

La exposición a plaguicidas y el neurodesarrollo en niños de 6-9 años de edad, Talamanca, Costa Rica

Berna van Wendel de Joode^{a,*}, Ana M. Mora^a, Christian H. Lindh^b, David Hernández-Bonilla^c, Leonel Córdoba^a, Catharina Wesseling^d, Jane A. Hoppin^e and Donna Mergler^f.

^aInstituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

^bDivisión de Medicina ambiental y ocupacional, Instituto de Medicina de Laboratorio, Universidad de Lund, Lund, Suiza.

^cDivisión de Salud Ambiental, Instituto Nacional de Salud Pública, Ciudad de México, México.

^dInstituto de Medicina Ambiental, Instituto Karolinska, Stockholm, Suiza.

^eDepartamento de Ciencias Biológicas y Centro para la Salud Humana y el Ambiente, Carolina del Norte, Estados Unidos.

^fCentro de Investigación interdisciplinario en Salud, Bienestar, Sociedad y Medio Ambiente (CINBIOSE), Universidad de Quebec en Montreal, Canadá.

Resumen

Algunos plaguicidas pueden afectar el neurodesarrollo infantil. Evaluamos si la exposición a plaguicidas se encontraba asociada con efectos neuroconductuales en niños de 6 a 9 años.

Realizamos un estudio de corte transversal en 140 niños, que vivían cerca de plantaciones bananeras y fincas de plátano en el cantón de Talamanca, Costa Rica, y evaluamos su desempeño neuroconductual. La exposición a plaguicidas fue determinada mediante el análisis de los metabolitos urinarios del clorpirifos (3,5,6-tricloro 2-piridinol, TCPy), mancozeb (etilentiourea, ETU) y piretroides (3-ácido fenoxibenzoico, 3-PBA). Se obtuvieron muestras repetidas de orina para 36 niños. Estimamos las asociaciones entre las concentraciones de los metabolitos de plaguicidas y los efectos neuroconductuales utilizando modelos de regresión multivariados lineales y logísticos.

Las medianas (percentiles 25-75) de las concentraciones de TCP, ETU y 3-PBA fueron de 1.4 (0.7-3.1), 1.2 (0.7-3.0) y 0.8 (0.5-1.5) mg/L respectivamente. Los coeficientes de correlación intraclase (CCI) variaron entre 0.32 y 0.67. Luego de ajustar por potenciales confusores, observamos que las concentraciones urinarias altas de TCPy se asociaban una disminución en la memoria de trabajo en niños varones ($n = 59$) (β por incremento de 10 veces en las concentraciones de TCPy = -7.5, IC 95%: -14.4, -0.7); una disminución en la coordinación visomotora en niños varones y niñas ($\beta = -1.4$, IC 95%: -2.7, -0.1); un aumento en la prevalencia de problemas cognitivos/falta de atención [OR ajustado (ORa) por incremento de 10 veces en las concentraciones urinarias = 5.8, IC 95%: 1.6, 22.9], trastornos oposicionales (ORa = 3.9, IC 95%: 1.0, 16.0) y trastorno de hiperactividad y déficit de atención (ORa = 6.8, IC 95%: 1.8, 28.6) en niños varones y niñas, todos reportados por los padres; y una disminución en la capacidad para discriminar colores en niños varones y niñas (ORa = 6.6, IC 95%: 1.6, 30.3; entre más alto el puntaje, peor la capacidad). Las concentraciones urinarias altas de ETU se asociaron con un peor desempeño en las pruebas de aprendizaje verbal en niños varones y niñas ($\beta = -7.0$, IC 95%: -12.7, -1.3). Las concentraciones urinarias altas de 3-PBA se asociaron con puntajes inferiores en las pruebas de velocidad de procesamiento, particularmente en niñas ($\beta = -8.8$, IC 95%: -16.1, -1.4).

Nuestros resultados indican que los niños que viven cerca de plantaciones de banano y plátano se encuentran expuestos a plaguicidas que pueden afectar su neurodesarrollo, y estos efectos pueden variar entre niños varones y niñas según el área de neurodesarrollo. Por lo tanto, recomendamos la implementación de medidas para reducir la exposición a plaguicidas en niños que viven cerca de estas plantaciones.

Referencia del artículo original: van Wendel de Joode B, Mora AM, Lindh CH, Hernández-Bonilla D, Córdoba L, Wesseling C, Hoppin JA, Mergler D. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6-9 years from Talamanca, Costa Rica. *Cortex*. 2016 Dec;85:137-150. doi: 10.1016/j.cortex.2016.09.003. Epub 2016 Sep 15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2016.09.003>.

© 2016 El autor(es). Publicado por Elsevier Ltd. Este es un artículo de acceso libre bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Hay un cuerpo de conocimiento que está creciendo rápidamente referente a los efectos dañinos de tóxicos ambientales en el neurodesarrollo de los niños, existiendo diferencias entre niños y niñas. (Mergler, 2012). El cerebro en desarrollo es particularmente vulnerable a las sustancias tóxicas. Exposiciones en la vida temprana a plomo, metilmercurio, bifenilos policlorados, arsénico, tolueno e insecticidas clorpirifos, pueden causar discapacidades de aprendizaje, déficit atencional e hiperactividad (ADHD), desorden de espectro autista, atrasos en el desarrollo, y problemas emocionales y conductuales (Bjørning-Poulsen, Andersen, & Grandjean, 2008; Grandjean & Landrigan, 2006).

Estudios de cohorte de nacimientos conducidos en los Estados Unidos (U.S.) han reportado asociaciones de exposiciones prenatales a organofosforados (OP), incluyendo insecticidas clorpirifos, con un retraso del desarrollo mental, un coeficiente intelectual (IQ) más bajo, y ADHD (Bouchard et al., 2011; Engel et al., 2011; Eskenazi et al., 2006; Marks et al., 2010; Rauh et al., 2011, 2006). Por ejemplo, una más alta concentración prenatal, pero no postnatal, de metabolitos OP urinarios fueron asociados con daños en el desarrollo cognitivo en niños con 2 años de edad (Eskenazi et al., 2006) y 7 años (Bouchard et al., 2011) que viven cerca de campos agrícolas en California. Similarmente, un estudio de cohorte de nacimientos de niños que viven en el centro de la ciudad de Nueva York mostraron que niveles más elevados de concentración de clorpirifos en sangre de cordón umbilical se encontraba asociado con retrasos en el desarrollo a los 3 años de edad (Rauh et al., 2006) y una más pobre puntuaciones de IQ a gran escala y en memoria de trabajo a los 7 años de edad. (Rauh et al., 2011). En contraste, estudios transversales que relacionan metabolitos de plaguicidas OP en orina con problemas neuroconductuales en niños han mostrado resultados inconsistentes, posiblemente debido a diferencias metodológicas, incluyendo el tamaño de la muestra (Fiedler et al., 2015; Lu et al., 2009; Sánchez Lizardi, O'Rourke, & Morris, 2008) y los métodos usados para evaluar los resultados neuroconductuales (por ejemplo, evaluación directa vs resultados de reportes parentales) (Bouchard, Bellinger, Wright, & Weisskopf, 2010; Oulhote & Bouchard, 2013). Las vías mecánicas por medio de las cuales los plaguicidas dañan el neurodesarrollo de los niños es en su gran mayoría desconocido (Bjørning-Poulsen et al., 2008). Las asociaciones descritas en estudios epidemiológicos de plaguicidas OP posiblemente pueden ser explicados por mecanismos no-colinérgicos, por ejemplo, oxon-metabolitos que pueden irrumpir procesos neuroconductuales en dosis más pequeñas que la inhibición por acetilcolinerasa (Flaskos, 2014; Yang et al., 2011).

Los efectos en el neurodesarrollo de los plaguicidas no-OP han sido escasamente estudiados (Bjørning-Poulsen et al., 2008). Los piretroides pueden actuar sobre el Sistema nervioso al alterar los canales de sodio en la membrana axonal de las neuronas induciendo la apoptosis de las células nerviosas. (Bjørning-Poulsen et al., 2008; Saillenfait, Ndiaye, & Sabaté, 2015). Estudios animales asimismo han demostrado que una exposición en etapas tempranas de la vida a piretroides puede reducir la densidad de receptores colinérgicos y muscarínicos (Eriksson & Fredriksson, 1991) y además afectar el sistema dopaminérgico (Richardson et al., 2015) llevando a desórdenes conductuales en etapas de vida posteriores. Dos estudios prospectivos de mujeres embarazadas de China (Xue et al., 2013) y U.S. (Horton et al., 2011) observaron que la concentración de piretroides en orina y en el aire que rodea a la persona (o sinergia piretroide) se asocia con un desarrollo mental más pobre en infantes y niños pequeños.

Adicionalmente, dos estudios transversales conducidos en Canadá y U.S. reportaron un incremento de los reportes parentales de problemas conductuales en niños en edad escolar cuando estos tenían una mayor concentración de piretroides en orina (Oulhote et al., 2014; Wagnerschuman et al., 2015). A la inversa, pocos estudios transversales encontraron una asociación nula entre la exposición a piretroides y resultados neuroconductuales en niños de edad escolar (Fiedler et al., 2015; Lu et al., 2009; Quirós-Alcalá, Mehta, & Eskenazi, 2014).

Finalmente, a nuestro conocimiento, no se han realizado estudios epidemiológicos que examinen los efectos neuroconductuales del mancozeb. El mancozeb es un fungicida ditiocarbamato comúnmente usado en casi 120 países alrededor del mundo (Gullino et al., 2010). Estudios *In vitro* e *In vivo* sugieren que la neurotoxicidad del mancozeb y/o su metabolito etilenotiurea (ETU) puede estar mediado por la generación de especies reactivas al oxígeno (Domico, Cooper, Bernard, & Zeevalk, 2007), interferencia del transporte vesicular de glutamato (Vaccari, Saba, Mocchi, & Ruiu, 1999), e inhibición de la Peroxidasa tiroidea (Doerge & Takazawa, 1990).

En países tropicales, los plaguicidas son extensivamente utilizados en los monocultivos, tales como en las plantaciones de banano y plátano, resultando esto en una elevada exposición ambiental para aquellas personas que viven en las cercanías (Rodríguez et al., 2006; van Wendel de Joode et al., 2012, 2014).

Bolsas tratadas con clorpirifos son utilizadas para envolver los bananos y los plátanos para proteger su piel (Barraza, Jansen, van Wendel de Joode, & Wesseling, 2011). Elevadas concentraciones urinarias de 3, 5, 6-ricloro-2-pyridinol (TCPy), un biomarcador específico de clorpirifos, han sido observadas en niños cercanos a tales plantaciones (van Wendel de Joode et al., 2012).

Adicionalmente, los niños que viven cerca de tales plantaciones de banano y plátano es probable que estén expuestos a otros plaguicidas como el mancozeb, el cual es utilizado en las plantaciones bananeras de Costa Rica de manera semanal por medio de aeronaves ligeras (Barraza et al., 2011; Bravo-Durán et al., 2013; van Wendel de Joode et al., 2014). Las elevadas concentraciones de ETU en orina, un biomarcador de exposición a mancozeb, ha sido reportado en mujeres embarazadas que habitan cerca de las plantaciones de banano en Costa Rica (van Wendel de Joode et al., 2014). Asimismo, es probable que los niños también estén expuestos a los plaguicidas usados tanto dentro como fuera de sus hogares, incluyendo químicos piretroides (usados para controlar pestes interiores, el tratamiento de piojos, sarna en humanos, las pulgas en los animales domésticos y el control de las enfermedades transmitidas por vectores) (ATDSR, 2003). En el presente estudio, evaluamos si la exposición a clorpirifos, mancozeb y piretroides químicos está asociada con daños en el desempeño cognitivo, motor, conductual y sensorio- motor de los niños expuestos a tales químicos.

2. Materiales y Métodos.

2.1 Población Estudiada.

Se realizó un estudio transversal en la región de Talamanca, Costa Rica, entre los meses de febrero y agosto del 2007. La región de Talamanca, localizada en la costa caribe, ha sido dedicada a la producción de plátano y banano a pequeña y larga escala. Siendo esta región una de las regiones con el menor índice de desarrollo humano en el país (PNUD-UCR, 2012). Una descripción detallada del área de estudio se encuentra en (Barraza et al, 2011), detalles sobre la población estudiada, y de las concentraciones de TCPy en las muestras de orina de los niños en (van Wendel de Joode et al., 2012). En resumen, se incluyeron niños de 3 pueblos que se localizan dentro de un radio de 40 kilómetros rodeados por: 1) Plantaciones de banano a gran escala con un uso extensivo de plaguicidas (Daytonia) que incluye un rocío aéreo de mancozeb y el uso de bolsas tratadas con clorpirifos para proteger los frutos (ver resumen gráfico); 2) Pequeños productores que crecen sus plantaciones utilizando plaguicidas por ejemplo utilizando aplicaciones terrestres de Mancozeb y el uso de bolsas tratadas con clorpirifos (Shiroles, 97% de las madres entrevistadas reportaron el uso de plaguicidas en los cultivos); o 3) Pequeños productores que producían sus cultivos de manera orgánica mayoritariamente (Amubrè, 12% de los entrevistados reportaron uso de plaguicidas en sus cultivos(van Wendel de Joode et al., 2012). Piretroides tipo-2 (por ejemplo, deltametrina, cipermetrina, ciflutrina), que se metabolizan en 3-PBA no se usaron en la agricultura, pero se usaron en interiores y para el control de vectores en los 3 pueblos.

Los niños formaban parte del estudio si tenían entre 6-9 años de edad, asistían a la escuela primaria, han vivido en la comunidad por al menos 1 año, y no tenían historial de problemas prenatales o perinatales, diabetes, traumas en la cabeza, problemas neurológicos o desordenes psiquiátricos. Los niños elegibles (n=190) y sus padres fueron invitados a participar a través de reuniones llevadas a cabo en escuelas y visitas al hogar. Los padres de 26 niños (14%) no pudieron ser localizados y 4 (2%) se rehusaron a participar. Consentimientos informados escritos se obtuvieron de 160 padres (84%) y un consentimiento verbal se obtuvo de los niños. De estos, 140 brindaron 1 o más muestras de orina y completaron la batería de pruebas neuroconductuales.

Los niños incluidos en el análisis de datos (n=140) eran similares a la población entera del estudio (n=160) al respecto de la edad, educación y edad de los padres, número de hermanos y bilingüismo (si/no). Todas las actividades del estudio se aprobaron por el Comité ético Científico de la Universidad Nacional de Costa Rica (CECUNA, 2007).

2.2 Entrevistas Maternas.

Cuestionarios estructurados se administraron a las madres de los niños para recolectar información sobre las características sociodemográficas (por ejemplo, edad de la madre, educación, estado civil, número de años viviendo en el pueblo), historia médica del niño, y factores relacionados a la exposición a plaguicidas (por ejemplo, ocupación parental, plaguicidas usados). Asimismo, se instruyó a las madres como recolectar las muestras de orina de los niños.

2.3 Evaluación de la Exposición a Plaguicidas.

Se evaluó la exposición a plaguicidas al medir los metabolitos de plaguicida en la orina de los niños (n=140). Para evaluar la confiabilidad temporal de tales metabolitos se obtuvieron muestras de orina repetidas de 40 niños de la siguiente manera: 35 niños de 2, un niño con 5, un niño con 6, dos niños con 8, y un niño con 10 muestras. En

promedio, el tiempo entre la primera y segunda muestra fue de 3.3 meses (desviación estándar= 1.3 meses). Para los 5 niños con repeticiones adicionales, se obtuvieron de 3 a 8 de las muestras adicionales durante los siguientes días a la recolección de la segunda muestra de orina. En total, se obtuvieron 207 muestras de orina de los 140 niños.

2.4 Muestras de orina y análisis.

A los niños se les dio vasos de precipitado de 100 mL (Vacurette®, estériles) y se les solicitó que trajesen la primera orina de la mañana como muestra el día de su evaluación neuroconductual. Un 5% (n=6) de los niños no trajo la muestra de orina, por tanto facilitaron la muestra en el lugar. Las muestras de orina fueron guardadas a 4°C durante la evaluación. Al final del día, las muestras fueron divididas en alícuotas y almacenadas a -20°C hasta que fuesen enviadas al Departamento de Medicina ambiental y ocupacional Medicina de Laboratorio de la Universidad de Lund, Suiza.

Los análisis de TCPy y 3-PBA en orina se realizaron a como se describe en (Lind, Littorin, Amilon & Jönsson, 2008; Elfman, Hogstedt, Engvall, Lampa & Lindt, 2009) Utilizando cromatografía líquida de triple espectrometría de masas cuadrupolo (LCeMS/MS; API 3000; AB Sciex, Foster City, CA, USA), con algunas modificaciones. Brevemente, la orina fue acidificada e hidrolizó durante la noche, y después se extrajo utilizando columnas de extracción de fase sólida. Para el análisis de TCPy, se utilizó una transición pseudo-MS / MS con ambos cuadrúpedos escaneando a m/z 196. Se utilizó el componente [$^{13}\text{C}_6$]-3-PBA como el estándar interno para el análisis de 3-PBA (Lindh, Littorin, Amilon, et al., 2008; Elfman, Hogstedt, Engvall, Lampa, & Lindh, 2009). La preparación de las muestras para el análisis ETU en orina se realizó utilizando un procedimiento de derivación extractiva en un solo paso y las muestras utilizadas se analizaron usando LCeMS /MS con [$^2\text{H}_4$]-ETU como el estándar interno. Todas las muestras urinarias fueron analizadas en duplicados. Los coeficientes de varianza calculados a partir de los duplicados fueron 10%, 11%, y 13% para TCPy, 3-PBA y ETU, respectivamente. Los límites de detección (LOD) de TCPy, 3-PBA, y ETU en orina fueron 1, .1, y .1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Los niveles de creatinina (g / l) se analizaron usando un método enzimático y se usaron para ajustar la dilución de orina (Mazzachi, Peake & Ehrhardt, 2000). Todas las muestras procesadas fueron analizadas en duplicados. Se detectaron metabolitos de plaguicidas en 57% (TCPy), 96%(ETU), y 94% (3-PBA) de las muestras de orina. Valores por debajo del LOD se reemplazaron con el LOD dividido por la raíz cuadrada de 2 (Hornung and Reed, 1990).

2.5 Examinación Médica.

Todos los niños recibieron un examen físico por parte de un médico. La altura y peso se registraron y se utilizaron para calcular el índice de masa corporal [BMI= peso en kilogramos/(altura en metros)²]. La agudeza visual se evaluó utilizando el Test de Snellen E a 20 pies con luz adecuada.

2.6 Evaluación Neuroconductual.

2.6.1 Administración de Pruebas.

Las evaluaciones fueron realizadas por tres psicometristas, los cuales fueron entrenados y supervisados por un neuropsicólogo experimentado (DH). Cada psicometrista administró un subconjunto específico de pruebas a todos los participantes del estudio. Todas las evaluaciones se realizaron en español y se llevaron a cabo en salones de escuela o en librerías.

2.6.2 Habilidad intelectual.

La versión española mexicana de la escala de inteligencia Wechsler para niños cuarta edición (WISC-IV) se utilizó para evaluar las habilidades cognitivas de los niños (Wechsler, 2007). Puntuaciones de 3 índices fueron calculados: Razonamiento Perceptual (razonamiento no verbal y razonamiento fluido, pruebas: Bloques, conceptos de imagen y razonamiento de matriz), Memoria de trabajo (Pruebas: Retención de dígitos, secuenciación de números y letras), y Velocidad de procesamiento (Velocidad de procesamiento de información, pruebas: Codificar, búsqueda de símbolos, y Cancelación). Un cociente de inteligencia (IQ) a escala completa no fue calculado debido a que la subescala de comprensión verbal no fue administrada debido a que la validez concurrente fue motivo de preocupación en la población estudiada. El WISC-IV no ha sido estandarizado para su

uso en Costa Rica, por tanto, las puntuaciones fueron estandarizadas contra la normativa base de la población mexicana (media=100 \pm 10) (Weschler, 2007).

2.6.3 Problemas Conductuales.

La versión en español de la Escala de Calificación de Conner para Padres-Revisada versión corta (CPRS-R) (Keith Conners, Sitarenios, Parker, & Epstein, 1998) se administró a las madres de los niños. Esta prueba comúnmente usada es un cuestionario que consta de 27 ítems estandarizados que evalúan los problemas de conducta de los niños en casa, su aplicación dura entre 5-10 minutos. Las puntuaciones estandarizadas puntuaciones T (media \pm SD= 50 \pm 10) de la CPRS-R se distribuye en 4 subescalas (Oposicional, Problemas cognitivos/Inatención, hiperactividad, e índice de ADHD), las cuales se calcularon acorde a la normativa del manual (Conners, 1997).

2.6.4 Funcionamiento Sensorial (Discriminación de colores).

Se aplicó la prueba de desaturado de Lanthony D-15 (LDD-15) para evaluar la discriminación del color como una medida del funcionamiento sensorial. La prueba fue completada por separado para cada ojo y aplicada bajo condiciones estandarizadas (por ejemplo, en una mesa pequeña cubierta con un mantel negro y una lámpara de escritorio fluorescente). En la prueba, a los niños se les muestra una caja rectangular que contiene 16 tapas de colores organizadas en orden cromático. El psicometrista procede a mezclar las tapas frente al niño, seguido a esto posiciona correctamente la primera tapa y le solicita al niño que ordene las demás en una serie de color regular. Cuando el niño finaliza se voltea la caja y se registra el orden de las tapas. Se calculó una puntuación total de distancia de color (TCDS), entendida como la suma de las distancias perceptuales publicadas entre cada par de tapas en el orden colocado por los participantes. Se calculó un índice de confusión de color (CCI) acorde a Bowman (1982), como la relación entre el TCDS de cada niño y el TDCS asociado con un rendimiento tal que un CCI 1,0 indica una puntuación perfecta. Ya que los resultados fueron similares tanto para el ojo izquierdo como para el derecho, se calculó la media del CCI de ambos ojos.

2.6.5. Percepción y Memoria.

2.6.5.1. Construcción visoespacial y memoria visual.

Para evaluar las habilidades de construcción visoespacial, una carta con el complejo de figura Rey-Osterrietch (ROCF) se colocó en una mesa frente al niño, el cual fue instruido para que copiase el diseño en una hoja de papel (prueba de copiado) (Fig.1.). Marcadores de colores se facilitaron al niño para que su estrategia pudiese ser discernida más fácilmente. Para evaluar la memoria visual, 30 minutos después de que la carta con el ROCF se mostró al niño, se solicitó al mismo que dibujasen de memoria cuanto se recordaran de la figura (Ensayo de recuperación retardada). La calificación del ROCF se basó en los criterios definidos por Galindo y Villa, según los cuales la figura está dividida en 18 unidades estructurales (Cortés, Galindo, Villa, & Salvador, 1997; Knight, 2003). Una escala de 4 puntos entre 0 y 2 se asignó a cada unidad basado en el grado en que cada unidad fue trazada y ubicada correctamente, posteriormente se realizó una suma para calcular puntos totales.

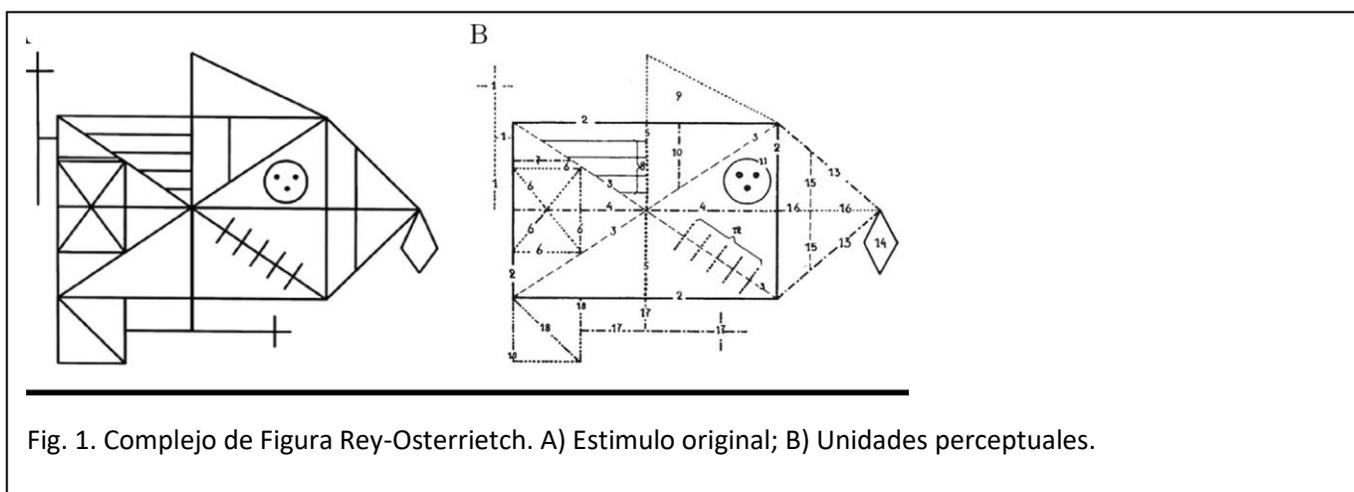


Fig. 1. Complejo de Figura Rey-Osterrietch. A) Estimulo original; B) Unidades perceptuales.

2.6.5.2. Memoria verbal y capacidad de aprendizaje.

Se utilizó la versión en español de la prueba de aprendizaje verbal y auditivo en niños, segunda edición (CAVLT-2), para evaluar el aprendizaje verbal y la capacidad de memoria de los niños (Talley, 1997; Torres-Agustín et al., 2013). Esta prueba incluye una lista de 16 palabras que son administradas a lo largo de cinco ensayos, a los niños se les solicita que recuerden las palabras posteriores a cada ensayo. Posteriormente un conjunto de palabras distintas es presentado al niño y se le solicita recordar las palabras de la nueva lista (Ensayo de interferencia). Seguido a la lista de interferencia, se instruye al niño a recordar la mayor cantidad de palabras posibles de la lista inicial (recuerdo inmediato). Al pasar 15 minutos, se le solicita al niño recordar la lista inicial una vez más (Recuerdo retrasado). Finalmente, se le presenta al niño una lista de 32 palabras y se le solicita que identifique las palabras de la lista inicial (Ensayo de reconocimiento). Para reducir el número de resultados, se calcularon puntuaciones estandarizadas para 3 subescalas (Jones et al., 2011; Torres-Agustín et al., 2013) acorde al manual (Talley, 1997). Capacidad de memoria inmediata (funcionamiento de memoria a corto plazo: sumatoria del primer ensayo y el ensayo de interferencia), Recuerdo retrasado (funcionamiento de memoria a largo plazo y capacidad de recuperación), y nivel de aprendizaje (tasa de aprendizaje: sumatoria de los ensayos 3, 4 y 5).

2.6.6. Funcionamiento motor.

2.6.6.1. Coordinación visomotora.

Se evaluó la coordinación visomotora de los niños por medio del subtest coordinación ojo-Mano de la prueba Método de evaluación de la percepción visual de Frostig, segunda edición (DTVP-2) (Hammill, Pearson, Voress & Alvarado Guerrero, 1995). En este subtest, se requiere que los niños tracen líneas rectas o curvas para conectar dos objetos (por ejemplo, ratón y queso, perro y hueso) acorde a sus límites visuales. Las puntuaciones estandarizadas acorde a la edad se calcularon basándose en lo bien que el niño dibujó entre los límites y si rompió la continuidad del trazo.

2.6.6.2. Funcionamiento de la motora fina.

Se administró a los niños la prueba del tablero de la Evaluación de amplio rango de habilidades visomotoras (WRAVMA) para evaluarla destreza de la motora fina (Adams & Shelow, 1995). En esta prueba se indica a los niños que tienen 90 segundos para introducir cuantas clavijas les sea posible en un tablero cuadrado (70 huecos) usando su mano dominante y posteriormente con su mano no dominante. Puntuaciones estandarizadas a la edad (media= 100 ± 15) se calcularon acorde al manual de la prueba.

2.6.6.3. Velocidad psicomotora.

La atención se evaluó mediante la Reaction Time Task (RTT), una tarea diseñada para medir el tiempo de respuesta ante un estímulo visual (Lezak, Howieson & Loring, 2004). En esta prueba, un cuadrado aparece en la pantalla y el niño es instruido a presionar un botón (con su mano dominante) tan rápido como le sea posible para hacerlo desaparecer. Se realiza un total de 64 ensayos y se obtiene la media de la puntuación de la latencia de respuesta (en milisegundos).

2.7 Análisis Estadístico.

Las concentraciones de metabolitos siguieron una distribución lognormal, por lo que se transformaron a \log_{10} las concentraciones de TCPy, ETU y 3-PBA para los análisis estadísticos. Para calcular el coeficiente de correlación intra clase (ICC), un indicador de la confiabilidad temporal de los biomarcadores, Se utilizaron modelos de componentes de varianza con intercepciones aleatorias para cada niño con muestras de orina repetidas (Rosner, 2006) incluyendo los niveles de creatinina urinaria como un factor fijo (Bar et al., 2005).

Se examinó la asociación de la concentración TCPy, ETU y 3-PBA urinaria medida el día de la evaluación (variable independiente) con los resultados neuroconductuales como variables dependientes continuas, utilizando una regresión multivariada lineal. Debido a que los plaguicidas pueden tener una relación distinta con los resultados, se construyó un modelo separado para cada metabolito de plaguicida y cada resultado de las pruebas. Para la RTT, CPRS-R, y LDD-15 puntuaciones más elevadas reflejan un peor desempeño. Como los residuos de los modelos lineales para la RTT, CPRS-R y LDD-15 no fueron distribuidos normalmente, se dicotimizaron tales resultados usando percentiles 50 y 75 como puntos de corte y subsecuentemente se usaron modelos de regresión logística para estimar la razón de probabilidad.

Se seleccionaron las covariadas principales basándose en reportes de literatura previos (Bouchard et al., 2011; Oulhote & Bouchard, 2013; Rojas-Rodríguez et al., 2010) y ajustes de modelo. El sexo y la edad al momento de la evaluación (continuo). La educación maternal (variable categórica: ≤ 3 años, de 3 a 6 años, ≥ 6 años) se incluyó debido a que se conoce como un bien conocido predictor del desarrollo cognitivo en niños. El haber repetido un año escolar (sí/no) también se incluyó pues puede que sea resultado tanto de problemas del

Cuadro 1. Características de los niños de 6-9 años y sus concentraciones de plaguicidas en orina medidas el día de las pruebas neuroconductorales, Cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007 (n = 140).

Característica	n (%)	TCPy MG (95%IC)	ETU MG (95%IC)	3-PBA GM (95%IC)
Características de los niños y niñas				
Sexo				
Niño	69 (49)	1.7 (1.4, 2.0)	1.2 (0.9, 1.6)	0.8 (0.7, 1.0)
Niña	71 (51)	1.4 (1.2, 1.7)	1.2 (1.0, 1.6)	0.9 (0.7, 1.1)
Edad (años) ^a				
6.5-7.5	43 (31)	1.7 (1.4, 2.2)	1.4 (1.0, 2.0)	1.2 (0.9, 1.6)*
7.5-8.5	47 (34)	1.5 (1.2, 1.8)	1.3 (0.9, 1.8)	0.8 (0.6, 1.1)
8.5-9.3	50 (36)	1.5 (1.2, 1.8)	1.1 (0.8, 1.5)	0.7 (0.5, 0.9)
Estado nutricional ^{a, b}				
Bajo peso	9 (6)	1.2 (0.7, 2.1)	1.8 (0.8, 3.7)	0.7 (0.4, 1.3)
Normal	105 (75)	1.6 (1.4, 1.9)	1.3 (1.0, 1.6)	0.9 (0.7, 1.1)
Sobrepeso u obeso	26 (19)	1.3 (0.9, 1.7)	1.0 (0.6, 1.5)	0.8 (0.6, 1.2)
Agudeza visual normal ^c				
Sí	81 (58)	1.5 (1.3, 1.8)	1.3 (1.0, 1.6)	0.8 (0.7, 1.0)
No	59 (42)	1.6 (1.3, 2.0)	1.2 (0.9, 1.6)	0.9 (0.7, 1.2)
Número de hermanos ^a				
0	10 (7)	1.5 (0.9, 2.5)	0.7 (0.3, 1.4)#	0.8 (0.5, 1.5)
≥ 1	130 (93)	1.5 (1.3, 1.8)	1.3 (1.1, 1.6)	0.9 (0.7, 1.0)
Repitió algún grado				
Yes	16 (11)	1.5 (1.0, 2.1)	0.9 (0.5, 1.6)	0.5 (0.3, 0.7)**
No	124 (89)	1.6 (1.4, 1.8)	1.3 (1.1, 1.6)	0.9 (0.8, 1.1)
Características Maternas				
Edad (años)				
20-30	58 (41)	1.5 (1.2, 1.8)	1.2 (0.9, 1.7)	0.9 (0.7, 1.1)
≥ 30-40	58 (41)	1.7 (1.4, 2.0)	1.3 (0.9, 1.7)	0.8 (0.6, 1.0)
≥ 40	22 (16)	1.5 (1.1, 2.1)	1.1 (0.7, 1.8)	1.1 (0.7, 1.7)
Educación				
≤ 3rd grado	33 (24)	2.0 (1.5, 2.6)*	1.7 (1.2, 2.5)	0.6 (0.4, 0.9)*
3-6th grado	76 (54)	1.5 (1.3, 1.8)	1.1 (0.9, 1.5)	0.9 (0.7, 1.1)
> 6th grado	31 (22)	1.2 (0.9, 1.6)	1.1 (0.7, 1.6)	1.1 (0.8, 1.6)
Casada o viviendo como casada				
Sí	101 (72)	1.5 (1.3, 1.8)	1.4 (1.1, 1.7)	0.9 (0.7, 1.0)
No	39 (28)	1.6 (1.2, 2.0)	1.0 (0.7, 1.4)	0.9 (0.7, 1.2)
Características de las viviendas				
Pueblo o sitio del estudio				
Daytonia (banano)	38 (27)	2.2 (1.7, 2.7)**	3.4 (2.6, 4.6)**	0.7 (0.5, 1.0)**
Shiroles (plátano)	48 (34)	1.9 (1.6, 2.3)	1.2 (0.9, 1.6)	1.1 (0.9, 1.5)
Amubrë (orgánico)	54 (39)	1.0 (0.8, 1.2)	0.6 (0.5, 0.8)	0.9 (0.7, 1.1)

Abreviaciones: MG, media geométrica; IC, intervalo de confianza; TCPy, 3,5,6-tricloro 2-piridinol; ETU, etilenotiurea; and 3-PBA, 3-ácido fenoxibenzoico. ^aModelado como una variable continua en los modelos multivariados. ^bEstado nutricional con base en el índice de masa corporal del niño (IMC): bajo peso = IMC < 5to percentil, normal = IMC 5to < 85to percentil, sobrepeso u obeso = IMC ≥ 85to percentil. ^cAgudeza visual anormal = ≥ 20/30 in Snellen E chart en un, o ambos, ojo(s). #p < 0.10; *p < 0.05; **p < 0.01; valor de p de ratio F del análisis univariado de varianza de concentraciones log-transformadas.

Cuadro 2. Descripción de las concentraciones urinarias de plaguicidas ($\mu\text{g} / \text{L}$) en niños de 6-9 años, Cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007.

Metabolito de plaguicida	Muestras colectadas el día de la evaluación del neurodesarrollo ($n = 140$)			Muestras repetidas ($n = 207$, niños = 140)			
	% > LD ^a	Mediana (P25-P75)	Max	% > LD ^a	Mediana (P25-P75)	Max	CCI
TCPy	57	1.4 (0.7-3.1)	9.6	62	1.6 (0.7-3.2)	26.8	0.52
ETU	96	1.2 (0.7-3.0)	11.0	97	1.6 (0.8-3.8)	34.5	0.67
3-PBA	94	0.8 (0.5-1.5)	20.4	94	0.7 (0.4-1.3)	20.4	0.32

Abreviaciones: LD, límite de detección; CCI, coeficiente de correlación intraclase; TCPy, 3,5,6-tricloro 2-piridinol; ETU, etilenotiourea; and 3-PBA, 3-ácido fenoxibenzoico.^a LD para TCPy = 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$; y para ETU y 3-PBA = 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$.

neurodesarrollo o la exposición a plaguicidas. El número de hermanos(as)(continuo) y el BMI (continuo) (Oulhote & Bouchard, 2013; Rojas-Rodriguez et al., 2010) se mantuvieron en los modelos multivariados por que se asociaron con la exposición y al menos con un resultado de interés en los análisis bivariados ($p \leq .10$).

La agudeza visual (Dicotómica, 20/20 vs. otras) se incluyó en todos los modelos, siendo la única excepción la CAVLT-2 porque esta prueba carece de un componente visual. El número de lenguajes hablados en su casa (dicotómica, 1 vs. ≥ 1 lenguaje) se consideró como un potencial factor de confusión, sin embargo, ya que las madres de familias bilingües también tenían menor nivel educativo ($t\text{-ratio} = -3.4$, $p \leq .001$), no se retuvo en los modelos multivariados. Para corregir la dilución urinaria, se incluyó la creatinina como covariable en todos los modelos (Barr et al., 2005). Para el caso de los resultados continuos, se evaluaron las diferencias de las asociaciones entre las concentraciones de plaguicidas en orina y los resultados neuroconductuales por sexo infantil utilizando productos de términos cruzados (sexo x concentración de plaguicida). La interacción por sexo fue considerada notable para aquellos con $p \leq .20$. Subsecuentemente se presentaron los resultados estratificados por sexo. Debido al limitado poder estadístico, no se estratificaron los modelos de regresión logística por sexo infantil.

Se definieron los valores atípicos como residuos estudiados (residuos divididos por el error estándar del modelo) más grandes que 3 unidades estándar, y se evaluó la influencia de los valores atípicos en el estimado del efecto mediante la ejecución de modelos con y sin los valores atípicos. Los valores atípicos que cambiaron la magnitud del estimado del efecto en más de un 30% se excluyeron de los análisis a como se indica en las notas de página de los cuadros 4 y 5.

Los efectos principales se consideraron significativos con un $p \leq .05$ basado en pruebas de dos colas. Todos los análisis se realizaron se llevaron a cabo usando JMP 8 (SAS Institute, Cary, NC).

3. Resultados

3.1. Características de la población estudiada y concentraciones de plaguicidas.

El cuadro 1. Presenta un resumen de las estadísticas de la población del presente estudio. Brevemente, los niños tenían entre 6.5 – 9.3 años (edad media = 7.9+.8 años al momento de la evaluación) y la mayoría de ellos tenían un peso normal (75%) y más de un hermano(a) (93%). Sorprendentemente, tan solo el 58% de los niños tenía una agudeza normal. Sus madres eran relativamente jóvenes (edad media = 32.4 + 6.9 años al momento de la inscripción), mayoritariamente casadas o viviendo en unión libre (72%), y con bajos logros académicos (78% con estudios de primaria o menos).

Las concentraciones de TCPy eran más elevadas en los niños que vivían en los pueblos bananeros y de plátano y cuyas madres tenían los niveles educativos más bajos (≤ 3 años de educación), asimismo las concentraciones de 3-PBA eran más bajas en los niños cuyas madres tenían los niveles educativos más bajos. Las concentraciones de ETU eran más elevadas en los niños que vivían en los pueblos bananeros, seguido de aquellos que viven en comunidades de plátano. Los niños más jóvenes tenían concentraciones más altas de 3-PBA en comparación con los niños mayores, mientras los niños que han repetido un año escolar tenían menores concentraciones en comparación con aquellos que no han repetido un año escolar. También, las concentraciones de 3-PBA eran más elevadas en niños viviendo en villas de plátano que en pueblos bananeros

Cuadro 3. Distribución de los resultados de las pruebas neuroconductuales en niños de 6-9 años de edad, Cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007 ($n = 140$).

Prueba	Promedio \pm DE	Mediana (P25-P75)
<i>Habilidad intelectual</i>		
Escalas de WISC-IV (puntajes estandarizados)		
Memoria de trabajo	85 \pm 8.8	86 (80-91)
Velocidad de procesamiento	81 \pm 11	80 (74-88)
Razonamiento perceptual	81 \pm 10	79 (74-86)
<i>Problemas Conductuales</i>		
CPRS-R (T-scores) ^a		
Problemas cognitivos/Inatención	53 \pm 10	50 (44-59)
Trastorno oposicional	50 \pm 10	47 (43-57)
Trastorno de hiperactividad	58 \pm 10	56 (50-66)
Índice de ADHD	53 \pm 9.3	51 (46-58)
<i>Función sensorial (discriminación de colores)</i>		
LDD-15 (mean CCI) ^a	1.4 \pm 0.27	1.3 (1.2-1.5)
<i>Percepción and memoria</i>		
<i>Construcción visoespacial y memoria visual</i>		
Rey-Osterrieth Figura Compleja		
Copia	13 \pm 3.6	14 (11-16)
Recuerdo retrasado	7.5 \pm 3.3	8.0 (6.0-9.5)
<i>Verbal learning abilities and memory</i>		
CAVLT-2 (puntajes estandarizados) ^b		
Memoria inmediata	90 \pm 18	91 (76-102)
Recuerdo retrasado	96 \pm 15	96 (86-107)
Nivel de aprendizaje	99 \pm 15	101 (92-108)
<i>Función motora</i>		
<i>Coordinación Visomotora</i>		
Coordinación Ojo-Mano (DTVP-2) (media puntajes estandarizados)	6.1 \pm 2.4	6.0 (4.0-8.0)
<i>Motora Fina</i>		
Tablero de WRAVMA (puntajes estandarizados)	108 \pm 14	110 (100-118)
<i>Velocidad psicomotora</i>		
Reaction Time Task (RTT) (puntajes crudos) ^{a,c}		
Latencia media de respuesta (ms)	0.68 \pm 0.24	0.63 (0.51-0.81)

Abreviaciones: WISC-IV, Escala de Inteligencia Wechsler para niños cuarta edición; CAVLT-2, Test de Aprendizaje Verbal y Auditivo de California en niños 2da edición; and WRAVMA, Evaluación de amplio rango de habilidades visomotoras ; CPRS-R, Escala de Calificación de Conner para Padres-Revisada versión corta; ADHD, déficit de atención/trastorno de hiperactividad; LDD-15, la prueba de desaturado de Lanthony-15; and CCI, índice de confusión de colores. ^a Puntajes más altos reflejan resultados peores. ^b Data falta para un(a) niño(a). ^c Data faltantes para 5 niños(as).

o pueblos orgánicos. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de metabolitos de plaguicidas para las variables adicionales presentadas en el Cuadro 1.

La distribución de la concentración de metabolitos de plaguicidas en la orina de los niños (n=140) se muestra en el Cuadro 2. La media (Percentiles 25-75) para las concentraciones de TCPy, ETU, y 3-PBA fueron 1.4 (.7 – 3.1), 1.2 (.7 – 3.0) y .8 (.5 – 1.5) µg/L, respectivamente. Las concentraciones de metabolitos de plaguicidas correlacionaron débilmente [Rango de coeficientes de correlación de Spearman: .21 – 3.2 (p≤.01)]. Los ICC correspondieron de la siguiente manera: .52 para TCPy, .67 para ETC y .32 para 3-PBA, indicando lo anterior una confiabilidad temporal moderada (Cuadro 2).

3.2. Exposición a plaguicidas y resultados neuroconductuales.

Un resumen estadístico del desempeño de los niños en diversas tareas neuroconductuales es presentado en el Cuadro 3. Exceptuando la RTT, CPRS/R y la LDD/15, debido a que sus resultados siguieron una distribución normal y se mantuvieron dentro del rango normal. Notablemente, la media del WISC-IV en los índices de razonamiento perceptual, memoria de trabajo y velocidad de procesamiento se encontraban por debajo del promedio (Weschler, 2007), mientras la puntuación de la motora fina se encontró por encima del promedio.

3.2.1. Capacidad Intelectual.

A como se muestra en el Cuadro 4, en general, se encontraron asociaciones nulas entre las concentraciones de TCPy y ETU en orina y los resultados referentes a la capacidad intelectual. Sin embargo, en un análisis estratificado por sexo, se observó que mayores concentraciones de TCPy se encontraban asociadas con un desempeño más pobre en los índices de memoria de trabajo en niños (β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de TCPy = -7.5, 95% CI: -14.4, -7), pero no para el caso de las niñas (β =1.9, 95% CI: -4.7, 8.4; Cuadro 5 y Figura 2). Al respecto del 3-PBA, concentraciones más elevadas se asociaron con índices de velocidad de procesamiento más pobres (Cuadro 4). Esta asociación era más fuerte en el caso de las niñas (β = -8.8, 95% CI: -16.4, -1.4) que en el caso de los niños (β =-1.9, 95% CI: -8.5, -4.6; Cuadro 5).

3.2.2. Problemas Conductuales.

El cuadro 6 muestra como las concentraciones de TCPy se asociaron con un incremento en la posibilidad de problemas cognitivos/inatención reportados por los padres, al utilizar un percentil 75 como punto de corte (aOR=5.8, 95% CI: 1.6, 22.9), reportes de desorden oposicional (aOR=3.9, 95% CI: 1.0, 16.0) e índice de ADHD (aOR= 6.8, 95% CI: 1.8, 28.6). Se observó una asociación nula entre las concentraciones de ETU y 3-PBA en orina con los reportes parentales de problemas de conducta.

3.2.3. Funcionamiento Sensorial (Discriminación de colores).

El Cuadro 6 ilustra como las altas concentraciones de TCPy se encuentran asociadas con un rendimiento pobre en la capacidad para discriminar colores: La probabilidad de tener un ICC medio \geq 1.5 (percentil 75) se incrementó en 6.6 veces (95% CI: 1.6, 30.3) por cada incremento de 10 veces en las concentraciones TCPy. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de ETU o 3-PBA y la discriminación del color.

3.2.4. Percepción y Memoria.

El Cuadro 4 muestra que los niños con mayores concentraciones de ETU tienen una capacidad de aprendizaje verbal reducida (β = -7.0, 95% CI: -12.7, -1.3; Cuadro 4). Los niños con concentraciones elevadas de TCPy mostraron una tendencia a presentar puntuación de memoria visual (β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de TCPy = -1.2, 95% CI: -3.0, .5) pero tales asociaciones no fueron estadísticamente significativas. Las asociaciones fueron similares tanto para niños como para las niñas. Las concentraciones de 3-PBA no mostraron una asociación con los resultados de percepción y memoria (Cuadro 5).

3.2.5. Funcionamiento Motor.

Los niños con una mayor concentración de TCPy mostraron una peor puntuación en la coordinación visomotora (β =-1.4, 95% CI: -2.7, -.1; Cuadro 4). En contraste, se encontraron asociaciones nulas entre las concentraciones de ETU y 3-PBA con el funcionamiento motor (Cuadro 4). Exceptuando el 3-PBA las asociaciones fueron similares tanto para niños como para niñas (Cuadro 5).

Los niños con mayores concentraciones de TCPy y 3-PBA mostraron una tendencia a una peor velocidad psicomotora, tal y como se muestra en sus más largos tiempos de reacción, en comparación con aquellos que tenían una menor concentración [razón de probabilidades ajustada (aOR) (usando un percentil 75 como punto de corte) por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de TCPy y 3-PBA en orina = 2.1, 95% CI: .5, 8.5;

y aOR= 1.5, 95% CI: .6, 4.3; respectivamente, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (Cuadro 6).

4. Discusión.

Los resultados indican que los niños que viven cerca de plantaciones de banano y plátano están expuestos a plaguicidas que pueden afectar su neurodesarrollo. Más específicamente, se observó que la exposición a clorpirifos puede perjudicar la coordinación visomotora, el comportamiento, y la capacidad para discriminar colores tanto en niños como en niñas. Adicionalmente, se encontró que la exposición a Mancozeb y/o su metabolito ETU pueden afectar de manera perjudicial el aprendizaje verbal de los niños. También se encontró que la exposición a químicos piretroides puede perjudicar la velocidad de procesamiento en los niños evaluados, específicamente para el caso de las niñas.

Los hallazgos contrastan con los estudios transversales de Fiedler et al. (2015) y Lu et al. (2009). A pesar de que las medidas de concentración de TCPy y 3-PBA urinario en este estudio son menores a las reportadas por Fiedler et al. (2015), se encontró que las concentraciones de metabolitos de plaguicidas se asocian con resultados neuroconductuales, mientras Fiedler et al. (2015) y Lu et al. (2009) observaron asociaciones nulas. Un estudio realizado por Sánchez Lizardi et al. (2008) reportó que niños con una concentración más elevada de un metabolito OP dialquilfosfato (DAP) no específico en orina tuvo un peor desempeño cognitivo; aunque las asociaciones perdieron el valor estadístico posterior a la exclusión de 2 valores extremos de concentración de DAP en orina. Posiblemente, los estudios de Fiedler et al. (2015), Lu et al. (2009) y Sánchez Lizardi et al. (2008) carecían de poder estadístico debido a que las muestras incluían tan solo 53 o menos participantes.

Varios de nuestros resultados son similares a los reportados por algunos estudios prospectivos (Rauh et al. 2011; Bouchard et al. 2011; Fortenberry et al. 2014). Por ejemplo, un estudio estadounidense encontró que la exposición prenatal a clorpirifos se encontraba asociada con una peor puntuación en memoria de trabajo y la puntuación total de coeficiente intelectual (IQ), pero tan solo para el caso de los niños. Desafortunadamente, el estudio prospectivo realizado en U.S. no examinó la asociación de la exposición postnatal a clorpirifos o la interacción por sexo del niño. En un estudio de cohorte distinto de pares de madre-hijo que viven cerca de campos agrícolas en California (CHAMACOS), la exposición prenatal a OP, estimada utilizando metabolitos DAP, fue asociada con un peor rendimiento en memoria de trabajo, puntuaciones de IQ en niños de edad escolar (Bouchard et al. 2011), pero en el estudio se encontró una asociación nula con la exposición postnatal a OP, tampoco se encontraron diferencias relacionadas al sexo.

Un tercer estudio de cohorte realizado en México (n=187) por Fortenberry et al. (2014) encontró asociaciones significativas dentro del límite de las medidas de concentración de TCPy en orina obtenidas en el tercer trimestre del embarazo con un aumento de los índices de ADHD en niños y problemas de atención en niñas según lo reportado por los padres, a las edades de 6-11 años. En el presente estudio se observó que concentraciones más elevadas de TCPy se asociaban con un incremento en el riesgo de que las madres reportaran niños con desorden oposicional, problemas cognitivos/inatención y ADHD, pero no se pudieron examinar diferencias de género debido a la falta de poder estadístico. Notablemente, a pesar de que las concentraciones de TCPy entre el presente estudio y el realizado en México pudiese ser comparables, la confiabilidad temporal de las concentraciones de TCPy en el presente estudio era mayor (Fortenberry et al. 2014). Los resultados de este estudio son consistentes con lo encontrado en los estudios de cohorte realizados en U.S, los cuales observaron que una mayor exposición prenatal a clorpirifos y OP se asociaba con problemas de ADHD/inatención en niños de 3 a 5 años de edad (Marks et al., 2010; Rauh et al., 2006).

Los hallazgos de este estudio asocian la exposición a piretroides y el neurodesarrollo son en alguna medida consistentes con algunos estudios epidemiológicos que han sido reportados hasta la fecha. Por ejemplo, un estudio transversal que analiza información del NHANES 1999-2002 reportó una asociación nula entre las concentraciones de 3-PBA en orina y los reportes parentales de ADHD en niños de entre 6-15 años (Quirós-Alcalá et al., 2014). A la inversa, otro estudio que también utilizó información del NHANES 2011-2012, encontró que mayores concentraciones de 3-PBA en orina se asociaban con mayores probabilidades de diagnóstico de ADHD y el número de síntomas de ADHD en niños, pero no en niñas, en edades de entre 8-15 años (Wagnerschuman et al., 2015). Un estudio de niños canadienses de entre 6-11 años de edad encontró que la exposición postnatal a piretroides se asociaba con una mayor frecuencia de reportes de problemas de conducta, los cuales eran más pronunciados en el caso de las niñas en contraste a los niños (Oulhote & Bouchard, 2013). En el presente, no se encontró una asociación entre las concentraciones de 3-PBA y el reporte de problemas conductuales, pero se observó que los niños con una mayor concentración de 3-PBA tendieron a tener peores resultados a nivel atencional, reflejado en sus más largos tiempos de respuesta (medias), en contraste con aquellos que tenían concentraciones más bajas.

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta los potenciales efectos del mancozeb y su metabolito ETU en el neurodesarrollo. Por tanto, no se pueden comparar estos hallazgos con los de estudios previos. Adicionalmente, este es el primer estudio que informa sobre los posibles efectos de la exposición a

plaguicidas en la coordinación visomotora y el funcionamiento sensorial, como las habilidades para discriminar color. Sin embargo, consistente con los hallazgos, un estudio con personas que aplican clorpirifos usó la misma prueba que en el presente estudio (LDD-15) y encontró que un incremento en las concentraciones de TCPy en orina se asociaba con una pobre capacidad para discriminar colores (Dick, Steenland, Krieg & Hines, 2001).

Como las exposiciones, en general, eran similar tanto para niños como para niñas, los efectos neuroconductuales puede que difieran entre niños y niñas. El clorpirifos, el mancozeb y los químicos piretroides son sospechados disruptores neuroendocrinos que pueden conducir a diferencias de comportamiento sexualmente dimórficas en los niños (Rosenfeld & trainor, 2014; Venerosi, Tait & Calamandrei, 2012). No obstante, una limitación de este estudio es su relativo pequeño tamaño de muestra (n=140), aún más reducido en los análisis estratificados, condición que limitó su poder estadístico. Sin embargo, nuestra población de estudio fue más de dos veces mayor que los reportados en estudios transversales previos sobre exposición a plaguicidas y neurodesarrollo en niños de edad escolar (Sánchez Lizardiet al. 2008; Lu et al., 2009; Fiedler et al., 2015).

Una fortaleza de este estudio es que la exposición a plaguicidas se estimó utilizando biomonitoreo, el cual es considerado el estándar de oro para evaluar la exposición, debido a que toma en cuenta todas las vías de exposición, absorción y metabolización (Fenske, Bradman, Whyatt, Wolf & Barr, 2005). Una fortaleza adicional es que, de más un cuarto de la población (n=40), se obtuvo una o más muestras de orinas repetidas, lo que permitió comprender si las concentraciones urinarias representaban exposiciones a largo plazo (Rosner, 2006), ya que los metabolitos de los plaguicidas que se evaluaron tienen un tiempo de vida relativamente corto.

Las inferencias que pueden extraerse del presente estudio se ven limitadas por un tamaño de muestra relativamente pequeño, condición que se ve reflejada en los amplios intervalos de razón de probabilidades. Otra limitación es el diseño transversal del presente estudio. Sin embargo, casi con seguridad se puede asumir que la exposición a plaguicidas comenzó durante el embarazo para la mayoría de los niños. La mayoría de los niños (86%) ha vivido en el mismo pueblo durante toda su vida, donde el uso de plaguicidas ha sido similar durante la última década. Adicionalmente, se observó una confiabilidad temporal aceptable para las concentraciones de plaguicidas, lo que sugiere que las medidas de concentración predicen la exposición crónica al menos hasta cierto punto. Sin embargo, no se tiene certeza de qué período de exposición reflejan los metabolitos de los plaguicidas urinarios y si las asociaciones observadas son el resultado de la exposición prenatal o postnatal, crónica o aguda, o una combinación de las mencionadas. Otra limitación del estudio es que las pruebas administradas pueden estar influenciadas por diferencias culturales, ya que las pruebas no están estandarizadas para la población costarricense. Por tanto, a priori, se decidió excluir de la evaluación los índices de la prueba de comprensión verbal del WISC-IV. A pesar de que los restantes índices se encontraban por debajo del promedio, la variabilidad en los resultados en las pruebas fueron lo suficientemente grandes para detectar asociaciones estadísticamente significativas con el incremento de las concentraciones de metabolitos de plaguicidas. Además, dado que comparamos a los niños con diferentes gradientes de exposición a plaguicidas que vivían en contextos socioeconómicos y culturales similares y todos recibían educación similar, los efectos sobre los resultados de las pruebas debido a las diferencias culturales afectarían a todos los niños de manera similar, independientemente de su nivel de exposición.

5. Conclusiones.

Los resultados indican que los niños de entre 6-9 años de edad que viven en las cercanías de las plantaciones de banano y plátano en la región de Talamanca, Costa Rica, tienen una mayor exposición a clorpirifos y mancozeb en comparación a niños que viven cerca de pueblos con granjas orgánicas. En contraste, los algo más bajos niveles de concentración de 3-PBA en orina parecen reflejar la exposición residencial o exposición mediante alimentos, esto debido a que las concentraciones no difirieron entre los pueblos. Los resultados indican que la exposición a clorpirifos puede perjudicar la cognición de los niños, su conducta, y las funciones sensoriales y motoras; el mancozeb y los piretroides puede que también afecten las capacidades cognitivas. Adicionalmente, se observaron diferencias relacionadas con el sexo en las asociaciones entre la exposición a plaguicidas y los resultados neuroconductuales que ameritan alguna investigación adicional. En vista de tales hallazgos, se recomienda implementar medidas para reducir la exposición a plaguicidas en los niños que viven cerca de las plantaciones de banano y plátano, esto para prevenir los posibles efectos neuroconductuales asociados a tales exposiciones.

Cuadro 4. Efecto estimado (β , con un 95% CI) de los modelos de regresión lineal ajustados^{a,b} para los resultados neuroconductuales en niños entre los 6-9 años de edad por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de plaguicidas en orina ($\mu\text{g/L}$), cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007 ($n = 140$).

Resultados^c	TCPy	ETU	3-PBA
Habilidades Intelectuales			
Escala WISC-IV			
Memoria de Trabajo	-2.1 (-6.6, 2.5)	0.3 (-2.7, 3.4)	-0.2 (-4.1, 3.7)
Velocidad de procesamiento	-2.0 (-7.9, 4.0)	-0.1 (-4.1, 4.0)	-5.3 (-10.3, -0.2)*
Razonamiento Perceptual	3.0 (-1.9, 8.0)	1.6 (-1.7, 4.9)	-0.4 (-4.7, 3.9)
Percepción y memoria			
<i>Construcción visoespacial y memoria visual</i>			
Figura Rey-Osterrieth			
Copiado	-0.6 (-2.5, 1.2)	0.1 (-1.1, 1.3)	-0.2 (-1.7, 1.4)
Recuperación retrasada	-1.2 (-3.0, 0.5)	0.2 (-1.0, 1.4)	0.4 (-1.1, 1.9)
<i>Habilidades de aprendizaje verbal y memoria</i>			
CAVLT-2 ^d			
Recuperación inmediata	-3.9 (-14.0, 6.1)	-3.0 (-9.8, 3.7)	-3.2 (-11.8, 5.5)
Recuperación retrasada	-0.7 (-9.4, 7.9)	-0.9 (-6.7, 4.9)	-0.8 (-8.2, 6.7)
Nivel de aprendizaje	-4.1 (-12.8, 4.6)	-7.0 (-12.7, -1.3)*	-2.8 (-10.2, 4.6)
Funcionamiento motor			
<i>Coordinación visomotora</i>			
Coordinación ojo-mano (DTVP-2) (media) ^d	-1.4 (-2.7, -0.1)*	0.0 (-0.9, 0.8)	-0.3 (-1.4, 0.8)
<i>Coordinación motora fina</i>			
Tablero de clavijas WRAVMA	-0.4 (-9.1, 8.3)	0.2 (-5.6, 6.1)	0.2 (-7.1, 7.5)

Abreviaciones: TCPy, 3,5,6-tricloro 2-piridinol ; ETU, etilenotiourea ; 3-PBA, 3- ácido fenoxibenzoico ; CI, Intervalo de Confianza; WISC-IV, Escala de Inteligencia para niños Wechsler 4^a edición; CAVLT-2, Prueba de aprendizaje verbal auditivo para niños 2^a edición; y la WRAVMA, Evaluación de amplio rango de la capacidad visomotora .

^a Modelos ajustados por educación materna , sexo del niño, edad al momento de la evaluación, índice de masa corporal, número de hermanos, niños que han repetido algún año de escuela, niveles de creatinina en orina (medido en las mismas muestras con las cuales las concentraciones de plaguicidas fueron cuantificadas), y deterioro de la agudeza visual (CAVLT-2, los modelos no se ajustaron para esta última variable).

^b Excluyendo valores atípicos con residuos estudentizados $> |3|$: WISC-IV memoria de trabajo ($n = 2$), Velocidad de procesamiento ($n=1$), Razonamiento perceptual ($n = 2$), Figura Rey-Osterrieth, Copiado ($n = 1$).

^c Los resultados se muestran en puntuaciones estandarizadas, excepto la prueba Figura de Rey-Osterrieth, para la cual las puntuaciones crudas se usaron para el análisis.

^d Se perdió el dato de CAVLT-2 y coordinación ojo-mano (DTVP-2) para una niña.

$p < 0.10$; * $p < 0.05$.

Cuadro 5. Efecto estimado (β , con un 95% CI) de los modelos de regresión lineal ajustados^{a,b} para los resultados neuroconductuales, niños (n = 69) y niñas (n = 71) entre los 6-9 años de edad por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de plaguicidas en orina ($\mu\text{g/L}$), cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007.

Resultados ^c	TCPy			ETU			3-PBA		
	Niños	Niñas	<i>p</i> _{int}	Niños	Niñas	<i>p</i> _{int}	Niños	Niñas	<i>p</i> _{int}
Intellectual ability									
Escalas WISC-IV									
Memoria de Trabajo ^d	-7.5 (-14.4, -0.7)*	1.9 (-4.7, 8.4)	0.15	-3.6 (-8.4, 1.1)	3.2 (-0.8, 7.3)	0.04	-0.8 (-6.4, 4.9)	1.0 (-4.5, 6.5)	0.62
Velocidad de procesamiento ^e	0.4 (-7.5, 8.3)	-3.3 (-12.5, 5.8)	0.13	-0.2 (-5.3, 5.8)	0.4 (-5.4, 6.2)	0.45	-1.9 (-8.5, 4.6)	-8.8 (-16.1, -1.4)*	0.04
Razonamiento Perceptual ^f	5.9 (-1.8, 13.6)	0.3 (-6.9, 7.5)	0.35	0.3 (-5.2, 5.9)	2.6 (-1.9, 7.0)	0.49	3.8 (-2.7, 10.3)	-3.9 (-9.8, 2.0)	0.08
Percepción y memoria.									
<i>Construcción visoespacial y memoria visual</i>									
Figura Rey-Osterrieth									
Copiado ^g	-1.5 (-3.9, 1.0)	-0.3 (-3.1, 2.5)	0.94	-0.8 (-2.6, 0.9)	1.0 (-0.8, 2.7)	0.46	-0.6 (-2.7, 1.5)	0.3 (-2.1, 2.6)	0.60
Recuperación retrasada	-1.1 (-4.0, 1.7)	-1.7 (-4.0, 0.7)	0.41	0.4 (-1.6, 2.4)	0.3 (-1.2, 1.8)	0.53	1.1 (-1.3, 3.4)	-0.2 (-2.2, 1.8)	0.06
<i>Habilidades de aprendizaje verbal y memoria</i>									
CAVLT-2 ^f									
Recuperación inmediata	0.4 (-14.0, 14.7)	-10.1(-25.3, 5.2)	0.12	-6.2 (-16.2, 3.9)	-2.2 (-11.9, 7.5)	0.80	2.1 (10.0, 14.2)	-7.4 (-20.1, 5.4)	0.35
Recuperación retrasada	1.8 (-10.5, 14.2)	-3.9 (-16.8, 9.0)	0.40	-3.9 (-12.7, 4.8)	-0.5 (-7.7, 8.6)	0.81	7.4 (-2.9, 17.7)	-8.1 (-18.7, 2.6)	0.09
Nivel de aprendizaje	-9.0 (-21.9, 4.0)	-1.1 (-13.2, 11.0)	0.61	-8.0 (-17.1, 1.2)	-5.6 (-13.1, 1.9)	0.59	0.5 (-10.6, 11.7)	-4.8 (-14.8, 5.3)	0.27
Funcionamiento Motor									
<i>Coordinación visomotora</i>									
Coordinación ojo-mano (DTVP-2) (media) ^f	-0.9 (-2.9, 1.0)	-2.2 (-4.1, -0.3)*	0.62	0.1 (-1.3, 1.5)	-0.2 (-1.4, 1.0)	0.89	0.4 (-1.2, 2.1)	-1.1 (-2.7, 0.5)	0.48
<i>Motora fina</i>									
Tablero de clavijas WRAVMA	-3.2 (-16.0, 9.7)	3.4 (-7.5, 14.4)	0.65	-0.5 (-9.6, 8.6)	0.7 (-6.2, 7.7)	0.95	5.8 (-4.9, 16.5)	-3.8 (-13.0, 5.3)	0.17

Abreviaciones: TCPy, 3,5,6-tricloro 2-piridinol ; ETU, etilenotiourea ; 3-PBA, 3- ácido fenoxibenzoico ; CI, Intervalo de Confianza; WISC-IV, Escala de Inteligencia para niños Wechsler 4a edición; CAVLT-2, Prueba de aprendizaje verbal auditivo para niños 2a edición; y la WRAVMA, Evaluación de amplio rango de la capacidad visomotora .

^a Modelos ajustados por educación materna , sexo del niño, edad al momento de la evaluación, índice de masa corporal, número de hermanos, niños que han repetido algún año de escuela, niveles de creatinina en orina (medido en las mismas muestras con las cuales las concentraciones de plaguicidas fueron cuantificadas), y deterioro de la agudeza visual (CAVLT-2, los modelos no se ajustaron para esta última variable).

^b Excluyendo valores atípicos con residuos estudentizados > |3|.

^c Los resultados se muestran en puntuaciones estandarizadas, excepto la prueba Figura de Rey-Osterrieth, para la cual las puntuaciones crudas se usaron para el análisis.

^d Para niños, 2 valores atípicos con residuos estudentizados > |3| se excluyeron del análisis.

^e Para niños, 2 valores atípicos con residuos estudentizados > |3| se excluyeron del análisis.

^f Para niñas, 2 valores atípicos con residuos estudentizados > |3| se excluyeron del análisis.

^h Se perdió el dato de CAVLT-2 y coordinación ojo-mano (DTVP-2) para una niña.

$p < 0.10$; * $p < 0.05$.

Table 6. Razón de probabilidad (con un 95% CI) de los modelos de regresión logística ajustados^a para los resultados neuroconductuales en niños entre los 6-9 años de edad por cada incremento de 10 veces en las concentraciones de plaguicidas en orina ($\mu\text{g/L}$), cantón de Talamanca, Costa Rica, 2007 ($n = 124$).

Resultados^b	TCPy	ETU	3-PBA
<i>Funcionamiento sensorial (discriminación del color)</i>			
LDD-15 (media CCI \geq P50)	3.5 (1.0, 12.9) [*]	1.2 (0.5, 2.9)	0.8 (0.3, 2.2)
LDD-15 (media CCI \geq P75)	6.6 (1.6, 30.3) [*]	1.1 (0.4, 3.1)	1.7 (0.5, 5.8)
<i>Problemas conductuales</i>			
CPRS-R (T-puntaje \geq P50):			
Problemas cognitivos/Inatención	3.2 (0.9, 11.8) [#]	1.0 (0.4, 2.4)	0.5 (0.2, 1.4)
Desorden Oposicional	3.8 (1.2, 13.5) [*]	0.6 (0.2, 1.3)	1.6 (0.6, 4.5)
Hiperactividad	1.9 (0.6, 6.3)	1.4 (0.6, 4.3)	1.1 (0.0, 10.1)
Índice de ADHD	2.0 (0.6, 6.7)	0.7 (0.3, 1.4)	0.6 (0.2, 1.6)
CPRS-R (T-puntaje \geq P75):			
Problemas cognitivos/Inatención	5.8 (1.6, 22.9) ^{**}	1.0 (0.4, 2.4)	0.7 (0.2, 2.0)
Desorden Oposicional	3.9 (1.0, 16.0) [*]	0.7 (0.3, 1.8)	1.5 (0.5, 5.0)
Hiperactividad	2.6 (0.6, 10.8)	1.1 (0.4, 2.8)	0.8 (0.2, 2.6)
Índice de ADHD	6.8 (1.8, 28.6) ^{**}	0.9 (0.4, 2.2)	0.8 (0.2, 2.6)
<i>Velocidad psicomotora</i>			
Prueba de tiempo de reacción (Puntuación cruda \geq P50) ^c	2.4 (0.7, 8.9)	1.3 (0.6, 3.1)	0.4 (0.1, 1.3)
Prueba de tiempo de reacción (Puntuación cruda \geq P75) ^c	2.1 (0.5, 8.5)	1.5 (0.6, 4.3)	0.7 (0.2, 2.6)

Abreviaciones: TCPy, 3,5,6-tricloro 2-piridinol ; ETU, etilenotiourea ; 3-PBA, 3- ácido fenoxibenzoico ; OR, Razón de probabilidad; CI, Intervalo de confianza; CPRS-R, Escala de clasificación de los Padres de Connors revisada; ADHD, Desorden de déficit atencional/hiperactividad; LDD-15, Prueba de desaturado de Lanthony D-15; y CCI, índice de confusión del color.

^a Modelos ajustados por educación materna , sexo del niño, edad al momento de la evaluación, índice de masa corporal, número de hermanos, niveles de creatinina en orina (medido en las mismas muestras con las cuales las concentraciones de plaguicidas fueron cuantificadas) y deterioro de la agudeza visual.

^b Reference category for all outcomes: raw scores, T-scores, or mean ICC < 50 or 75th percentile, respectively.

^c Data missing for 5 children.

[#] $p < 0.10$; ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$.

Leyenda

Resumen gráfico (página siguiente).

A. Fumigación aérea de mancozeb en Daytona, con bolsas azules tratadas con clorpirifos en el fondo (foto de Karin Hallén); **B.** Bolsas tratadas con clorpirifos en Shiroles; **C.** Niños con edad escolar en una plantación de plátano en Shiroles.



A.



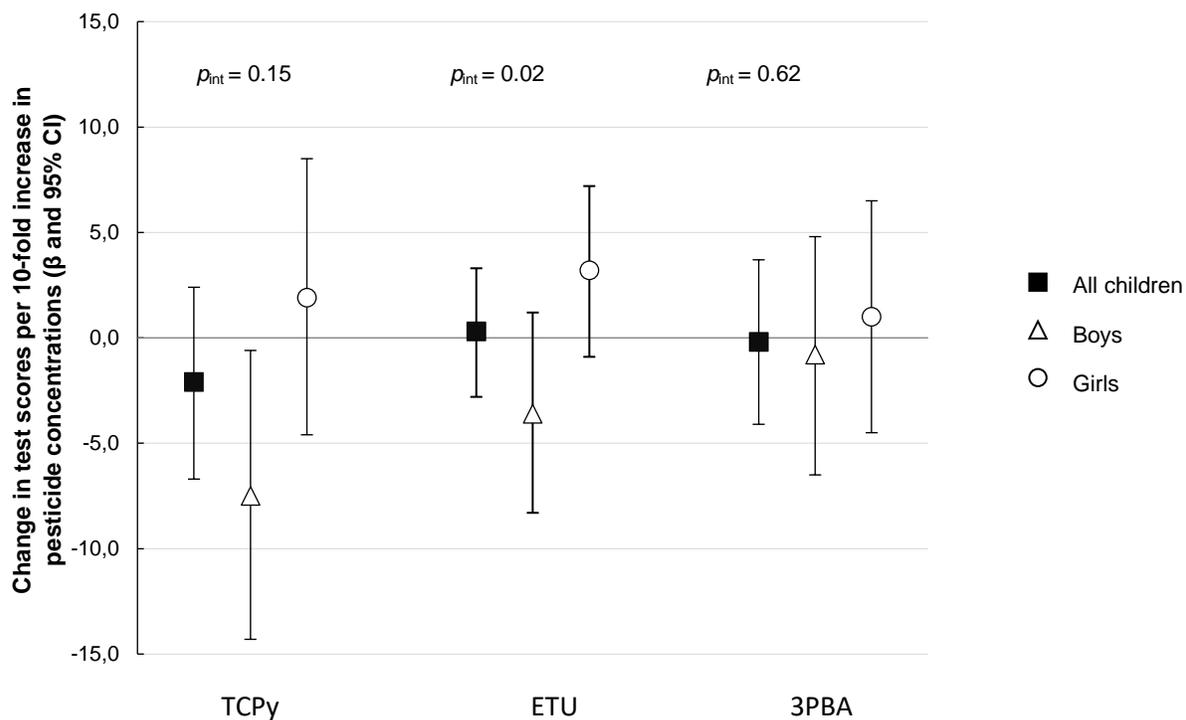
B.



C.

Figura 2. Adjusted linear models for WISC-IV Working Memory IQ at age 6-9 years per 10-fold increase in urinary pesticide concentrations ($\mu\text{g/L}$) stratified by child sex. Models adjusted for maternal education, child's age at neurobehavioral assessment; body mass index, number of siblings, urinary creatinine levels, and visual acuity impairment. *Abbreviations:* TCPy, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol; ETU, ethylenethiourea; 3-PBA, 3-phenoxybenzoic acid; WISC-IV, Wechsler Intelligence Scale for Children 4th edition.

Figure 2.



Expresiones de Gratitud

Agradecemos a Mariam Gutiérrez y a Darío Villagra por su ayuda en la recolección de datos. Estamos en deuda con los participantes del estudio por su amable colaboración. Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigación para el Desarrollo Internacional de Canadá y por las subvenciones 2010-1211 y 2009-2070 del Consejo Sueco de Investigación para el Medio Ambiente, Ciencias Agrícolas y Ordenación del Territorio.

Referencias.

- Adams, W., & Shelow, D. (1995). Wide range assessment of visual motor ability (WRAVMA). Wilmington, Delaware, USA: Wide Range., Inc.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2003). Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. Atlanta, GA: ATSDR. Retrieved from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp155.pdf>.
- Barraza, D., Jansen, K., van Wendel de Joode, B., & Wesseling, C. (2011). Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica. *Environmental Research*, 111(5), 708717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.02.009>.
- Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudill, S. P., Gonzalez, A. J., Needham, L. L., & Pirkle, J. L. (2005). Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environmental Health Perspectives*, 113(2), 192-200. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7337>.
- Bjørning-Poulsen, M., Andersen, H. R., & Grandjean, P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 7, 50. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-7-50>.
- Bouchard, M. F., Bellinger, D. C., Wright, R. O., & Weisskopf, M. G. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics*, 125(6), e1270-e1277. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2009-3058>.
- Bouchard, M. F., Chevrier, J., Harley, K. G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., et al. (2011). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1189-1195. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003185>.
- Bravo Durán, V., de la Cruz Malavassi, E., Herrera Ledezma, G., & Ramírez Muñoz, F. (2013). Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. *Uniciencia*, 27(1), 351-376. <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/4960/4754>. (In Spanish).
- Bowman, K. J. (1982). A method for quantitative scoring of the Farnsworth Panel D-15. *Acta Ophthalmologica*, 60(6), 907-916.
- Conners, K. C. (1997). Conners' rating scales e revised (CRS-R) technical manual. Toronto, Canada: Multi-Health Systems Inc.
- Cortés, S., J., Galindo, G., Villa, M., & Salvador, C., J. (1997). La Figura Compleja de Rey para niños: propiedades psicométricas. *Salud Mental*, 20(2), 17-20. Retrieved from: <http://www.inprf-cd.gob.mx/pdf/sm2002/sm200217.pdf?PHPSESSID¼e3dbde808a4c2dd81cfa2a40e6cbf23f>.
- Dick, R. B., Steenland, K., Krieg, E. F., & Hines, C. J. (2001). Evaluation of acute sensory-motor effects and test sensitivity using termiticide workers exposed to chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(4), 381-393. [http://dx.doi.org/10.1016/S08920362\(01\)00143-X](http://dx.doi.org/10.1016/S08920362(01)00143-X).
- Doerge, D. R., & Takazawa, R. S. (1990). Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chemical Research in Toxicology*, 3(2), 98-101. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2130946>.
- Domico, L. M., Cooper, K. R., Bernard, L. P., & Zeevalk, G. D. (2007). Reactive oxygen species generation by the ethylene-bisdithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, 28(6), 1079-1091. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.008>.
- Elfman, L., Hogstedt, C., Engvall, K., Lampa, E., & Lindh, C. H. (2009). Acute health effects on planters of conifer seedlings treated with insecticides. *Annals of Occupational Hygiene*, 53(4), 383-390. <http://annhyg.oxfordjournals.org/content/53/4/383>.

- Engel, S. M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D. B., Canfield, R. L., et al. (2011). Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1182-1188. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003183>.
- Eriksson, P., & Fredriksson, A. (1991). Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: Changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(1), 78-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(91\)90270-O](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(91)90270-O).
- Eskenazi, B., Marks, A. R., Harley, K., Bradman, A., Johnson, C., Barr, D. B., et al. (2006). Organophosphate pesticides and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Epidemiology*, 17(Suppl), S102-S103. <http://dx.doi.org/10.1097/00001648-200611001-00248>.
- Fenske, R. A., Bradman, A., Whyatt, R. M., Wolff, M. S., & Barr, D. B. (2005). Lessons learned for the assessment of children's pesticide exposure: Critical sampling and analytical issues for future studies. *Environmental Health Perspectives*, 113(10), 1455-1462. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7674>.
- Fiedler, N., Rohitrattana, J., Siriwong, W., Suttiwan, P., Ohman Strickland, P., Ryan, P. B., et al. (2015). Neurobehavioral effects of exposure to organophosphates and pyrethroid pesticides among Thai children. *Neurotoxicology*, 48, 90-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.015.02.003>.
- Flaskos, J. (2014). The neuronal cytoskeleton as a potential target in the developmental neurotoxicity of organophosphorothionate insecticides. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12204>.
- Fortenberry, G. Z., Meeker, J. D., Sánchez, B. N., Barr, D. B., Panuwet, P., Bellinger, D., et al. (2014). Urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPY) in pregnant women from Mexico City: Distribution, temporal variability, and relationship with child attention and hyperactivity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(2-3), 405-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.018>.
- Geller, A. M. (2001). A table of color distance scores for quantitative scoring of the Lanthony Desaturate color vision test. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(3), 265-267. [http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362\(01\)00139-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362(01)00139-8).
- Grandjean, P., & Landrigan, P. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*, 368(9553), 2167-2178.
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L. & Sheppard, B. (2010). Mancozeb, past, present and future. *Plant Disease*, 94(9), 1076-1087.
- Hammill, D. D., Pearson, N. A., Voress, J. K., & Alvarado Guerrero, I. R. (1995). In L. Blanca (Ed.), *DTVP-2 Métodos de evaluación de la percepción visual de Frostig* (2nd ed.). El Manual Moderno SA México DF.
- Hornung, R. W., & Reed, R. D. (1990). Estimation of average concentration in the presence of non-detectable values. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 5(1), 46-51.
- Horton, M. K., Rundle, A., Camann, D. E., Boyd Barr, D., Rauh, V. A., & Whyatt, R. M. (2011). Impact of prenatal exposure to piperonyl butoxide and permethrin on 36-month neurodevelopment. *Pediatrics*, 127(3), e699-e706. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2010-0133>.
- Jones, C. R. G., Happ_e, F., Pickles, A., Marsden, A. J. S., Tregay, J., Baird, G., et al. (2011). "Everyday memory" impairments in autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(4), 455-464. <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-010-1067-y>.
- Keith Connors, C., Sitarenios, G., Parker, J. D. A., & Epstein, J. N. (1998). The revised Connors' Parent Rating Scale (CPRS-R): Factor structure, reliability, and criterion validity. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 26(4), 257-268. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022602400621>.
- Knight, E. (2003). In J. Kaplan (Ed.), *The handbook of Rey-Osterrieth complex figure usage: Clinical and research applications* (1st ed.). Psychological Assessment Resources.
- Lezak, M., Howieson, D., & Loring, D. (2004). *Neuropsychological assessment* (4th ed.). New York: Oxford University Press.
- Lindh, C. H., Littorin, M., Amilon, A., & Jönsson, B. A. G. (2008). Analysis of phenoxyacetic acid herbicides as biomarkers in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(2), 143-150. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.334>.
- Lindh, C. H., Littorin, M., Johannesson, G., & Jönsson, B. A. G. (2008). Analysis of ethylenethiourea as a biomarker in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(16), 2573-2579. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3647>.

- Lu, C., Essig, C., Root, C., Rohlman, D. S., McDonald, T., & Sulzbacher, S. (2009). Assessing the association between pesticide exposure and cognitive development in rural Costa Rican children living in organic and conventional coffee farms. *International Journal of Adolescent Medicine and Health*, 21(4), 609-621. <http://dx.doi.org/10.1515/IJAMH.2009.21.4.609>.
- Marks, A. R., Harley, K., Bradman, A., Kogut, K., Barr, D. B., Johnson, C., et al. (2010). Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: The CHAMACOS study. *Environmental Health Perspectives*, 118(12), 1768-1774. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002056>.
- Mazzachi, B. C., Peake, M. J., & Ehrhardt, V. (2000). Reference range and method comparison studies for enzymatic and Jaffe creatinine assays in plasma and serum and early morning urine. *Clinical Laboratory*, 46(1e2), 53-55, 10745982.
- Mergler, D. (2012). Neurotoxic exposures and effects: Gender and sex matter! H€anninen Lecture 2011. *Neurotoxicology*, 33(4), 644-651. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.05.009>.
- Oulhote, Y., & Bouchard, M. F. (2013). Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. *Environmental Health Perspectives*, 121(11-12), 1378-1384. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1306667>.
- Oulhote, Y., Mergler, D., Barbeau, B., Bellinger, D. C., Bouffard, T., Brodeur, M.-E., et al. (2014). Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 122(12), 1343-1350. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307918>.
- PNUD-UCR. (2012). Atlas del desarrollo humano cantonal de Costa Rica. Retrieved January 28, 2016, from: <http://desarrollohumano.or.cr/mapa-cantonal/desarrollo-humano.html>.
- Quirós-Alcalá, L., Mehta, S., & Eskenazi, B. (2014). Pyrethroid pesticide exposure and parental report of learning disability and attention deficit/hyperactivity disorder in U.S. children: NHANES 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 122(12), 1336-1342. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1308031>.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D. B., et al. (2011). Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1196-1201. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003160>.
- Rauh, V. A., Garfinkel, R., Perera, F. P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D. B., et al. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*, 118(6), e1845-e1859. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2006-0338>.
- Richardson, J. R., Taylor, M. M., Shalat, S. L., Guillot, T. S., Caudle, W. M., Hossain, M. M., et al. (2015). Developmental pesticide exposure reproduces features of attention deficit hyperactivity disorder. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(5), 1960-1972. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.14-260901>.
- Riojas-Rodríguez, H., Solís-Vivanco, R., Schilman, A., Montes, S., Rodríguez, S., Ríos, C., et al. (2010). Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environmental Health Perspectives*, 118(10), 1465-1470. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901229>.
- Rodríguez, T., Younglove, L., Lu, C., Funez, A., Weppner, S., Barr, D. B., et al. (2006). Biological monitoring of pesticide exposures among applicators and their children in Nicaragua. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 12(4), 312-320.
- Rosenfeld, C. S., & Trainor, B. C. (2014). Environmental health factors and sexually dimorphic differences in behavioral disruptions. *Current Environmental Health Reports*, 1(4), 287-301. <http://dx.doi.org/10.1007/s40572-014-0027-7>.
- Rosner, B. (2006). *Fundamentals of biostatistics* (6th ed.). Pacific Grove, CA: Duxbury Press. Saillenfait, A.-M., Ndiaye, D., & Sabat_e, J.-P. (2015). Pyrethroids: Exposure and health effects e an update. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(3), 281-292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.01.002>.
- Sánchez Lizardi, P., O'Rourke, M. K., & Morris, R. J. (2008). The effects of organophosphate pesticide exposure on Hispanic children's cognitive and behavioral functioning. *Journal of Pediatric Psychology*, 33(1), 91-101. <http://dx.doi.org/10.1093/jpepsy/jsm047>.
- Talley, J. L. (1997). Children's auditory verbal learning teste2 (CAVLT-2). Psychological Assessment Resources (PAR), Inc.
- Torres-Agusti'n, R., Rodríguez-Agudelo, Y., Schilman, a., Solís-Vivanco, R., Montes, S., Riojas-Rodríguez, H., et al. (2013). Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. *Environmental Research*, 121, 39-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2012.10.007>.

- Vaccari, A., Saba, P., Mocci, I., & Ruiu, S. (1999). Dithiocarbamate pesticides affect glutamate transport in brain synaptic vesicles. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(1), 1-5. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862745>.
- Venerosi, A., Ricceri, L., Tait, S., & Calamandrei, G. (2012). Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos. *Neurotoxicology*, 33(6), 1420-1426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.009>.
- Wagner-schuman, M., Richardson, J. R., Auinger, P., Braun, J. M., Lanphear, B. P., Epstein, J. N., et al. (2015). Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U. S. children. *Environmental Health*, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-015-0030-y>.
- Wechsler, D. (2007). WISC-IV Escala Wechsler de Inteligencia para niños IV: Manual Técnico traducido por Gloria Padilla Sierra, México. México DF: Editorial el Manual Moderno SA. México DF.
- van Wendel de Joode, B., Barraza, D., Ruepert, C., Mora, A. M., Córdoba, L., Öberg, M., et al. (2012). Indigenous children living nearby plantations with chlorpyrifos-treated bags have elevated 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy) urinary concentrations. *Environmental Research*, 117, 17-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2012.04.006>.
- van Wendel de Joode, B., Mora, A. M., Córdoba, L., Cano, J. C., Quesada, R., Faniband, M., et al. (2014). Aerial application of mancozeb and urinary ethylene thiourea (ETU) concentrations among pregnant women in Costa Rica: The Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environmental Health Perspectives*, 10-12. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307679>.
- Xue, Z., Li, X., Su, Q., Xu, L., Zhang, P., Kong, Z., et al. (2013). Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. *Asia-Pacific Journal of Public Health/Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health*, 25(4 Suppl), 72Se79S. <http://dx.doi.org/10.1177/1010539513496267>.
- Yang, D., Lauridsen, H., Buels, K., Chi, L. H., La Du, J., Bruun, D. A., et al. (2011). Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. *Toxicological Sciences*, 121(1), 146-159. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr028>.