

01485



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud.

Relación entre la exposición subcrónica a plaguicidas Inhibidores de colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino

Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias
Campo de conocimiento Ciencias Médicas

Presenta

Margarita Levario Carrillo

Tutora de tesis: Doctora Patricia Ostrosky-Wegman. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Comité Tutorial: Doctora Luz Helena Sanin Aguirre, Universidad Autónoma de Chihuahua, Instituto Nacional de Salud Pública.

Doctor José Dante Amato Martínez, Investigación Clínica, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS. México, D. F.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social en Chihuahua, México, el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua y los Laboratorios del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

México D. F. Abril 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A los Doctores: Patricia Ostrosky-Wegman, Luz Helena Sanin Aguirre y José Dante Amato Martínez, por su apoyo personal y académico invaluable, por brindarme su asesoría en todo momento, por compartir conmigo sus conocimientos, por sus críticas y por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial.

A la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño, por su asesoría técnica y colaboración en la estandarización de la técnica para la determinación de micronúcleos.

A los integrantes del jurado de examen de grado: Dr. Fabio Abdiel Salamanca Gómez, Dra. Alessandra Carnevale Cantoni, Dra. Patricia Ostrosky Wegman, Dr. Silvestre Frenk Freund, Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes, Dr. José Dante Amato Martínez, Dr. Víctor Hugo Borja Aburto. Por sus aportaciones y críticas al presente trabajo.

Al equipo de salud del Hospital General de Zona Número 11 de Ciudad Delicias, Chihuahua, en especial a: Lic. En Enf. Yolanda Corona, Dr. Enrique Octavio Félix Mendoza, Dr. Julio Cuellar Estrada, Personal médico y de Enfermería del área de hospitalización de obstetricia y sala de labor, por su apoyo en la recolección de las muestras.

A las Doctoras María Del Carmen González Horta y Blanca Sánchez Ramírez de la Facultad de ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir conmigo su amistad y conocimientos.

A las Q.B.P. Karely Islas, Celia Quiñonez y Selene Porras, por su colaboración y apoyo.

Este trabajo fue financiado por la Organización Panamericana de la Salud, Oficina de Campo en El Paso Texas, por el fondo de fomento a la investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, por el grupo de investigadores que obtuvo el premio GLAXO, segundo lugar en Investigación Clínica en el año 2000.

Índice

| | Página |
|---|--------|
| 0. Resumen | 5 |
| 0.1 Abstract | 7 |
| 1. Introducción | 9 |
| 1.1 Generalidades de los plaguicidas órganofosforados | 10 |
| 1.1.1 Grupos de alto riesgo en la exposición a plaguicidas órganofosforados | 11 |
| 1.2 Efectos reproductivos adversos de los plaguicidas órganofosforados. | 11 |
| 1.2.1 Paso tras-placentario de plaguicidas órganofosforados | |
| 1.2.2 Efectos sobre la tasa de reabsorciones y aborto espontáneo | 13 |
| 1.2.3 Efectos de la exposición prenatal a plaguicidas sobre la proporción de partos prematuros | 15 |
| 1.2.4 Resultados de estudios que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la muerte fetal | 19 |
| 1.2.5 Resultados de estudios que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el bajo peso al nacer | 20 |
| 1.2.6 Conclusiones | 25 |
| | 29 |
| 1.3 Biomarcadores | |
| 1.3.1 Biomarcadores de daño genotóxico | |
| 1.3.2 Biomarcadores en la exposición a plaguicidas órganofosforados | 31 |
| 1.3.3 Estudios que evalúan biomarcadores de daño genotóxico en poblaciones expuestas a plaguicidas | 33 |
| 1.3.4 Agentes xenobióticos y daño genotóxico embrionario y fetal | 35 |
| | 37 |
| | 42 |
| 2. Preguntas de Investigación | 43 |
| 3. Hipótesis | 44 |
| 4. Objetivo | 44 |
| 5. Justificación | 44 |

| | | |
|------|--|----|
| 6. | Pacientes, material y métodos | 46 |
| 6.1 | Diseño | 46 |
| 6.2 | Universo de trabajo | 46 |
| 6.3 | Criterios de selección | 47 |
| 6.4 | Variables | 48 |
| 6.5 | Procedimientos | 50 |
| 6.6 | Técnicas | 51 |
| 6.7 | Análisis estadístico | 53 |
| 7 | Resultados | 55 |
| 7.1 | Relación entre la exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino | 55 |
| 7.2 | Frecuencia de micronúcleos en mujeres en puerperio y recién nacidos de poblaciones agrícolas y urbanas. | 57 |
| 8. | Discusión | 58 |
| 8.1 | Relación entre la exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino | 58 |
| 8.2 | Frecuencia de micronúcleos en mujeres en puerperio y recién nacidos de poblaciones agrícolas y urbanas. | 62 |
| 9. | Referencias | 66 |
| 10. | Cuadros | |
| 10.1 | Cuadro 1. Órganofosforados mas utilizados y sus metabolitos. | 78 |
| 10.2 | Cuadro 2. Plaguicidas utilizados en el área de estudio. | 79 |
| 10.3 | Cuadro 3. Factores asociados al retardo en el crecimiento intrauterino. | 80 |
| 10.4 | Cuadro 4. Características del Recién nacido. | 82 |
| 10.5 | Cuadro 5. Relación entre la exposición a plaguicidas y el retardo en el crecimiento intrauterino, OR ajustado por masa materna libre de grasa, peso de la placenta y anticuerpos anti-citomegalovirus. | 83 |
| 10.6 | Cuadro 6. Características clínicas de los grupos estudiados para determinar la asociación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la frecuencia de micronúcleos. | |
| 10.7 | Cuadro 7. Frecuencia de micronúcleos por 100 células binucleadas. | 84 |
| | | 85 |

| | | |
|------|---|----|
| 11. | Figuras | |
| 11.1 | Figura 1. Actividad de la acetilcolinesterasa materna y del recién nacido según temporada de aplicación de plaguicidas. | 86 |
| 11.2 | Figura 2. Correlación entre la actividad de la acetilcolinesterasa materna y del recién nacido. | 87 |
| 11.3 | Figura 3. Frecuencia de Micronúcleos en recién nacidos. | 88 |
| 11.4 | Figura 4. Frecuencia de micronúcleos en pares madres/ recién nacido de Delicias Chihuahua, México. | 89 |
| 12. | Anexo 1 | 90 |
| 12.1 | Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, González-Horta C, Corona Y, Sanin LH. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. Chemosphere 2004;55:1421-1427. | |

0. Resumen:

Objetivos: 1. Determinar la relación entre la exposición a plaguicidas y el retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU). 2. Comparar la proporción de micronúcleos (MN) durante la gestación y en el recién nacido, en sangre periférica y en el cordón umbilical en diversas poblaciones: dos urbanas, una agrícola y una considerada de alto riesgo durante la gestación.

Pacientes, material y métodos: Con un diseño tipo casos y controles para el cumplimiento del primer objetivo, se incluyeron 450 recién nacidos (RN) vivos, únicos, con y sin diagnóstico de RCIU, cuyas madres residieron en comunidades eminentemente agrícolas del distrito de riego 05 en el estado de Chihuahua, México durante el período de gestación. Se realizó una entrevista para evaluar exposición durante la gestación a productos agroquímicos y se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa. Por medio de un enzoinmunoensayo de micropartículas se realizó la determinación de anticuerpos IgM contra el virus de la rubéola, contra toxoplasma gondii y anticuerpos anti-citomegalovirus. Para el cumplimiento del segundo objetivo, se realizó un estudio transversal, se estudiaron recién nacidos de áreas urbanas (n = 21 cuyas madres residieron en Chihuahua, México y 12 RN de mujeres residentes en México D. F.) clínicamente sanos. De áreas agrícolas, se estudiaron dieciséis RN y finalmente se evaluaron 15 RN que cursaron la gestación con alto riesgo. También se realizó la evaluación de 31 mujeres en el periodo de puerperio inmediato: 16 de áreas urbanas y 15 de áreas agrícolas de México. Se tomaron las muestras sanguíneas maternas y del cordón umbilical para la determinación de MN.

Resultados: La proporción de exposición en los casos fue 18% y 8 % en los controles. Se identificó asociación entre la exposición a plaguicidas y el RCIU (OR crudo de 2.64 (p =0.01) IC_{95%} 1.28-5.44). La actividad de la acetilcolinesterasa materna fue menor en el

grupo de mujeres con recién nacidos con diagnóstico de retardo en el crecimiento intrauterino (5.33 ± 1.26) que en los controles (5.59 ± 1.29) $p = 0.07$. Los anticuerpos anti-citomegalovirus M fueron positivos en una mayor proporción en el grupo de casos (6%) que en el grupo de controles (2%) ($p < 0.01$). El OR ajustado de la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el retardo en el crecimiento intrauterino (masa magra, anticuerpos anti-citomegalovirus y peso de la placenta) fue de 2.3 ($p = 0.04$).

La frecuencia de MN en recién nacidos clínicamente sanos cuyas madres residieron en áreas urbanas fue 1 ± 1 con un rango de 0 a 5. En RN cuyas madres residieron en áreas agrícolas y con un antecedente positivo de exposición a plaguicidas, la frecuencia de MN fue de 2 ± 1 con un rango de 0-5. La diferencia entre estos dos grupos no fue significativa ($p = 0.17$), en recién nacidos que cursaron la gestación con alto riesgo se observó un incremento en la frecuencia de MN de 5 ± 2 ($p < 0.01$). La frecuencia de MN en las madres fue similar en las áreas agrícola y urbana de Chihuahua.

Conclusión: En este estudio se identificó asociación entre el RCIU en recién nacidos cuyas madres refirieron una historia de exposición a plaguicidas órganofosforados y que cursaron con niveles de actividad de la acetilcolinesterasa (ellas o sus RN), inferiores al 20% de actividad en relación con las cifras de mujeres y RN de grupos similares en período de no aplicación de plaguicidas.

Se identificó la frecuencia de MN al nacer en poblaciones urbanas de México y no se encontró evidencia de que en las poblaciones que residen en áreas agrícolas con historia de exposición ambiental a plaguicidas la frecuencia de MN fuera mayor. Sin embargo, ciertos individuos muestran una mayor frecuencia de MN que el promedio, lo cual podría indicar una sensibilidad individual que debe ser investigada.

0.1 Abstract

Objectives: 1. To determine the relation between exposure to pesticides and intrauterine growth retardation (IUGR). 2. To compare the proportion of micronuclei (MN) during gestation and in the newborn in the peripheral and umbilical cord blood in diverse populations: two urban, one agricultural, and one determined to be at high risk during the gestation.

Subjects, materials and methods: With a standard case-control design, to fulfill our first objective, we selected 450 living, newborn infants, (NB), with and without the diagnosis of IUGR, whose mothers were known to reside in agricultural communities within irrigation district number 05 in the state of Chihuahua, Mexico during the gestational period. We conducted interviews to evaluate exposure during pregnancy to agrochemical products, and determined the level of acetylcholinesterase activity. By a microparticle enzyme immunoassay, we ascertained the levels of IgM antibodies against the rubella virus, and toxoplasma gondii, and of anti-cytomegalovirus antibodies.

To fulfill the second objective, we performed a cross-sectional study; for this, we chose as subjects, clinically healthy newborns living in urban areas (21 whose mothers resided in Chihuahua, Mexico, and 12 born to women residing in Mexico D. F.). From the agricultural areas, we studied 16 newborns, of which we finally evaluated 15 who had undergone a high-risk gestation. In addition, we examined 31 immediately postpartum women, 16 from urban areas and 15 from agricultural areas of Mexico. To determine the MN, we took both maternal and umbilical cord blood samples.

Results: The frequency of exposure in the cases group was 18%, and, in the controls, 8%. An association between exposure to pesticides and IUGR was clearly present (crude OR of 2.64 ($p = 0.01$), ($_{95\%}$ CI 1.28-5.44). The maternal acetylcholinesterase activity level was

lower in the group of women with newborns diagnosed with retardation in intrauterine growth: 5.33 ± 1.26 in this group as opposed to 5.59 ± 1.29 in the controls ($p = 0.07$). The anti-cytomegalovirus M antibodies were positive in a greater proportion in the group of cases (6%) than in the control group (2%) ($p < 0.01$). The OR of the relation between the prenatal exposure to pesticides and retardation in intrauterine growth (lean mass, anti-cytomegalovirus antibodies and weight of the placenta) was 2.3 ($p = 0.04$).

The frequency of MN in clinically healthy newborns whose mothers resided in urban areas was 1 ± 1 with a range from 0 to 5. In those infants whose mothers resided in agricultural areas and with a positive previous exposure to pesticides, the frequency of MN was 2 ± 1 with a range of 0-5; the difference between these two groups was not significant ($p = 0.17$). However, in the newborns who suffered a high-risk gestation period, we observed an increase in the frequency of MN to 5 ± 2 ($p < 0.01$). The frequency of MN in the mothers was similar in the agricultural and urban areas of Chihuahua.

Conclusion: This study demonstrates an association between intrauterine growth retardation in newborns whose mothers had positive exposure to organophosphate pesticides and mothers who presented with reduced activity levels of acetylcholinesterase, in themselves or their infants. The levels of enzyme activity in these individuals were 20% lower than those of a similar group of mothers and infants in a period free of pesticide applications.

Having identified the frequency of MN in those born in urban populations of Mexico, we see no evidence that this frequency is greater in populations that reside in agricultural areas with a history of environmental exposure to pesticides. Nevertheless, certain individuals show a greater frequency of MN than the average, a finding which could indicate an individual sensitivity that should be investigated.

1. Introducción.

Los plaguicidas órganofosforados (OF) tanto en México como en otros países han desplazado en forma creciente a los órganoclorados por su menor persistencia en el ambiente, sin embargo poseen una mayor toxicidad aguda (Ortega-Ceseña, y cols., 1994). El principal mecanismo de acción de estas sustancias es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que interviene en la transmisión del impulso nervioso; dicha inhibición produce la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las terminales sinápticas con la consiguiente sobreestimulación de las células postsinápticas (Fukuto, 1990). Los OF son plaguicidas no selectivos y además de su acción sobre las plagas también provocan efectos adversos en los seres humanos. Toda la población está inevitablemente expuesta a plaguicidas a través de contaminación ambiental u ocupacional. La población en general está expuesta a residuos de plaguicidas incluyendo productos de degradación física y biológica en aire, agua y alimentos (Bolognesi, 2003).

Las consecuencias de la exposición subcrónica o crónica son poco conocidas, entre los efectos de la contaminación ambiental es de particular interés resaltar el posible efecto sobre la salud reproductiva humana, dado que la mayor parte del conocimiento disponible acerca de la toxicidad reproductiva deriva de estudios en animales de experimentación cuya anatomía, fisiología y metabolismo de los plaguicidas OF puede diferir en la especie humana. El interés del presente estudio fue evaluar el efecto de la exposición ambiental a plaguicidas OF sobre dos aspectos: el crecimiento intrauterino y el daño genotóxico en recién nacidos, cuyas madres durante la gestación residieron en áreas agrícolas del estado de Chihuahua consideradas con un mayor riesgo de exposición a plaguicidas (ATSDR, 1997).

1.1 Generalidades de los plaguicidas órganofosforados:

Los compuestos OF muestran una estructura química similar, de acuerdo con su estructura y se dividen en fosfatos, fósforotionatos, fósforoditionatos, fosforamidas y fosfonatos.

La absorción es a través de los pulmones, el intestino, la piel y la conjuntiva (Fuortes, y cols., 1993). La población en general puede estar expuesta a los plaguicidas vía la inhalación de aire, la ingesta de alimentos contaminados y a través del contacto dérmico. Se distribuyen en la mayoría de los tejidos corporales (ATSDR, 1997) y son transferidos al feto a través de la placenta (Gupta, 1995).

Los plaguicidas OF son hidrolizados en el organismo a fosfatos alquílicos y a otros grupos químicos. La biotransformación depende de la activación oxidativa por reemplazo de la terminación tío o sulfúrica, por oxígeno. La biotransformación ocurre primeramente en el hígado por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (CYP 450), por hidrolasas y por transferasas (Fukuto, 1990).

Para entender cómo se lleva a cabo la biotransformación de los OF, se describirá el metabolismo del paration. La reacción consiste en la sustitución de un oxígeno por un azufre formando un S-oxido intermediario, que puede sufrir dos reacciones diferentes :

1. Reaccionar para formar un anillo de tres miembros integrado por el fósforo, el azufre y el oxígeno, de este anillo se puede perder el azufre y producirse el correspondiente oxon.
2. El intermediario S-óxido puede sufrir un ataque nucleofílico por una molécula de agua y romper la molécula en para-nitrofenol y dietilfosforotionato.

Otro mecanismo enzimático de biotransformación de los OF se lleva al cabo por las glutation-s-transferasas, que son un grupo de enzimas citosólicas que conjugan al glutation con el producto de las reacciones de monooxigenación o directamente con los compuestos originales sin

requerimiento del paso preliminar de metabolismo. Esto se da a través de dos reacciones: O-dealquilación y O-dearilación.

Los efectos tóxicos de los plaguicidas OF se producen por la inhibición de la AChE, mecanismo fundamental, pero posiblemente no el único responsable de los procesos fisiopatológicos; la AChE está presente en eritrocitos y en los terminales sinápticos del tejido nervioso. Se estima que los síntomas de intoxicación aparecen cuando la actividad habitual de la AChE del propio individuo desciende por debajo del 50%, por lo que el neurotransmisor acetilcolina queda en las sinapsis sin hidrolizar y produce hiperexcitación del sistema nervioso (Repetto, 1997).

1.1.1 Grupos de alto riesgo en la exposición a plaguicidas órganofosforados.

La exposición a compuestos órganofosforados puede ser ocupacional o ambiental. La agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades (ATSDR, 1997), refiere que poblaciones cercanas a las áreas de aplicación de órganofosforados (específicamente paratión metílico) tienen un incremento en el riesgo a la exposición a través de contacto dérmico con agua y plantas contaminadas. Entre los grupos de riesgo más vulnerables a la acción de estos tóxicos se encuentran las mujeres embarazadas y los fetos entre otros, dados los cambios en el metabolismo y la disposición de los plaguicidas durante el embarazo y en organismos en formación y crecimiento (Weitman, 1983).

La exposición no ocupacional en familias de trabajadores agrícolas y residentes de áreas agrícolas ha sido documentada recientemente ya que se pudieron detectar en muestras de orina metabolitos de compuestos órganofosforados como los alquilfosfatos (Azaroff, y cols., 1999).

1.2 Efectos reproductivos adversos de los plaguicidas órganofosforados.

La reproducción humana puede alterarse por factores como la edad, la reserva ovárica, enfermedades de transmisión sexual, factores genéticos, fertilidad masculina y exposición a tóxicos ambientales, físicos, químicos y biológicos (Sharara, 1998).

Diversos factores determinan el efecto deletéreo de los tóxicos ambientales sobre la funcionalidad del sistema reproductor femenino. La intensidad y el tiempo de la exposición al tóxico contribuyen a la potencial alteración de dicho sistema. Así también, la susceptibilidad de los tejidos está determinada por el período de desarrollo embrionario o fetal en el que se presenta la exposición (Sharara, 1998).

Las sustancias químicas en el medio ambiente pueden alterar la reproducción humana de manera directa (disrupción hormonal) o indirecta. Efectos directos ocurren cuando un químico en el ambiente es estructuralmente similar a una molécula endógena y es capaz de introducirse en los órganos reproductivos. Así, la sustancia química puede alterar los procesos celulares normales como la diferenciación, mitosis, meiosis, muerte celular programada, comunicación intracelular, daño y reparación ADN, o la función mitocondrial (Mattison, 1983). Estas alteraciones pueden producir un crecimiento anormal del tejido, modificación de su función o la muerte. Algunos químicos ambientales pueden minimizar o bloquear la acción natural de hormonas, de ésta manera alteran los procesos reproductivos. Entre los efectos reproductivos adversos asociados a una exposición prenatal a sustancias tóxicas se han mencionado: patrones alterados en la fertilidad y fecundidad, aborto espontáneo, anormalidades cromosómicas, alteración en la razón de género, muerte fetal tardía, muerte neonatal, bajo peso al nacer, problemas del desarrollo y trastornos conductuales entre otros (Longo, 1980).

Múltiples estudios han evaluado los efectos reproductivos adversos de los plaguicidas tanto en humanos como en modelos animales. Esta discusión está enfocada a evaluar algunos de los efectos reproductivos adversos de los plaguicidas órganofosforados (aborto espontáneo y reabsorciones, parto prematuro, muerte fetal y bajo peso al nacer). Se revisaron y resumieron estudios en modelos animales, clínicos y epidemiológicos para identificar el

estado del conocimiento sobre la exposición prenatal a plaguicidas y los efectos reproductivos adversos.

1.2.1. Paso tras-placentario de los plaguicidas órganofosforados:

La placenta desempeña un papel muy importante en la nutrición del embrión y en el desarrollo de las funciones de regularización y secreción para el mantenimiento del embarazo.

La barrera placentaria protege al feto del paso de una gran parte de las sustancias perjudiciales; sin embargo, no limita la transferencia de otras como los plaguicidas (órganofosforados, carbamatos, órganoclorados y piretroides). Cualquier compuesto químico con peso molecular de 500 daltones o menor puede atravesar la barrera placentaria y muchos plaguicidas tienen un peso molecular menor a 500 daltones.

La salud del feto depende de la salud de la placenta. La transferencia de plaguicidas por la misma se ha establecido por la presencia de metabolitos de estos compuestos en la propia placenta, en sangre del cordón umbilical y en el feto. Así también, la inhibición de la AChE en el feto es una fuerte evidencia de que la placenta transfiere o sufre los efectos por la acción de órganofosforados y carbamatos en ratas preñadas, expuestas a estos compuestos (Gupta, 1995).

En seres humanos, dos estudios recientes han identificado plaguicidas OF o sus metabolitos en meconio de recién nacidos, Whyatt y Barr, en el año 2001 analizaron muestras de meconio de 20 recién nacidos en la ciudad de Nueva York, identificando metabolitos de OF como el dietilfosfato y al dietiltiofosfato en el 95 y 100% de las muestras. Ambos son metabolitos de órganofosforados como el diazinon y clorpirifos, que son plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura. Ostrea, y cols., en el año 2002, estudiaron muestras de meconio de recién nacidos en Filipinas identificando al compuesto original, en 426 muestras determinaron la presencia de clorpirifos en el 11%, de diazinon en el 34%, de malatión en el 53% y de paratión en el 32% .

Aunque se sabe que la placenta no está innervada, se han identificado en este tejido: acetilcolina, acetilcolinesterasa, acetiltransferasa y receptores de acetilcolina todos ellos componentes del sistema colinérgico. Diversas funciones se han atribuido al sistema colinérgico en la placenta entre las cuales se incluyen la regulación del flujo sanguíneo y del volumen de fluidos en los vasos placentarios, apertura y cierre de los canales trofoblásticos, inducción de propiedades contráctiles de las células y facilitación del transporte de aminoácidos para el crecimiento fetal y placentario entre otras (Sastry, 1997). Agentes anticolinesterásicos como los organofosforados pueden ejercer un efecto regulatorio no específico sobre el crecimiento del feto, tal vez por una influencia sobre el transporte de nutrientes a través de la placenta (Eskenazi, y cols., 1999) o por alteración en la actividad y re-actividad de la cascada de la adenilato ciclasa, lo que podría conducir a un desarrollo celular no adecuado en todas las áreas del cuerpo (Slotkin, 1999; Auman, y cols., 2000), no sólo en las reguladas por el sistema colinérgico sitio de acción de plaguicidas organofosforados y carbamatos al inhibir la función de la enzima acetilcolinesterasa (Fukuto, 1990).

Los efectos de los plaguicidas OF sobre el sistema colinérgico placentario se han estudiado *in vitro*, determinando la capacidad de la placenta para desulfurar al paratión, permitiendo la formación de paraoxón, un potente metabolito anticolinesterásico (Sultatos y Gagliardi CL, 1990). Utilizando el paratión en un modelo de perfusión placentaria con lóbulo aislado, se identificó una reducción de la actividad de la acetilcolinesterasa placentaria en 52.38% , este grado de inhibición fue notable a los 120 minutos de perfusión (Benjaminov, y cols., 1991). Una inhibición de la AChE de tal magnitud *in vivo*, pudiera alterar las funciones placentarias atribuidas al sistema colinérgico placentario. Estudios experimentales con dimetoate en ratas han identificado una inhibición dosis-dependiente en placenta de ratas expuestas al tóxico del día 6 al 20 de la gestación (Sirvastava y Raizada, 1996).

Los efectos del metil paratión sobre la síntesis de proteínas fueron estudiados *in vivo* en ratas del día 6 al 15 o 19 de gestación y se identificó inhibición de la incorporación del (¹⁴C) valina dentro de proteínas en tejidos materno, placentarios, embrionarios y fetales (Gupta, y cols., 1984).

Estudios en comunidades donde se aplican continuamente plaguicidas OF han identificado incremento en la proporción de lesiones placentarias caracterizadas por mayor daño vascular con lesiones tipo infarto y fibrosis (Levario-Carrillo, y cols., 2001).

Aunque pocos trabajos han identificado el efecto sobre la propia placenta del paso de los plaguicidas órganofosforados, éstos sugieren que se producen cambios que pudieran comprometer las funciones de la placenta que contribuyen a mantener un adecuado pasaje de micronutrientes al feto. Son por ello necesarios estudios que identifiquen daño al sistema colinérgico placentario y que lo relacionen con efectos reproductivos adversos tanto en modelos animales como en poblaciones humanas con alto riesgo por exposición a dichas sustancias.

1.2.2 Efectos sobre la tasa de reabsorciones y aborto espontáneo (Cuadro I).

Estudios experimentales en modelos animales han evaluado el efecto de los plaguicidas órganofosforados como el malatión, administrado del 7º, al 12º, día de la gestación a conejos a dosis de 100 mg/kg y los autores informan que no hubo diferencias en la proporción de reabsorciones comparando con el grupo control (Machin y Mc Bride, 1989). La evaluación del fosfamidón sobre la tasa de reabsorciones mostró incremento de reabsorciones en dosis altas y sobretodo cuando el plaguicida fue administrado 30 días previos al apareamiento (Soni y Bhatnagar, 1989). Otros trabajos que han evaluado al clorpirifos en modelos experimentales, han identificado que en ratas a dosis de 0-15 mg/kg/día no se presenta incremento en la proporción de reabsorciones (Breslin, y cols.,

1996), pero a dosis de 25 mg/kg. Farag y cols., identificaron una tasa mayor de reabsorciones y muerte fetal (Farag, y cols., 2003).

Estudios en seres humanos que han evaluado la exposición ocupacional paterna a plaguicidas y su relación con un aumento en la tasa de abortos espontáneos en la pareja han identificado un incremento de abortos en relación con los grupos control. Trabajadores agrícolas expuestos a herbicidas y a un grupo misceláneo de plaguicidas órganofosforados mostraron un riesgo para aborto espontáneo en su pareja de 1.6 cuando la exposición fue a plaguicidas y 1.4 en el caso de exposición a herbicidas. En este trabajo la exposición fue evaluada a través de un cuestionario estructurado, además se controló por variables asociadas a aborto espontáneo como edad materna y paterna, tabaquismo, alcoholismo entre otras (Savitz, y cols., 1997). Resultados similares fueron observados por Lindbohm, y cols., en 1984 y por Rupa, y cols., 1991 en la India, Petrelli, y cols., 2000 en Italia, cuando se evaluó la exposición ocupacional paterna, identificando un incremento en la tasa de abortos espontáneos en los grupos expuestos a plaguicidas.

La exposición materna ocupacional o por área de residencia, ha sido evaluada en diversos trabajos los cuales han mostrado resultados contradictorios. Hay estudios que han utilizado para evaluar la exposición un cuestionario estructurado identificando un incremento en la tasa de abortos espontáneos, al evaluar poblaciones expuestas a grupos heterogéneos de plaguicidas, como los realizados en Colombia por Restrepo, y cols., 1990 y en Canadá por Arbuckle, y cols., 2001. En otros trabajos no se ha identificado una asociación significativa entre exposición prenatal a plaguicidas y un incremento en la proporción de abortos espontáneos como en el estudio de Thomas, y cols., 1992, que evaluaron una población de San Francisco en Estados Unidos de Norteamérica; dicha población permaneció expuesta a malatión esparcido en campos agrícolas cercanos al sitio de residencia, dicha exposición

fue evaluada a través de cuestionario estructurado y no se identificó una importante asociación con la proporción de aborto. Otro estudio similar tampoco encontró asociación entre aborto y exposición prenatal a plaguicidas (Willis, y cols., 1993).

Los resultados de estudios en modelos experimentales sugieren que tanto la dosis así como el tipo de plaguicida podrían influir en el incremento de la proporción de reabsorciones, ya que los dos trabajos con clorpirifos no muestran un cambio significativo entre la dosis de 0-15 mg/kg/día, sin embargo a una dosis de 25 mg/kg se incrementó la tasa de reabsorciones. Otro plaguicida órganofosforado como el fosfamidon mostró un efecto positivo, no así el malatión en conejos en los que no se apreció una diferencia significativa.

Los estudios en seres humanos muestran resultados contradictorios, ya que la evaluación de la exposición es complicada. La determinación del tóxico o sus metabolitos a los que estuvo expuesta la mujer o su pareja durante la gestación en la gran mayoría de los estudios se evalúa en forma indirecta.

Cuadro I.

Resultados de estudios experimentales y observacionales que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la tasa de reabsorciones y aborto espontáneo.

| Referencia | Plaguicida | Exposición y País | Resultados | Control de variables | Comentario |
|-------------------------|----------------------------------|--|--|---|---|
| Lindbohm, y cols., 1984 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna y materna Finlandia | Incremento en el riesgo de aborto espontáneo | Edad Número de gestación Área de residencia | Estudio de casos y controles n = 4896. |
| Soni y Batnagar, 1989. | Fosfamidon | Estudio experimental Ratones India | Incremento en la proporción de reabsorciones | _____ | Se observó el efecto solo a dosis altas de plaguicida y cuando fue administrado 30 días antes del apareamiento. |

| | | | | | |
|-------------------------|---|---|--|--|--|
| Machin, y cols., 1989 | Malatión | Estudio experimental en conejos Australia | No se encontró diferencia en la proporción de reabsorciones | _____ | Se evaluaron dosis de 100 mg/kg/día del 7-12 día de la gestación. |
| Restrepo, y cols., 1990 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Colombia | Incremento en el riesgo de aborto espontáneo | No | N=8867, grupo de mujeres evaluadas expuestas por ocupación en la floricultura. |
| Rupa, y cols., 1991 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna India | Incremento en el riesgo de aborto espontáneo | Edad Nivel socioeconómico | Estudio de cohorte n = 1016 expuestos y n = 1020 no expuestos. |
| Rupa, y cols., 1991 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna India | Incremento en el riesgo de aborto espontáneo | Edad Nivel socioeconómico | Estudio de cohorte n= 1016 expuestos y n= 1020 no expuestos. |
| Thomas y cols., 1992 | Malatión | Materna Estados Unidos de Norteamérica | No se identificó una mayor proporción de abortos | Edad materna Consumo de alcohol y aborto previo | Se evaluó la exposición por cuestionario estructurado |
| Willis, y cols., 1993 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Estados Unidos de Norteamérica | No se identificó una asociación entre exposición y aborto | No | Población estudiada 374 y solo 8 casos de aborto es cuestionable el número de casos. |
| Breslin, y cols., 1996 | Clorpirifos | Estudio experimental en ratas. Estados Unidos de Norteamérica | No se observó modificación en la proporción de reabsorciones | _____ | Se evaluaron dosis de 0-15 mg/kg/día. |
| Savitz, y cols., 1997 | Herbicidas Plaguicidas órganofosforados | Paterna Canadá | Incremento en el riesgo de aborto, exposición a plaguicidas OR 1.6, herbicidas 1.4 | Edad materna y educación, tabaquismo | N=2946 Exposición medida por Cuestionario y tipo de ocupación. |
| Petrelli, y cols., 2000 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna Italia | Incremento en el riesgo de aborto espontáneo | Edad Tabaquismo | N= 32 aplicadores de plaguicidas. |

| | | | | | |
|-------------------------|---|---|--|---|--|
| Arbuckle, y cols., 2001 | Herbicidas Tio carbamatos Grupo misceláneo de plaguicidas | Materna Canadá | Incremento en la tasa de abortos en casos de exposición pre-concepcional | Edad paterna y materna, educación, tabaquismo | N= 3936 N= 395 abortos espontáneos. |
| Farag, y cols., 2003 | Clorpirifos | Estudio experimental, en ratas. Egipto | Incremento en el número de reabsorciones | _____ | Se evaluaron dosis de 0,5,15 y 25 mg/kg. Muerte fetal y reabsorciones fueron observadas a la dosis de 25 mg. |

1.2.3 Efectos de la exposición prenatal a plaguicidas sobre la proporción de partos prematuros (Cuadro II).

Son escasos los estudios que han evaluado la asociación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el parto prematuro. Saxena, y cols., 1981 determinaron los niveles de plaguicidas oragnoclorados en sangre, placenta y feto identificando una mayor concentración en pacientes con aborto espontáneo y parto pre-término. En la ciudad de México se estudiaron 233 mujeres y se realizó la determinación de niveles séricos de p-p DDE, Beta -HCH y HCB. Solo se identificó una asociación de niveles elevados de Beta-HCH con parto pretérmino (Torres -Arreóla, y cols., 2003).

En otros estudios en los que se ha evaluado la exposición ocupacional paterna y su relación con un incremento de parto pre-término, se ha identificado una mayor proporción en pacientes en los que el empleo de su pareja está relacionada con el uso de plaguicidas (Hournai y Hilton, 2000).

Como puede verse en el cuadro II los estudios sobre la asociación entre exposición prenatal a plaguicidas órganofosforados y parto prematuro son escasos. Sólo en el trabajo de Willis y cols., 1993, se menciona entre los plaguicidas mas utilizados en el área el grupo de plaguicidas órganofosforados. Sin embargo no encontraron una asociación significativa. Los resultados de los trabajos que evalúan la presencia de plaguicidas órganoclorados o sus

metabolitos si han identificado una posible asociación. Son necesarios trabajos que evalúen biomarcadores objetivos de exposición prenatal como la presencia de metabolitos de plaguicidas órganofosforados en meconio de recién nacidos (Ostrea, y cols., 2002).

Cuadro II.
Resultados de estudios que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el parto prematuro.

| Referencia | Plaguicida | Exposición, País | Resultados | Control de variables | Comentario |
|-------------------------------|----------------------------------|--|---|----------------------|---|
| Saxena, y cols., 1981 | Órganoclorados (OC) | Materna Estados Unidos de Norteamérica | Niveles elevados de OC se relacionaron con parto prematuro | No | Se midieron OC en sangre, placenta y feto. |
| Willis, y cols., 1993 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Estados Unidos de Norteamérica | No efectos sobre parto pre-termino | No | Estudio de 1 cohorte de 337 mujeres a las cuales se les evaluó exposición por cuestionario estructurado |
| Hourani y Hilton, 2000 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna Estados Unidos de Norteamérica | Incremento de parto pre-termino | | n = 1032 mujeres, se evaluó la exposición paterna y materna. |
| Torres-Arreola, y cols., 2003 | OC | Materna México | Asociación entre niveles superiores de Beta-HCH y parto prematuro OR 1.85 | — | N=233 mujeres de tres hospitales de la ciudad de México |

1.2.4 Resultados de estudios que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la muerte fetal (Cuadro III).

La relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la muerte fetal ha sido evaluada en estudios experimentales con modelos animales y en estudios clínicos y epidemiológicos. Los estudios experimentales en su mayoría coinciden en sus resultados y muestran un incremento en la mortalidad fetal. Ejemplos de lo anterior son los estudios que han evaluado paratión (Harbison, 1975), acetafe (Farag, y cols., 2000) y dursban (Muto, y cols., 1992) que han identificado un incremento en la mortalidad fetal. Otros trabajos han encontrado que sólo a dosis altas el clorpirifos se asocia a mortalidad fetal. (Breslin , y cols., 1996; Farag, y cols., 2003) y en diversos estudios no se ha identificado un incremento en la mortalidad fetal con plaguicidas como imidán, dipterex, dimetoate.

Los trabajos que han estudiado ésta relación en poblaciones humanas en su mayoría han determinado el efecto de la exposición prenatal a un grupo heterogéneo de plaguicidas (White, y cols., 1988; Gouleth y Theriault, 1991; Bell, y cols., 2001, Taha y Gray, 1993, Pastore, y cols., 1997; Rupa, y cols., 1991; Savitz, y cols., 1989). El incremento en el riesgo de mortalidad fetal en las poblaciones estudiadas ha sido informado desde 1.3 hasta 4.5 de acuerdo con las variables que se controlan en cada estudio y el tiempo de exposición durante la gestación. Sin embargo, otros trabajos no han identificado un incremento en el riesgo para mortalidad perinatal como son los de Restrepo, y cols., 1990, que informa un OR de 0.99 y los de Roan, y cols., un OR de 0.85.

Los trabajos experimentales (cuadro III) en su mayoría refieren una asociación significativa entre exposición prenatal a plaguicidas y muerte fetal, dado que en estos estudios experimentales es posible aislar el tóxico, controlar la dosis y evaluar finalmente el efecto.

Una gran mayoría de los trabajos que han relacionado la exposición prenatal a plaguicidas y la muerte fetal lo han hecho con un grupo heterogéneo de sustancias, dada la dificultad para la medición de la exposición en poblaciones humanas en la que se dificulta la

determinación de este tipo de plaguicidas dada su vida media. Solo el estudio de Rupa, y cols., 1991 menciona que los trabajadores estuvieron expuestos en su trabajo a diferentes grupos de plaguicidas entre los que se incluyeron los organofosforados. Thomas, y cols., 1992 que evaluaron esta asociación en poblaciones que residen en áreas cercanas a cultivos en donde se aplicó malatión, informan una asociación entre estas variables (RR = 1.95 IC 95% 0.88-4.35). Serían necesarios estudios en los que se evalúe un plaguicida organofosforado y /o un grupo de plaguicidas de este grupo para identificar el riesgo de esta exposición sobre la muerte fetal. Así mismo sería conveniente controlar variables que han sido identificadas como de riesgo para mortalidad fetal.

Cuadro III.

Resultados de estudios que relacionan la exposición prenatal a plaguicidas y la mortalidad fetal.

| Referencia | Plaguicida | Exposición y País | Resultados | Variables de control | Comentario |
|-------------------------|-----------------------------------|---|--|----------------------|--|
| Harbison, 1975 | Paratión | Estudio experimental en ratones Estados Unidos de Norte América | Incremento en la mortalidad fetal | _____ | Fue mayor la mortalidad fetal cuando el plaguicida se administró los días 12-13y 14. |
| Staples, y cols., 1976 | Imidan Dipterex | Estudio experimental Ratas | No incremento en la mortalidad fetal | _____ | Los plaguicidas se administraron del día 6 al 15 de la gestación. |
| Roan, y cols., 1984 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna Estados Unidos de Norteamérica | No incremento de muerte fetal en grupo expuesto OR =0.85 | No | Se estudiaron n =314 pilotos de aviación dedicados a la agricultura. |
| Courtney, y cols., 1985 | Baygón Carbofuran Demetoate | Experimental ratas | No incremento en la mortalidad fetal | _____ | Los tres plaguicidas se evaluaron de los 6-16 días de gestación. |
| White, y cols., 1988 | Grupo heterogéneo | Materna Canadá | Aumento de la tasa de | Edad materna | Datos obtenidos de fuente 2 ^a . |

| | | | | | |
|-------------------------|--|--|---|---|---|
| | de plaguicidas | | mortalidad fetal cuando la exposición fue en el 20. trimestre de gestación | | (Statistics Canada and information on birth defects) |
| Savitz, y cols., 1989. | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna y Paterna Estados Unidos de Norteamérica | Mortalidad fetal Exposición materna Aplicación en áreas cercanas al hogar OR= 1.6, Hogar 1.5, ocupacional 1.6 Paterna OR = 1.4, 1.3, 1.2, respectivamente | Edad materna Antecedente de aborto | Se consideró exposición positiva cuando ésta ocurrió 12 meses antes del parto. |
| Restrepo, y cols., 1990 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Colombia | No Incremento en el riesgo mortalidad fetal OR= 0.99 | No | n =8867, grupo de mujeres evaluadas expuestas por ocupación en la floricultura. |
| Rupa, y cols., 1991 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Paterna India | Muerte fetal RR =1.3 no fumadoras RR = 4.5 en fumadoras | Tabaquismo | No se evaluó el período de exposición a plaguicidas. |
| Muto, y cols., 1992 | Dursban (Ingrediente activo del clorpirifos) | Experimental en ratas Jamaica | Incremento en la mortalidad fetal | _____ | Estudio que evaluó embriotoxicidad, fetotoxicidad y alteraciones neurotóxicas.. |
| Thomas, y cols., 1992 | Malation | Materna Estados Unidos de Norteamérica | Muerte fetal OR= 1.52 | Edad materna Consumo de alcohol y aborto previo | Se evaluó la exposición por cuestionario estructurado |

| | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|---|--|--|---|
| Taha y Gray , 1993 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Sudán | Muerte fetal Mujeres con ocupación relacionada a la agricultura OR = 3.6, otras ocupaciones OR 0 1.6 | Ocupación Peso materno Ingesta de hierro y vitaminas durante el embarazo | Estudio de casos y controles n= 197 casos y 812 controles |
| Breslin, y cols., 1996 | Clorpirifos | Estudio experimental en ratas. Estados Unidos de Norteamérica | No se observó modificación en la frecuencia de mortalidad fetal | _____ | Se evaluaron dosis de 0-15 mg/kg/día. |
| Pastore, y cols., 1997 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Estados Unidos de Norte América | Muerte fetal Exposición en el primer trimestre OR = 1.3, 2°. Trimestre OR = 1.4 | Tabaquismo Alcoholismo Etnia Edad materna | Estudio de casos y controles. Exposición evaluada por cuestionario estructurado |
| Farag, y cols., 2000 | Acetafe | Experimental en Ratones Egipto | Incremento en la mortalidad fetal | _____ | Se utilizaron dosis de 7-14-28 mg/kg/día. Desde el 6°. Al 15°. Día de gestación. |
| Bell, y cols., 2001 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Estados Unidos de Norte América | Ligero incremento en el riesgo para mujeres que residen en áreas cercanas a la aplicación de plaguicidas | _____ | Estudio de casos y controles n= 319 casos, n = 611 controles, se determinó exposición por área de residencia. |
| Chung, y cols., 2002 | Flupyrazofos | Experimental en Ratas República de Corea | Incremento en la mortalidad Fetal | _____ | Este plaguicida es un nuevo organofosforado , se administró durante el día 7 al 17 de la gestación |

| | | | | | |
|----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------------|-------|---|
| Farag, y cols., 2003 | Clorpirifos | Experimental en ratas Egipto | Incremento en la mortalidad fetal | _____ | Se evaluaron dosis de 0,5,15 y 25 mg/kg. Muerte fetal fue observada a la dosis de 25 mg |
|----------------------|-------------|------------------------------|-----------------------------------|-------|---|

1.2.5 Resultados de estudios que evalúan la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el bajo peso al nacer (Cuadro IV).

Estudios experimentales han identificado la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el bajo peso al nacer, los modelos animales más utilizados han sido ratas, ratones, conejos y embriones de pollo. La mayoría de éstos trabajos ha identificado una diferencia significativa en el peso al nacer en los recién nacidos de madres expuestas a plaguicidas órganofosforados. El paratión que ha sido evaluado en ratas (Harbison, 1975) y en embriones de pollo, (Kumar y Devi, 1992) condiciona una disminución de peso al nacer y en embriones de pollo también se observó una disminución en la longitud.

El clorpirifos, otro plaguicida órganofosforado comúnmente usado, condicionó un decremento en el peso al nacer en la primera generación (Breslin, y cols., 1996), así como en crías las cuales estuvieron expuestas al tóxico del 6°. al 15°. día de gestación (Farag, y cols., 2003).

Otros plaguicidas órganofosforados de los que hay evidencia de su efecto sobre el peso al nacer son: fosfamidón (Soni y Bhatanger, 1989), flupyrazofos (Chung, y cols., 2002), Imidan (Staples, y cols., 1976), dicrotofos (Garrison, y cols., 1985), somán (Bates, y cols., 1990). Sin embargo en la evaluación de otros plaguicidas órganofosforados como el sarín (La Borde y cols., 1996) no se identificaron alteraciones en el peso al nacer en ratas a las cuales se administraron dosis de 0,10, 240, y 380 µg/kgdía, o en conejos que durante los días 6-19 de gestación recibieron 0, 5, 10, o 15 µg/kgdía.

Son escasos los estudios que han evaluado esta asociación en seres humanos. En Estados Unidos de Norteamérica se evaluaron 263 recién nacidos de mujeres Afro-Americanas y Dominicanas identificando una relación significativa entre el bajo peso al nacer y una disminución en la longitud al nacimiento en los hijos de mujeres con concentraciones positivas de clorpirifos en plasma (Perera, y cols., 2003). Otro trabajo (Dabrowski, y cols., 2003) que relacionó estas variables de infantes nacidos de mujeres que durante el primer y segundo trimestre de la gestación estuvieron expuestos a plaguicidas (entre los cuales se mencionan los órganofosforados) identificó un peso ligeramente menor en promedio de 189g ($p = 0.067$).

Otros trabajos en los que se ha evaluado la exposición prenatal a plaguicidas del grupo de piretroides (Hanke y Sobala, 2003) o de órganoclorados (Siddiqui, y cols., 2003; Rylander, y cols., 2000; Longnecker, y cols., 2001) también informan una asociación positiva entre estas variables.

Sin embargo, autores como, Willis, y cols., en 1993 que estudiaron mujeres con riesgo de exposición a mezclas de plaguicidas no identificaron una diferencia con el grupo control, otros resultados negativos evaluando exposición a plaguicidas órganoclorados en leche materna y bajo peso al nacer no identificaron una relación significativa (Galden, y cols., 2002).

Cuadro IV.

Resultados de estudios que relacionan la exposición prenatal a plaguicidas y el bajo peso al nacer.

| Referencia | Plaguicida | Exposición y País | Resultados | Variables de control | Comentario |
|----------------|------------|--|-----------------|----------------------|---|
| Harbison, 1975 | Paratión | Estudio experimental Ratones Estados Unidos de Norte América | ↓ peso al nacer | _____ | Este efecto se observó cuando el plaguicida se administró los días 8-10 de gestación. |

| | | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|---|--|-------|---|
| Staples, y cols., 1976 | Imidan Dipterex | Estudio experimental Ratas | ↓ peso al nacer | _____ | Los plaguicidas se administraron del día 6 al 15 de la gestación. |
| Garrison y Wytentach, 1985 | Dicrotofós | Experimental embriones de pollo | Retardo en el desarrollo | _____ | Los huevos fueron incubados 24, 48, 72. o 96 horas se administró 2.0 mg/huevo. |
| Soni y Bhatanger, 1989 | Fosfamidon | Experimental Ratonés India | ↓ peso al nacer ↓ longitud al nacer | _____ | El efecto se observó cuando se administraron dosis altas y cuando se habían tratado los animales mes antes del apareamiento. |
| Bates, y cols., 1990 | Soman | Experimental Ratas Conejos Estados Unidos de Norte América | ↓ peso al nacer | _____ | Soman es un órganofosforado con potente actividad anticolinesterásica, el efecto se observó a dosis altas del tóxico. |
| Zhang, y cols., 1992 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna China | ↓ peso al nacer | No | Estudio de casos y controles |
| Willis, y cols., 1993 | Grupo heterogéneo de plaguicidas | Materna Estados Unidos de Norteamérica | No efectos sobre peso al nacer | No | Estudio de 1 cohorte de 337 mujeres a las cuales se les evaluó exposición por cuestionario estructurado |
| La Borde, y cols., 1996 | Sarin | Experimental Ratas, conejos Estados Unidos de Norte América | No alteraciones en el peso fetal | _____ | En ratas se administro del 6°. Al 15 día de gestación dosis de 0-380 µg/kgdía, en conejos del 6-19 día de gestación a dosis de 0-15 µg/kgdía. |

| | | | | | |
|--------------------------|-----------------|--|---|---|---|
| Breslin, y cols., 1996 | Clorpirifos | Experimental ratas Estados Unidos de Norte América | ↓ peso al nacer | _____ | El efecto solo se observó en la primera generación. |
| Farag, y cols., 2000 | Acetafe | Experimental en ratones Egipto | ↓ peso al nacer | _____ | Se utilizaron dosis de 7-14-28 mg/kg/día. Desde el 6°. al 15°. Día de gestación. El efecto se observó a la dosis de 28 mg |
| Rylander, y cols., 2000 | Organo-clorados | Materna Suecia | Alto riesgo para bajo peso al nacer OR= 1.6 | Zona de Residencia Género Edad Materna Paridad tabaquismo | Se estudió población que en La infancia y adolescencia estuvo Expuesta a órganoclorados por alimentos contaminados |
| Longnecker y cols., 2001 | Organo-clorados | Materna Estados Unidos de Norteamérica | Altas concentraciones de DDE se asociaron a un mayor riesgo para recién nacidos pequeños para su edad gestacional | Nivel socio-económico genero edad materna etnia | N=2613 Se evaluó edad gestacional por fecha de última menstruación |
| Galden, y cols., 2002 | Organo-Clorados | Materna Estados Unidos de Norte América | No efectos sobre el peso al nacer | Edad gestacional | N= 197, se identificaron órganoclorados en leche materna en el posparto inmediato. |
| Farag, y cols., 2003 | Clorpirifos | Experimental en ratas Egipto | ↓ peso al nacer | _____ | Se evaluaron dosis de 0,5,15 y 25 mg/kg. El efecto fue observado a la dosis de 25 mg |
| Siddiqui, y cols., 2003 | Organo-clorados | Materna India | Incremento en el riesgo para retardo en el crecimiento intrauterino | Edad gestacional | Estudios de casos (n= 30) y controles (n= 24). Trabajo con una pequeña muestra |

| | | | | | |
|--------------------------|---------------------------------|---|--|---|---|
| Perera, y cols., 2003 | Clorpirifos | Materna Estados Unidos de Norte América | ↓ peso al nacer ↓ longitud al nacer | Etnia tabaquismo | N = 263 mujeres Afro-Americanas y Dominicanas, se evaluó la concentración de clorpirifos en plasma. |
| Hanke y cols., 2003 | Piretroides | Materna Polonia | Aumento en el riesgo para bajo peso al nacer | Edad materna Ocupación Tabaquismo | N = 123, el efecto se observó en mujeres expuestas en el primer y segundo trimestre. |
| Dabrowski, y cols., 2003 | Órganofosforados Piretroides | Materna Polonia | ↓ peso al nacer p=0.067 | Edad gestacional | Estudio de casos (n =117) y controles (n = 377). Infantes nacidos de mujeres expuestas a plaguicidas en el primer y segundo trimestre tuvieron un peso menor a 189 g. |

Las resultados de estudios de la relación entre la exposición prenatal a plaguicidas y el bajo peso al nacer en su mayoría provienen de trabajos experimentales, ya que los estudios en seres humanos son escasos y solo hay un trabajo reciente que realizó mediciones del plaguicida en plasma relacionando al clorpirifos con bajo peso al nacer (Perera, y cols., 2003). Otras estudios en seres humanos se han informado evaluando tóxicos como organoclorados que son persistentes en masa grasa por períodos prolongados. Debido a que el empleo de plaguicidas organofosforados se ha incrementado a nivel mundial, se requieren de estudios que evalúen esta relación. Sería conveniente el uso de biomarcadores que evalúen la exposición prenatal para identificar el o los compuestos involucrados en este efecto adverso en la salud reproductiva.

1.2.6 Conclusiones.

Numerosos contaminantes ambientales pueden afectar el desarrollo del embrión, del feto o del recién nacido. La exposición a plaguicidas durante la gestación puede ocurrir por contaminación ambiental o por uso ocupacional de estas sustancias (ATSDR, 1997). Estudios experimentales con modelos animales han mostrado evidencia del paso de plaguicidas órganofosforados a través de la placenta (Gupta, 1995). El efecto que dichas sustancias pueden ejercer sobre el sistema colinérgico placentario o sobre las funciones que normalmente llevan a cabo en la placenta han sido poco estudiados (Benjaminov, y cols., 1990; Sirvastava y Raizada, 1996).

Diversos estudios han identificado plaguicidas órganoclorados y algunos órganofosforados que atraviesan la placenta y pueden causar aborto espontáneo, parto prematuro, muerte fetal o bajo peso al nacer. Estudios experimentales muestran resultados positivos de asociación entre exposición prenatal y muerte fetal secundaria a la exposición a plaguicidas órganofosforados, con un efecto de dosis respuesta.

Los estudios en seres humanos revelan resultados contradictorios, éstos incluyen estudios con diseño de cohorte o casos y controles en los cuales se han identificado rangos muy amplios en el riesgo en que estos tóxicos pudieran asociarse a la muerte fetal (Restrepo, y cols., 1990 ;Taha y Gray, 1993). No queda clara la razón de la ambigüedad de los resultados de estudios en seres humanos. Sin embargo, los factores que a continuación se mencionan pueden influir:

1. La mayoría de los trabajos que han abordado este problema, tiene limitaciones entre ellas la imprecisión de la variable exposición prenatal a plaguicidas, en muy pocos se ha identificado el efecto de un agente específico (Thomas, y cols., 1992) o se han realizado mediciones de biomarcadores de exposición o de efecto en la madre para identificar el tóxico que pudiera estar relacionado con el evento en estudio (Perera, y cols., 2003).

2. Otra limitante es que rara vez se evalúa la relación temporal entre la exposición y el desenlace estudiado y en muy pocos trabajos se menciona en qué trimestre ocurrió la exposición y el tiempo en que la mujer permaneció expuesta al tóxico.

3. Además algunos tienen una muestra insuficiente.

4. Las variables de control en los estudios son muy diversas y no hay estandarización de los confusores o predictores independientes de cada evento.

5. Un factor asociado que pudiera influir en los resultados tan diversos en seres humanos es la regulación del uso de plaguicidas en cada país, ya que en sitios como la India la mayoría de los estudios muestran asociación entre la exposición prenatal a plaguicidas y los efectos adversos en la gestación y en otros países como Estados Unidos de Norte América los resultados muestran ésta asociación sólo parcialmente.

La extrapolación de datos en estudios en animales a poblaciones humanas puede no realizarse de manera adecuada ya que no se consideran factores como las diferencias reproductivas específicas en cada especie, la respuesta a la dosis de exposición y las diferencias metabólicas. Algunos insecticidas pueden ser muy tóxicos para los seres humanos pero no para animales de laboratorio o viceversa, por lo que serían necesarios estudios clínicos y epidemiológicos con muestras adecuadas para evaluar un plaguicida específico o un grupo de plaguicidas cuya acción sea similar, cuantificar el nivel de exposición, evaluar el período del embarazo en el cual ocurrió la exposición, tomar en cuenta las diversas interacciones entre sustancias y controlar el efecto de variables potenciales que pudieran confundir el efecto.

1.3 Biomarcadores

Los efectos tóxicos secundarios a la exposición a agentes xenobióticos puede manifestarse en el corto plazo, cuando la exposición se presenta en grandes dosis y en una sola

exposición (exposición aguda), o bien, a largo plazo cuando la exposición es en bajas dosis durante un largo período (exposición crónica), si la exposición a sustancias tóxicas produce cambios o alteraciones tempranas iniciales en los individuos antes del desarrollo de la enfermedad estos cambios podrían convertirse en señales o marcadores, los que pueden ser evaluados mediante estrategias adecuadas y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt, 1997).

La detección de un xenobiótico en fluidos o tejidos es una señal de que el organismo tuvo contacto con éste, es decir ha estado expuesto a él, por lo que constituirá un marcador de exposición. Los marcadores biológicos de efecto son alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidos como generadores de un daño potencial o efectivo sobre la salud. Finalmente, un marcador biológico de susceptibilidad es aquel indicador de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt, 1997).

Un efecto se define como una alteración en un tejido u órgano, un evento temprano en un proceso biológico predictivo del desarrollo de una enfermedad clínicamente identificable, o una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero correlacionado con él y por lo tanto útil para predecir el padecimiento. El mismo marcador biológico puede también utilizarse como un indicador de la fisiología normal, por ejemplo la concentración de glucosa o de colinesterasa en la sangre. Los marcadores de efectos biológicos tempranos incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blanco después de la exposición. Como señales de alarma estos marcadores pueden actuar como dosímetros para guiar la intervención y reducir o prevenir la exposición. El objetivo principal de la investigación en

marcadores biológicos es el desarrollo de pruebas que relacionen la exposición con el efecto.

Entre los principios para la selección de marcadores es deseable tener en cuenta que la misma se base en un amplio conjunto de datos históricos de estudios *in vitro*, *in vivo*, epidemiológicos o en mediciones de exposición y propiedades fisicoquímicas del agente tóxico en cuestión por lo que se deberían escoger o generar marcadores biológicos que puedan identificar los estados iniciales de la enfermedad y que se conviertan en herramientas valiosas que permitan desarrollar estrategias que prevengan la progresión de la enfermedad, con técnicas poco invasivas de bajo costo. (Ostrosky-Wegman , Gonsebatt, 1997).

1.3.1. Biomarcadores de daño genotóxico

El uso de biomarcadores de efecto temprano permite determinar la acción de sustancias tóxicas antes de que ocurran las manifestaciones clínicas adversas. Las técnicas que miden el daño al ácido desoxiribonucleico (ADN) proveen una poderosa herramienta para estimar los efectos de tóxicos (Anwar, 1997).

Los marcadores de daño temprano se han asociado en su mayoría con procesos que miden el daño al ADN. La mayoría de estos marcadores no son específicos. Sin embargo, en muchos casos pueden cumplir funciones aun de biomarcadores de exposición, como en los casos de individuos expuestos a sustancias de vida media corta, por lo que al tratar de evaluar dichas sustancias en los líquidos biológicos, pasado cierto tiempo éstas no pueden ser detectadas.

Los efectos genotóxicos pueden ser causados por factores físicos, químicos y biológicos.

provee mediciones cualitativas y cuantitativas de la dosis interna y los efectos en el organismo humano (He, 1993).

Los métodos empleados para realizar un monitoreo biológico y evaluar la exposición a plaguicidas OF son la cuantificación del compuesto original que resulta poco viable dado el rápido metabolismo o degradación que sufre el compuesto por efecto de las hidrolasas plasmáticas (Coye, y cols., 1986), un biomarcador de efecto; la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en sangre o suero y la cuantificación de metabolitos de OF, el cual es un método adecuado y no invasivo. Sin embargo, sólo permite evaluar exposición reciente (Wang, 1989).

La medición de la actividad de la acetilcolinesterasa en individuos expuestos a plaguicidas OF, es el biomarcador que se utiliza con mayor frecuencia por la accesibilidad para la determinación de la muestra, la sencillez para su realización, la rapidez con la que se pueden obtener los resultados y el bajo costo de la técnica. Sin embargo, tiene limitantes que disminuyen su aplicabilidad como amplia variabilidad interindividual lo que implica que debe de contarse con una medición basal y así después de la exposición determinar el porcentaje de inhibición enzimática (Lotti, 1995). Múltiples factores pueden influir en la actividad de la enzima como enfermedades hepáticas, desnutrición y anemias crónicas, entre otros (Henao, 1991).

Durante la gestación también se ha observado variación en la actividad de la enzima. La acetilcolinesterasa se incrementa conforme avanza la gestación y es mayor durante el trabajo de parto (González-Horta y cols., 2000) La medición de la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria es teóricamente un mejor indicador de efectos biológicos que la sérica. La primera es útil para evaluar exposición a OF varios meses antes, en tanto que la sérica evalúa la exposición del último mes (Filkins, 1998).

Los efectos genotóxicos se clasifican en: macrolesiones, daños detectables a través del análisis de cromosomas y microlesiones, cambios no visibles los cuales ocurren a nivel de nucleótidos, consistentes en sustitución de pares de bases.

Las macrolesiones puede ser: cambios en el número de cromosomas, ganancia o pérdida en el número de uno o varios cromosomas, cambios en la estructura, rompimientos, deleciones y cambios de posición, lo que puede condicionar una completa disociación de uno o varios cromosomas en metafase, esto puede resultar en células aneuploides, monosomías, trisomías, causando serios efectos en organismos intactos como el síndrome de Down (Brusick, 1987). Existen pruebas para medir el daño temprano como son la determinación directa del daño al ADN por electroforesis unicelular o prueba del cometa, la determinación de células con micronúcleos, la identificación del intercambio de crómátides hermanas y de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Anwar, 2002).

Una técnica de detección desarrollada para evaluar la inducción de daño cromosómico es la prueba de determinación del la producción de micronúcleos. La base teórica de esta prueba se fundamenta en que se ha determinado que cromosomas rotos o fragmentos de cromosomas, no son integrados dentro del núcleo principal y pueden observarse como pequeños núcleos o micronúcleos en el citoplasma. (Fenech y Morley, 1985).

El incremento en la frecuencia de MN se utiliza como un biomarcador de efectos genotóxicos que pueden resultar de la exposición a clastógenos (factores que rompen cromosomas) o aneuploidógenos (factores que alteran el número de cromosomas). Los MN fueron descritos hace mas de 50 años por Howell y Jolly, quienes los descubrieron en reticulocitos humanos como cuerpos nucleares que se teñían con el colorante de Feulgen y que representan cromosomas que se han separado del huso mitótico, son poco frecuentes en individuos sanos, pero característicos de personas esplenectomizadas ó con anemia

hemolítica. En 1951 Thoday propuso la evaluación de MN para evaluar el daño genético producido por la radiación. En 1973 Heddle reportó la inducción de MN en células hematopoyéticas de ratón expuestas a diversos mutágenos.

Heddle y cols., en 1983, propusieron el análisis de MN en linfocitos de seres humanos. Sin embargo, el ensayo presentó varios problemas, uno de los más importantes fue la fragilidad de las células durante la preparación de las muestras, lo que provocaba que los MN se alejaran de las células en las que se habían originado, dando como resultado poca reproducibilidad en los datos que se obtenían. Diversos trabajos propusieron modificaciones como el cambio de la solución hipotónica. Sin embargo, el problema principal se originaba de la respuesta variable de los linfocitos al estímulo mitogénico y a las células que no entraban en división. Por lo que se desarrollaron métodos para poder identificar a las células que si se habían dividido y poder llevar a cabo una estimación real de la frecuencia de MN. Fueron Fenech y Morley los que en 1985 propusieron el bloqueo de la citocinesis utilizando citocalasina B y la evaluación de MN en células binúcleadas.

Esta técnica se convirtió en una herramienta poderosa y sensible para la detección de daño genético, además de presentar ventajas como rapidez, facilidad y aplicabilidad a diferentes tipos de células, pudiendo en algunos casos inclusive sustituir al laborioso análisis de cromosomas. Esta metodología ha demostrado funcionar como un biomarcador confiable y sensible en diversos estudios en seres humanos (Joksic y cols., 1997; Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2001; Bolognesi, 2002)

1.3.2. Biomarcadores para identificar exposición a plaguicidas órganofosforados

Los riesgos a la salud después de una exposición a plaguicidas OF varían de acuerdo con el tipo de plaguicida o mezcla de plaguicidas, a los patrones de uso, higiene personal y alimentación entre otros factores. El monitoreo biológico utilizando métodos validados

La identificación de exposición crónica a plaguicidas inhibidores de colinesterasas es complicada debido a que no se ha determinado un biomarcador único capaz de medir esta exposición (Loti, 1995). Estudios epidemiológicos han utilizado cuestionarios estructurados (Taha y Gray, 1993) los cuales han sido considerados como una herramienta tradicional válida.

1.3.3 Estudios que evalúan biomarcadores de daño genotóxico en poblaciones expuestas a plaguicidas (Cuadro V).

Los genes están sujetos a sufrir cambios o accidentes, que por supuesto se transmitirán de una generación a otra si se afectan las células gaméticas y reciben el nombre de mutaciones. Los agentes que los originan, denominados agentes mutagénicos, pueden ser de naturaleza biológica como los virus, físicos como las radiaciones o químicos como las mostazas nitrogenadas, los antimetabolitos y algunas sustancias con fines terapéuticos (Salamanca, 1993). Estudios que han evaluado a plaguicidas como potenciales agentes mutagénicos convergen en que son capaces de producir mutación genética, alteraciones cromosómicas y daño al ADN (Garret, y cols., 1986; Dearfield, y cols., 1993; Bolognesi, 2003). El monitoreo de daño genotóxico en poblaciones humanas es usado como una herramienta para estimar el riesgo genético de la exposición a una sustancia química en particular o mezcla compleja de agentes químicas.

Se han identificado diversos factores que pudieran incrementar la frecuencia de daño genotóxico evaluado por medio de MN en una población como la edad, variable que ha mostrado consistencia en diversos informes asociando un incremento en la frecuencia de micronúcleos con la edad del sujeto (Banadana, 1993). Otro factor relacionado al incremento sería el género, así se informa que en las mujeres es mayor la frecuencia que en hombres (Fenech, y cols., 1994). El tabaquismo, la deficiencia de ácido fólico y vitamina

B12, así como la exposición a plaguicidas también se han asociado con una mayor daño genotóxico (Duthie, 1999; Thierns, 1996; Joksic y cols., 1997).

Estudios de monitoreo citogenético en poblaciones expuestas a plaguicidas (trabajadores agrícolas, floricultores, fumigadores y otras) han identificado un mayor daño genotóxico en relación con poblaciones sin éste tipo de exposición. Los principales biomarcadores utilizados han sido: aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de crómatides hermanas (ICH) y la frecuencia de micronúcleos (MN). Sin embargo, no todos los autores han informado resultados positivos. Esta respuesta inconsistente entre estudios (cuadro V), podría reflejar exposición a plaguicidas en diferentes condiciones, tales como la magnitud de la exposición, el empleo de medidas de protección y el potencial genotóxico específico del compuesto al que se está expuesto, además el tipo de cultivo y factores ambientales pueden influenciar el tipo de plaguicida a usar. La falta de uniformidad en la descripción de cómo se midió la exposición, el empleo de mezclas de plaguicidas dependiendo de cada región, el tamaño de la muestra, el tiempo de exposición por intervalos antes de la exposición principal entre otras variables, podrían también estar influyendo en el momento de comparar los resultados de los diversos estudios (Bolognesi, 2003).

Una relación dosis /efecto ha sido observada para daño genotóxico en poblaciones expuestas a plaguicidas, el incremento de daño al parecer se relacionó con la magnitud de la exposición. La inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en linfocitos fue determinada en trabajadores agrícolas y en poblaciones cercanas a las áreas donde se aplican insecticidas en comparación con controles con área de residencia a 200 Km., de estas zonas encontrando un incremento significativo ($p < 0.01$) de este tipo de lesiones (Joksic, y cols., 1997).

Otros estudios determinaron diferencias en daño citogenético en individuos con síntomas de intoxicación crónica con respecto a los grupos control (Shaham, y cols., 2001 ; Dulout, y cols., 1987). En trabajadores agrícolas se informa un incremento en el daño cromosómico durante los períodos de uso intenso y aplicación de plaguicidas, principalmente en trabajadores que no utilizan equipo de protección (Falck, y cols., 1999; Dulout, y cols., 1985; Carbonell, y cols., 1990; Carbonell, y cols., 1995). En contraste en trabajadores agrícolas en los que se documentó exposición a bajas dosis de plaguicidas se informan resultados negativos (Barbosa, y cols, 1994; Gómez-Arroyo, y cols., 1992).

Sujetos con tabaquismo positivo pudieran tener un efecto que incremente la frecuencia de daño genotóxico, se ha observado un incremento aberraciones cromosómicas (Rupa, y cols., 1988; Rupa, y cols., 1989) e intercambio de cromátides hermanas (Padmavathi, y cols., 2000; Nehez, y cols., 1981), lo anterior ha sido consistente en estudios *in vitro* que han identificado un grado mayor de daño genotóxico del metilparatión en muestras de sujetos con antecedente de alcoholismo o tabaquismo positivos, este daño se presentó cuando el metilparatión se aplicó a una concentración de 0.08 µg/mL (Sunil, y cols., 1993). En estudios que han evaluado el daño genotóxico en trabajadores expuestos de forma ocupacional a mezclas de plaguicidas se ha identificado un incremento en el número de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y una mayor migración del ADN, después de un período de 8 meses éstos parámetros mostraron un decremento significativo en comparación con las muestras iniciales pero más alto en relación a los grupos control (no expuestos a plaguicidas) lo que sugiere que el daño al ADN puede ser detectado varios meses después (Garaj-Vrhovac y Zelijezic, 2001).

Cuadro V. Resultados de estudios que evalúan el daño genotóxico en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas

| Sujetos estudiados n Expuestos /No expuestos | Exposición y ocupación | Biomarcador analizado | Resultado | Referencia |
|--|---|-----------------------|--|--------------------------------|
| 42/16 | Etilparation, metilparati6n, diazinon Fumigadores | AC | Positivo(en periodos de alta exposici6n) | Yoder, y cols., 1973 |
| 109/57 | No datos | AC | Positivo | Nehez, y cols., 1981 |
| 15/13 | Metilparati6n de Trabajadores para la fabricaci6n del compuesto | AC | Negativo | De Cassia, y cols., 1982 |
| 36/15 | 6rganofosforados, 6rganoclorados y carbamatos | AC | Positivo | Dolout, y cols., 1985 |
| 94/76 | Mezcla de plaguicidas OF, carabamatos y tiocarabamatos Horticultores | ICH | Negativo | G6mez-Arroyo, y cols., 1992 |
| 24/24 | Fosfina y otros plaguicidas Fumigadores | AC | Positivo | Garry y Cols., 1992 |
| 31/21 | Fosfina Fumigadores | MN | Negativo | Barbosa, Bonin, 1994 |
| 71/29 | Mezcla de plaguicidas OF y piretroides Jardineros | MN | Negativo | Bolognesi, y cols., 1995 |
| 38/16 | Malati6n Fumigadores | MN | Negativo | Titenko-Holland, y cols., 1997 |
| 27/20 | Mezcla de plaguicidas Fumigadores | AC ICH MN | Positivo Negativo Positivo | Joksic y cols., 1997 |
| 8/41 | Dursban, Diazinon Exposici6n en el hogar | ICH AC | Positivo | Lieberman, y cols., 1998 |
| 25/30 | Dimetoate, paration , malation | AC ICH | Positivo | Rupa, y cols., 1998 |

| | | | | |
|---------|--|---------------------------|----------------------------------|---|
| 20/20 | Mezcla de plaguicidas 2,4-D atrazine, alachlor, malatión Trabajadores de planta química | AC MN ICH | Positivo Positivo Positivo | Grarj-Vrhovac y Zeljezic, 1999,2001 Zeljezic y Grarj-Vrhovac, 2001 Zeljezic y Grarj-Vrhovac, 2002 |
| 30/30 | Mezcla de plaguicidas Carbamatos, organoclorados y OF Floricultores | ICH MN(en mucosa oral) | Positivo Positivo | Gómez-Arroyo, y cols., 2000 |
| 49/50 | Mezcla de plaguicidas OF, prietroides, carabamatos Trabajadores agrícolas | MN | Negativo | Pastor, y cols., 2001 |
| 50/66 | Mezcla de plaguicidas metamidofos, cymoxanil Trabajadores agrícolas | MN | Negativo | Pastor, y cols., 2001 |
| 107/61 | Mezcla de plaguicidas OF, carabamatos y pretroides Floricultores | MN | Positivo | Bolognesi, y cols., 2002 |
| 84/65 | Mezcla de plaguicidas Trabajadores agrícolas | MN | Negativo | Pastor, y cols., 2002 |
| 239/231 | Mezcla de plaguicidas trabajadores agrícolas | MN | Negativo | Pastor, y cols., 2003 |

A C = Aberraciones cromosómicas, ICH = Intercambio de cromátides hermanas, MN= Micronúcleos.

Conclusiones: La exposición ocupacional a plaguicidas ha sido asociada con un incremento en el daño genotóxico, que al parecer depende del grado de exposición, una relación dosis efecto pudiera ser considerada, los resultados negativos han sido asociado con exposiciones a dosis bajas. Puesto que los trabajadores están frecuentemente expuestos a mezclas complejas de plaguicidas, sería difícil atribuir el daño genotóxico a un químico en particular. Debido a que la gran mayoría de los estudios evalúa exposición ocupacional y en casos eventuales se considera la exposición ambiental (Joksic y cols., 1997), sería conveniente la realización de más investigaciones en poblaciones que residen en áreas cercanas a los campos agrícolas y que han sido consideradas de alto riesgo para la

exposición a éste tipo de sustancias (ATSDR. 1997), así como considerar a la familia del trabajador agrícola en estudios de monitoreo para evaluar el daño genotóxico de los plaguicidas.

1.3.4. Agentes xenobióticos y daño genotóxico embrionario y fetal:

Desde los primeros días del desarrollo embrionario se está expuesto a una variedad de agentes xenobióticos ambientales o a drogas que son administradas a la madre con fines terapéuticos mediante su paso a través de la placenta (Filkins, 1998).

Las etapas del desarrollo embrionario y fetal se consideran con un riesgo mayor de daño a una exposición química, debido a que las células se encuentran proliferando, migrando y diferenciándose, éstas células en división representan una oportunidad para los efectos tóxicos capaces de producir daño al ADN (Everson , 1987; Eskenazi, y cols., 1999; Miller, 1987). Además debido a que las proteínas se están sintetizando, se pueden presentar errores en la transcripción o traducción que llevan a productos o sustratos protéicos inadecuados o disfuncionales, resultando en la detención del crecimiento o en errores en el desarrollo (Filkins, 1998). La precisa determinación de un riesgo para la salud en la prevención de enfermedades es de especial importancia para la epidemiología molecular (Ostrosky-Wegeman y Gonsebatt, 1997). Estudios en ratones han mostrado la capacidad de agentes con propiedades mutagénicas para inducir un incremento en la frecuencia de MN no sólo en la madre sino en el feto (King y Wild, 1979).

La información sobre la frecuencia de MN en recién nacidos es escasa. Encontramos dos reportes del mismo grupo (Henderson y cols., 1984, Aghamohammadi y cols., 1986) que evalúan MN en sangre obtenida del cordón umbilical. En ambos trabajos los autores siguen el método propuesto por Countryman y Heddle en 1976 para la evaluación de MN en sangre venosa la cual cultivan durante 96 h, después de las cuales evalúan los MN en

células mononúcleadas. En el primer estudio evalúan la frecuencia basal en 28 recién nacidos, en el segundo determinan la frecuencia de MN en 9 muestras de recién nacidos expuestos in útero a ultrasonido y en 10 no expuestos. Los promedios y rangos fueron de 3.03 (0.5-9.5), de 3.4(1-9.5) y 2.9 (0.5-8.6) respectivamente. No encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos del segundo estudio. Utilizando el método de citocalasina, que como mencionamos previamente inhibe la citocinesis, permitiendo la evaluación de MN en células binúcleadas y que ha sido validado utilizando sangre venosa para el monitoreo de poblaciones expuestas (ver biomarcadores de daño genotóxico), solo encontramos un reporte (Nath y cols., 1995) que aplica la técnica de Fenech y Morley a la sangre de cordón umbilical de 18 recién nacidos y encuentra solo 17 células con 1 MN en 36000 células binúcleadas analizadas, el máximo número de MN que encontraron fue de 3 MN/2000 células binucleadas.

Por otro lado, Fenech y Morley, 1985, realizaron un estudio en linfocitos aislados de individuos sanos para ver el efecto de la edad. En los linfocitos de lactantes menores de un año encontraron hasta 7 MN/1000 células binúcleadas. Asimismo, Gangulay, 1993, en un estudio donde correlaciona la edad con daño cromosómico y formación de MN, menciona que en un niño de aproximadamente 1 mes de edad con 6 MN/1000 células binúcleadas.

2. Preguntas de Investigación:

¿Es la exposición subcrónica a plaguicidas inhibidores de colinesterasas un factor asociado al retardo en el crecimiento intrauterino?

¿En poblaciones donde continuamente se aplican plaguicidas inhibidores de colinesterasas se encuentra una mayor proporción de micronúcleos en mujeres durante la gestación en sangre periférica y en recién nacidos en el cordón umbilical?

3. Hipótesis

1. La exposición subcrónica a plaguicidas durante la gestación es un factor asociado al retardo en el crecimiento intrauterino dado que mujeres en riesgo a exposición a éstos tóxicos pueden cursar con una mayor proporción de lesiones en placenta caracterizadas por fibrosis e infartos así como insuficiencia placentaria, lo que condicionaría un menor paso de micronutrientes al feto contribuyendo a una menor ganancia de peso de el mismo.
2. La proporción de micronúcleos en mujeres embarazadas y recién nacidos es mayor en poblaciones donde continuamente se aplican plaguicidas inhibidores de colinesterasas, en comparación con residentes de un área urbana dado que los plaguicidas pudieran actuar como agentes clastógenos y condicionar un mayor daño al ácido desoxirribonucleico en poblaciones en riesgo de exposición de éstas sustancias.

4. Objetivos.

- 4.1 Determinar la relación entre la exposición subcrónica a plaguicidas y el retardo en el crecimiento intrauterino.
- 4.2 Comparar la proporción de micronúcleos durante la gestación y en el recién nacido en sangre periférica y en el cordón umbilical en diversas poblaciones: dos urbanas, una agrícola y una considerada de alto riesgo durante la gestación.

5. Justificación :

El retardo en el crecimiento intrauterino se define como la disminución patológica del ritmo del crecimiento fetal; el resultado final sería un feto que no alcanza su potencial inherente de crecimiento y está en peligro de sufrir mayores complicaciones y la muerte.

Se clasifica en retardo en el crecimiento intrauterino simétrico o de tipo I, cuando existe una disminución proporcional en el crecimiento de la circunferencia del abdomen y el de la cabeza.

El retardo en el crecimiento asimétrico o de tipo II se caracteriza por una disminución desproporcionada en la circunferencia del abdomen fetal en relación con la cabeza.

El RCI simétrico puede ser consecuencia de un factor lesivo temprano que obstaculizó la hiperplasia celular fetal y que causó disminución proporcional en el tamaño de los órganos del neonato, el patrón asimétrico puede depender de un factor lesivo anterior que impidió la hiperplasia celular y que al final produjo disminución desproporcionada de la circunferencia abdominal en comparación con la de la cabeza.

La insuficiencia uteroplacentaria progresiva puede manifestarse por este patrón asimétrico, el 75% de los pacientes puede clasificarse como asimétrico.

La importancia clínica del RCI radica en el hecho de que el peso neonatal constituye el indicador mas preciso de complicaciones y muertes perinatales.

Se ha informado incremento en las lesiones placentarias en los casos de retardo en el crecimiento intrauterino entre las que se encuentran una mayor proporción de infartos y de vellosidades terminales avasculares.

Un estudio previo en la zona de Delicias Chihuahua donde continuamente se aplican plaguicidas inhibidores de colinesterasas, sobre alteraciones placentarias informó que en esta área la proporción de lesiones en la placenta de tipo infarto e incremento de fibrosis es mayor que en zonas urbanas y que esto pudiera relacionarse con la exposición a plaguicidas (Levario-Carrillo, y cols., 2001).

El retardo en el crecimiento intrauterino es una variable que se ha asociado a la mortalidad perinatal, así como a mayor proporción de enfermedades en la vida adulta sobre todo

cuando se acompaña de grandes tamaños placentarios, asociación que se ha presentado en casos de anemia por deficiencia de hierro y que se ha relacionado con hipertensión en la vida adulta (Barker, 1993), por lo que estudiar factores que puedan estar vinculados a un retardo en el crecimiento intrauterino es de suma importancia.

Por otro lado, debido a que un daño genotóxico es un factor de riesgo primario para efectos en el largo plazo tales como, efectos reproductivos adversos o carcinogénesis (Salamanca, 1993) y las etapas del desarrollo embrionario y fetal se consideran con un riesgo mayor de daño a una exposición química, debido a que las células se encuentran proliferando, migrando y diferenciándose. Estas células en división representan una oportunidad para los efectos tóxicos capaces de producir daño al ADN, por lo que es importante evaluar el efecto de la exposición ambiental a plaguicidas sobre el daño genotóxico en poblaciones que residen en zonas cercanas a la aplicación de dichas sustancias, aunado a esto, en recién nacidos es escasa la información sobre daño genotóxico (Nath y cols., 1995) por lo que la determinación de MN en la sangre del cordón umbilical podría ser una herramienta para evaluar daño genotóxico en los recién nacidos de mujeres expuestas a xenobióticos durante la gestación.

6. Pacientes, Material y Métodos:

6.1 Diseños:

Casos y controles para el primer objetivo.

Transversal observacional para el segundo objetivo

6.2 Universo de trabajo

Para el cumplimiento del primer objetivo.

Población: Recién nacidos vivos, únicos cuyas madres residieron en las comunidades eminentemente agrícolas del distrito de riego 05 en el estado de Chihuahua, México durante el período de gestación.

Para el cumplimiento del segundo objetivo: recién nacidos vivos, únicos cuyas madres residieron en las comunidades eminentemente agrícolas del distrito de riego 05 en el estado de Chihuahua, México durante el período de gestación y en áreas urbanas de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua y México D. F.

6.3 Criterios de selección

De inclusión: Recién nacidos cuyas madres reunieron las siguientes características:

- Con información sobre el último período menstrual.
- Que aceptaron participar en el estudio.
- Que cumplieron con la definición de caso o control.

Criterios de exclusión:

- Mujeres con antecedente de preeclampsia o eclampsia.
- Mujeres con diagnóstico de hipertensión arterial o diabetes mellitus insulín dependiente, diabetes mellitus tipo II y diabetes gestacional.
- Que durante el embarazo recibieron tratamiento con diazepam o fenobarbital.
- Mujeres con prueba de TORCH positiva

Para el cumplimiento del segundo objetivo.

Población residente en la zona agrícola mencionada y población residente en zonas urbanas sin exposición expresa a plaguicidas.

Se integraron los siguientes grupos de estudio:

Grupo I

Se estudiaron recién nacidos (n =21) clínicamente sanos residentes en áreas urbanas de Chihuahua, México y n = 17 madres que cursaron el embarazo sin complicaciones y sin exposición expresa ocupacional, ambiental o en el hogar a tóxicos. Se excluyeron RN de mujeres con el antecedente de enfermedades crónico degenerativas y que recibieron tratamiento con fármacos.

Grupo II

Formado por n = 12 recién nacidos clínicamente sanos cuyas madres residieron en México D. F., con similares características a las del grupo I.

Grupo III

RN (n = 16), cuyas madres (n =15) residieron en un área agrícola del estado de Chihuahua, México, caracterizada por una aplicación continua de plaguicidas del grupo de los inhibidores de las colinesterasas por aire y tierra durante los ciclos agrícolas de verano y otoño.

Grupo IV

Se conformó por RN (n =15) cuyas madres cursaron el embarazo con alguna enfermedad y /o complicación.

Con diagnóstico de diabetes gestacional (n =1), hipotiroidismo (n =2), lupus eritematoso (n =1), epilepsia (n =2), miomatosis uterina (n = 1), placenta previa (n =1), pielonefritis (n = 1). Algunos fármacos utilizados fueron: ácido valpróico, prednisona, difenilhidantoína.

6.4 Variables:

Independiente:

Exposición subcrónica a plaguicidas inhibidores de colinesterasas: para considerar a un par (madre /recién nacido) como expuesto a plaguicidas que inhiben las colinesterasas éste debía reunir dos o más de los siguientes criterios: 1) historia de exposición prenatal positiva

a plaguicidas, determinada por sitio de residencia a una distancia menor o igual a un kilómetro de las áreas de cultivo, 2) aplicación de plaguicidas durante el periodo de gestación en estas áreas, 3) compañero o familiar que conviviera en el mismo domicilio dedicado a la aplicación ó manejo de plaguicidas 4) pareja dedicada a las labores agrícolas. Además, que la actividad de la acetilcolinesterasa materna o la del recién nacido presentara una disminución del 20% o más (Lotti, 1995) de acuerdo con el promedio de la actividad enzimática presentada en la misma comunidad en época de no-aplicación de plaguicidas. Este criterio se estableció evaluando cada una de las variables mencionadas por separado y determinando cuales variables en conjunto identificaban al par madre /recién nacido con una historia de exposición a plaguicidas positiva.

Dependientes: Retardo en el crecimiento intrauterino, frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de mujeres en puerperio inmediato y en el cordón umbilical de recién nacidos residentes en zonas agrícolas.

RN con diagnóstico de retardo en el crecimiento intrauterino (Casos)

R N con peso para su edad gestacional inferior al percentil 10 (Overpeck, y cols., 1999), sin malformaciones congénitas aparentes y sin evidencia de infección intrauterina.

RN clínicamente sanos (Grupo de Controles)

RN con peso superior al percentil 10, de acuerdo a su edad gestacional según Overpeck, y cols., 1999, con similares características clínicas que en los casos.

Frecuencia de micronúcleos:

Presencia de fragmentos de cromosoma o un cromosoma completo en el citoplasma de células binucleadas en sangre periférica de mujeres en puerperio inmediato o en cordón umbilical de recién nacidos, evaluados en 1000 células binucleadas.

VARIABLES CONFUSORAS Y PREDICTORAS INDEPENDIENTES: edad materna, semana de gestación, nutrición materna, antecedente de tabaquismo durante la gestación, anemia materna, diabetes mellitus, hipertensión arterial, preeclampsia, eclampsia, tabaquismo, infecciones intrauterinas.

6.5 Procedimientos

Los grupos fueron conformados de acuerdo con los criterios de inclusión mencionados.

En pares madre /RN del hospital general de zona Número 11 del Instituto Mexicano del Seguro Social en Delicias, Chihuahua, que reunieron criterios de inclusión se le aplicó un tamizaje para evaluar crecimiento intrauterino, se evaluaron las semanas de gestación de acuerdo a la fecha de última menstruación clasificando como recién nacido con retardo en el crecimiento intrauterino, aquél que de acuerdo a las semanas de gestación, tuviera un peso inferior al percentil 10 comparado con las tablas propuestas por Overpeck, y cols., 1999, aquellos con un peso superior al percentil 10 se incluyeron en el grupo de controles. Se realizó una invitación a las madres de estos recién nacidos explicándoles el motivo del estudio así como los objetivos y los pasos del mismo, pidiéndoles su consentimiento para participar. Se procedió a realizar la entrevista para evaluar exposición durante la gestación a productos agroquímicos, se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa (Método de Ellman y Cols.). La hemoglobina por espectrofotometría en un sistema analizador hematológico automático *Cell- Dyn 3700 SL*, por medio de un enzimoimmunoensayo de micro partículas se realizó la determinación de anticuerpos IgM frente al virus de la rubéola, frente a toxoplasma gondii y anticuerpos anti-citomegalovirus en suero, el cual permaneció congelado a -20° C hasta su determinación en un aparato *IMX System*. La impedancia bioeléctrica se llevó al cabo con analizador de composición corporal *Body Dynamics 310*, se realizó la medición entre las 4 y 12 horas posteriores al parto.

Se pesó a la paciente y se tomó la estatura, luego en posición semifowler con una inclinación de 30 grados se colocaron las almohadillas sensoras en mano, antebrazo, pie y pierna derecha, colocando los cables de acuerdo al instructivo del analizador, y procediendo a la toma del análisis de composición corporal.

Después del alumbramiento se retiró el coágulo materno de la placenta y se colocó en una bolsa de plástico para pesarla en una báscula pediátrica previamente calibrada.

Por cada caso se integraron 4 controles.

Los procedimientos para la clasificación y estudio de los controles fueron de igual forma que los descritos para los casos. Las variables antropométricas fueron evaluadas por personal previamente entrenado y estandarizado.

Para el cumplimiento del segundo objetivo se procedió a identificar los grupos de estudio en las áreas de toco cirugía de los centros hospitalarios de Chihuahua, del Instituto Nacional de Perinatología y Hospital de Ginecología y Obstetricia Número 4 del IMSS en la ciudad de México D. F. y el Hospital General de Zona No. 11 de Delicias, Chihuahua. Se realizaron las entrevistas y la toma de muestras tanto de la madre como del cordón umbilical para la determinación de micronúcleos y AChE.

6.6 Técnicas:

Determinación de micronúcleos en sangre periférica y en cordón umbilical (Fenech y Morley, 1985):

Se realizó en linfocitos, para los cultivos se procedió de la siguiente manera:

1. Se colocaron 0.5 ml de sangre periférica o de cordón umbilical en 6 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con L- glutamina y aminoácidos esenciales al 1%.

2. La proliferación de linfocitos se estimuló agregando 0.2ml de la lectina fitohemaglutinina (PHA) (Gibco).
3. La mezcla anterior se incubó a 37° C por 48 horas.
4. A las 48 horas de cultivo se agregó 42 µl de citocalasina B (Cit B) continuando la incubación por 24 horas más.
5. A las 72 horas de incubación se realizó la cosecha de linfocitos, los tubos se centrifugaron por 10 minutos en una centrífuga clínica a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y con el tubo en un agitador en movimiento se le agregó un fijador de metanol ácido acético (3-1), refrigerado a 4° C, nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 1200 rpm, repitiendo el procedimiento hasta que el líquido quedó transparente y el botón celular blanco.
6. Una vez retirado el último fijador se realizó la preparación de las laminillas las cuales se encontraban en agua destilada fría a 4° C.
7. Con la laminilla húmeda se goteó el botón celular con una pipeta Pasteur realizando dos laminillas por tubo y se dejó secar al medio ambiente.
8. 24 horas más tarde se realizó la tinción con eosina y azul de metileno .
9. El recuento de micronúcleos se realizó en 1000 células binucleadas.
10. Se evaluaron 8000 células binucleadas por dos investigadores tomando como referencia el informe del laboratorio de Genómica y Toxicología ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se realizó una evaluación independiente y cegada de laminillas de cultivos obtenidos tanto en Chihuahua como en México D. F., se determinó el coeficiente de variación intraclase en 0.80 con una $r = 0.85$ ($p = 0.006$).

Determinación de AChE : Se siguió el método de Ellman y cols., con las modificaciones sugeridas por la Organización Mundial de la Salud. Se realizó una dilución de 1:900 de 10 μ l de sangre total con 9 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH de 8. Se transfirieron 3 ml de esta suspensión en una cuveta y se añadirán 100 μ l de DTNB (5.5-ditiobis -2-nitrobenzoico) 0.01 M preparado en amortiguador de fosfatos 0.1M y pH de 7.5 . Se ajustó el espectofotómetro a cero a 412 nm, la reacción se inició con la adición de 50 μ l de yoduro de acetiltiocolina 0.06M y se tomó la lectura al minuto 1 y al minuto 4. Al final se tomó la temperatura del ensayo. Por cada μ mol de tiocolina presente en el medio se forma un mol de anion tionitrobenzoato de color amarillo intenso y se utilizó el valor de 13 600 mol/l -1 cm-1 como coeficiente de extinción molar .

Los valores obtenidos se corrigieron para 25 ° C multiplicando los valores de actividad por el factor de temperatura correspondiente. Una unidad de enzima se definirá como la cantidad necesaria para la formación de un μ mol de tiocolina por minuto a 25 ° C, los resultados se reportaron en unidades(U) por mililitro. Se ajustaran los valores de la actividad colinesterásica por gramos de hemoglobina.

6.7 Análisis Estadístico:

Cálculo del tamaño de la muestra:

Para el objetivo:

1. Determinar la relación entre la exposición ambiental a plaguicidas inhibidores de colinesterasas y el RCIU.

Se tomaron como base los datos de los primeros 150 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión al estudio.

N = 31 casos y n = 119 controles se calculó con el programa estadístico STATA (Stata Statistical Software, Release 5.0, Stata Corporation, College Station, TX), con un poder de

prueba de 90% y un nivel de confianza del 95% y un OR de 2.0. La muestra se determinó en 77 casos y 308 controles.

2.- Para el objetivo: Determinar la frecuencia de micronúcleos en poblaciones ambientalmente expuestas a plaguicidas. Se tomaron como base los datos del artículo de Joksic y cols., 1997. Con un alfa de 0.05, beta de 0.80, considerando los promedios de MN informados para población que residen cercanas a campos agrícolas y aquéllas que están a una distancia de 200 Km., en donde se informa una frecuencia de MN de 9.63 ± 5.69 en la población con residencia en áreas cercanas a las áreas de aplicación de plaguicidas y de 5.20 ± 2.01 en aquéllas con residencia a una distancia de 200 km de donde se aplicaron los plaguicidas, se obtuvo una $n = 15$ para cada grupo a estudiar.

Análisis de resultados:

Se examinó la relación entre la exposición a plaguicidas que inhiben a las colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino evaluando los predictores más documentados de peso al nacer, así como potenciales confusores de esta relación (González-Cossío, y cols., 1997, Kramer, 1987, Sanin, y cols., 2001). Las variables medidas incluyeron: peso magro materno (kg), talla materna (cm), edad de la madre (años), niveles de hemoglobina materna (g/L), hábito tabáquico, ocupación, paridad, peso de la placenta (g), anticuerpos IgM contra el virus de la rubéola, contra toxoplasma gondii y anticitomegalovirus así como sexo del recién nacido.

Se hizo un análisis exploratorio y univariado para cada una de las variables. El análisis bivariado y multivariado se realizó con 371 pares madre / recién nacido que contaban con la medición de las variables con potencial confusor, esto se llevó al cabo con el programa STATA 5.0 para Windows. Se utilizó la regresión logística para ver el efecto de la exposición a plaguicidas en etapa prenatal sobre el RCIU, y de cada una de las variables

sobre el RCIU. Nuestro modelo saturado inicial, incluyó todas las variables mencionadas, basándonos en un modelo biológico de RCIU, de acuerdo a la literatura. Se fueron eliminando una a una las variables de acuerdo a los valores de p (>0.10). El efecto de confusión fue evaluado de acuerdo al porcentaje de cambio del OR con respecto a la principal asociación y el cambio en éste cuando se ajustó por los principales predictores de peso al nacer (Rothman., 1987). El modelo final quedó integrado sólo por aquellas variables que tuvieran una influencia significativa y contribuyeran a aumentar el valor predictivo y explicativo del modelo.

Para evaluar la diferencia en la frecuencia de micronúcleos en las poblaciones estudiadas, se utilizó el análisis de varianza para determinar la diferencia entre los grupos estudiados en las variables cuantitativas con distribución normal. Para evaluar la diferencia entre la frecuencia de MN en linfocitos maternos y del RN se realizó una regresión de Poisson.

Control de sesgos:

De selección: Se evitó, incluyendo pacientes a los grupos de caso o control sin tener conocimiento previo de la historia de exposición, se caracterizaron las pérdidas.

De información: Estandarización de personal, estandarización de instrumentos, lectura cegada de laminillas.

De confusión: Restricción y análisis.

7. Resultados:

7.1 Relación entre la exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino.

Durante el período de estudio (2000-2002) se atendieron 6109 partos en el hospital de referencia. Se incluyeron 450 (7.36%) mujeres y sus recién nacidos; 104 RN con diagnóstico de retardo en

el crecimiento intrauterino y 346 R N clínicamente sanos. El análisis final se realizó con 371 pares madre /recién nacido, 79 con retardo en el crecimiento intrauterino y 292 clínicamente sanos, no fue posible la recolección de algunas variables. Se consideraron como pérdidas: peso de la placenta (n =27), anticuerpos anticitomegalovirus Ig M (n = 8), masa materna libre de grasa (n = 8), y acetilcolinesterasa en el recién nacido (n = 4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pares madre /recién nacido incluido y los no incluidos en el análisis final.

Las características clínicas de las madres (cuadro 2), fueron similares. El antecedente de muerte fetal tardía fue de 10% en los casos y 8% en los controles pero esta diferencia no fue significativa (p = 0.79). El antecedente de tabaquismo durante la gestación fue manifestado en el 4% de los casos y 2% en los controles (p = 0.23).

La actividad enzimática mostró una reducción en los meses de mayor aplicación de plaguicidas 5.24 ± 1.16 UI (abril-agosto), en comparación con el período no-aplicación 5.78 ± 1.21 UI (octubre-febrero), o en aquellos en que la aplicación es mínima (marzo-septiembre) 6.21 ± 1.25 UI (figura 1). La relación entre la acetilcolinesterasa materna y del recién nacido fue significativa (figura 2) $r = .43$ (p<0.01). La variabilidad interindividual fue de 22% en la actividad de la AChE materna y del 26% en el RN.

En la composición corporal materna, no se observaron diferencias con excepción de la masa magra y la talla las cuales fueron menores en mujeres cuyos recién nacidos fueron diagnosticados como retardo en el crecimiento intrauterino (p = <0.01).

Las características de los recién nacidos (cuadro 3) fueron diferentes como se suponía, en los dos grupos de estudio. Los niveles de actividad de la AChE fueron menores en el grupo de casos (p = 0.01). Los anticuerpos IgM contra el virus de la rubéola y contra toxoplasma gondii no presentaron diferencia significativa.

La asociación entre la exposición a plaguicidas y el RCIU se valoró a través de una regresión logística (cuadro 4) ajustando por las variables que en el análisis bivariado mostraron una significancia, una vez que en el modelo todas las variables mostraron una $p < 0.05$ se realizaron la prueba de bondad de ajuste la cual mostró una significancia de $p > 0.05$.

7.2 Frecuencia de micronúcleos (MN) en mujeres en puerperio y recién nacidos:

Las características clínicas de las madres y recién nacidos (RN) se muestran en el cuadro 4. La frecuencia de MN, (cuadro 5) en recién nacidos clínicamente sanos cuyas madres residieron en Chihuahua, México fue de 1 ± 0.92 , con un rango de 0 a 3. En el grupo de recién nacidos en las que las madres residieron en México D. F., fue de 1.41 ± 0.79 (rango de 0-2).

En RN de madres que vivieron en zonas agrícolas la frecuencia de MN fue de 2 ± 1.5 (rango 1-5). La diferencia entre estos tres grupos no fue significativa ($p = 0.17$). Sin embargo, en RN que cursaron la gestación con alto riesgo mostraron una frecuencia de MN de 4 ± 2 (rango 1-8), cuando se comparó esta frecuencia con la de los tres grupos anteriores la diferencia fue significativa ($p < 0.01$).

La figura 3 muestra la frecuencia de MN en los cuatro grupos de RN estudiados.

La correlación entre MN maternos y MN en recién nacidos se estableció en 28 pares madre/recién nacido, se observó una $r = .46$ ($p = 0.01$)

Los plaguicidas utilizados en el área agrícola durante el período de estudio se muestran en el cuadro 2, donde se aprecia una mayor proporción del grupo de los organofosforados.

Las enfermedades con las que cursaron las pacientes con embarazo de alto riesgo fueron: diabetes gestacional, epilepsia, hipotiroidismo, lupus eritematoso o pielonefritis.

La figura 4 muestra la frecuencia de MN en madres y RN de zonas agrícolas y zonas urbanas. El rango del número de MN en madres que residieron en zonas urbanas fue de 2-7 con un promedio de 4 MN en 1000 células binucleadas y en mujeres que residieron en zonas agrícolas fue de 4.5.

8. Discusión:

8.1 Relación entre la exposición subcrónica a plaguicidas inhibidores de colinesterasas y el retardo en el crecimiento intrauterino.

En este estudio se identifica una asociación entre la historia de exposición a plaguicidas y el RCIU en recién nacidos cuyas madres refirieron una historia de exposición positiva a estas sustancias y que cursaron con niveles de actividad de la acetilcolinesterasa ellas o sus RN, inferiores al 20% de acuerdo a mujeres y RN de grupos similares en período de no-aplicación de plaguicidas. Estudios que evalúan la asociación entre el bajo peso al nacer y exposición a plaguicidas han informado un incremento en riesgo según las concentraciones de DDE (1,1 -dichloro-2,2- bis(p-chlorophenyl) ethylene) en suero materno, las mujeres que mostraron una concentración entre 15-29 $\mu\text{g/L}$ presentaron un OR de 2.1 para bajo peso al nacer y en aquéllas con concentraciones mayores o iguales a 60 $\mu\text{g/L}$ el OR fue de 3.7. Los OR para bajo peso al nacer (< 2500g) fueron similares 2.0 y 4.1 con respecto a las concentraciones mencionadas (Longnecker, y cols., 2001).

También se ha evaluado el riesgo para bajo peso al nacer en mujeres que durante la infancia y la adolescencia estuvieron expuestas a plaguicidas órganoclorados a través de pescado contaminado observando un mayor riesgo en este grupo de estudio (OR 1.6) en relación al grupo control (Rylander, y cols., 2000).

En las comunidades donde residieron durante la gestación las pacientes de éste estudio los plaguicidas utilizados con mayor frecuencia (Lagunes-Tejada, 1994) corresponden al grupo

de los organofosforados (cuadro 2) aunque en estudios clínico-epidemiológicos de corte transversal se dificulta aislar el o los tóxicos a los cuales la población está expuesta ya que por lo general, se está expuesto a una mezcla heterogénea de compuestos químicos y el uso de “mezclas” para el combate de las plagas en la agricultura es cada vez más frecuente y persiste la aplicación de plaguicidas organoclorados, compuestos que también atraviesan la placenta y que se han identificado en el cordón umbilical (Waliszewski, y cols., 2000) y en la leche materna de poblaciones en México (Terrones, y cols., 2000).

Autores que han determinado la asociación entre la exposición a plaguicidas medida por zona de residencia han identificado un mayor riesgo para bajo peso al nacer en mujeres cuya residencia está a una distancia igual o menor de 300 m (Xiang, y cols., 2000).

También se ha relacionado la exposición a plaguicidas del grupo de piretroides sintéticos durante el primer y segundo trimestre con un decremento en el peso al nacer en comunidades de Polonia (Hanke, y cols., 2003).

Nosotros no encontramos evidencia de una interacción entre la exposición a plaguicidas y la masa magra materna ≤ 45 Kg, tal vez porque la muestra no fue calculada para evaluar tal interacción. No podemos excluir la posibilidad de que variables no incluidas en el trabajo y que tienen potencial teratógeno sean fuente de posible confusión.

Estudios *in vitro* con plaguicidas organofosforados como el paratión han determinado una reducción del 50% de la actividad de la AChE en la placenta con una cantidad importante de transferencia del plaguicida al compartimiento fetal (Benjaminov y cols., 1992). El plaguicida o sus metabolitos en un organismo en desarrollo pudiera tener un efecto no específico en la regulación del crecimiento tal vez por una influencia en el transporte de nutrientes (Eskenazi, y cols., 1999) ó por la interacción con receptores y proteínas involucradas en la transducción y en la producción del AMP cíclico lo que conduciría a

efectos adversos sobre la replicación y diferenciación celular como se le ha atribuido al Clorpirifos (Auman, y cols., 2000).

Entre las limitaciones de este trabajo que deberían tomarse en cuenta en el momento de la interpretación de los resultados se encuentran las siguientes: 1. El haber determinado la edad gestacional de acuerdo a la fecha de última menstruación (FUM) lo cual condiciona un error en la clasificación en RN prematuros o posmaduros ya que el estándar de oro para medir edad gestacional es la valoración conjunta de FUM mas estudio ultrasonográfico entre la semana 8 y 16 con medición de la longitud occipucio-cóccix (Taipale, y cols., 2001), aunque solo se aceptaron mujeres con datos sobre la FUM y el error pudiera considerarse aleatorio. Para evaluar este tipo de error se eliminaron los RN menores a 37 semanas de gestación y mayores de 41, la asociación de las variables en estudio no mostraron cambios significativos. 2. El hecho de haber establecido el diagnóstico de RCIU con apoyo de las tablas de Overpeck, y cols., en la que la población estudiada correspondió a recién nacidos de padres mexicanos nacidos en Estados Unidos de Norteamérica, pudiera constituir un sesgo, sin embargo nosotros comparamos el acuerdo para clasificar recién nacidos con retardo en el crecimiento intrauterino con estas tablas y las de Williams y cols., 1982, que son las que sugiere la Organización Mundial de la salud y la kappa fue de 0.86 (IC_{95%} 0.77-0.95). Estos mismos datos se compararon con el percentil 10° del peso al nacer en la población de referencia del estado de Chihuahua, México, de RN durante los años 2000-2001(datos no mostrados), observando un valor del coeficiente de concordancia de kappa de 0.84(IC_{95%} 0.75-0.93).

3. La determinación de la exposición a plaguicidas por medio de cuestionario estructurado y cifras inferiores al 20% de la actividad de la AChE. Esta propuesta podría ser cuestionable dadas las implicaciones y complejidades al interpretar la actividad enzimática

y condicionar una mala clasificación entre expuestos y no expuestos a plaguicidas. Sin embargo, no existe un biomarcador único capaz de determinar la exposición subcrónica en poblaciones con alto riesgo de exposición a estas sustancias. La gran variabilidad de la actividad de la AChE (10-40%), hace compleja su interpretación (Lotti, 1995). La variabilidad interindividual en esta muestra presentó un rango entre estas proporciones, y se determinó una menor actividad de la enzima en recién nacidos tanto en casos como en controles cuando la historia de exposición fue positiva. En otras comunidades donde continuamente se aplican plaguicidas inhibidores de colinesterasas como en Israel también se ha informado que la actividad de ésta enzima se encuentra disminuida en temporada de aplicación de plaguicidas, no solo en trabajadores agrícolas sino también en residentes de áreas cercanas a la aplicación de estos tóxicos (Richter, 1986). Otro factor que dificulta su interpretación es que difícilmente se cuenta con cifras previas de actividad en la población que reside en áreas cercanas a la aplicación continua de este tipo de tóxicos por lo que se ha sugerido que la corrección por gramos de hemoglobina pudiera disminuir esta variabilidad (Mc Connel, 1994) y es aceptado que la actividad de la AChE es más específica y puede persistir entre 1 y 3 meses (Filkins, 1998). En este trabajo se determinó actividad de la AChE menor en recién nacidos cuyas madres cursaron con una historia de exposición positiva y en especial en el grupo de casos.

Aunque el peso es un factor que contribuye a modificar la actividad de esta enzima (Henao, 1991), cuando se realizó el análisis evaluando por separado los diferentes grupos de estudio, en el grupo de casos solo aquellos con historia de exposición prenatal a plaguicidas (n =19) mostró una actividad enzimática menor. El haber determinado una menor actividad de la AChE en recién nacidos y no en sus madres pudiera estar en relación a la sensibilidad de este grupo de edad a la exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasas (Eskenazi,

y cols., 1999) lo cual ha sido informado en estudios experimentales (Pope, y cols., 1991). Por otro lado, la recolección de muestras incluyó diversas temporadas en relación con la aplicación de plaguicidas y se identificó una menor actividad tanto en madres como en recién nacidos en la época de alta aplicación de estas sustancias. Sin embargo, se reconoce que otros biomarcadores como la medición de metabolitos en meconio pudieran aportar datos con mayor precisión para determinar la exposición a plaguicidas en el periodo perinatal como ha sido informado por Whyatt y cols., 2001 y correlacionar estas mediciones con la historia de exposición y la actividad de la AChE en el recién nacido ya que estas dos ultimas opciones tienen la ventaja de tener mas accesibilidad en países en vías de desarrollo dado el costo y la infraestructura necesarias para la determinación de los metabolitos.

Debido a que son múltiples los factores asociados a RCIU, las variables que mostraron significancia estadística se incluyeron en un análisis multivariado y la asociación entre la exposición a plaguicidas y el RCIU fue persistente. Dada la importancia del peso al nacer no solo para la supervivencia en la etapa perinatal, sino en su influencia en la vida adulta, (Barker, y cols., 1993; Benedikston, y cols., 1993) el estudio de los factores que determinan esta condición son de suma importancia.

8.2 Frecuencia de micronúcleos en mujeres en puerperio y recién nacidos residentes en áreas agrícolas.

La frecuencia de MN en recién nacidos fue baja y no se observó un cambio significativo en las células binucleadas de los recién nacidos cuyas madres durante el periodo gestacional tuvieron una historia positiva de exposición a plaguicidas.

Estos datos están en acuerdo con los informados por Nath y cols. 1995 para recién nacidos clínicamente sanos. En donde se mostró que la máxima frecuencia de MN en RN fue de 3

en 2000 células binucleadas. Lo que sugiere que en recién nacidos sanos la presencia de MN es poco probable y que en el transcurso de los años al enfrentarse el individuo a exposiciones ambientales esta frecuencia se incrementa progresivamente como se ha determinado en diversos estudios los que han informado una correlación positiva entre la frecuencia de MN y la edad (Koteles, y cols. , 1993; Peace, 1999).

Las mujeres embarazadas y los recién nacidos se han considerado como grupos de riesgo para la exposición a plaguicidas y en diversos estudios se han asociado los efectos adversos durante la gestación de mujeres residentes en áreas agrícolas con un mayor número de abortos, un incremento en la mortalidad perinatal I y secuelas en el neurodesarrollo de los niños (Restrepo, y cols., 1990; Bell, y cols., 2001, Gupta, 1995), además en recién nacidos en Los Estados Unidos de Norte América se ha informado de la presencia de metabolitos de los organofosforados en meconio, las madres de estos recién nacidos no habían permanecido expuestas laboralmente a estos compuestos y dicha exposición pudiera estar asociada a los plaguicidas que se utilizan en el hogar y jardín en ese país (Whyatt y Barr, 2001). Lo que sugiere que es posible la exposición prenatal en mujeres que no laboran en la agricultura o manejo de estas sustancias. Sin embargo la dosis y el tiempo en el cual las mujeres de áreas agrícolas como las aquí estudiadas son difíciles de cuantificar.

A través del cuestionario estructurado se obtuvo información de riesgo a exposición, en estas zonas de México. Dado que no se cuenta con valores previos de AChE, la valoración de la misma es complicada. Diversos autores (Magnotti, y cols., 1988) han sugerido que el ajuste de la AChE por niveles de hemoglobina podría aportar una información de hasta tres meses previos. En éste estudio aunque fue menor la actividad de la AChE en el grupo del área agrícola, no se observó una diferencia significativa estadísticamente. Por lo anterior propuestas para medir la presencia de metabolitos de compuestos organofosforados en

meconio serían de gran utilidad en éstas áreas con alto riesgo de exposición a dichos tóxicos.

La frecuencia de MN en mujeres entre los 20 y 30 años de edad se ha informado entre 2 y 3 en 1000 células binucleadas por Banadana, y cols., 1993, en la India, y de 6 por Bolognesi, 1993, en Italia. En este estudio el rango para la zona urbana fue de 2-7 con una mediana de 4 MN en 1000 células binucleadas, aunque el rango aquí informado es amplio los promedios son similares a los de estos autores para la misma década de la vida. La gran mayoría de los trabajos sobre daño genotóxico se han realizado en poblaciones laboralmente expuestas a una mezcla de plaguicidas cuyos resultados están en controversia. Mientras en algunos estudios se muestra la evidencia de un incremento (Joksic, y cols., 1997) en la frecuencia de MN poblaciones aledañas a los campos de cultivo con respecto a una zona urbana, en este estudio no se observó diferencia significativa. Bolognesi y cols., 1993, muestran una asociación entre la exposición y la frecuencia de MN a partir de los 36 años de edad, entre los 20 y los 35 años no se aprecia un incremento significativo con relación a los controles lo que sugiere que la edad podría ser factor importante de interacción con la exposición para potencializar el efecto genotóxico. El rango de edad del grupo aquí estudiado fue de 19 a 30 años.

En México se evaluó la frecuencia de MN en células de la mucosa bucal de trabajadores dedicados a la floricultura encontrando un incremento significativo de MN con relación a los controles (Gómez-Arroyo, y cols., 2000).

Otros trabajos no han encontrado evidencia de un incremento en el número de aberraciones cromosómicas como el trabajo de De Cassia, y cols., 1982, en Brasil en donde en trabajadores crónicamente expuestos al paratión metílico se comparó la frecuencia con controles; aquí no se evidenció un incremento en células con aberraciones aunque la

proporción de actividad de la acetilcolinesterasa fue inferior al 76% en los trabajadores expuestos.

Cuando comparamos la frecuencia de MN en recién nacidos clínicamente sanos con aquéllos cuyas madres cursaron con embarazo de alto riesgo se encontró un incremento significativo lo que sugiere que diversos factores podrían estar interactuando para condicionar un mayor daño al ácido desoxiribonucleico del RN en estas condiciones. Sin embargo, el tamaño de la muestra y la diversidad de enfermedades que condicionaron el alto riesgo durante la gestación no permitirían aislar los factores contribuyentes. Sería conveniente estudiar recién nacidos con un tipo de riesgo específico como aquéllos cuyas madres reciben tratamiento con difenilhidantoina, durante el embarazo (Kaul, 1999) .

En conclusión en éste trabajo se identifica la frecuencia de MN al nacer en poblaciones urbanas de México, en recién nacidos que cursan la gestación con un alto riesgo la frecuencia de MN es mayor y no se encontró evidencia para aseverar que las poblaciones que residen en áreas agrícolas con historia de exposición ambiental a plaguicidas la frecuencia de MN se incremente. Sin embargo, ciertos individuos muestran una mayor frecuencia de MN que el promedio, lo cual podría indicar una sensibilidad individual que debe ser investigada.

Referencias:

Aghamohammadi SZ, Henderson L.M, R.J. Cole. The human lymphocyte micronucleus assay. Response of cord blood lymphocytes to gamma-irradiation and bleomycin. *Mutat Res* 1984; 130: 395-401.

Anwar WA. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ Health Perspect* 1997;105 Suppl:801-805.

Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* 2001;109:851-857.

ATSDR . Toxicological profiles, Copyright 1997, CRC press , Inc. Metylparathion.

Auman JT, Seidler FJ, Slotkin TA. Neonatal chlorpyrifos exposure targets multiple proteins governing the hepatic adenylyl cyclase signaling cascade: implications for neurotoxicity. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;121:19-27.

Azaroff LS. Biomarkers of exposure to organophosphorous insecticides among farmers' families in rural El Salvador: factors associated with exposure. *Environ Res* 1999; 80: 138-147.

Banadana B. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutat Res* 1993;295:135-148.

Barbosa A, Bonin AM. Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales, Australia. *Occup Environ Med* 1994;51:700-705.

Barker DJ, Gulkman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-941.

Bates HK, LaBorde JB, Dacre JC, Young FJ. Developmental toxicity of soman in rats and rabbits. *Teratology* 1990;42:15-23.

Bell EM, Hertz-Picciotto I, Beaumont JJ. A case-control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. *Epidemiology* 2001;12:148-156.

Benediktson R, Lindsay R, Noble J, Seckl J, Edwards C. Glucocorticoid exposure in uterus: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993;341:339-341.

Benjaminov O, Hoffer E, Taitelman U, Urbach J, Brandes JM. Parathion transfer and acetylcholinesterase activity in an in vitro perfused term human placenta. *Vet Hum Toxicol* 1992;34:10-12.

Bolognesi C, Parrini M, Bonassi S, Ianello G, Salanitto A. Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutat Res* 1993;285:239-249.

Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Roggieri P, Reggiardo G, Abbondandolo A. Genotoxic risk from occupational exposure to pesticides in floriculture. *Clin Chem* 1995;41: 1919-1022.

Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria Italy. *Mutagenesis* 2002;17:391-397.

Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2003;543:251-272.

Brandt HC, Watson WP. Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann Occup Hyg.* 2003; 47:349-78.

Breslin WJ, Liberacki AB., Dittenber DA, Quast JF. Evaluation of developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 1996;29:119-130.

Brusick D. Fundamentals of genetic toxicity. In: *Principles of genetic toxicology* 1987. 2a. Ed. , New York: 13-50.

Carbonell E, Puig F, Xamena N, Creus R, Marcos R. Sister chromatid exchange in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 1990;5:403-405.

Carbonell E, Valbuena A, Xamena N, Creus A, Marcos R. Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutat Res* 1995;344:127-134.

Chung MK, Kim JC, Han SS. Developmental toxicity of flupyrzofos, a new organophosphorus insecticide, in rats. *Food Chem Toxicol* 2002;40:723-729.

Courtney KD, Andrews JE, Springer J, Dalley L. Teratogenic evaluation of the pesticides baygon, carbofuran, deimethoate and EPN. *J Environ Sci Health B* 1985;20:373-406.

Coye MJ, Lowe JH, Maddy JK. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides. 1:Cholinesterase activity determinants. *J Occup Med* 1986;28: 619- 627.

Dabrowski S, Hanke W, Polanska K, Mackowiec-Dabrowska T, Sovala W. Pesticide exposure and birthweight: An epidemiological study in central Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 2003;16:31-39.

De Cassia R, Becak W, Gaeta R, Rabello-Gay N. Cytogenetic study of workers exposed to methyl-parathion. *Mutat Res* 1982;103:71-76.

Dearfield KL, Stack JA, Quest JA, Whiting RJ, Waters MD. A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity. I. Introduction and first ten chemicals. *Mutat Res* 1993;297:197-233.

Dulout FN, Pastori MC, Olivero OA, Gonzáles CM, Loria D, Matos E, Sobel N, de Bujan EC, Albiano N. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat Res* 1985;143:237-244.

Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *BMJ* 1999;55:578-592.

Ellman G, Courtyne D, Valentino A, Featherstone E. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.

Everson RB. A review of approaches to the detection of genetic damage in the human fetus. *Environ Health Perspect* 1987;74:109-117.

Eskenazi B, Bradman A, Castorina R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect* 1999;10 Suppl 3:409-419.

Falck GCM, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 1999;441:225-237.

Farag AT, Eweidah MH, Tayel SM, El-Sebae AH. Developmental toxicity of acephate by gavage in mice. *Reprod Toxicol* 2000;14:241-245.

Farag AT, El Okazy AM, El-Aswed AF. Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. *Reprod Toxicol* 2003;17:203-208.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29-36.

Fenech M, Morley AA. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei.

Mutat Res 1985;148: 99-105.

Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res* 1994;313:203-207.

Filkins, K. 1998. Normal reproductive and development biology. In: Hage, M., Frazier, L. (Eds.) *Reproductive hazards of the work place*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 207.

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990;87:245-254.

Fuortes LJ, Ayebo AD, Kross BC. Cholinesterase-Inhibiting insecticide toxicity. *Am Fam Phy* 1993;47:1613-1620.

Gangulay B. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors related to donor's age. *Mutat Res* 1993;295:135-148.

Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in workers employed in pesticide production. *Biologia* 1999;54:707-712.

Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 2001;165:153-162.

Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Assessment of the genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis micronucleus assay and comet assay. *J Appl Toxicol* 2002;22:249-255.

Garrett NE, Stack HF, Waters MD. Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides. *Mutat Res* 1986;168:301-325.

Garrison JC, Wytenbach CR. Teratogenic effects of the organophosphate insecticide dicrotophos (Bidrin): histological characterization of defects. *Anat Rec* 1985;213:464-472.

Garry VF, Schreinemachers D, Harkins ME, Griffith J. Pesticide applicers, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environ Health Perspect* 1996;104:394-399.

Garry VF, Danzl TJ, Tarone R, Griffith J, Cervenka J, Krueger L, Whorton EB, Nelson RL. Chromosome rearrangements in fumigant applicers: possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1:287-291.

Gladen BC, Shkiryak-Nyzhnyk ZA, Chyslovska N, Zadorozhnaja TD, Little RE. Persistent organochlorine compounds and birth weight. *Ann Epidemiol* 2003;13:151-157.

Gómez-Arroyo S, Díaz-Sánchez Y, Meneses -Pérez MA, Villaobos-Pietrini R, De León Rodríguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res* 2000;466:117-124.

Gómez-Arroyo S, Noriega-Aldana N, Osorio A, Galicia F, Ling S, Villaobos-Pietrini R. Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides. *Mutat Res* 1992;281:173-179.

González-Cossío T, Peterson K, Sanin LH, Fishbein E, Palazuelos E, Aro A, Hernández-Avila M, Hu H. Decrease in birth weight in relation to maternal bone-lead burden. *Pediatrics* 1997;100:856-862.

González-Horta C, Casillas N, Erives G, Reza-López S, Sanin LH, Levario-Carrillo M. Actividad de la acetilcolinesterasa durante el embarazo y en el recién nacido. *Gin Obst Mex* 2000;68:231-235.

Goulet L, Thériault G. Stillbirth and chemical exposure of pregnant workers. *Scand J Work Environ Health* 1991;17:25-31.

Gupta, R.C., 1995. Environmental agents and placental toxicity: Anticholinesterases and other insecticides. In Sastry, B.V. (Ed.) *Placental Toxicology*. CRS Press, Inc., Tennessee, USA, pp. 257-278.

Gupta RC, Thornburg JE, Stedman DB, Welsch F. Effect of subchronic administration of methyl parathion on *in vivo* protein synthesis in pregnant rats and their conceptuses. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;72:457-468.

Heddle J.A, Kirkhart B, Mavourin K, Macgregor JT, Newell GW, Salomone MF. The Induction of Micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the USEPA Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; 123: 61- 118.

Hanke W, Romitti P, Fuortes L, Sobala W, Mikulski M. The use of pesticides in a Polish rural population and its effect on birth weight. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76:614-620.

Harbison RD, Parathion-induced toxicity and phenobarbital-induced protection against parathion during prenatal development. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;32:482-493.

Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, Estado de México: Centro Panamericano de Ecología y Salud OPS/ OMS;1991: 25.

He F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:S69-76.

Henderson L.M. Aghamohammadi SZ and R.J. Cole. Lack of discernible effects of diagnostic ultrasound on chromosomes of cord blood lymphocytes exposed in utero. *Br J Radiol* 1986, 59,499-503.

Hournai L, Hilton S. Occupational and environmental exposure correlates of adverse live-birth outcomes among 1032 US navy women. *J Occup Environ Med* 2000;42:1156-1165.

Joksić G, Vidaković A, Spasojević-Tišma V. Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ Res* 1997;75:113-118.

Kaul A, Goyle S. Genotoxicity of the anticonvulsant drug phenytoin(PTH) : a follow-up study of PTH-untreated epileptic patients. I. Sister chromatid exchange(SCE) analysis. *Teratog Carcinog Mutagen* 1999;19:61-72.

King MT, Wild D. Transplacental mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. *J Hum Genet* 1979;51:183-194.

Koteles G, Bojtor I, Szirmai S, Berces J, Otos M. Micronucleus frequency in cultured lymphocytes of an urban population. *Mutat Res* 1993;319:267-271.

Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull WHO* 1987;65:663-737.

Kumar KB, Devi KS. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *Vet Hum Toxicol* 1992;34:408-410.

LaBorde JB, Bates HK, Dacre JC, Young JF. Developmental toxicity of sarin in rats and rabbits. *J Toxicol Environ Health* 1996;47:249-265.

Lagunes-Tejeda, A., Rodríguez, J.C., Mota-Sánchez, D., 1994. Combate químico de plagas agrícolas en México. Sáenz, A., Vázquez, J. M., México.

Lieberman AD, Craven MR, Lewis HA, Nemenzo JH. Genotoxicity from domestic use of organophosphate pesticides. *Occup Environ Med* 1998;40:954-957.

Levario-Carrillo M, Feria-Velazco A, De Celis R, Ramos-Martínez E, Córdova-Fierro L, Solís F. Parathion, a cholinesterase-inhibiting plaguicide induces changes in tertiary villi of placenta of women exposed: A scanning electron microscopy study. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52: 269-275.

Lindbohm ML, Hemminki K, Kyyrönen P. Prenatal occupational exposure and spontaneous abortions in Finland. *Am J Epidemiol* 1984;120: 370-378.

Longo LD. Environmental pollution and pregnancy: Risks and uncertainties for the fetus and infant. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:162-73.

Lotti M. Cholinesterase inhibition: Complexities in interpretation. *Clin Chem* 1995;41:1814-1818.

Longnecker M, Klebanoff M, Zhou H, Brock JW. Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small for gestational age babies at birth. *Lancet* 2001;358:110-14.

Machin MG, Mc Bride WG. Teratological study of malathion in the rabbit. *J Toxicol Environ Health* 1989;26:249-253.

Magnotti R, Dowling K, Eberly P, Mc Connell R. Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterases. *Clin Chem Acta* 1988;315:315-332.

Mc Connel R, Heano S, Nieto O, Rosenstock L, Zanaga A, Wesseling C. Plaguicidas en epidemiología ambiental un proyecto para América Latina y el Caribe. Ed. Finkelman J, Corey G, Calderón RR. OMS;1994:153-210.

Mattison DR. The mechanisms of action of reproductive toxins. *Am J Ind Med* 1983; 4: 65-79.

Miller R. Introduction: biomarkers of toxicity during pregnancy. *Environ Health Perspect* 1987;74:77-80.

Muto MA, Lobelle F, Bidanset JH, Wurpel JN. Embriotoxicity in rats associated with prenatal exposure to DURSABAN. *Vet Hum Toxicol* 1992;34:498-501.

Nath J, Tucker JD, Hando JC. Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* 1995;103:725-731.

Nehez M, Berncsi G, Paldy A, Selypes A, Czeizel A, Sentéis I, Csanko J, Levay K, Maurer E, Nagi E. Data on the chromosome examinations of workers exposed to pesticides. *Regul Toxicol Pharmacol* 1981;1:116-122.

Ortega-Ceseña J, Espinoza-Torres F, López-Carrillo L. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el tratado de libre comercio. *Salud Publica Mex* 1994;36:624-632.

Ostera EM, Morales V, Ngoumgna E, Prescilla R, Tan E, Hernández E, Baens G, Cifra H, Manlapaz ML. Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *Neurotoxicology* 2002;23:329-339.

Ostrosky-Wegeman P, Gonsebatt ME. Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos de xenobióticos. *Gac Méd Méx* 1997;133:93-96.

Overpeck MD, Hediger ML, Zhang J, Trumble AC, Klebanoff MA. Birth weight for gestational age of Mexican American infants born in the United States. *Obstet Gynecol* 1999; 93:943-947.

Padmavathi P, Parbhavathi PA, Reddy PP. Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 2000;64:115-160.

Pastor S, Guitierrez S, Creus A, Cebulka-Wasilewska A, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 2001;495:147-156.

Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001;16:539-545.

Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C, Marcos R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ Mol Mutagen* 2002;40:101-109.

Pastor S, Lucero L, Gutiérrez S, Durban R, Gomez C, Pparron T, Creus A, Marcos R. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 2002; 17(1):79-82

Pastor S, Creus A, Tesifon P, Cebulka-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003;18:249-258.

Pastore LM, Hertz-Picciotto I, Beaumont J. Risk of stillbirth from occupational and residential exposures. *Occup Environ Med* 1997;54:511-518.

Peace B, Succop P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values?. *Mutat Res* 1999;425:225-230.

Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, Bernert T, Garfinkel R, Tu YH, Diaz D, Dietrech J, Whyatt RM. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect* 2003;111:201-205.

Petrelli G, Figa-Talamanca I, Tropeano R, Tangucci M, Cini C, Aquilani S, Gasperini L, Meli P. Reproductive male-mediated risk: Spontaneous abortion among wives of pesticide applicators. *Eur J Epidemiol* 2000;16:391-393.

Pope CN, Chakraborti TK, Chapman ML, Farrar JD, Arthun D. Comparison of in vivo

cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* 1991; 68, 51-61.

Repetto M, Martínez D, Sanz P. 1995. Actualización de la toxicología de los plaguicidas. En: *Toxicología avanzada*. Ed. Díaz de Santos. Madrid. P. 577.

Restrepo M, Muñoz N, Day NE, Parra JE, de Romero L, Nguyen-Dinh X. Prevalence of adverse reproductive outcomes in population occupationally exposed to pesticides in Colombia. *Scand J Work Environ Health* 1990;16:232-238.

Restrepo M, Muñoz N, Day N, Parra JE, Hernández C, Blettner M, Giraldo A. Birth defects among children born to a population occupationally exposed to pesticides in Colombia. *Scand J Work Environ Health* 1990;16:239-246.

Richter E, Rosenvald Z, Levy S, Gruener N. Sequential cholinesterase tests and symptoms for monitoring organophosphate absorption in field workers and persons exposed to pesticide spray drift. *Toxicol Lett* 1986;33:25-35.

Roan CC, Matanoski GE, McIlroy CQ, Olds KL, Pylant F, Trout JR, Wheeler P, Morgan DP. Spontaneous abortions, stillbirths, and birth defects in families of agricultural pilots. *Arch Environ Health* 1984;39:55-60.

Rothman, K.J., 1987. Análisis estratificado. En: *Epidemiología Moderna*. Ediciones Díaz de Santos, S.A., Massachusetts, USA. pp 199-204.

Rupa DS, Rita P, Reddy PP, Reddi OS . Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Hum Toxicol* 1988;7:333-336.

Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields. *Mutat Res* 1989;22: 37-41.

Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. Reproductive performance in population exposed to pesticides in cotton fields in India. *Environ Res* 1991;55:123-128.

Rylander L, Strömberg U, Hagmar L. Lowered birth weight among infants born to women with a high intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Chemosphere* 2000;40:1255-1262

Salamanca F., 1993. Citogenética y mutagénesis. En: *Citogenética Humana*. Editorial Médica Panamericana. México D. F. Pp,219-233.

Sanin LH, Reza S, Tufiño E, Corral M., Robles, M.A, Levario-Carrillo M. Relation between birth weight and placenta weight. *Biol Neonate* 2001; 80,113-117.

Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and Sterility* 1998;70:613-622.

Sastry BV. Human placental cholinergic system. *Biochem pharmacol* 1997; 53:1577-1586.

Savitz DA, Whelan EA, Kleckner RC. Self-reported exposure to pesticides and radiation related to pregnancy outcome results from national natality and fetal mortality surveys. *Public Health Rep* 1989;104:473-477.

Savitz DA, Arbuckle T, Kaczor D, Curtis KM. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 1997;146:1025-1036.

Saxena MC, Siddiqui MK, Seth TD, Krishna CR, Bhargava AK, Kutty D. Organochlorine pesticides in specimens from women undergoing spontaneous abortion, premature of full-term delivery. *J Anal Toxicol* 1981;5:6-9.

Shaham J, Kaufman Z, Gurvich R, Levi Z. Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 2001;491:71-80.

Siddiqui MK, Sirbastava SP, Mehrotra PK, Mathur N, Tandon I. Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76:75-80.

Sirvastava MK, Raizada RB. Development effect of technical dimethoate in rats: maternal and fetal toxicity evaluation. *Indian J Exp Biol* 1996;34:329-333.

Slotkin TA. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect* 1999;107 (Suppl 1): 71-80.

Soni I, Bhatnagar P. Embryotoxic and teratogenic studies of phosphamidon in swiss albino mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 1989;9:253-257.

Staples RE, Kellman RG, Haseman JK. Developmental toxicity in the rat after ingestion or gavage of organophosphate pesticides (Diptrex, Imidan) during pregnancy. *Environ Health Perspect* 1976;13:133-140.

Sultatos LG, Gagliardi CL. Desulfuration of the insecticide parathion by human placenta in vitro. *Biochem Pharmacol* 1990;39:799-801.

Sunil KB, Ankathil R, Devi KS. Chromosomal aberrations induced by methylparathion in human peripheral lymphocytes of alcoholics and smokers. *Hum Exp Toxicol* 1993;12:285-288.

Taha T, Gray R. Agricultural pesticide exposure and perinatal mortality in central Sudan. *Boull World Health Organ* 1993;71:317-321.

Taipale O, Hilesma V. Predicting delivery date by ultrasound and last menstrual period in early gestation. *Obstet Gynecol* 2001;97:189-194.

Terrones S, Llamas J, Jaramillo F, Espino MG, León S. 2000. DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazos de término. *Gin Obst Mex* 68, 97-104.

Thiernes H, Vral A, De Ridder L. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat Res* 1996;360:75-82.

Thomas DC, Petitti DB, Golhaber M, Swan SH, Rappaport EB, Hert-Picciotto I. Reproductive outcomes in relation to malathion prying in the San Francisco Bay area, 1981-1982. *Epidemiology* 1992;3:32-39.

Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinish F, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo : a study of malathion exposed workers. *Mutat Res* 1997; 388:85-95.

Torres-Arreola L, Berkowitz G, Torres Sánchez L, López -Cervantes M, Cebrian M, Uribe M, López-Carrillo L. Preterm birth in relation to maternal organochlorine serum levels. *Annals of Epidemiology* 2003;13:158-162.

Waliszewski S, Aguirre A, Infanzon R, Siliceo J. Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Pública Mex* 2000;42:384-390.

Wang RGM, Franklin CA, Honeycutt RC, Reinert JC. Measurement, estimation and risk reduction. In: *Biological monitoring for pesticide exposure*. Wang RGM (ed.) American Chemical Society, Washington DC, 1989;6-23.

Weitman SD, Vodcink MJ, Lech JJ. Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;71:215-224.

Whyatt R, Barr DB. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: A Validation study. *Environ Health Perspect* 2001;109:417-420.

Williams RL, Creas RJ, Cunningham GC, Hawes WE, Norris FD, Tashiro M. Fetal growth and perinatal viability in California. *Obstet Gynecol* 1982.;59, 624-632.

Willis WO, De Peyster A, Molgaard CA, Walker C, Mackendrick T. Pregnancy outcome among women exposed to pesticides through work or residence in an agricultural area. *JOM* 1993;35:943-949.

White F, Cohen F, Sherman G, Mc Curdy R. Chemicals, birth defects and stillbirths in New Brunswick: associations with agricultural activity. *CMAJ* 1988;138:117-124.

Xiang H, Nuckols JR, Satallones L. A geographic information assessment of birth weight and crop production patterns around mother's residence. *Environ Res* 2000;82:160-167.

Yoder J, Waston M, Benson WW. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutat Res* 1973;21: 335-340.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 2001;16:359-363.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere* 2002; 46: 295-303.

Zhang J, Cai WW, Lee DJ. Occupational hazards and pregnancy outcomes. *Am J Ind Med* 1992;21:397-408.

Cuadro 1.

Órganofosforados más utilizados y sus metabolitos

| Plaguicidas | Principales metabolitos | | | | | |
|-----------------|-------------------------|------|-------|-----|------|-------|
| | DMF | DMTF | DMDTF | DEF | DETF | DMDTF |
| Azifos metílico | X | X | X | | | |
| Clorpirifos | | | | X | X | |
| Diazinón | X | X | X | | | |
| Malatión | X | X | X | | | |
| Paratión | | | | X | X | |
| Metilparatión | X | X | | | | |
| Forate | | | | X | X | X |
| Terbufos | | | | X | X | X |

DMF= Dimetilfosfato

DMTF= Dimetiltipofosfato

DMDTF= Dimetilditiofosfato

DEF= Dietilfosfato

DETF= Dietiltiofosfato

DEDTF= Dietilditiofosfato

Cuadro 2.

Plaguicidas utilizados en el área de estudio

| Órganofosforados | Órganoclorados | Carbamatos | Piretroides |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| Acefato | Endosulfán | Carbaril | Cipermetrina |
| Azinfos metílico | | Carbofurán | |
| Clorpirifos | | Metomil | |
| Diazinón | | Oxamil | |
| Dimetoato | | | |
| Malatión | | | |
| Monocrotofos | | | |
| Metiparatión | | | |
| Terbufos | | | |

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 3.
Factores asociados al retardo en el crecimiento intrauterino.

| Variable | Casos n(%) | Controles n(%) | OR * | IC 95% † |
|---|------------|----------------|------|-------------|
| Edad materna (años) | | | | |
| <20 y >35 | 26(33) | 73(25) | 1.47 | (0.85-2.52) |
| 20-35 | 53(67) | 219(75) | 1.00 | |
| Número de embarazo | | | | |
| Primigesta | 31(39) | 105(36) | 1.15 | (0.69-1.91) |
| Multigesta | 48(61) | 187(64) | 1.00 | |
| Antecedente de muerte fetal | | | | |
| Positivo | 8(10) | 24(8) | 0.98 | (0.78-1.22) |
| Negativo | 70(90) | 263(92) | 1.0 | |
| Ocupación materna | | | | |
| Fuera del hogar | 31(39) | 106(37) | 1.12 | (0.67-1.86) |
| Hogar | 48(61) | 184(63) | 1.00 | |
| Hemoglobina materna | | | | |
| <110 g/L | 37(47) | 166(58) | 0.65 | (0.39-1.08) |
| ≥110 g/L | 41(53) | 121(42) | 1.00 | |
| Talla materna (cm) | | | | |
| ≤150 | 8(10) | 21(7) | 1.44 | (0.61-3.39) |
| 151-159 | 31(39) | 89(31) | 1.45 | (0.87-2.44) |
| 160 o > | 40(51) | 180(62) | 1.00 | |
| Masa magra(Kg) | | | | |
| ≤45 | 34(43) | 72(25) | 2.30 | (1.37-3.87) |
| 45.1/50 | 20(25) | 62(21) | 2.06 | (0.69-2.21) |
| >50 | 25(32) | 158(54) | 1.00 | |
| Género del recién nacido | | | | |
| Femenino | 41(52) | 158(54) | 1.27 | (0.77-2.09) |
| masculino | 38(48) | 134(46) | 1.00 | |
| Anticuerpos IgM frente a Citomegalovirus | | | | |
| Presentes | 5(6) | 7(2) | 2.75 | (0.84-8.91) |
| Ausentes | 74(94) | 285 (98) | 1.00 | |

| | | | | |
|--|--------|---------|------|--------------|
| Anticuerpos IgM contra Toxoplasma | | | | |
| Presentes | 1(1) | 11(4) | 0.32 | (0.04-2.59) |
| Ausentes | 76(99) | 271(96) | 1.00 | |
| | | | | |
| Anticuerpos IgM contra virus de la Rubéola | | | | |
| Presentes | 6(8) | 16(6) | 1.40 | (0.53-3.72) |
| Ausentes | 73(92) | 274(94) | 1.00 | |
| | | | | |
| Peso de la placenta (g) | | | | |
| ≤ 425 | 33(42) | 22(8) | 8.80 | (4.71-16.42) |
| >425 | 46(58) | 270(92) | 1.00 | |
| | | | | |
| Antecedente de exposición a plaguicidas | | | | |
| Positivo | 14(18) | 22(8) | 2.64 | (1.28-5.44) |
| Negativo | 65(82) | 270(92) | 1.00 | |

* OR crudo, † Intervalo de confianza (95%).

Cuadro 4.

Características del Recién nacido

| Variable | Casos N = 104 | Controles N = 346 | p |
|--------------------------------|------------------|----------------------|-------|
| Peso(g) | 2630±225 | 3415±434 | <0.01 |
| Longitud (cm) | 50±3 | 53±3 | <0.01 |
| Peso de la placenta(g) | 467±119 | 589±115 | <0.01 |
| Perímetro cefálico(cm) | 33±2 | 34±2 | <0.01 |
| Perímetro torácico(cm) | 31±2 | 34±2 | <0.01 |
| Perímetro abdominal(cm) | 29±2 | 32±2 | <0.01 |
| Hemoglobina (g/L) | 160±3 | 150±2 | 0.36 |
| Acetilcolinesterasa (U/mL)* | 3.67±1 | 4.02±1 | <0.01 |

* n= 102 RN con diagnóstico de retardo en el crecimiento intrauterino y 344 RN clínicamente sanos.

Cuadro 5.

Relación entre la exposición a plaguicidas y el retardo en el crecimiento intrauterino, OR ajustado por masa materna libre de grasa, peso de la placenta y anticuerpos anti-citomegalovirus.

| Variable | OR* | IC 95% † | p |
|---|-----|----------|-------|
| Exposición a plaguicidas | 2.3 | 1.0-5.3 | 0.04 |
| Masa magra (kg) ≤45 | 2.1 | 1.2-3.8 | 0.01 |
| Peso de la placenta (g) ≤425 | 8.6 | 4.5-16.4 | <0.01 |
| Anticuerpos IgM contra citomegalovirus positivo | 3.7 | 1.0-13.6 | 0.05 |

*OR ajustado n = 371 pares madre/ recién nacido que contaban con el 100% de las variables bajo estudio. † Intervalo de confianza (95%)

Cuadro 6.

Características clínicas de los grupos estudiados para determinar la asociación entre la exposición prenatal a plaguicidas y la frecuencia de micronúcelos.

| Variable | Área urbana Grupo I X±DE* | Área urbana Grupo II X±DE* | Área agrícola X±DE* | Grupo con embarazo de alto riesgo X±DE* | p |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--|-------|
| Edad (años) | 25±6 | 27±6 | 24±4 | 28±7 | 0.33 |
| Semanas de gestación | 39±1 | 39±1 | 40±1 | 38±1 | 0.08 |
| Número de embarazo | 2±1 | 2±1 | 2±1 | 2±1 | 0.45 |
| Número de consultas prenatales | 6±2 | 6±2 | 7±2 | 7±3 | 0.46 |
| Peso del recién nacido (g) | 3356±4 | 3062±27 | 3241±394 | 2866±609 | <0.01 |
| Longitud del recién nacido(cm) | 51±3 | 49±1 | 52±2 | 49±2 | 0.02 |

Cuadro 7.
Frecuencia de micronúcleos por 1000 células binucleadas

| | Área urbana Grupo I | Área urbana Grupo II | Área agrícola Grupo III | Embarazo de p alto riesgo Grupo IV | p |
|--------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|--|---------------------|
| | X±DE* (Rango) | X±DE* (Rango) | X±DE* (Rango) | X±DE* (Rango) | |
| Recién nacido § | 1±1(0-5) † | 1±0.75(0-3) | 2±1 (0-5) † | 5±2 (2-8) ‡ | 0.17† ‡<0.01 |
| Madre¶ | 3.7± 1.4(2-7) | N.R. £ | 4.5±4 (0-9) | N.R.£ | 0.65 |

*Media ± desviación estándar. † Diferencia en MN entre RN de áreas urbanas y agrícolas.
‡ Diferencia en MN entre RN de embarazo de alto y bajo riesgo. § Grupo I, n = 21 RN clínicamente sanos de Chihuahua México, Grupo II, n =12 RN clínicamente sanos México D. F. Grupo III, n =16 RN de áreas agrícolas y Grupo IV, n =15 RN que cursaron la gestación con alto riesgo.
¶ n =16 madres de áreas urbanas , n =15 madres de áreas agrícolas. £ no realizado.

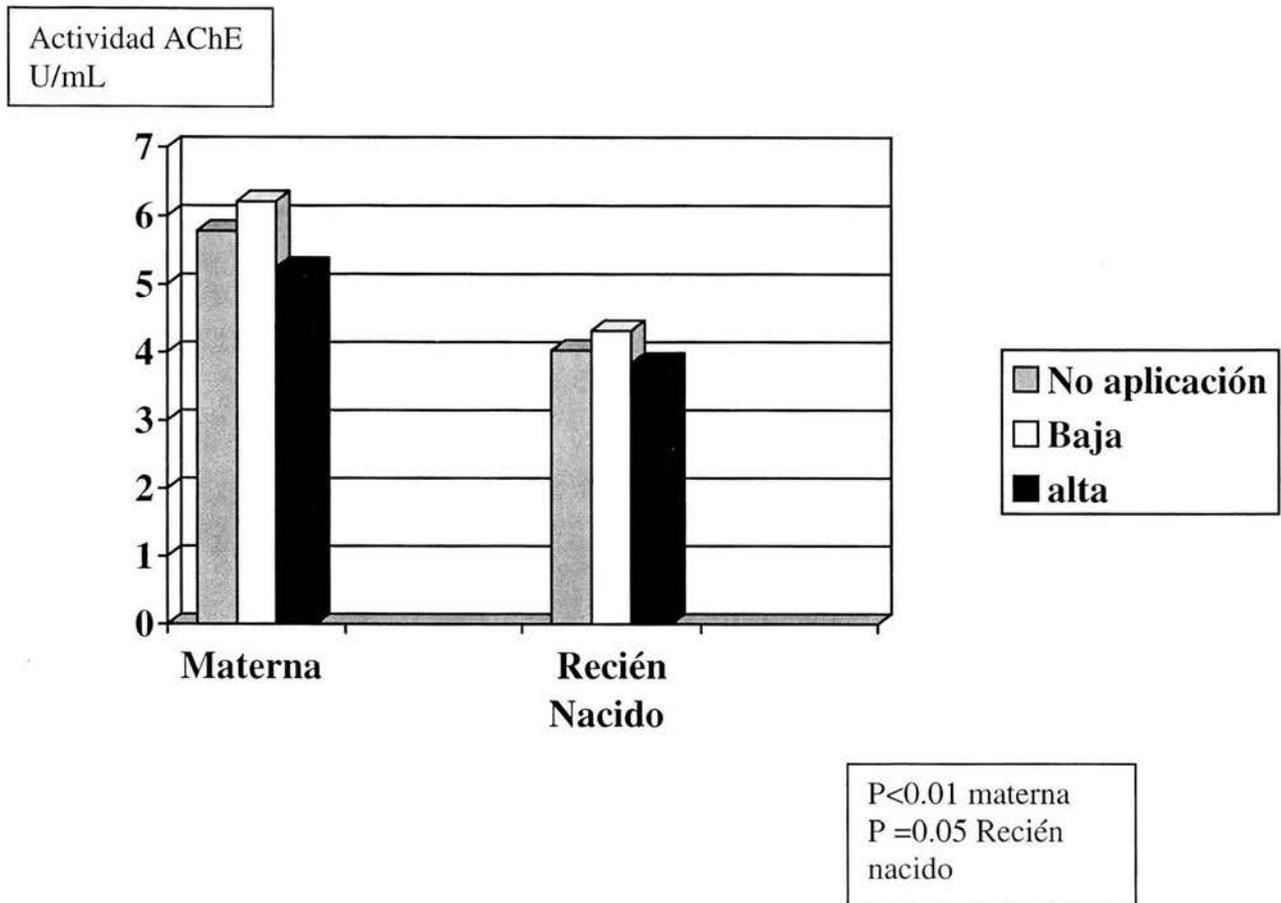


Figura 1.

Actividad de la AChE materna y en el RN según temporada de aplicación de plaguicidas

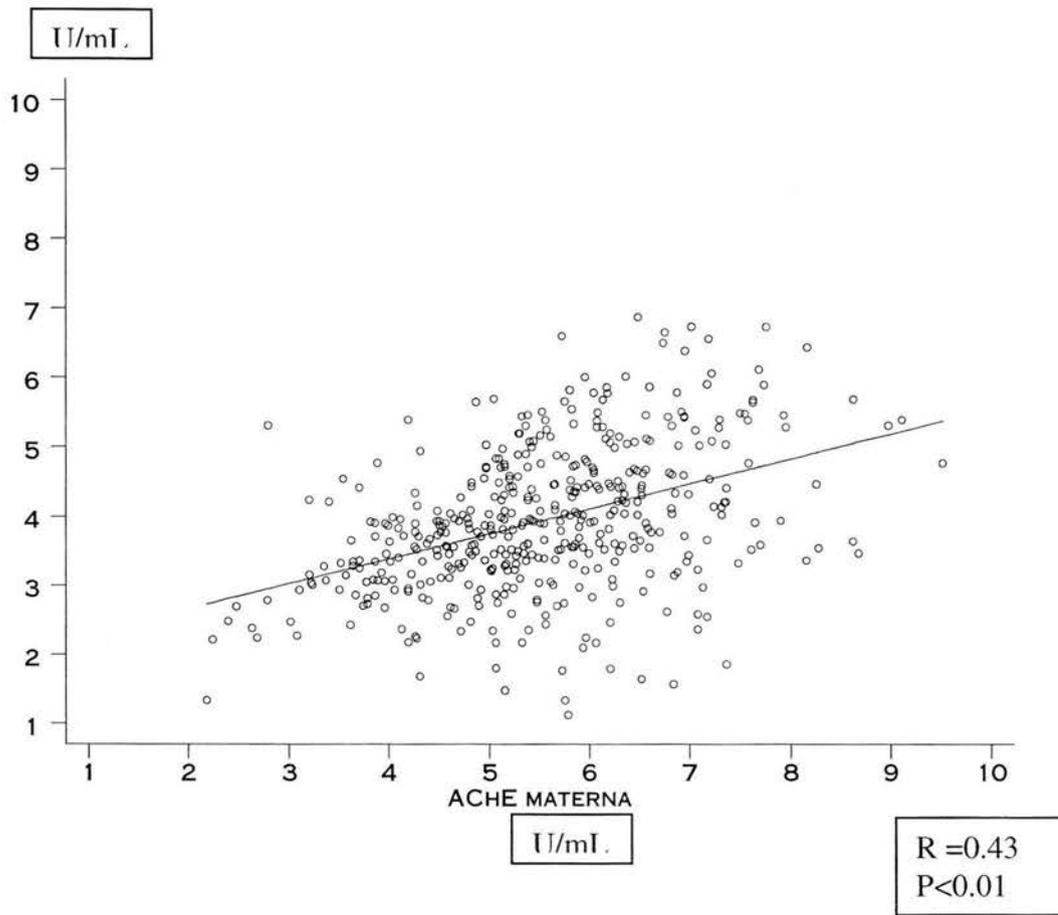


Figura 2. Correlación entre la actividad de la acetilcolinesterasa(AChE) materna y del recién nacido.

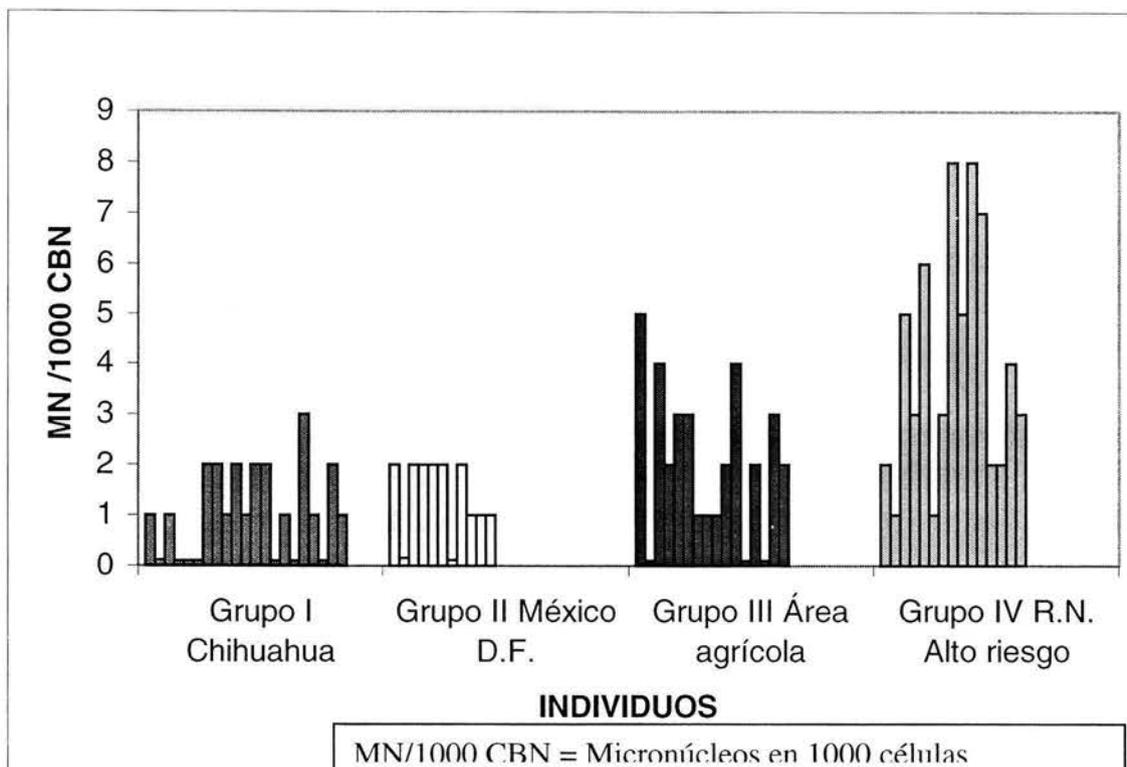
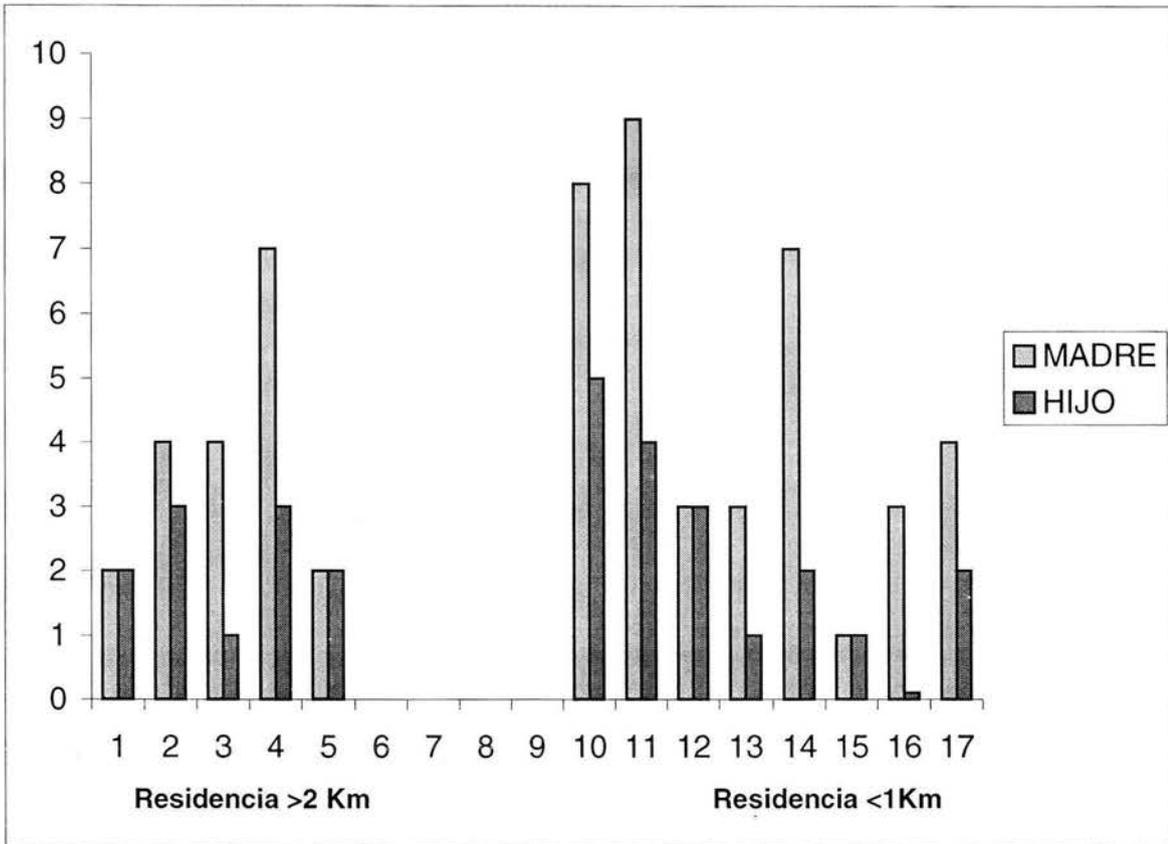


Figura 3. Frecuencia de Micronúcleos en recién nacidos

MN/1000 CBN



M N= Frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas (CBN).
Residencia > 2Km: Pacientes que durante la gestación residieron entre 2 y 5 Km de distancia de las áreas de cultivo y aplicación de insecticidas.
Residencia < 1Km: Pacientes que durante la gestación residieron a una distancia \leq 1Km de distancia de las áreas de cultivo y aplicación de insecticidas.

Figura 4. Frecuencia de micronúcleos en pares madre- hijo de Delicias, Chihuahua, México.

12. Anexo 1.

Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation

Margarita Levario-Carrillo ^{a,*}, Dante Amato ^a, Patricia Ostrosky-Wegman ^b,
Carmen González-Horta ^c, Yolanda Corona ^a, Luz Helena Sanin ^c

^a *Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Hospital de Ginecología y Obstetricia IMSS, Av. División del Norte 2300 CH 44-228, Colonia Altavista, CP 31320 Chihuahua, México*

^b *Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F., 04510 México*

^c *Universidad Autónoma de Chihuahua, 31000 Chihuahua, México*

Received 2 January 2003; received in revised form 20 October 2003; accepted 10 November 2003

Abstract

The increased use of organophosphorus insecticides in agriculture and their widespread existence in the environment poses a potential health hazard.

To determine the relationship between exposure to pesticides and intrauterine growth retardation (IUGR), live newborns from singleton pregnancies, with ($n = 79$) and without ($n = 292$) IUGR were studied. During the gestational period the mothers were living in agricultural communities in the state of Chihuahua, Mexico. Exposure to agro-chemical products was evaluated. A significant association between the history of positive exposure to pesticides (i.e. the women themselves or their newborns who showed acetylcholinesterase activity levels lower than 20%) and the presence of IUGR was found. The proportions of exposure in the cases were 18% and 8% in the control group; the adjusted OR (fat free mass, anti-cytomegalovirus antibodies and placental weight) was 2.33 ($p = 0.04$).

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Intrauterine growth retardation; Pesticides; Acetylcholinesterase; Organophosphoric; Birthweight

1. Introduction

Intrauterine growth retardation (IUGR) has been related to increased prenatal morbidity and mortality (Kramer et al., 1990; Rizzo and Arduini, 1991), limited growth during childhood and adolescence (Strauss and Dietz, 1997; Saigal et al., 2001) and a greater proportion of cardiovascular and metabolic diseases in adult life (Barker et al., 1993; Benediktson et al., 1993).

Factors related to IUGR include maternal diseases, placental pathology, and newborns' diseases. Also linked to IUGR is maternal body composition, highly associated with infant birth weight (Lederman et al., 1999). One of the features of congenital infection (cytomegalovirus, rubella and toxoplasmosis) is IUGR (Yankowitz and Weiner, 1999).

During the gestational period the exposure to toxics, (Kramer, 1987) like maternal tobacco addiction (Christianson, 1979), cocaine addiction (Ostrea et al., 1997), exposure to lead (González-Cossío et al., 1997), or other toxics such as pesticides (Kramer, 1987) may also be associated to IUGR. There have been reports of a links between exposure to pesticides during the gestational period and adverse reproductive outcomes (De Cock et al., 1994; Arbuckle et al., 2001), in populations

* Corresponding author. Tel.: +52-614-413-0725; fax: +52-614-413-0925.

E-mail addresses: mlevario@lycos.com, margarita.levario@imss.gob.mx (M. Levario-Carrillo).

exposed to these substances as well as low birth weight (Sanjose et al., 1991). In animal models, the perinatal effects have been similar but only low birth weight has been consistently associated to exposure in a large number of research studies (Gupta, 1995).

Exposure to organophosphate compounds can be occupational or environmental. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry of the United States (ATSDR, 1997) reports that populations in close proximity to areas where methyl-parathion was used have an increased risk of exposure through skin contact and contaminated water, food and plants.

The objective of this study was to determine the relation between environmental exposure to cholinesterase inhibitory pesticides and IUGR, adjusted by most documented predictors of IUGR in an agricultural region in the state of Chihuahua, Mexico, consisting of agricultural communities with zones of intensive cropping (26000 ha) and usage of pesticides, mainly from the cholinesterase inhibiting group, such as chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, malathion, monocrotophos, and methyl parathion (Lagunes-Tejeda et al., 1994).

2. Patients, material and methods

Live newborns from singleton pregnancies, with (case) and without IUGR (control) were studied. They had been born to mothers living in agricultural communities in the state of Chihuahua, Mexico during the gestational period. A case-control study design was used. The study was carried out during the 2000–2001 period. Only patients who had information about their last menstrual period were included. The influence of other factors reportedly linked to IUGR was evaluated, such as mother's age (under 20 or over 35 years), primiparous mothers, maternal occupation outside the home, maternal anemia, history of urinary tract infections, maternal nutrition, newborn's gender, maternal infections during the gestational period and placental weight. The exclusion criteria were a history of preeclampsia, eclampsia, arterial hypertension or diabetes mellitus (gestational diabetes, insulin dependent diabetes or non-insulin dependent diabetes), and diazepam or phenobarbital treatment during the pregnancy.

2.1. Study groups

2.1.1. Newborns with IUGR

Newborns with weight for gestational age <10th percentile (Overpeck et al., 1999), without apparent congenital malformations and without evidence of intrauterine infection, were included to complete the sample size, and were integrated to the case group.

2.1.2. Clinically healthy newborns

The control group was formed with newborns with weight for the gestational age over the 10th percentile, according to Overpeck et al. (1999), with similar clinical characteristics as in the IUGR group.

3. Procedures

Mother/newborn pairs were recruited from the Hospital General de Zona 11, Instituto Mexicano del Seguro Social in Delicias, Chihuahua. A screening was done to evaluate IUGR. The weeks of gestation were determined according to the last menstrual period, classifying as newborns with IUGR the ones who according to the weeks of gestation had a lower weight than the 10th percentile in the tables of Overpeck et al. (1999). The protocol was approved by the Hospital's institutional review board. When the mothers were invited, the objectives and steps of the study were explained to them. All the participants read and signed an informed consent form. An interview was carried out in order to evaluate exposure to agrochemical products during the gestational period, a structured questionnaire was completed and after delivery, a blood sample was taken to determine acetylcholinesterase (AChE) activity (Ellman et al., 1961), hemoglobin (spectrophotometry, automatic Cell-Dyn 3700 SL hematology analyzing system) and a qualitative estimate of serum IgM antibodies against rubella virus, *Toxoplasma gondii* and cytomegalovirus, using an enzyme-immunoassay for microparticles. Serum samples were stored frozen at -20°C until assayed in an IMX System. Newborns blood sample was collected from the umbilical cord vein for measuring acetylcholinesterase and hemoglobin. Maternal coaguli were removed from the placentas after delivery and the after that, placentas were placed in a plastic bags and weighed on a previously calibrated pediatric scale.

Electric bioimpedanciometry was made with a Body Dynamics 310 corporal composition analyzer 4–12 h after delivery as follows: maternal weight and height were measured, and then in semi-flower position with 30° inclination, the sensor pads were placed in the right hand, forearm, foot, and leg.

Previously trained personnel already familiar with standard procedures being used evaluated the anthropometric variables.

A research was carried out with the Plant Health authorities in the State of Chihuahua, Mexico, and with agrochemical products vendors in order to find what pesticides were had been used in each area where the patients had been living during the time the research for this work was in progress.

To consider a mother/newborn pair to be exposed to cholinesterase inhibiting pesticides two of the following criteria should be met: (1) a positive history of prenatal

exposure to pesticides, determined by living 1 km or less from the crop areas and usage of pesticides during the gestational period in those areas, (2) a spouse or relative living in the same residence who used or handled pesticides, (3) a spouse working in agriculture. Besides, maternal or newborn acetylcholinesterase activity decreased 20% or more with respect to the average enzymatic activity in the same community during a time when pesticides were not applied (Lotti, 1995). This criteria were built up to separately evaluate each one of the mentioned variables and to determine which variables in the group identified the mother/newborn pair with a positive history of exposure to pesticides.

4. Acetylcholinesterase measurement

The Ellman et al. method was used with the modifications suggested by the World Health Organization. 1:900 of 10 μl of total blood was diluted in 9 ml phosphate shock absorber 0.1 M, pH 8; 3 ml of this suspension were placed in a bucket with 100 μl of DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic) 0.01 M prepared in a phosphate shock absorber 0.1 M, pH 7.5.

The reaction was initiated by adding 50 μl of acetylthiocholine iodide 1.0 M and readings were done on the 1st and 4th min. Throughout the test the temperature was registered. For each μmol of thiocholine present, one mol of intense yellow thionitrobenzoate anion was formed with a value of $13\,600\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ as a coefficient of molar extinction. The resulting values were corrected to 25 °C multiplying the activity values by the corresponding temperature factor. One enzyme unit was defined as the necessary amount to form one μmol of thiocholine per minute at 25 °C. The results are reported in units (U) per milliliter. The values of the cholinesterase activity were adjusted by the hemoglobin values.

5. Statistical analysis

The relationship between the cholinesterase inhibiting pesticides exposure and IUGR was examined and corrected by the most documented birth weight predictors (Kramer, 1987; González-Cossío et al., 1997; Sanin et al., 2001). First, a descriptive data analysis was conducted to understand the characteristics of the study group. In order to detect the main predictors of IUGR as well as the potential confounders of this relationship, a multivariate analysis was conducted using logistic regression models. We choose the best model by dropping covariates one by one from a saturated model that included all variables with $p < 0.10$ in the bivariate analysis. Confounding was evaluated according to the percentage of change of the odd ratios (OR) with respect to that of the main association (Rothman, 1987).

The measured variables included: maternal fat-free mass (kg), maternal height (cm), maternal age (years), maternal hemoglobin level (g/l), tobacco addiction, occupation, parity, placental weight (g), IgM antibodies against rubella virus, *T. gondii* and cytomegalovirus, as well as the newborn's gender.

The final multivariate model included all important confounders and predictors with a statistically significant association. The results were expressed as OR, calculated by the method of maximum likelihood with corresponding 95% confidence interval (95%CI). The adjustment of the final model was tested according to the standard techniques proposed by Hosmer and Lemeshow (2000).

All the analyses and sample size calculations were performed using Stata (Stata Statistical Software, Release 5.0, Stata Corporation, College Station, TX). The sample size was calculated for a 90% statistical power, with a 95% confidence level, expecting to find 10% of exposure to cholinesterase inhibiting pesticides in the healthy group and 25% in the IUGR group, according to the results of a pilot study.

6. Results

During study period 6109 deliveries occurred in the hospital and the patients included in the study represent 7.36% of them. Four hundred and fifty women and their newborns were included; 104 newborns with IUGR and 346 clinically healthy newborns. The final analysis was carried on 371 mother/newborn pairs, 79 with IUGR and 292 without IUGR, because some variables were missing: placental weight ($n = 27$), anti-cytomegalovirus IgM antibodies ($n = 48$), maternal fat-free mass ($n = 8$), and newborn AChE ($n = 4$). There were no statistically significant differences between mother/newborns pairs included and not included in the final analysis regarding the available variables.

The clinical characteristics of the mothers (Table 1) were similar. There was fetal death antecedent in 10% of the IUGR group and 8% of the healthy group, but this difference was not statistically significant ($p = 0.79$). Tobacco smoking during the gestational period was present in 4% of the IUGR group and 2% of the healthy group ($p = 0.23$).

The enzymatic activity of AChE decreased during the months of greater use of pesticides in patients assessed during this time (5.24 ± 1.16 IU—April to August), compared to the non-use period 5.78 ± 1.21 UI (October–February) or those in which the use was minimal (March and September) 6.21 ± 1.25 UI ($p < 0.01$). There was a statistically significant correlation between the maternal and the newborn acetylcholinesterase activities $r = 0.43$ ($p < 0.01$). The inter-individual variability of AChE activity was 22% in the mothers, and 26% in the newborns.

Table 1
Crude odd ratios for intrauterine growth retardation according to some clinical characteristics

| Variable | IUGR n(%) | Healthy n(%) | OR _(95%CI) ^a |
|---|-----------|--------------|------------------------------------|
| <i>Maternal age (years)</i> | | | |
| <20 and >35 | 26(33) | 73(25) | 1.47(0.85–2.52) |
| 20–35 | 53(67) | 219(75) | 1.00 |
| <i>Parity</i> | | | |
| Primiparous | 31(39) | 105(36) | 1.15(0.69–1.91) |
| Multiparous | 48(61) | 187(64) | 1.00 |
| <i>Fetal death antecedent</i> | | | |
| Present | 8(10) | 24(8) | 0.98(0.78–1.22) |
| Absent | 70(90) | 263(92) | 1.0 |
| <i>Maternal occupation</i> | | | |
| Outside home | 31(39) | 106(37) | 1.12(0.67–1.86) |
| Home | 48(61) | 184(63) | 1.00 |
| <i>Maternal hemoglobin</i> | | | |
| <110 g/l | 37(47) | 166(58) | 0.65(0.39–1.08) |
| ≥110 g/l | 41(53) | 121(42) | 1.00 |
| <i>Maternal height (cm)</i> | | | |
| ≤150 | 8(10) | 21(7) | 1.44(0.61–3.39) |
| 151–159 | 31(39) | 89(31) | 1.45(0.87–2.44) |
| ≥160 | 40(51) | 180(62) | 1.00 |
| <i>Fat-free mass (kg)</i> | | | |
| ≤45 | 34(43) | 72(25) | 2.30(1.37–3.87) |
| 45.1–50 | 20(25) | 62(21) | 2.06(0.69–2.21) |
| >50 | 25(32) | 158(54) | 1.00 |
| <i>Newborn's gender</i> | | | |
| Female | 41(52) | 158(54) | 1.27(0.77–2.09) |
| Male | 38(48) | 134(46) | 1.00 |
| <i>IgM antibodies for a cytomegalovirus</i> | | | |
| Present | 5(6) | 7(2) | 2.75(0.84–8.91) |
| Absent | 74(94) | 285(98) | 1.00 |
| <i>IgM antibodies for a toxoplasm</i> | | | |
| Present | 1(1) | 11(4) | 0.32(0.04–2.59) |
| Absent | 76(99) | 271(96) | 1.00 |
| <i>IgM antibodies for rubella virus</i> | | | |
| Present | 6(8) | 16(6) | 1.40(0.53–3.72) |
| Absent | 73(92) | 274(94) | 1.00 |
| <i>Placental weight (g)</i> | | | |
| ≤425 | 33(42) | 22(8) | 8.80(4.71–16.42) |
| >425 | 46(58) | 270(92) | 1.00 |
| <i>Pesticide exposure</i> | | | |
| Positive | 14(18) | 22(8) | 2.64(1.28–5.44) |
| Negative | 65(82) | 270(92) | 1.00 |

^a 95% confidence interval.

No differences of maternal body composition were observed except for fat free mass, which was lower in women whose newborns were classified as having IUGR ($p \leq 0.01$).

The characteristics of the newborns (Table 2) were different by design in both study groups. The levels of

AChE activity were lower in the case group ($p = 0.01$). Anti-cytomegalovirus antibodies were positive in a greater proportion in the case (9%) than in the control group (2%, $p < 0.01$); IgM antibodies against rubella virus and *T. gondii* did not show significant differences.

Table 2
Newborn's characteristics

| Variable | IUGR <i>n</i> = 104 | Healthy <i>n</i> = 346 | <i>p</i> |
|--|------------------------|---------------------------|----------|
| Weight (g) | 2630 ± 225 | 3415 ± 434 | <0.01 |
| Length (cm) | 50 ± 3 | 53 ± 3 | <0.01 |
| Placental weight (g) | 467 ± 119 | 589 ± 115 | <0.01 |
| Cephalic perimeter (cm) | 33 ± 2 | 34 ± 2 | <0.01 |
| Thoracic perimeter (cm) | 31 ± 2 | 34 ± 2 | <0.01 |
| Abdominal perimeter (cm) | 29 ± 2 | 32 ± 2 | <0.01 |
| Hemoglobin (g/l) | 160 ± 3 | 150 ± 2 | 0.36 |
| Acetylcholinesterase (U/ml) ^a | 3.67 ± 1 | 4.02 ± 1 | <0.01 |

^a *n* = 102 (IUGR) and *n* = 344 (healthy).

Table 3
Adjusted odds ratios of pesticide exposure, fat-free mass, placental weight, and anti-cytomegalovirus antibodies as risk factors for intrauterine growth retardation

| Variable | OR ^a | 95% CI ^b | <i>p</i> |
|--|-----------------|---------------------|----------|
| Pesticide exposure | 2.3 | 1.0–5.3 | 0.04 |
| Fat-free mass ≤ 45 kg | 2.1 | 1.2–3.8 | 0.01 |
| Placental weight ≤ 425 g | 8.6 | 4.5–16.4 | <0.01 |
| Positive anti-cytomegalovirus IgM antibodies | 3.7 | 1.0–13.6 | 0.05 |

^a OR adjusted *n* = 371 mother/newborn pairs with 100% availability of the variables under study.

^b 95% confidence interval.

The association between pesticide exposure and IUGR, adjusted for the others variables with *p* < 0.10 in the bivariate analysis, was also evaluated by logistic regression. The OR for pesticide exposure did not significantly change, although other variables were significantly and independently associated with IUGR in the model (Table 3).

7. Discussion

In this study, a relationship between IUGR in newborns and the history of mother's positive exposure to pesticides is identified. These mothers and their newborns presented acetylcholinesterase activity levels 20% below than that of women and newborns from similar groups in a period when pesticides were not applied. In the communities where the participants in this study lived during the gestational period, the most frequently used pesticides belong to the organophosphate group although the present design makes it difficult to isolate the toxic agents to which the subjects were exposed. Usually they were exposed to a mixture of heterogeneous chemical compounds. The use of pesticides mixtures to deal with plagues in agriculture is increasingly more frequent and the use of organochlorine pesticides persists. These are compounds that also pass through the placenta and have been identified in the umbilical cord (Waliszewski et al., 2000) and in

the breast milk of women in some towns of Mexico (Terrones et al., 2000).

Authors who have identified the pesticides exposure relationship and measured it in residential areas, have shown a greater risk of low birth weight in women whose residence is at a distance of up to 300 m from the zone where these kinds of substances have been used (Xiang et al., 2000).

Other studies have failed to identify a significant relationship between pesticides exposure and IUGR, but have found a substantial increase in low birth weight and perinatal mortality (Hanke and Hausman, 2000).

We have not found evidence of an interaction between pesticide exposure and maternal fat-free mass ≤ 45 kg (data not shown), perhaps because the sample was not calculated to support such an interaction. We cannot exclude the possibility of confounding with other variables or potential teratogens which were not considered in the present study.

In vitro studies with organophosphate pesticides, such as parathion, showed that the AChE activity in placental tissue decreased by 50%. This amount of transferred parathion could have caused damage to fetuses (Benjaminov et al., 1992). The pesticide or its metabolites in a developing organism may have non-specific effects in growth regulation, perhaps altering the transport of nutrients or the interaction between receptors and proteins involved in the transduction and production of cyclic AMP, contributing to adverse

effects on cellular replication and differentiation, as has been attributed to Chlorpyrifos (Auman et al., 2000).

Determining the gestational age according to the date of the last menstrual period (LMP) is subject to errors in the classification of premature or post-mature newborns, since the gold standard in measuring the gestational age considers both LMP and measurement of the crown-rump length by ultrasonography between weeks 8 and 16 (Taipale and Hilesma, 2001). Only women with data about their LMP were included; therefore, if there was a misclassification error, it should be of the non-differential type. To evaluate this type of error, an analysis was carried out excluding the newborns under 37 and over 41 weeks of gestation. The relationship between variables in the study did not show significant changes. Diagnosing IUGR with the Overpeck's tables could result in a misclassification. For this reason the 10th percentile of the weight of the newborns in the state of Chihuahua, Mexico during the years 2000–2001 was also used (data not shown). Fifteen newborns (3.33%) showed discrepancies in classification according to the two tables. The concordance coefficient κ was 0.84 (95%CI 0.75–0.93), thus the agreement was good, and the use of the before mentioned tables cannot be considered a source of significant error. Determining exposure to pesticides by means of a structured questionnaire and a 20% reduction of the AChE activity can be questioned given the implications and complexities of interpreting enzymatic activity. There is no single biomarker that can determine subchronic exposure in populations with high risk of exposure to these substances. The great variability in the AChE activity (10–40%) makes its interpretation very complex (Lotti, 1995). The range of the inter-individual variability in this sample lies within these limits. Less enzymatic activity was found in newborns in both case and control groups when the exposure history was positive. In other communities such as one in Israel, where cholinesterase inhibiting pesticides are continuously used, it has been found that the AChE activity decreased while the pesticides were applied; not only in farmers but also in residents living close to the places where toxics were used (Richter et al., 1986). On the other hand, it is accepted that AChE activity is the most specific marker of exposure to this kind of pesticides and it can persist for 1–3 months (Filkins, 1998). In this study, less AChE activity was found in newborns whose mothers had a history of positive exposure, especially in the case group.

Even though weight is a modifying factor of AChE activity, when the analysis was performed evaluating the different study groups separately, those newborns in the case group with history of prenatal exposure to pesticides had less enzymatic activity. Decreased AChE activity was found in newborns but not in their mothers; thus, the results may be explained by increased sensitivity to cholinesterase inhibiting pesticides in the neo-

natal period (Eskenazi et al., 1999), as previously reported (Pope et al., 1991).

It should be pointed out that the collection of samples included several periods of pesticide application and that less enzymatic activity was detected both in mothers and newborns at the time when the pesticides were actively applied.

New biomarkers such as pesticides metabolites levels in meconium could provide more precise data to determine exposure in the prenatal period (Whyatt and Barr, 2001). Also, genotoxic biomarkers sensitive to early effects could add useful information.

Since there are multiple factors related to IUGR, the variables with statistical significance were included in a multivariate analysis. In this model the relationship between exposure to pesticides and IUGR persisted. It may be worthwhile to study the weight determinants at birth, since it is a very important predictor both for survival in the perinatal stage and for healthy development in adult life (Barker et al., 1993; Benediktson et al., 1993). Besides, at different societal levels it is very important to look for a broad range of strategies to reduce the health impacts of pesticides, and to move towards a more sustainable agricultural production.

Acknowledgements

This study was supported by Organización Panamericana de la Salud, Oficina de Campo en El Paso, Texas, and by Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI), Instituto Mexicano del Seguro Social.

References

- Arbuckle, T., Lin, Z., Mery, L., 2001. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ. Health Perspect.* 109, 851–857.
- ATSDR Toxicological Profiles, Copyright 1997. Methylparathion. CRC Press, Inc.
- Auman, J.T., Seider, H.J., Slotkin, T.A., 2000. Neonatal chlorpyrifos exposure targets multiple proteins governing the hepatic adenyl cyclase signaling cascade: implications for neurotoxicity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 121, 19–27.
- Barker, D.J., Gulkman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341, 938–994.
- Benediktson, R., Lindsay, R., Noble, J., Seckl, J., Edwards, C., 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 341, 339–341.
- Benjaminov, O., Hoffer, E., Taitelman, U., Urbach, J., Brandes, J.M., 1992. Parathion transfer and acetylcholinesterase activity in vitro perfused term human placenta. *Vet. Hum. Toxicol.* 34, 10–12.
- Christianson, R., 1979. Gross differences observed in the placentas of smokers and nonsmokers. *Am. J. Epidemiol.* 110, 178–187.

- De Cock, J., Westveer, K., Heederik, D., Te Velde, E., Van Kooij, R., 1994. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in The Netherlands. *Occup. Environ. Med.* 51, 693–699.
- Ellman, G., Courtyne, D., Valentino, A., Featherstone, E., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R., 1999. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ. Health Perspect.* 107, 409–419.
- Filkins, K., 1998. Normal reproductive and development biology. In: Hage, M., Frazier, L. (Eds.), *Reproductive Hazards of the Work Place*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, p. 207.
- González-Cossío, T., Peterson, K., Sanin, L.H., Fishbein, E., Palazuelos, E., Aro, A., Hernández-Ávila, M., Hu, H., 1997. Decrease in birth weight in relation to maternal bone-lead burden. *Pediatrics* 100, 856–862.
- Gupta, R.C., 1995. Environmental agents and placental toxicity: anticholinesterases and other insecticides. In: Sastry, B.V. (Ed.), *Placental Toxicology*. CRS Press Inc., Tennessee, USA, pp. 257–278.
- Hanke, W., Hausman, K., 2000. Reproduction disorders in women occupationally exposed to pesticides. *Med. Pr.* 51, 57–68.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Assessing the fit of the model. Applied logistic regression*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 143–188.
- Kramer, M.S., 1987. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull. WHO* 65, 663–737.
- Kramer, M.S., Olivier, M., Mc Lean, F., Willis, D., Usher, R., 1990. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality of fetal and neonatal outcome. *Pediatrics* 86, 707–713.
- Lagunes-Tejeda, A., Rodríguez, J.C., Mota-Sánchez, D., 1994. Combate químico de plagas agrícolas en México. Sáenz, A., Vázquez, J.M., México.
- Lederman, S.A., Paxton, A., Heymsfield, S.B., Wang, J., Thornton, J., Pierson, R.N., 1999. Maternal body fat and water during pregnancy: do they raise infant birth weight? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 235–240.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.* 41, 1814–1818.
- Ostrea, E., Ostrea, A., Simpson, P., 1997. Mortality within the first 2 years in infants exposed to cocaine, opiate or cannabinoid during gestation. *Pediatrics* 100, 79–83.
- Overpeck, M.D., Hediger, M.L., Zhang, J., Trumble, C., Klebanoff, M.A., 1999. Birth weight for gestational age of Mexican American infants born in the United States. *Obstet. Gynecol.* 93, 943–947.
- Pope, C.N., Chakraborti, T.K., Chapman, M.L., Farrar, J.D., Arthun, D., 1991. Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* 68, 51–61.
- Richter, E., Rosenvald, Z., Levy, S., Gruener, N., 1986. Sequential cholinesterase tests and symptoms for monitoring organophosphate absorption in field workers and persons exposed to pesticide spray drift. *Toxicol. Lett.* 33, 25–35.
- Rizzo, G., Arduini, D., 1991. Fetal Cardiac function in intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 876–882.
- Rothman, K.J., 1987. Análisis estratificado. In: *Epidemiología Moderna*. Ediciones Díaz de Santos, S.A., Massachusetts, USA, pp. 199–204.
- Saigal, S., Stoskopf, B., Streiner, D., Burrows, E., 2001. Physical growth and current health status of infants who were of extremely low birth weight and controls at adolescence. *Pediatrics* 108, 407–415.
- Sanin, L.H., Reza, S., Tufiño, E., Corral, M., Robles, M.A., Levario-Carrillo, M., 2001. Relation between birth weight and placenta weight. *Biol. Neonate* 80, 113–117.
- Sanjose, S., Roman, E., Beral, V., 1991. Low birth and preterm delivery Scotland 1981–1984: effect of parent's occupation. *Lancet* 338, 428–431.
- Strauss, R., Dietz, W., 1997. Effects of intrauterine growth retardation in premature infants on early childhood growth. *J. Pediatr.* 130, 95–102.
- Taipale, O., Hilesma, V., 2001. Predicting delivery date by ultrasound and last menstrual period in early gestation. *Obstet. Gynecol.* 97, 189–194.
- Terrones, S., Llamas, J., Jaramillo, F., Espino, M.G., León, S., 2000. DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazos de término. *Ginecol. Obstet. Mex.* 68, 97–104.
- Waliszewski, S., Aguirre, A., Infanzon, R., Siliceo, J., 2000. Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Publica Mex.* 42, 384–390.
- Whyatt, R., Barr, D., 2001. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* 109, 417–420.
- Xiang, H., Nuckols, J.R., Satallones, L., 2000. A geographic information assessment of birth weight and crop production patterns around mother's residence. *Environ. Res.* 82, 160–167.
- Yankowitz, J., Weiner, C.P., 1999. Fetal infection. In: Rodeck, C.H., Whittle, M.J. (Eds.), *Fetal Medicine*. Harcourt Brace and Company Ltd., London, UK, pp. 849–862.