</p>	

y totales. Las variables sociodemográficas, dietéticas y ambientales se obtuvieron a través de cuestionarios. Los SNP en los genes APOE, BDNF, GSTP1 y PON1 se genotiparon en ADN de sangre de cordón umbilical. Se ajustaron modelos de regresión binomiales negativos tanto bivariados como multivariados, considerando tanto las relaciones lineales como no lineales. Se evaluó la interacción con el sexo y los diferentes genotipos incluyendo términos de interacción. El aumento de las concentraciones urinarias maternas de Pb se asoció con un mayor riesgo de presentar trastornos durante la infancia (IRR 4,6-5,9%) en las tres escalas CBCL. Los varones mostraron peores resultados en los índices, así como aquellos de ambos sexos que presentaban genotipos específicos en los genes BDNF y PON1. En esta población, la exposición prenatal a Pb se ha asociado a peores resultados en los test de comportamiento en preadolescentes. Las características genéticas y el sexo de los individuos muestran una modificación del efecto tóxico del Pb.

Abstract

Humans are regularly exposed to lead (Pb) which can cross the placental barrier and lead to adverse effects on the developing foetus. Our aim was to study the association between maternal Pb exposure during gestation and children's behaviour at 9 years of age. Socio-demographic, environmental and dietary variables, as well as single nucleotide polymorphisms (SNPs) in brain- and metabolism related genes, were considered. The study sample comprised Spanish mother-child pairs in the INMA (Environment and Childhood) cohort study recruited in the regions Valencia, Sabadell and Gipuzkoa (n=1027). Pb was measured in urine samples collected during first and third trimesters of pregnancy. Behaviour was assessed at 9 years of age using the Child Behaviour Checklist (CBCL) composed of three scales: internalizing, externalizing and total problems. Sociodemographic, dietary and environmental variables were obtained through questionnaires. SNPs in APOE, BDNF, GSTP1, and PON1 were genotyped in cord blood DNA. Bivariate and multivariate negative binomial models were built considering both linear and non-linear relationships. The interaction with sex and genotypes was evaluated including interaction terms. Increasing maternal urinary concentrations of Pb were associated with an increased incidence ratio risk (IRR 4.6-5.9%) for all three CBCL scales in the children. Worse scoring on scales with increasing Pb were found particularly for boys and children carrying specific genotypes in BDNF and PON1 genes. In our population, prenatal exposure to Pb was associated with worse scores on behavioral tests in preadolescents. Sex and genetic background may play a role in Pb toxicity.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	4
1.1 Contexto y justificación del Trabajo	4
1.2 Objetivos del Trabajo	5
1.3 Enfoque y método seguido	5
1.4 Planificación del Trabajo	7
1.5 Breve sumario de productos obtenidos	8
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	8
4. Metodología	10
4.1 Población de estudio	10
4.2 Evaluación de la exposición a Pb	10
4.3 Evaluación del comportamiento	10
4.4 Covariables sociodemográficas	11
4.5 Covariables dietéticas	11
4.6 Covariables ambientales	12
4.7 Análisis genético	12
4.8 Análisis estadístico	12
5. Resultados	19
6. Discusión	30
8. Conclusiones	31
9. Glosario	32
10. Bibliografía	33

Lista de figuras

Figura 1. Modelos multivariados ajustados para cada escala CBCL.	25
Figura 2. Razones de Tasas de Incidencia (IRR) del Pb y los factores asociados.	26
Figura 3. Representación gráfica de los GAM para cada una de las escalas CBCL.	28
Figura 4. Asociaciones del Pb y las puntuaciones de la escala CBCL según genotipo.	29

Lista de tablas

Tabla 1. Características sociodemográficas, dietéticas y ambientales de los participantes.	15
Tabla 2. Polimorfismos de Nucleótido Único incluidos en el estudio.	18
Tabla 3. Escalas de trastorno de conducta según características de la población.	21
Tabla 4. Coeficientes de razón de riesgo de incidencia del plomo en los modelos ajustados.	27

1. Resumen

La población general está regularmente expuesta al plomo (Pb), el cual puede atravesar la barrera placentaria y provocar efectos adversos en el feto en desarrollo. Nuestro objetivo fue estudiar la asociación entre la exposición materna al Pb durante la gestación y el comportamiento de los niños a los 9 años de edad. Se consideraron variables sociodemográficas, ambientales y dietéticas, así como polimorfismos (SNP) en genes relacionados con el desarrollo cerebral o la toxicidad relacionada con el Pb. La muestra del estudio estuvo formada por pares madre-hijo de las cohortes INMA (Infancia y Medio Ambiente) pertenecientes en las regiones de Valencia, Sabadell y Gipuzkoa (n=1027). El Pb se midió en muestras de orina recogidas durante el primer y tercer trimestre del embarazo. La conducta infantil se evaluó a los 9 años mediante el Child Behavior Checklist (CBCL) compuesto por tres escalas: trastornos internalizantes, externalizantes y totales. Las variables sociodemográficas, dietéticas y ambientales se obtuvieron a través de cuestionarios. Los SNP en los genes *APOE*, *BDNF*, *GSTP1* y *PON1* se genotiparon en ADN de sangre de cordón umbilical. Se diseñaron modelos binomiales negativos tanto bivariados como multivariados, considerando tanto las relaciones lineales como no lineales. Se evaluó la interacción con el sexo y los diferentes genotipos incluyendo términos de interacción. El aumento de las concentraciones urinarias maternas de Pb se asoció con un mayor riesgo de presentar trastornos durante la infancia (IRR 4,6-5,9%) en las tres escalas CBCL. Los varones mostraron peores resultados en los índices, así como aquellos de ambos sexos que presentaban genotipos específicos en los genes *BDNF* y *PON1*.

Antecedentes

La población general está regularmente expuesta al plomo (Pb), el cual puede atravesar la barrera placentaria y provocar efectos adversos en el feto en desarrollo. Nuestro objetivo fue estudiar la asociación entre la exposición materna al Pb durante la gestación y el comportamiento de los niños a los 9 años de edad. Se consideraron variables sociodemográficas, ambientales y dietéticas, así como polimorfismos (SNP) en genes relacionados con el desarrollo cerebral o la toxicidad relacionada con el Pb.

Método

La muestra del estudio estuvo formada por pares madre-hijo de las cohortes INMA (Infancia y Medio Ambiente) pertenecientes en las regiones de Valencia, Sabadell y Gipuzkoa (n=1027). El Pb se midió en muestras de orina recogidas durante el primer y tercer trimestre del embarazo.

La conducta infantil se evaluó a los 9 años mediante el Child Behavior Checklist (CBCL) compuesto por tres escalas: trastornos internalizantes, externalizantes y totales. Las variables sociodemográficas, dietéticas y ambientales se obtuvieron a través de cuestionarios. Los SNP en los genes *APOE*, *BDNF*, *GSTP1* y *PON1* se genotiparon en ADN de sangre de cordón umbilical. Considerando que las variables respuesta son puntuaciones escaladas y la variable de exposición (concentraciones de Pb) es continua transformada en escala logarítmica, se ajustaron modelos de regresión binomiales negativos tanto bivariados como multivariados considerando las variables dietéticas, de estilo de vida, ambientales y genéticas, siguiendo el protocolo del proyecto INMA que gestiona los datos. Se evaluaron tanto las relaciones lineales como no lineales mediante el uso de modelos GAM y la exploración gráfica. Se valoró la interacción con el sexo y los diferentes genotipos incluyendo términos de interacción en los modelos multivariados.

Resultados

La muestra del estudio estuvo formada por pares madre-hijo de las cohortes INMA (Infancia y Medio Ambiente) pertenecientes en las regiones de Valencia, Sabadell y Gipuzkoa (n=1027). El Pb se midió en muestras de orina recogidas durante el primer y tercer trimestre del embarazo. La conducta infantil se evaluó a los 9 años mediante el Child Behavior Checklist (CBCL) compuesto por tres escalas: trastornos internalizantes, externalizantes y totales. Las variables sociodemográficas, dietéticas y ambientales se obtuvieron a través de cuestionarios. Los SNP en los genes *APOE*, *BDNF*, *GSTP1* y *PON1* se genotiparon en ADN de sangre de cordón umbilical. Se diseñaron modelos binomiales negativos tanto bivariados como multivariados, considerando tanto relaciones lineales como no lineales. Se evaluó la interacción con el sexo y los diferentes genotipos incluyendo términos de interacción.

Conclusiones

En nuestra población, la exposición prenatal a Pb se asoció con peores resultados en pruebas de comportamiento en preadolescentes. El sexo y los antecedentes genéticos pueden desempeñar cierto papel en la toxicidad de este metal pesado.

Aportación

Los estudios que relacionan la exposición prenatal a Pb y el efecto sobre la incidencia de trastornos del comportamiento durante la infancia son escasos. El presente trabajo no solo muestra un claro efecto de este metal pesado sobre el riesgo de padecer trastornos del comportamiento en todas sus variantes (internalizantes y externalizantes), sino que apunta de

forma novedosa a una modificación en dicha toxicidad en función del sexo y ciertos polimorfismos en genes previamente relacionados con mecanismos neurotóxicos, tales como *BDNF* y *PON1*.

2. Introducción

Contexto y justificación del Trabajo

Los problemas emocionales y de conducta en la infancia son un desafío relativo a la salud mundial, ya que la prevalencia conjunta de estos trastornos alcanzó el 20 % durante la última década (1). Se ha demostrado que estos problemas están asociados con resultados adversos, como logros educativos deficientes y dificultades en la sociabilidad de los niños, pudiendo persistir hasta la edad adulta (2,3). La aparición de estos trastornos puede ser evaluada durante la infancia a través de indicadores de problemas internalizantes y externalizantes (4). Los problemas internalizantes o emocionales son síntomas dirigidos hacia adentro que provocan sufrimiento en el niño e incluyen ansiedad, depresión, quejas somáticas y retraimiento (5) y su prevalencia es de hasta el 22,6% entre adolescentes españoles (6). Los problemas externalizantes o de comportamiento describen síntomas dirigidos hacia el exterior que, además de producir sufrimiento en el niño, también provocan malestar en otras personas (7). Comprenden conductas agresivas y de oposición, inatención/hiperactividad y desregulación emocional (5), y su prevalencia llega al 14,6% en adolescentes españoles (6).

Las diferencias específicas de sexo, así como las tendencias genéticas parecen jugar un papel al evaluar estos trastornos durante la infancia y su persistencia más allá de ésta. Los problemas de comportamiento parecen ser más comunes y más persistentes en los niños que en las niñas y los problemas emocionales en las niñas tienden a aumentar con la edad (5,8,9). Además, los polimorfismos genéticos específicos en ciertos genes han mostrado asociaciones tanto con problemas internalizantes como externalizantes durante la infancia (10–13). Estos factores pueden actuar modificando la asociación entre un amplio espectro de exposiciones ambientales prenatales y posnatales relacionadas con los trastornos mentales, incluidas las exposiciones al aire libre, en interiores, químicas, de estilo de vida y sociales (4,14). Así, el proyecto europeo HELIX (15) en un estudio desarrollado en seis cohortes longitudinales con 1287 niños de 6 a 11 años, asoció mayor duración del sueño, dieta saludable y mayor nivel social con menos problemas internalizantes y externalizantes mientras que una mayor exposición al Pb, el cobre, la contaminación del aire interior y la dieta poco saludable se relacionaron con los peores resultados (14).

La exposición a Pb ocurre principalmente a través de la dieta, el agua potable, la contaminación del aire, el tabaquismo, la medicación o los suplementos dietéticos (17). El Pb atravesar la

placenta y las barreras hematoencefálicas (16). Sin embargo, las relaciones entre los problemas emocionales y de comportamiento y la exposición a Pb durante el período prenatal han sido escasamente evaluadas. Algunos estudios han abordado las relaciones entre la exposición a Pb y algunos trastornos, como el déficit de atención (17) y un menor desarrollo mental (18–20). Además, también los polimorfismos sexuales y genéticos han mostrado interacciones con estos éste y otros metales con efectos tóxicos (21).

El Proyecto INMA – Infancia y Medio Ambiente (<http://www.proyectoinma.org/>), es una red de siete cohortes en España que tiene como objetivo estudiar el papel que juega la exposición a los contaminantes ambientales en el aire, el agua y la dieta durante el embarazo y la infancia en el crecimiento y desarrollo infantil. Estudios previos enmarcados en el Proyecto INMA han proporcionado datos de Pb en orina durante el embarazo y sus factores asociados (22).

Objetivos del Trabajo

El objetivo del presente trabajo es analizar la relación entre la exposición prenatal materna al Pb (medida la concentración de Pb en orina a las 12 y 32 semanas) y los índices de trastornos de conducta de los niños (medidos a los 9 años) como resultado en cohortes INMA.

- a) Se calcularán las razones de riesgo de incidencia (IRR) para el Pb como variable de exposición con respecto a las escalas del Child Behavior Checklist test (CBCL) como variable dependiente (23). Las básculas CBCL son:
 - Problemas de internalización.
 - Problemas de externalización.
 - Trastornos mentales totales
- b) Las variables sociodemográficas, ambientales y dietéticas, así como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) serán considerados en los modelos para evaluar los factores asociados a la exposición al Pb.
- c) También se considerarán las relaciones no lineales y la modificación del efecto en función del sexo y SNP.

Enfoque y método seguido

El siguiente enfoque se basa en los protocolos de análisis INMA, que establecen algunas recomendaciones para realizar pruebas estadísticas en estudios con las escalas CBCL como outcome y variables de exposición continua como los metales.

CBCL es una herramienta reconocida para la evaluación del comportamiento de los niños e incluye varias subescalas, que permiten identificar posibles áreas problemáticas. Para el protocolo, solo usamos la segunda parte de la prueba (que comienza en la página 3 de la prueba original) con la instrucción de clasificar la frecuencia de diferentes conductas en su hijo durante los últimos 6 meses (0 = No es cierto, 1 = algo o algunas veces cierto, 2 = muy cierto o frecuentemente cierto). Los resultados recomendados son escalas de internalización-problemas emocionales, escalas de externalización-problemas de conducta y problemas totales. Las tres escalas se interpretan como: rendimiento óptimo-puntuaciones más bajas.

Hasta la fecha, existen algunas normas específicas desarrolladas por la Universitat Autònoma de Barcelona (24) y otras universidades internacionales.

En el caso español, estas normas han sido aprobadas por la redacción de Achenbach System of Empirically Based Assessment (ASEBA), de hecho, esta Unidad es la responsable de haber traducido los formularios del CBCL al idioma español. Sin embargo, tras varios análisis realizados por el grupo de Valencia del Proyecto INMA, nos dimos cuenta de que los datos INMA no se ajustaban a estas normas, porque incrementaban las diferencias de género en lugar de anularlas.

Por ello, nos pusimos en contacto vía e-mail con los creadores de CBCL para saber cuál era el procedimiento más adecuado para puntuar una muestra de niños españoles, y si existía alguna norma sensitiva a la cultura. Respondieron que sus perfiles de puntuación no tienen opciones de puntuación multiculturales, y que solo su software ASEBA-PC y ASEBA-WEB podían utilizarse usando sus normas multiculturales, e incluso en ese caso, las normas específicas no estaban disponibles para el contexto español. A pesar de este hecho, se ha observado una alta consistencia interna de la escala CBCL en todas las sociedades internacionales (25), y esta parece ser la principal razón por la cual el manual (26) recomienda el uso de normas norteamericanas.

Por estos motivos, los responsables del INMA sugieren el uso de puntuaciones directas y realizar los análisis mediante regresiones binomiales negativas en estudios epidemiológicos (27–29), ajustando por edad, sexo y cohorte.

Planificación del Trabajo

TAREA	SEMANAS														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PLAN DE ANÁLISIS															
DESCRIPTIVOS															
Descripción de los niveles de plomo maternos															
Análisis descriptivo de la población estudiada															
Descripción de los niveles de plomo en función de las características de la población															
DISEÑO DE UN CORE MODEL (MODELO DE EXPOSICIÓN)															
Análisis bivalente															
Diseño de un modelo de exposición multivariante															
DISEÑO DE UN MODELO BASAL PARA CADA ESCALA CBCL (MODELOS DE LOS OUTCOMES)															
Diseño del modelo basal para problemas internalizantes															
Diseño del modelo basal para problemas externalizantes															
Diseño del modelo basal para problemas totales															
CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS MULTIVARIABLES FINALES															
Construcción del modelo multivariable fina de problemas internalizantes															
Construcción del modelo multivariable fina de problemas externalizantes															
Construcción del modelo multivariable fina de problemas totales															
EVALUACION DE MODELOS NO LINEALES															
EVALUACIÓN DE MODELOS DE INTERACCIÓN															
Interacciones por sexo															
Interacciones por SNP															
REDACCIÓN DE LA MEMORIA FINAL															

Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos

En el presente trabajo se han obtenido los siguientes resultados, los cuales contribuyen al conocimiento científico respecto a la toxicidad de los metales pesados:

- Se han evaluado los factores asociados a las concentraciones de Pb en orina durante el embarazo, observando relaciones directas con la paridad, el consumo de tabaco y la exposición a la contaminación ambiental. Por el contrario, menores niveles de Pb se relacionaron con el consumo de frutos secos.
- Las concentraciones maternas de Pb prenatales se han relacionado con mayores puntuaciones (peores resultados) en las 3 escalas CBCL en los niños y niñas a los 9 años de edad, mostrando un incremento del riesgo de incidencia de trastornos internalizantes del 5.7%, de externalizantes en un 6.9% y un 4.6% en los trastornos totales.
- Se ha observado que esta relación es lineal.
- Los niños varones han mostrado peores resultados que las niñas.
- Ciertos polimorfismos en los SNPs rs6265, rs11030104, rs2049045, rs10835210 and rs7934165 en el gen *BDNF*, así como el rs662 en el *PON1*, modificaron el efecto del Pb sobre los problemas externalizantes y totales.

Material facilitado en el TFM

Se aporta memoria del trabajo, presentación y código de R utilizado.

La base de datos utilizada no es pública ni pueden transferirse a otras bases debido a las cláusulas de confidencialidad en la gestión de los datos de las madres e hijos/as del proyecto INMA.

Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

En el capítulo 3 se indica la información existente hasta la fecha relacionada con los factores asociados a la exposición prenatal al Pb, así como la relación de éste con la neurotoxicidad y los trastornos del comportamiento. El capítulo 4 detalla a continuación la muestra utilizada para el presente estudio, describe el marco investigador del proyecto, la metodología empleada para la obtención de las muestras biológicas, el GWAS empleado y el control de calidad, así como el protocolo completo del análisis estadístico. El capítulo 5 muestra los resultados obtenidos secuenciados como descriptivos, factores asociados a los niveles maternos de Pb prenatal, el modelo multivariable que asocia el Pb con cada una de las tres escalas de trastornos mentales, los modelos de interacción con sexo y SNPs, así como los análisis de sensibilidad excluyendo una de las cohortes, la cual siguió un procedimiento de análisis del Pb en orina diferente. El capítulo

6 discute estos resultados con los resultados obtenidos en la literatura y se concluye con los resultados del presente estudio que se consideran robusto considerando la discusión del apartado anterior.

3. Metodología

Población de estudio

Los sujetos fueron participantes en las cohortes de Valencia, Gipuzkoa y Sabadell del Proyecto INMA. El protocolo ha sido descrito en estudios anteriores (30). En resumen, durante el primer trimestre del embarazo, se reclutaron 2270 mujeres embarazadas en su primera visita prenatal (2003-2004) en 3 regiones: Valencia (n=855), Gipuzkoa (n=638) y Sabadell (n=777). La recogida de datos se realizó por muestreo de aquellas mujeres que cumplían los criterios de inclusión: \geq 16 años, embarazo único, concepción no asistida, parto programado en el hospital de referencia y sin impedimento comunicativo. La muestra de estudio estuvo compuesta por pares madre-hijo con medidas de: (1) Pb determinado en orina tanto en el primer como en el tercer trimestre de gestación; (2) índices de trastornos de conducta de los niños a la edad de 9 años (2012-2013); y (3) covariables incluidas en el estudio (n=1027, 45,2%). Los detalles sobre las concentraciones de Pb por cohorte, trimestre de medición y características de la muestra pueden consultarse en un estudio INMA anterior (22). Las características comparadas entre la población incluida y no incluida en el presente estudio se muestran en el anexo (**Tabla 1**). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en cada fase, y el estudio fue aprobado por los comités de ética de los hospitales de las regiones participantes.

Evaluación de la exposición a Pb

Los niveles de Pb y creatinina se determinaron en muestras puntuales de orina (21) tomadas en el primer trimestre (media [DE]= 13,13 [1,47] semanas de gestación) y el tercer trimestre (media [DE]= 33,08 [2,13] semanas de gestación) del embarazo. Se dispuso de concentraciones Pb y creatinina en las tres cohortes INMA, con descripción detallada de métodos, límites de detección y referencias disponibles en un estudio INMA previo (22), que evaluó las concentraciones de metales y sus factores asociados en la misma población. La concentración de Pb en la orina se expresó con fines descriptivos en $\mu\text{g/g}$ de creatinina para controlar las diferencias en la dilución de la orina.

Evaluación del comportamiento

La presencia de problemas de conducta en los niños se evaluó a los 9 años (media [desviación estándar (DE)] = 9,33 (0,23)) mediante la prueba Child Behavior Checklist (CBCL) (23). La prueba ha sido validada para la población española (31). Las puntuaciones más altas indican mayores

problemas de conducta. El CBCL es una herramienta reconocida para evaluar el comportamiento de los niños e incluye varias subescalas, que permiten identificar posibles problemas de comportamiento medidos: (1) problemas emocionales (internalizantes: ansiedad, depresión, quejas somáticas); (2) problemas de conducta (externalizantes: conducta infractora y agresiva); y (3) problemas totales (suma de internalización, externalización y otras escalas: problemas sociales, de pensamiento y de atención). El CBCL es un cuestionario de cumplimentado por los padres que consta de de 112 ítems referido a problemas que podrían haber ocurrido en los dos meses anteriores y se califican en una escala de tres puntos (0 = no es cierto, 1 = algo o a veces es cierto y 2 =muy o a menudo cierto).

Covariables sociodemográficas

Las mujeres cumplimentaron dos cuestionarios durante su embarazo, en el primer trimestre (media [DE]= 13,21 [1,58] semanas de gestación) y en el tercer trimestre (media [DE]= 32,3 [2,21] semanas de gestación). Los cuestionarios fueron administrados por entrevistadores entrenados y se centraron en información sociodemográfica, ambiental y de estilo de vida durante el embarazo. Las covariables maternas utilizadas en este estudio fueron edad (años), índice de masa corporal (IMC) (kg/m^2), país de nacimiento (España, América Latina, otros), nivel educativo (hasta primaria, secundaria, universidad), paridad (0, 1, ≥ 2), tipo de zona de residencia (urbana, semiurbana, rural), situación laboral activa durante el embarazo (sí/no), fumadora antes del embarazo (sí/no), fumadora durante el embarazo (sí/no) y exposición pasiva al humo del tabaco (sí/no). Definimos la clase social de los padres a partir de la ocupación de los padres durante el embarazo de acuerdo con una adaptación española ampliamente utilizada del sistema de codificación de la Clasificación Internacional Estándar de Ocupaciones (ISCO88). La clase I+II incluía puestos de dirección, personal técnico y directores comerciales; la clase III incluía trabajadores no manuales cualificados; y la clase IV+V incluía trabajadores manuales y no cualificados (33).

Covariables dietéticas

La información sobre la dieta durante el embarazo se obtuvo de un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimentos (CFA) en el primer y tercer trimestre. Este CFA fue validado en la cohorte de Valencia con buena reproducibilidad para la ingesta de nutrientes y alimentos (32). Obtuvimos datos (expresados como la media de las raciones diarias registradas en ambos trimestres) sobre la ingesta de lácteos, huevos, carnes (incluyendo las categorías de carnes rojas y blancas), mariscos (incluyendo pescado magro, pescado azul y otros), frutas, hortalizas,

legumbres, frutos secos, patatas, cereales y pastas, pan, dulces, bebidas con y sin alcohol, café, té y otras infusiones, grasas animales y vegetales, alimentos procesados y aderezos. Las estimaciones sobre la ingesta calórica diaria se derivaron del CFA.

Covariables ambientales

La exposición a contaminantes ambientales se evaluó analizando las exposiciones al aire libre en función de la dirección de la casa durante el período de embarazo. Algunas de estas variables se recogieron a través de cuestionarios en el tercer trimestre del embarazo e incluyen la proximidad a una calle con tráfico (metros), la frecuencia con la que pasan los coches cerca de la casa (constantemente, frecuentemente, rara vez, nunca), la frecuencia con la que el tránsito intenso pasa cerca de la vivienda (constantemente, con frecuencia, rara vez, nunca), y la proximidad a un invernadero (sí/no), a un campo de cultivo (sí/no) o a una actividad industrial (sí/no). Se obtuvieron los porcentajes de superficies agrícolas, seminaturales y humedales en uso, usos del suelo de tejido urbano y zonas verdes urbanas, e instalaciones deportivas y de ocio al aire libre cercanas a la vivienda dentro de un área de amortiguamiento de 300 m para cada geocódigo. La información de usos del suelo se obtuvo de la base de datos Urban Atlas para el periodo 2006-2012, excepto INMA Gipuzkoa, donde se utilizaron datos locales del European Nature Information System (EUNIS) en 2009. También se midió la exposición prenatal a contaminantes atmosféricos, incluidas partículas (<2,5 µm de diámetro, PM_{2,5}, µg/m³) y dióxido de nitrógeno (NO₂), siguiendo la metodología explicada en estudios INMA anteriores (33,34).

Análisis genético

Las muestras de ADN fueron genotipadas en las tres cohortes (n=1221) y disponibles para 716 (69,7%) de las muestras incluidas en el presente estudio: Gipuzkoa (n=295), Sabadell (n=195) y Valencia (n=226). El presente estudio se enfocó en genes candidatos, seleccionando SNP en genes con un posible papel en vías asociadas con la toxicidad de metales y problemas de comportamiento: rs769449, rs429358 y rs7412 (Apolipoproteína E [APOE]); rs6265, rs11030104, rs2049045, rs10835210, rs11030119, rs7934165 y rs962369 (factor neurotrófico derivado del cerebro [BDNF]), rs1695 y rs1138272 (glutación S-transferasa Pi 1 [GSTP1]); y rs662 (Paraoxonase 1 [PON1]), cuyos detalles se muestran en el anexo (**Tabla 2**).

Análisis estadístico

Calculamos la media y la desviación estándar (DE) de las puntuaciones en las pruebas de comportamiento CBCL. Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis entre las puntuaciones CBCL y las

covariables categóricas para contrastar las puntuaciones entre las características sociodemográficas, ambientales, dietéticas y genéticas de la población estudiada. Se realizaron pruebas de Spearman ajustadas por cohorte para evaluar las correlaciones entre las puntuaciones de CBCL y las covariables continuas. Los niveles de Pb se describieron calculando su media geométrica (GM) e intervalos de confianza (IC), así como se transformaron \log_2 para su inclusión en los modelos estadísticos, debido a su distribución sesgada.

Para evaluar la relación entre la exposición prenatal a Pb y las puntuaciones en las pruebas de comportamiento CBCL, se construyeron modelos binomiales negativos multivariados en tres pasos:

En primer lugar, se ajustó un modelo de exposición para evaluar los factores que contribuyen a las concentraciones de Pb, para estudiar la relación entre la concentración de Pb en los dos trimestres del embarazo y los factores sociodemográficos, dietéticos y ambientales. Para ello, se evaluaron modelos mixtos lineales bivariados y multivariados, incluyendo un intercepto aleatorio para cada participante. Las covariables creatinina, semana de medición y cohorte se incluyeron en todos los modelos para ajustar las concentraciones de Pb. Los modelos con covariables dietéticas también se ajustaron incluyendo la ingesta de energía en los modelos. Cada modelo multivariante se construyó de la siguiente manera: 1) Obtención de un modelo sociodemográfico multivariante basal mixto utilizando todas las covariables sociodemográficas previamente asociadas con un valor de $p < 0,2$ en los análisis bivariados. Siguiendo un procedimiento de eliminación hacia atrás, todas las covariables sociodemográficas asociadas con las concentraciones de Pb en un nivel de valor $p < 0,1$ en la prueba de razón de verosimilitud se mantuvieron en el modelo; 2) Las covariables dietéticas se agregaron a este modelo basal sociodemográfico individualmente y aquellas con un valor de $p < 0.2$ fueron candidatas para ingresar al modelo. Siguiendo un procedimiento de eliminación hacia atrás, todas las covariables candidatas dietéticas asociadas con las concentraciones de Pb en un nivel de valor $p < 0.1$ también se mantuvieron en el modelo; 3) Se repitió el mismo procedimiento en este nuevo modelo basal sociodemográfico y dietético utilizando covariables ambientales para obtener el modelo multivariante final.

En segundo lugar, se construyeron tres modelos multivariados para las escalas CBCL (modelos de los outcomes: problemas internalizantes, externalizantes y totales). El ajuste de estos modelos basales siguió el mismo proceso explicado anteriormente, aunque en este caso se usaron regresiones binomiales negativas ya que las puntuaciones CBCL son un conteo escalado y se

midieron en un solo punto de tiempo. Estos modelos se ajustaron por sexo, edad en el momento de la prueba y cohorte.

En tercer lugar, la variable \log_2 -Pb se introdujo en cada uno de los modelos multivariado ajustados de las escalas CBCL. Se incluyeron posibles factores de confusión adicionales si cambiaban la magnitud de los efectos principales del Pb sobre la variable respuesta en más del 10%. Todas las covariables en cada modelo de exposición del Pb se consideraron posibles factores de confusión. La edad de los niños en la evaluación, el sexo, la ingesta de calorías, la creatinina y la cohorte se incluyeron en todos los modelos, independientemente de su significación estadística con fines de ajuste. Las variables se consideraron estadísticamente significativas en los modelos multivariados finales si el valor de $p < 0,05$.

Se ajustaron modelos binomiales negativos aditivos generalizados para evaluar patrones no lineales. El ajuste de los modelos no lineales (con uno o dos nodos internos) se compararon con el equivalente modelo lineal mediante puntuaciones de Akaike (AIC), decidiendo como mejor ajustado aquel con menor AIC. Luego, el modelo lineal y el modelo no lineal de AIC más bajo se compararon mediante un examen gráfico.

Las modificaciones del efecto por sexo de los niños y SNP se evaluaron mediante la inclusión de un término de interacción en los modelos. Los coeficientes del Pb según sexo y genotipo se evaluaron gráficamente en caso de que el término de interacción fuera significativo después de la corrección de pruebas múltiples (FDR).

Se realizaron análisis de sensibilidad para evaluar la solidez de los modelos multivariados eliminando los casos de la cohorte de Sabadell debido a su diferente metodología analítica de determinación del Pb en orina.

La validez de los modelos de regresión se evaluó mediante análisis de los residuos. No se identificaron datos influyentes mediante representación gráfica. Se realizaron diagnósticos de colinealidad en los modelos finales.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico R versión 4.1.1 (35)

Tabla 1. Características sociodemográficas, dietéticas y ambientales de los participantes del estudio y diferencias entre la población incluida y no incluida (aquellos sin doble medición de plomo en orina o sin medición de índices de trastorno de conducta infantil a los 9 años). Proyecto INMA (Gipuzkoa, Sabadell y Valencia, España, 2003-2005).

Covariables	Incluido	No incluido	p-valor ^b
	(n = 1027)	(n = 1243)	
	N (%) ^{un}	N (%) ^{un}	
Grupo			
Gipuzkoa	350 (34,9)	542 (34,7)	0,233
Sabadell	278 (27,7)	392 (25,1)	
Valencia	375 (37,4)	629 (40,2)	
País de nacimiento materno			
España	917 (92,1)	1425 (91,8)	0,905
América Latina	54 (5,4)	84 (5,4)	
Otro	25 (2,5)	44 (2,8)	
Nivel educativo materno			
hasta primaria	249 (24,9)	379 (24,3)	0,859
Secundario	385 (38,5)	617 (39,6)	
Universidad	365 (36,5)	562 (36,1)	
Paridad			
0	552 (55,1)	857 (54,9)	0,969
1	376 (37,6)	593 (38,0)	
≥2	73 (7,3)	111 (7,1)	
zona de residencia			
Rural	52 (5,2)	87 (5,6)	0,913
Semi urbano	178 (17,7)	280 (17,9)	
Urbano	773 (77,1)	1195 (76,5)	
Situación laboral de la madre durante el embarazo			
No	133 (13,3)	215 (13,8)	0,738
Sí	870 (86,7)	1348 (86,2)	
clase social de los padres			
I+II (alto)	329 (32,8)	511 (32,7)	0,838
III	255 (25,4)	413 (26,4)	
IV+V (bajo)	419 (41,8)	639 (40,9)	
Tabaquismo materno antes del embarazo			
No	690 (69,9)	1066 (69,2)	0,723
Sí	297 (30,1)	474 (30,8)	
Tabaquismo materno durante el embarazo			
No	822 (83,4)	1263 (82,1)	0,451
Sí	164 (16,6)	275 (17,9)	
Exposición al humo del tabaco			
No	351 (36,0)	550 (36,1)	0,998
Sí	624 (64,0)	975 (63,9)	
Frecuencia de los autos que pasan cerca de la casa, Constantemente			
	364 (36,8)	568 (36,9)	0,589

Frecuentemente	262 (26,5)	371 (24,1)	
Un poquito	266 (26,9)	455 (29,5)	
Nunca	96 (9,7)	146 (9,5)	
Frecuencia del tráfico pesado que pasa cerca de la casa,			
Constantemente	154 (15,6)	241 (15,6)	0,909
Frecuentemente	147 (14,9)	206 (13,4)	
Un poquito	299 (30,3)	453 (29,4)	
Nunca	387 (39,2)	640 (41,6)	
Proximidad de la casa a un invernadero,			
Sí	62 (6,3)	109 (7,1)	0,697
No	927 (93,7)	1433 (92,9)	
Proximidad de la casa a un campo de cultivo			
Sí	310 (31,4)	526 (34,1)	0,947
No	678 (68,6)	1015 (65,9)	
Proximidad de la casa a la actividad industrial			
Sí	299 (30,3)	473 (30,7)	0,628
No	689 (69,7)	1068 (69,3)	
Sexo del niño			
Masculino	511 (51,4)	798 (51,4)	0,999
Femenino	484 (48,6)	755 (48,6)	
	Media (DE)	Media (DE)	p-valor ^c
Edad materna (años)	30,60 (4,11)	30,62 (4,11)	0,954
IMC antes del embarazo (Kg/m²)	23,32 (4,10)	23,40 (4,21)	0,763
Consumo materno de alimentos			
Productos lácteos (raciones/día)	2,83 (1,39)	2,84 (1,41)	0,965
Huevos (raciones/día)	0,40 (0,18)	0,40 (0,18)	0,662
Carne (raciones/día)	1,13 (0,47)	1,12 (0,48)	0,710
Carne roja (raciones/día)	0,35 (0,19)	0,34 (0,19)	0,540
Carne blanca (raciones/día)	0,46 (0,27)	0,46 (0,26)	0,814
Carne procesada (raciones/día)	0,32 (0,27)	0,32 (0,28)	0,882
Mariscos (raciones/día)	0,70 (0,37)	0,72 (0,38)	0,335
Pescado magro (raciones/día)	0,30 (0,22)	0,30 (0,22)	0,584
Pescado azul (raciones/día)	0,31 (0,23)	0,32 (0,24)	0,362
Otros (raciones/día)	0,10 (0,09)	0,10 (0,09)	0,429
Verduras (raciones/día)	2,29 (1,19)	2,28 (1,17)	0,886
Frutas (raciones/día)	2,65 (1,66)	2,61 (1,63)	0,558
Frutos secos (raciones/día)	0,06 (0,08)	0,06 (0,08)	0,563
Legumbres (raciones/día)	0,26 (0,17)	0,26 (0,18)	0,722
Cereales y pastas (raciones/día)	0,80 (0,49)	0,82 (0,49)	0,263
Patatas (raciones/día)	0,53 (0,31)	0,53 (0,31)	0,997
Pan (raciones/día)	1,81 (1,22)	1,80 (1,22)	0,768
Dulces (raciones/día)	3,85 (2,86)	3,82 (2,83)	0,819
Bebidas no alcohólicas (raciones/día)	6,10 (2,03)	6,12 (2,04)	0,584
Cafés y té (raciones/día)	0,97 (0,98)	0,97 (0,96)	0,936
Bebidas alcohólicas (raciones/día)	0,02 (0,09)	0,02 (0,09)	0,523
Grasa animal (raciones/día)	0,05 (0,15)	0,05 (0,16)	0,973
Aceite vegetal (raciones/día)	1,99 (1,33)	2,01 (1,32)	0,526

Alimentos procesados (raciones/día)	0,73 (0,47)	0,72 (0,46)	0,801
Aderezos (raciones/día)	0,78 (1,05)	0,77 (1,04)	0,611
Proximidad a una calle con tráfico (metros)	261,64 (765,36)	270,87 (764,40)	0,960
Áreas agrícolas y de humedales cerca de la casa (%)	7,85 (14,43)	8,08 (14,13)	0,268
Tejido urbano cerca de la casa (%)	45,52 (24,02)	45,00 (24,12)	0,625
Zonas verdes urbanas cercanas a la vivienda (%)	4,50 (7,87)	4,32 (7,69)	0,782
PM_{2,5} durante el embarazo (μ g/m³)	14,70 (2,41)	14,78 (2,38)	0,441
NO₂ durante el embarazo (μ g/m³)	30,77 (13,48)	30,74 (13,40)	0,978
Edad del niño en el momento de la prueba (años)	8,60 (0,73)	-	-

^a Valores faltantes para algunas variables no incluidas en porcentajes

^b Se realizó la prueba exacta de Fisher entre las covariables categóricas

^c Se realizó la prueba U de Mann-Whitney entre covariables continuas

IMC: Índice de Masa Corporal; IC: intervalo de confianza 95%; cr.: creatinina; GM: media geométrica; NO₂: dióxido de nitrógeno;

DE: desviación estándar; PM_{2.5}: material particulado (<2,5 μm de diámetro); SD: desviación estándar

Tabla 2. Polimorfismos de Nucleótido Único incluidos en el estudio, Proyecto INMA (Gipuzkoa, Sabadell y Valencia, 2003-2005).

SNPs	Gen	Genotipos*	N*	%*	P-valor HWE**	MAF**	Problemas internalizantes		Problemas externalizantes		Problemas totales	
							Media (DE)	P- valor	Media (DE)	P- valor	Media (DE)	P- valor
rs769449	<i>APOE</i>	GG	653	91.2	0.217	0.05	6.91 (5.61)	0.778	6.85 (6.18)	0.246	23.93 (18.67)	0.435
Intron variant (Chr19)		GA	63	8.8			6.71 (5.18)		5.89 (6.23)		25.86 (18.95)	
rs429358	<i>APOE</i>	TT	609	85.1	0.374	0.08	6.84 (5.54)	0.534	6.85 (6.22)	0.369	25.78 (18.93)	0.767
Missense variant (Chr 19)		TC	107	14.9			7.20 (5.71)		6.28 (5.98)		25.19 (18.93)	
rs7412	<i>APOE</i>	CC	636	88.6	0.555	0.06	6.86 (5.52)	0.601	6.76 (6.29)	0.932	25.66 (19.10)	0.886
Missense variant (Chr 19)		CT	80	11.3			7.20 (5.95)		6.81 (5.29)		25.96 (17.51)	
rs6265	<i>BDNF</i>	CC	445	62.1	0.680	0.21	6.71 (5.61)	0.250	6.79 (6.37)	0.989	25.58 (19.80)	0.936
Missense variant (Chr 11)		CT	241	33.7			7.05 (5.40)		6.72 (5.98)		25.75 (17.61)	
		TT	30	4.2			8.37 (6.11)		6.80 (5.15)		26.87 (15.92)	
rs11030104	<i>BDNF</i>	AA	422	58.9	0.925	0.24	6.26 (5.62)	0.386	6.78 (6.31)	0.835	25.62 (19.68)	0.976
Intronic variant (Chr 11)		AG	254	35.5			6.94 (5.43)		6.83 (6.14)		25.72 (18.11)	
		GG	40	5.6			8.03 (5.82)		6.20 (5.08)		26.30 (15.93)	
rs2049045	<i>BDNF</i>	GG	445	62.1	0.680	0.21	6.73 (5.60)	0.271	6.79 (6.37)	0.987	25.60 (19.79)	0.939
Intronic variant (Chr 11)		GC	241	33.7			7.02 (5.42)		6.71 (5.98)		25.71 (17.64)	
		CC	30	4.2			8.37 (6.11)		6.80 (5.15)		26.87 (15.92)	
rs10835210	<i>BDNF</i>	CC	226	31.6	0.186	0.43	7.18 (5.34)	0.480	6.93 (6.10)	0.794	26.09 (17.76)	0.925
Intronic variant (Chr 11)		CA	363	50.7			6.65 (5.57)		6.76 (6.18)		25.57 (18.83)	
		AA	127	17.7			7.09 (5.97)		6.46 (6.39)		25.35 (21.19)	
rs11030119	<i>BDNF</i>	GG	401	56.0	0.617	0.27	7.14 (5.68)	0.396	6.70 (6.06)	0.811	25.91 (18.94)	0.889
Intronic variant (Chr 11)		GA	254	35.5			6.53 (5.45)		6.94 (6.38)		25.60 (19.07)	
		AA	61	8.5			6.82 (5.27)		6.44 (6.24)		24.68 (18.38)	
rs7934165	<i>BDNF</i>	GG	188	26.2	0.419	0.47	7.34 (5.51)	0.051	6.91 (6.24)	0.575	26.34 (18.24)	0.279
Intronic variant (Chr 11)		GA	362	50.6			6.40 (5.28)		6.53 (6.03)		24.62 (18.06)	
		AA	166	23.2			7.48 (6.14)		7.10 (6.46)		27.29 (21.32)	
rs962369	<i>BDNF</i>	TT	404	56.4	0.678	0.26	7.13 (5.67)	0.428	6.68 (6.06)	0.712	24.39 (18.55)	0.855
Intronic variant (Chr 11)		TC	253	35.3			6.55 (5.45)		6.99 (6.37)		25.72 (19.05)	
		CC	59	8.2			6.76 (5.34)		6.34 (6.29)		24.39 (18.55)	
rs1695	<i>GSTP1</i>	AA	356	49.7	0.261	0.31	6.85 (5.56)	0.923	6.77 (6.13)	0.964	25.68 (19.22)	0.994
Missense variant (Chr 11)		AG	297	41.5			6.99 (5.56)		6.71 (6.28)		25.76 (18.42)	
		GG	63	8.8			6.76 (5.70)		6.94 (6.16)		25.46 (19.82)	
rs1138272	<i>GSTP1</i>	CC	641	89.5	0.464	0.05	7.00 (5.68)	0.161	6.86 (6.34)	0.223	26.01 (19.36)	0.186
Missense variant (Chr 11)		CT	75	10.5			6.04 (4.42)		5.94 (4.63)		22.96 (14.48)	
rs662	<i>PON1</i>	TT	335	46.8	0.564	0.30	6.62 (5.48)	0.040	6.72 (6.25)	0.035	24.88 (18.61)	0.032
Missense variant (Chr 7)		TC	308	43.0			7.45 (5.86)		7.20 (6.29)		27.54 (19.70)	
		CC	73	10.2			5.85 (4.38)		5.12 (5.14)		21.65 (14.99)	

Chr: Cromosoma; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; MAF: Minor Allele Frequency; DE: Desviación estándar SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms

* Frecuencias <1% para la variante homocigota se fusionaron con heterocigota para un análisis más detallado; ** HWE and MAF se han calculado para todos los SNP genotipados en la población de estudio (n=1221)

^a ANOVA p-valor

4. Resultados

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la población incluida y no incluida en el presente estudio (**Tabla 1**). Las puntuaciones CBCL de los niños según las características sociodemográficas, dietéticas y ambientales se muestran en la **Tabla 3**. La edad media de las madres en el momento de la concepción fue de 30,6 años, alrededor del 92% de ellas nacieron en España, el 35% tenían titulación universitaria, más del 40% pertenecían a la clase social más baja y casi el 80% vivían en áreas metropolitanas. Alrededor del 85% trabajó durante el embarazo y no fumó durante la gestación. Los niños de la cohorte de Gipuzkoa mostraron mejores resultados en las pruebas de comportamiento obteniendo las puntuaciones más bajas en las escalas CBCL. Los niños mostraron puntuaciones más altas en todas las escalas cuando vivían cerca de un invernadero. Los niños también mostraron puntuaciones más altas cuando sus madres habían nacido el extranjero, tenían un IMC más alto, un bajo nivel educativo o de clase social, eran no trabajadoras, fumadoras activas o pasivas, así como registraron un mayor consumo durante el embarazo de patatas, pan o carne (especialmente carne roja y procesada). Los niños varones mostraron puntuaciones más altas que las niñas, pero solo en cuanto a los problemas de externalización.

La **Figura 1** muestra los factores asociados a la exposición del Pb respecto a cada una de las escalas CBCL. La figura muestra qué factores se relacionaron modificando el efecto del Pb sobre el score correspondiente. Todos los modelos fueron ajustados por cohorte, sexo, edad al momento de la prueba, calorías diarias y creatinina. Los modelos de problemas de internalización y externalización también se ajustaron por el IMC, el nivel de educación y el tabaquismo durante el embarazo, y los modelos de problemas totales también para la clase social. La figura también muestra los factores de confusión provenientes del modelo basal del Pb que modifican más del 10% del coeficiente de metal en cada modelo multivariable.

En la **Figura 2** pueden observarse las Razones de Tasas de Incidencia (IRR) del Pb y los factores asociados en relación con las puntuaciones obtenidas en las tres escalas CBCL en los modelos multivariados ajustados finales. Así, el aumento de las concentraciones urinarias maternas de Pb se asoció con un mayor IRR para las tres escalas CBCL en los niños: trastornos internalizantes (+5,7%, p-valor=0,028), externalizantes (+6,9%, p-valor=0,027) y totales (+4,6%, p-valor=0,046). Por otra parte, entre los factores asociados a la exposición al Pb en cada modelo destacan: el IMC materno, que se muestra directamente relacionado con las tres escalas de comportamiento (peores resultados), mientras que mayores estudios se asoció de manera inversa. Además, los

problemas internalizantes y totales se relacionaron positivamente (peores resultados) con la proximidad a invernaderos y la mayor paridad de las madres. Los problemas externalizantes se asociaron de manera relevante al consumo de frutos secos y tanto éstos como los problemas totales se relacionaron directamente al sexo (varones) y al tabaquismo. Los problemas totales de comportamiento muestran un incremento en clases sociales más bajas.

El detalle de los coeficientes del Pb del obtenidos para cada uno de los modelos evaluados (ajustados multivariados, por sexos, excluyendo la cohorte de Sabadell y los no lineales) puede observarse en la **Tabla 4**. La relación entre el Pb y cada uno de las escalas CBCL resulta lineal debido al mayor AIC obtenido para los modelos no lineales, así como la exploración gráfica (**Figura 3**). Los modelos de sensibilidad excluyendo Sabadell (n=729) no mostraron discrepancias en la IRR del Pb frente a los modelos multivariados que incluyen las tres cohortes (n=1027).

En la **Tabla 4** también puede apreciarse que el sexo modificó las asociaciones entre las concentraciones maternas de Pb y las puntuaciones de los niños. Las concentraciones de Pb se asociaron positivamente con las tres escalas CBCL solo en niños varones (un aumento de la IRR del 7,3 %, 9,6 % y 5,1 % para las escalas de problemas internalizantes, externalizantes y totales, respectivamente).

Finalmente, el SNP rs11030104 (*BDNF*) también mostró una modificación del efecto de las concentraciones maternas de Pb. En este caso se halló una modificación en la relación entre el Pb y las puntuaciones CBCL para problemas totales en los niños después de la corrección FDR (p-valor término de interacción = 0,010). La **Figura 4** muestra las asociaciones del Pb y las puntuaciones de los problemas totales según el genotipo. Para esta escala, los niños homocigotos para el alelo común de rs11030104 mostraron un mayor riesgo con el aumento de la exposición prenatal a Pb (+ 6,7 %).

Tabla 3. Medición de índices de alteración de conducta infantil a los 9 años según características sociodemográficas, dietéticas y ambientales de los participantes del estudio. Proyecto INMA (Gipuzkoa, Sabadell y Valencia, España, 2003-2014)

	Problemas internalizantes		Problemas externalizantes		Problemas totales	
	Media (DE)	p-valor ^a	Media (DE)	p-valor ^a	Media (DE)	p-valor ^a
Muestra total (n=1027)	7,01 (5,49)	-	6,76 (6,07)	-	26,04 (18,49)	-
Grupo						
Gipuzkoa	5,84 (4,71)	<0,001	5,89 (5,46)	<0,001	21,60 (15,61)	<0,001
Sabadell	7,72 (5,98)		6,66 (6,66)		27,41 (20,36)	
Valencia	7,59 (5,63)		7,63 (6,05)		29,15 (18,76)	
País de nacimiento materno						
España	6,95 (5,50)	0,096	6,72 (6,09)	0,337	25,78 (18,53)	0,027
América Latina	8,30 (5,18)		7,46 (5,16)		31,16 (14,82)	
Otro	8,41 (5,66)		7,73 (6,12)		31,78 (19,59)	
Nivel educativo materno						
hasta primaria	8,70 (6,24)	<0,001	8,25 (6,95)	<0,001	32,60 (21,80)	<0,001
Secundario	7,34 (5,37)		7,42 (6,08)		27,55 (17,91)	
Universidad	5,86 (4,94)		5,39 (5,26)		21,34 (15,87)	
Paridad						
0	7,39 (5,56)	0,015	6,95 (6,06)	0,195	27,06 (18,38)	0,055
1	6,37 (5,13)		6,52 (5,88)		24,49 (17,67)	
≥2	7,66 (6,77)		6,48 (7,42)		26,49 (23,98)	
zona de residencia						
Rural	6,77 (4,83)	0,008	6,54 (5,86)	0,356	24,10 (17,38)	0,071
Semi urbano	5,81 (4,42)		6,11 (5,45)		22,96 (15,41)	
Urbano	7,34 (5,73)		6,94 (6,22)		26,95 (19,18)	
Situación laboral de la madre durante el embarazo						
No	8,08 (5,83)	0,011	7,89 (7,08)	0,079	30,74 (20,43)	0,003
Sí	6,87 (5,43)		6,60 (5,91)		25,41 (18,13)	
clase social de los padres						
I+II (alto)	5,91 (4,53)	<0,001	5,76 (5,42)	<0,001	21,65 (15,34)	<0,001

III	7,15 (5,72)		6,84 (6,30)		26,50 (19,38)	
IV+V (bajo)	8,08 (6,02)		7,75 (6,37)		30,34 (19,78)	
Tabaquismo materno antes del embarazo						
No	6,51 (5,21)	<0,001	6,29 (5,73)	<0,001	24,38 (17,50)	<0,001
Sí	8,31 (6,04)		8,03 (6,69)		30,53 (20,31)	
Tabaquismo materno durante el embarazo						
No	6,72 (5,39)	<0,001	6,38 (5,79)	<0,001	24,87 (17,87)	<0,001
Sí	8,52 (5,91)		8,88 (7,00)		32,49 (20,58)	
Exposición al humo del tabaco						
No	6,28 (4,99)	0,,001	5,93 (5,48)	0,001	23,18 (16,20)	<0,001
Sí	7,49 (5,76)		7,30 (6,35)		27,96 (19,61)	
Frecuencia de los autos que pasan cerca de la casa,						
Constantemente	7,24 (5,84)	0,921	6,83 (5,98)	0,340	26,75 (18,68)	0,434
Frecuentemente	6,93 (5,69)		7,05 (6,52)		26,44 (19,83)	
Un poquito	7,00 (5,20)		6,84 (6,03)		26,08 (18,09)	
Nunca	6,54 (4,62)		5,59 (5,12)		22,61 (15,41)	
Frecuencia de tráfico pesado cerca de la casa,						
Constantemente	7,45 (5,97)	0,429	5,97 (5,71)	0,184	26,07 (18,92)	0,508
Frecuentemente	7,22 (5,58)		7,43 (6,61)		27,70 (19,14)	
Un poquito	6,62 (5,39)		6,52 (5,78)		24,82 (17,72)	
Nunca	7,07 (5,39)		7,02 (6,17)		26,43 (18,72)	
Proximidad de la casa a un invernadero,						
Sí	8,32 (5,50)	0,019	8,06 (6,26)	0,041	29,15 (19,31)	0,138
No	6,92 (5,49)		6,68 (6,03)		25,86 (18,43)	
Proximidad de la casa a un campo de cultivo						
Sí	7,37 (5,65)	0,121	7,07 (5,94)	0,111	27,16 (18,70)	0,108
No	6,82 (5,41)		6,61 (6,12)		25,50 (18,38)	
Proximidad de la casa a la actividad industrial						
Sí	7,35 (5,60)	0,175	6,99 (6,13)	0,390	26,69 (19,12)	0,548
No	6,86 (5,45)		6,66 (6,02)		25,78 (18,22)	
Sexo del niño						

Masculino	7,28 (5,90)	0,528	7,51 (6,55)	<0,001	28,07 (19,86)	0,002
Femenino	6,74 (5,02)		5,98 (5,43)		23,94 (16,71)	
	Media (DE)	Correlación ^b		Correlación ^b		Correlación ^b
Edad materna (años)	30,60 (4,11)	-0,025		-0,022		-0,047
IMC antes del embarazo (Kg/m²)	23,32 (4,10)	0,120*		0,132*		0,139*
Consumo materno de alimentos						
Productos lácteos (raciones/día)	2,83 (1,39)	-0,010		-0,017		-0,020
Huevos (raciones/día)	0,40 (0,18)	-0,010		0,001		-0,012
Carne (raciones/día)	1,13 (0,47)	0,065*		0,130*		0,124*
Carne roja (raciones/día)	0,35 (0,19)	0,052		0,098*		0,092*
Carne blanca (raciones/día)	0,46 (0,27)	0,017		0,032		0,044
Carne procesada (raciones/día)	0,32 (0,27)	0,048		0,103*		0,091*
Mariscos (raciones/día)	0,70 (0,37)	-0,009		0,002		-0,003
Pescado magro (raciones/día)	0,30 (0,22)	-0,048		-0,040		-0,045
Pescado azul (raciones/día)	0,31 (0,23)	0,019		0,023		0,018
Otros (raciones/día)	0,10 (0,09)	0,023		0,041		0,047
Verduras (raciones/día)	2,29 (1,19)	0,013		-0,003		0,004
Frutas (raciones/día)	2,65 (1,66)	-0,045		-0,009		-0,031
Frutos secos (raciones/día)	0,06 (0,08)	0,032		0,036		0,028
Legumbres (raciones/día)	0,26 (0,17)	0,016		0,005		0,005
Cereales y pastas (raciones/día)	0,80 (0,49)	-0,018		-0,025		-0,018
Patatas (raciones/día)	0,53 (0,31)	0,077*		0,072*		0,085*
Pan (raciones/día)	1,81 (1,22)	0,065*		0,066*		0,077*
Dulces (raciones/día)	3,85 (2,86)	0,004		0,018		0,014
Bebidas no alcohólicas (raciones/día)	6,10 (2,03)	0,003		0,033		0,012
Cafés y té (raciones/día)	0,97 (0,98)	0,016		0,058		0,043
Bebidas alcohólicas (raciones/día)	0,02 (0,09)	0,048		0,030		0,042
Grasa animal (raciones/día)	0,05 (0,15)	-0,009		0,003		-0,006
Aceite vegetal (raciones/día)	1,99 (1,33)	0,024		-0,008		-0,014
Alimentos procesados (raciones/día)	0,73 (0,47)	-0,003		0,045		0,028
Aderezos (raciones/día)	0,78 (1,05)	0,050		0,017		0,029

Proximidad a una calle con tráfico (metros)	261,64 (765,36)	-0,013	0,018	-0,002
Áreas agrícolas y de humedales cerca de la casa (%)	7,85 (14,43)	-0,006	-0,015	-0,009
Tejido urbano cerca de la casa (%)	45,52 (24,02)	-0,004	-0,034	-0,023
Zonas verdes urbanas cercanas a la vivienda (%)	4,50 (7,87)	0,016	0,037	0,031
PM_{2,5} durante el embarazo (µg/m³)	14,70 (2,41)	-0,009	-0,009	-0,015
NO₂ durante el embarazo (µg/m³)	30,77 (13,48)	0,055	0,030	0,049
Edad del niño en el momento de la prueba (años)	8,60 (0,73)	0,011	-0,013	-0,003
Concentraciones de Pb (GM (CI), µg/g cr.)	1,44 (1,37,1,50)	0,028	0,015	0,023

^a prueba de Kruskal-Wallis entre las puntuaciones del CBCL y las covariables categóricas y la prueba de Spearman para evaluar la correlación entre las puntuaciones del CBCL y las covariables continuas.

^b Se realizó la prueba de Spearman ajustada por cohorte entre las puntuaciones CBCL y las covariables continuas. Se muestra el coeficiente de correlación y se agrega * cuando la significancia de la prueba mostró un valor de $p < 0.05$.

IMC: Índice de Masa Corporal; CBCL: Lista de Verificación de Comportamiento Infantil; IC: intervalo de confianza; GM: media geométrica; NO₂: dióxido de nitrógeno; DE: desviación estándar; PM_{2.5}: material particulado (<2,5 µm de diámetro)

**solo disponible para cohortes de Gipuzkoa y Valencia.

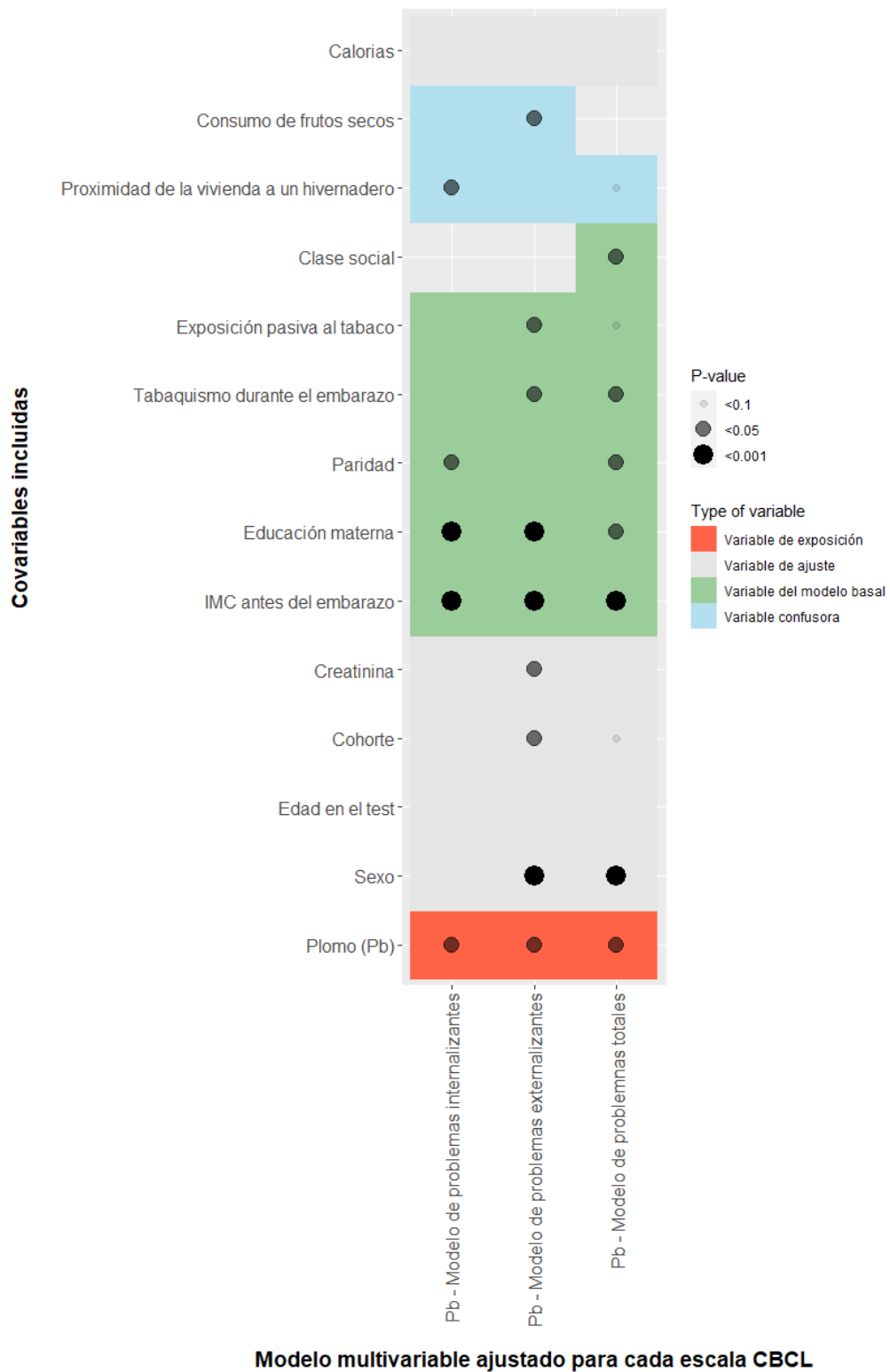


Figura 1. Modelos multivariados ajustados para cada escala CBCL y la exposición a Pb, incluidas las covariables y las variables de confusión que cambiaron la magnitud del efecto del Pb sobre la variable respuesta en más del 10 %.



Figura 2. Razones de Tasas de Incidencia (IRR) del Pb y los factores asociados en relación con las puntuaciones obtenidas en las tres escalas CBCL en los modelos multivariados ajustados finales.

Tabla 4. Coeficientes de razón de riesgo de incidencia (IRR) del plomo para los modelos ajustados multivariables (tamaño muestral máximo = 1027), para los mismos modelos fijando el sexo de referencia, los modelos de sensibilidad excluyendo la cohorte Sabadell (tamaño muestral máximo = 729) , y relación lineal/no lineal según el AIC y la interpretación gráfica.

	Problemas internalizantes			Problemas externalizantes			Problemas totales		
	N	IRR (IC 95%)	p-valor	N	IRR (IC 95%)	p-valor	N	IRR (IC 95%)	p-valor
Modelo ajustado	968	1,057 (1,006, 1,110)	0,028**	968	1,069 (1,006, 1,135)	0,027**	974	1,046 (1,000, 1,093)	0,046**
Sexo masculino (referencia femenina)	968	1,073 (1,011, 1,138)	0,019**	968	1,096 (1,020, 1,177)	0,011**	974	1,051 (0,996, 1,107)	0,065*
Sexo femenino (referencia masculina)	968	1,041 (0,982, 1,104)	0,174	968	1,043 (0,970, 1,120)	0,244	974	1,041 (0,986, 1,098)	0,140
Modelo de sensibilidad	729	1,068 (1,011, 1,128)	0,017**	729	1,084 (1,017, 1,155)	0,011**	729	1,061 (1,011, 1,114)	0,015**
Relación (punto de corte $\mu\text{g/g cr,}$)	968	Lineal (3,1)	0,088*	968	Lineal (0,69)	0,032*	974	Lineal (3,3)	0,102

¥ significado del término de interacción <0,05; * significado de los niveles de Pb <0,1; ** <0,05; ***<0,001. Los puntos de corte y los valores de p para los términos suavizados para modelos no lineales se muestran independientemente de la relación lineal o no lineal indicada de acuerdo con el mejor criterio AIC y exploración gráfica.

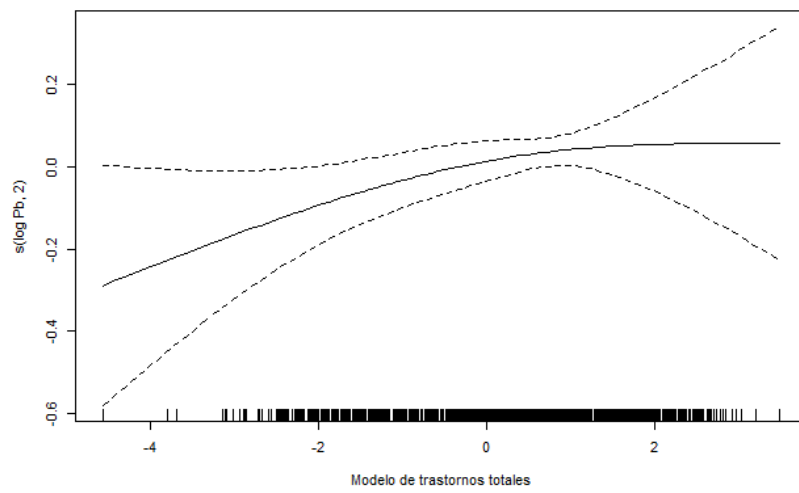
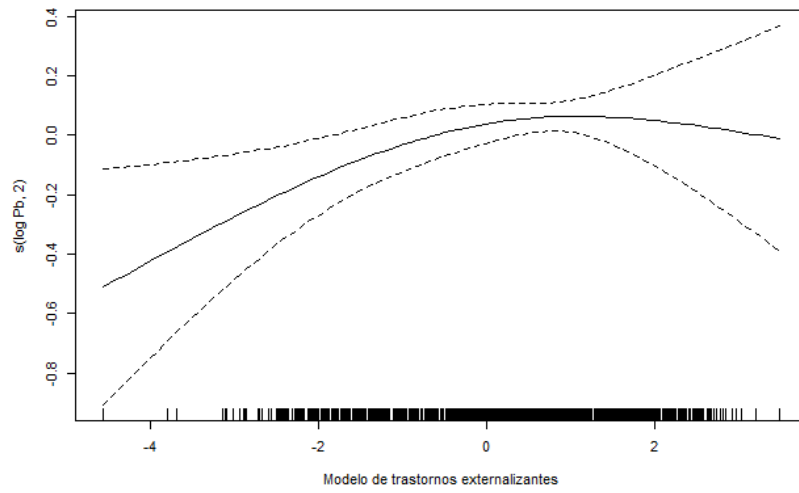
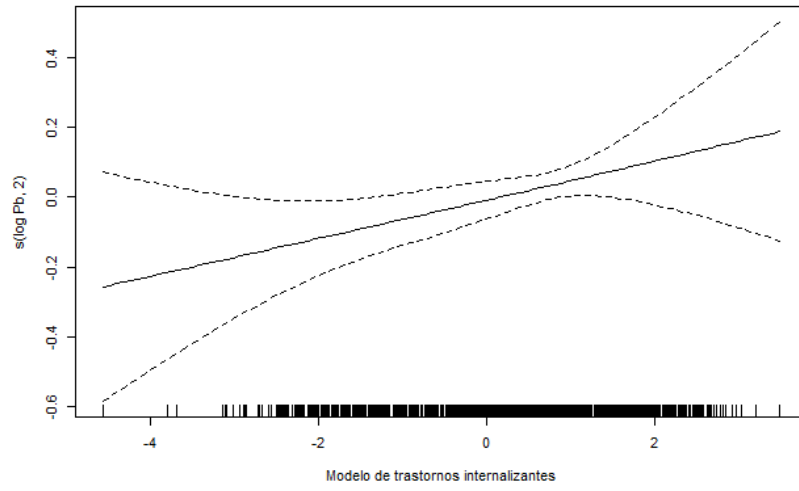


Figura 2. Representación gráfica de los GAM para cada una de las escalas CBCL.

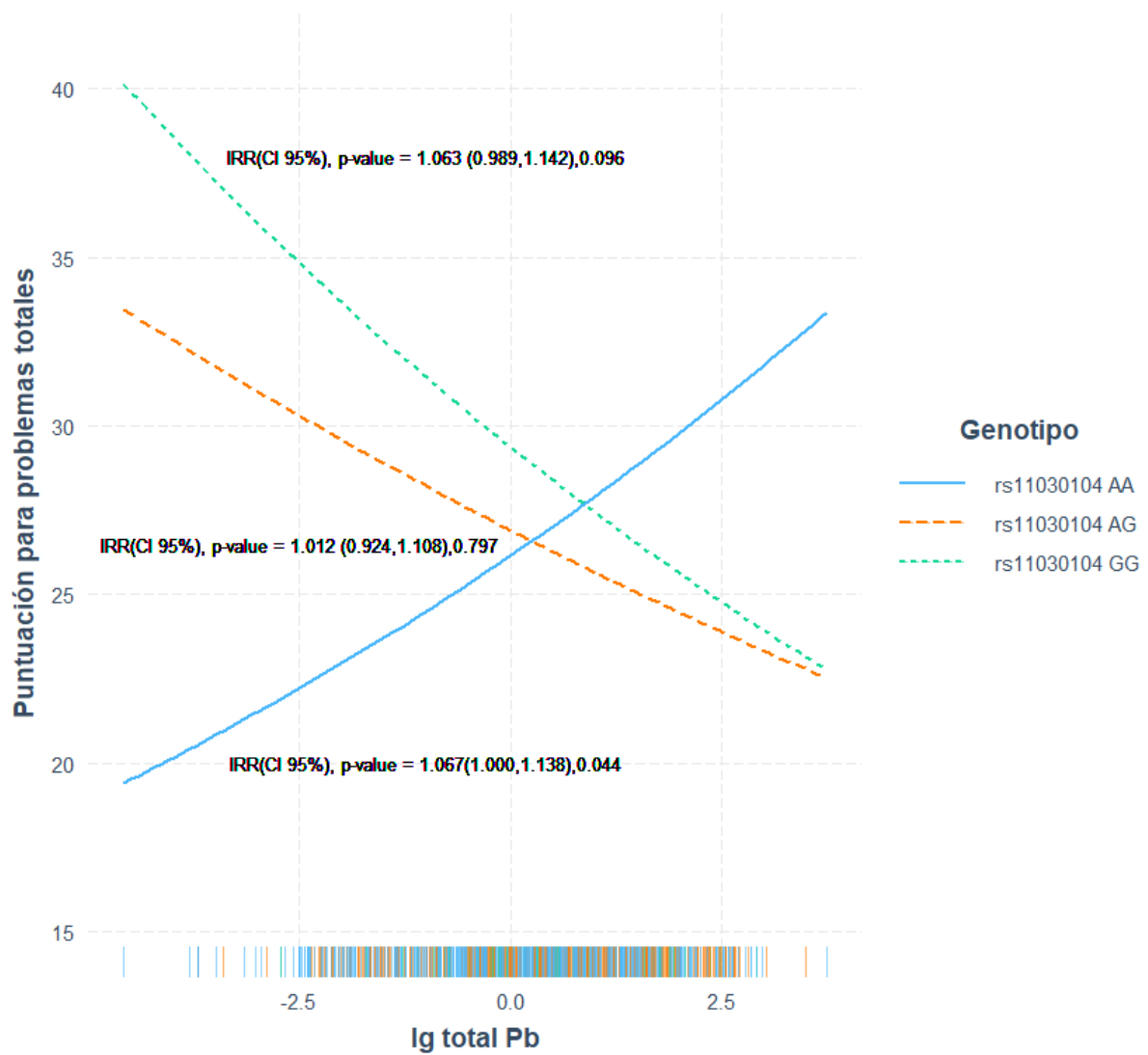


Figura 4. Asociaciones del Pb y las puntuaciones de la escala CBCL de problemas internalizantes medidos a través de las tasas de riesgo de incidencia (IRR) según el genotipo del SNP rs11030104 (*BDNF*)

5. Discusión

Las concentraciones de Pb en nuestra población resultaron ser inferiores a las observadas en la mayoría de países donde se ha medido la exposición prenatal, como indican otros estudios realizados en mujeres embarazadas birmanas (36), chinas (37) y japonesas (38). Este hecho podría explicarse por la prohibición del Pb en la gasolina en España a partir de 2001 (39).

El Pb urinario se ha utilizado en el marcador biológico de la exposición al metal, pero solo de forma limitada (40). Aunque existe una asociación entre las concentraciones de Pb en orina y sangre, la variación es demasiado grande para permitir la predicción de Pb en sangre individual a partir de una concentración de Pb en orina. La concentración de Pb en sangre se considera más adecuada para el biomonitordeo que en la orina porque refleja la combinación de la exposición durante los meses anteriores y la exposición durante los últimos años, pero al considerarse el efecto del Pb durante el embarazo, los niveles urinarios se pueden considerar adecuados para valorar el efecto sobre el feto (41). Otros autores han propuesto la determinación del ácido aminolevulínico (ALA) en orina, el cual aumenta con la exposición al Pb (42).

El efecto del Pb en orina en nuestro estudio se ha asociado con la proximidad de la vivienda a un invernadero. Aunque no se ha relacionado antes con invernaderos en concreto, el Pb se ha relacionado con material particulado procedente de fuentes contaminantes en ambientes exteriores e interiores, asociado a la resuspensión de materia mineral (43,44). Otros factores asociados con el efecto del Pb fueron el tabaquismo durante el embarazo y el aumento de la paridad. También se encontró que estos dos factores estaban relacionados con los niveles maternos de plomo en estudios llevados a cabo en Puerto Rico (45) y Estados Unidos(46). Por último, la asociación de los frutos secos con los niveles urinarios de Pb se han descrito previamente en las madres del proyecto INMA (22).

Aunque los niveles de Pb en las poblaciones de todo el mundo han disminuido debido a la eliminación gradual de la gasolina con plomo, todavía existe un debate sobre las concentraciones de plomo que se consideran seguras para los humanos (47). La exposición temprana a Pb se ha relacionado previamente con efectos adversos en el desarrollo cognitivo y conductual de los niños (48), siendo el estudio más amplio hasta la fecha el desarrollado en seis cohortes longitudinales europeas que relacionó la exposición prenatal maternal a Pb con peores resultados en los test CBCL de problemas internalizantes, en concordancia con el presente estudio (14).

6. Conclusiones

Conclusiones

- En la población estudiada, la exposición prenatal a Pb se asoció con peores resultados en las tres escalas de pruebas emocionales y conductuales en preadolescentes.
- El IMC materno, menor nivel de estudios y clase social, la proximidad a invernaderos, la paridad, el tabaquismo y el consumo de frutos secos, se relacionaron con la exposición al Pb y de manera negativa frente a los resultados de los test de comportamiento en los niños.
- El sexo parece ser relevante en la incidencia de estos trastornos del comportamiento, siendo los niños varones los que presentan un mayor riesgo de manera significativa.
- Los antecedentes genéticos en el SNP rs11030104 (*BDNF*) pueden desempeñar un papel en la toxicidad del Pb.

Líneas de futuro

El metabolismo del Pb es un proceso complejo que aún no se comprende por completo y serían necesarios más estudios epidemiológicos para comprender el posible impacto del sexo y la genética tanto en el metabolismo del Pb como en la vulnerabilidad a los efectos sobre la salud relacionados con su exposición. En conjunto, toda esta información podría utilizarse para proponer nuevas estrategias en salud pública.

Seguimiento de la planificación

La metodología empleada ha seguido los protocolos de análisis aprobados por el comité científico del proyecto INMA (<https://www.proyectoinma.org>), la cual ha sido ampliamente validada en numerosos estudios previos en los que se ha evaluado la exposición a metales frente a outcomes de tipo score como el empleado (https://www.proyectoinma.org/proyecto-inma/resultados-del-estudio/?_sft_resultados_categories=metales). El plan de trabajo descrito en la sección 2 del presente trabajo se ha respetado y ha manifestado los resultados esperados en cada ítem, confirmándose las hipótesis de trabajo iniciales.

7. Glosario

APOE: Apolipoprotein E

ALA: ácido aminolevulínico

ASEBA: Achenbach System of Empirically Based Assessment

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

CBCL: Child Behavior Checklist

CFA: Cuestionario Semicuantitativo de Frecuencia de Alimentos

EUNIS: European Nature Information System

GAM: Generalized additive model

GSTP1: Glutathione S-Transferase Pi 1

IMC: Índice de Masa Corporal

INMA: INfancia y Medio Ambiente

ISCO88: Clasificación Internacional Estándar de Ocupaciones

NO: Nitrogen oxide

Pb: Plomo

PM: Particulate matter

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

PON1: Paraoxonase 1

8. Bibliografía

1. Vasileva M, Graf RK, Reinelt T, Petermann U, Petermann F. Research review: A meta-analysis of the international prevalence and comorbidity of mental disorders in children between 1 and 7 years. *J Child Psychol Psychiatry*. 2021 Apr;62(4):372–81.
2. Arslan İB, Lucassen N, van Lier PAC, de Haan AD, Prinzie P. Early childhood internalizing problems, externalizing problems and their co-occurrence and (mal)adaptive functioning in emerging adulthood: a 16-year follow-up study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2021 Feb 1;56(2):193–206.
3. Fang Y, Raat H, Windhorst DA, Fierloos IN, Jonkman H, Hosman CMH, et al. The Association between Stressful Life Events and Emotional and Behavioral Problems in Children 0–7 Years Old: The CIKEO Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022 Jan;19(3):1650.
4. González L, Estarlich M, Murcia M, Barreto-Zarza F, Santa-Marina L, Simó S, et al. Poverty, social exclusion, and mental health: the role of the family context in children aged 7–11 years INMA mother-and-child cohort study. *Eur Child Adolesc Psychiatry [Internet]*. 2021 Jul 26 [cited 2022 Apr 26]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00787-021-01848-w>
5. Jaspers M, de Winter AF, Huisman M, Verhulst FC, Ormel J, Stewart RE, et al. Trajectories of Psychosocial Problems in Adolescents Predicted by Findings From Early Well-Child Assessments. *Journal of Adolescent Health*. 2012 Nov 1;51(5):475–83.
6. Ortuño-Sierra J, Fonseca-Pedrero E, Paíno M, Aritio-Solana R. Prevalencia de síntomas emocionales y comportamentales en adolescentes españoles. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*. 2014 Jul 1;7(3):121–30.
7. Forns M, Abad J, Kirchner T. Internalizing and Externalizing Problems. In: Levesque RJR, editor. *Encyclopedia of Adolescence [Internet]*. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2022 Apr 26]. p. 1965–70. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-33228-4_261
8. Supke M, Ferling C, Hahlweg K, Schulz W. Persistence and course of mental health problems from childhood into adolescence: results of a 10-year longitudinal study. *BMC Psychol*. 2021 Feb 27;9(1):38.
9. Klipker K, Baumgarten F, Göbel K, Lampert T, Hölling H. Mental health problems in children and adolescents in Germany. Results of the cross-sectional KiGGS Wave 2 study and trends. 2018 Sep 19 [cited 2022 Apr 26]; Available from: <https://edoc.rki.de/handle/176904/5774>
10. Benke KS, Nivard MG, Velders FP, Walters RK, Pappa I, Scheet PA, et al. A Genome-wide Association Meta-analysis of Preschool Internalizing Problems. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2014 Jun 1;53(6):667–676.e7.

11. Della Torre OH, Paes LA, Henriques TB, de Mello MP, Celeri EHRV, Dalgalarrrondo P, et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and externalizing behaviors in children and adolescents. *BMC Medical Genetics*. 2018 May 2;19(1):65.
12. Cimino S, Carola V, Cerniglia L, Bussone S, Bevilacqua A, Tambelli R. The μ -opioid receptor gene A118G polymorphism is associated with insecure attachment in children with disruptive mood regulation disorder and their mothers. *Brain and Behavior*. 2020;10(7):e01659.
13. Paes LA, Torre OHD, Henriques TB, de Mello MP, Celeri EHRV, Dalgalarrrondo P, et al. Association between serotonin 2C receptor gene (*HTR2C*) polymorphisms and psychopathological symptoms in children and adolescents. *Braz J Med Biol Res [Internet]*. 2018 Jun 14 [cited 2022 Apr 26];51. Available from: <http://www.scielo.br/j/bjmr/a/vCjb6FFzN8vp5spdwX8gKdf/?lang=en>
14. Maitre L, Julvez J, López-Vicente M, Warembourg C, Tamayo-Uria I, Philippat C, et al. Early-life environmental exposure determinants of child behavior in Europe: A longitudinal, population-based study. *Environment International*. 2021;153.
15. Maitre L, Bont J de, Casas M, Robinson O, Aasvang GM, Agier L, et al. Human Early Life Exposome (HELIX) study: a European population-based exposome cohort. *BMJ Open*. 2018 Sep 1;8(9):e021311.
16. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: Toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Science of The Total Environment*. 2001 Dec 3;280(1):221–38.
17. Xu J, Hu H, Wright R, Sánchez BN, Schnaas L, Bellinger DC, et al. Prenatal Lead Exposure Modifies the Impact of Maternal Self-Esteem on Children's Inattention Behavior. *Journal of Pediatrics*. 2015;167(2):435–41.
18. Vigeh M, Yokoyama K, Matsukawa T, Shinohara A, Ohtani K. Low level prenatal blood lead adversely affects early childhood mental development. *Journal of Child Neurology*. 2014;29(10):1305–11.
19. Liu J, Chen Y, Gao D, Jing J, Hu Q. Prenatal and postnatal lead exposure and cognitive development of infants followed over the first three years of life: A prospective birth study in the Pearl River Delta region, China. *NeuroToxicology*. 2014;44:326–34.
20. Yorifuji T, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Prenatal exposure to lead and cognitive deficit in 7- and 14-year-old children in the presence of concomitant exposure to similar molar concentration of methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011;33(2):205–11.
21. Napier MD, Poole C, Satten GA, Ashley-Koch A, Marrie RA, Williamson DM. Heavy metals, organic solvents, and multiple sclerosis: An exploratory look at gene-environment interactions. *Arch Environ Occup Health*. 2016;71(1):26–34.
22. Lozano M, Murcia M, Soler-Blasco R, Casas M, Zubero B, Riutort-Mayol G, et al. Exposure to metals and metalloids among pregnant women from Spain: Levels and associated factors. *Chemosphere*. 2022;286.

23. Achenbach TM, Ruffle TM. The child behavior checklist and related forms for assessing behavioral/emotional problems and competencies. *Pediatrics in Review*. 2000;21(8):265–71.
24. Universitat Autònoma de Barcelona. Baremos CBCL 6-18 (2001). Población española. [Internet]. 2013 [cited 2022 May 3]. Available from: <https://docplayer.es/7442699-Facultat-de-psicologia-unitat-d-epidemiologia-i-de-diagnostic-infantil.html>
25. Rescorla L, Achenbach T, Ivanova MY, Dumenci L, Almqvist F, Bilenberg N, et al. Behavioral and Emotional Problems Reported by Parents of Children Ages 6 to 16 in 31 Societies. *Journal of Emotional and Behavioral Disorders*. 2007 Jul 1;15(3):130–42.
26. Achenbach TM, Rescorla L. *Manual for the ASEBA school-age forms & profiles: an integrated system of multi-informant assessment*. 2001.
27. Ars CL, Nijs IM, Marroun HE, Muetzel R, Schmidt M, Steenweg-de Graaff J, et al. Prenatal folate, homocysteine and vitamin B12 levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: the Generation R Study. *Br J Nutr*. 2019 Sep;122(s1):S1–9.
28. Lozano M, Murcia M, Soler-Blasco R, González L, Iriarte G, Rebagliato M, et al. Exposure to mercury among 9-year-old children and neurobehavioural function. *Environment International*. 2021;146.
29. Benke KS, Nivard MG, Velders FP, Walters RK, Pappa I, Scheet PA, et al. A genome-wide association meta-analysis of preschool internalizing problems. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Jun;53(6):667-676.e7.
30. Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, et al. Cohort Profile: The INMA—INfancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project. *International Journal of Epidemiology*. 2012 Aug;41(4):930–40.
31. Rubio-Stipec M, Bird H, Canino G, Gould M. The internal consistency and concurrent validity of a Spanish translation of the Child Behavior Checklist. *Journal of Abnormal Child Psychology*. 1990;18(4):393–406.
32. Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Gimenez-Monzó D, García-de-la-Hera M, Granado F, Young IS, et al. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutrition Journal*. 2013 Feb 19;12(1):26.
33. Lertxundi A, Andiarena A, Martínez MD, Ayerdi M, Murcia M, Estarlich M, et al. Prenatal exposure to PM2.5 and NO2 and sex-dependent infant cognitive and motor development. *Environmental Research*. 2019 Jul 1;174:114–21.
34. Iñiguez C, Ballester F, Estarlich M, Llop S, Fernandez-Patier R, Aguirre-Alfaro A, et al. Estimation of personal NO2 exposure in a cohort of pregnant women. *Science of the Total Environment*. 2009;407(23):6093–9.
35. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Viena: R Foundation for Statistical Computing; 2017.

36. Wai KM, Umezaki M, Kosaka S, Mar O, Umemura M, Fillman T, et al. Impact of prenatal heavy metal exposure on newborn leucocyte telomere length: A birth-cohort study. *Environmental Pollution*. 2018 Dec 1;243:1414–21.
37. Wang X, Qi L, Peng Y, Xia W, Xu S, Li Y, et al. Urinary concentrations of environmental metals and associating factors in pregnant women. *Environ Sci Pollut Res*. 2019 May 1;26(13):13464–75.
38. Shirai S, Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y. Maternal exposure to low-level heavy metals during pregnancy and birth size. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2010 Sep;45(11):1468–74.
39. Llop S, Porta M, Martínez MD, Aguinagalde X, Fernández MF, Fernández-Somoano A, et al. Estudio de la evolución de la exposición a plomo en la población infantil española en los últimos 20 años: ¿un ejemplo no reconocido de «salud en todas las políticas»? *Gaceta Sanitaria*. 2013 Apr;27(2):149–55.
40. Tsaih SW, Korricks S, Schwartz J, Lee ML, Amarasiriwardena C, Aro A, et al. Influence of bone resorption on the mobilization of lead from bone among middle-aged and elderly men: the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect*. 2001 Oct;109(10):995–9.
41. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M. *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*. 2014. 1 p. (*Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*; vol. 1).
42. Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health*. 2000 Apr;38(2):127–42.
43. Rivas I, Viana M, Moreno T, Pandolfi M, Amato F, Reche C, et al. Child exposure to indoor and outdoor air pollutants in schools in Barcelona, Spain. *Environ Int*. 2014 Aug;69:200–12.
44. Li X, Zhang Y, Tan M, Liu J, Bao L, Zhang G, et al. Atmospheric lead pollution in fine particulate matter in Shanghai, China. *Journal of Environmental Sciences*. 2009 Jan 1;21(8):1118–24.
45. Ashrap P, Watkins DJ, Mukherjee B, Boss J, Richards MJ, Rosario Z, et al. Predictors of urinary and blood Metal(loid) concentrations among pregnant women in Northern Puerto Rico. *Environ Res*. 2020 Apr;183:109178.
46. Jain RB. Effect of pregnancy on the levels of urinary metals for females aged 17-39 years old: data from National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(2):86–97.
47. Shefa ST, Héroux P. Both physiology and epidemiology support zero tolerable blood lead levels. *Toxicol Lett*. 2017 Oct 5;280:232–7.
48. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 2006 Dec 16;368(9553):2167–78.