

La exposición prenatal al mancozeb, exceso de manganeso y neurodesarrollo al año de edad en el estudio Infantes y Salud Ambiental (ISA)

Ana M. Mora, MD, PhD^{1,2}, Leonel Córdoba, MSc¹, Juan Camilo Cano, MSc¹, David Hernández-Bonilla, MSc³, Larissa Pardo, MPH¹, Lourdes Schnaas, PhD,⁴ Donald R. Smith, PhD,⁵ José A. Menezes-Filho, PhD⁶, Donna Mergler, PhD⁷, Christian H. Lindh, PhD⁸, Brenda Eskenazi, PhD², Berna van Wendel de Joode, PhD¹

1. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica
2. Center for Environmental Research and Children's Health (CERCH), School of Public Health, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA;
3. Departamento de Salud Ambiental, Instituto Nacional de Salud Pública, Ciudad de México, México
4. Departamento de Investigación en Intervenciones Comunitarias, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, México.
5. Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA.
6. Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil.
7. Centre for Interdisciplinary Research Centre on Health, Well-being, Society and Environment (CINBIOSE), University of Quebec in Montreal, Montreal, Quebec, Canada
8. Division of Occupational and Environmental Medicine, Institute of Laboratory Medicine, Lund University, Lund, Sweden.

Traducción no-oficial del artículo: Prenatal Mancozeb Exposure, Excess Manganese, and Neurodevelopment at 1 Year of Age in the Infants' Environmental Health (ISA) Study. Mora AM, Córdoba L, Cano JC, Hernandez-Bonilla D, Pardo L, Schnaas L, Smith DR, Menezes-Filho JA, Mergler D, Lindh CH, Eskenazi B, van Wendel de Joode B. Environ Health Perspect. 2018 May 29;126(5):057007. doi: 10.1289/EHP1955.

Resumen

Antecedentes y objetivo. A pesar de que existe evidencia que sugiere que el exceso de manganeso (Mn) en etapas tempranas de la vida afecta el neurodesarrollo, la información sobre los efectos del mancozeb, un fungicida que contiene Mn, y su principal metabolito etilentiourea (ETU), en el neurodesarrollo es limitada. Por esta razón, realizamos un estudio para examinar si la exposición prenatal a mancozeb y el exceso de Mn, se asociaban con los efectos en el neurodesarrollo de 355 infantes de un año de edad que vivían cerca de plantaciones bananeras con fumigaciones aéreas frecuentes de mancozeb.

Métodos. Medimos las concentraciones de ETU en muestras de orina y de Mn en muestras de cabello y sangre, recolectadas entre un a y tres veces durante el embarazo, de 449 madres del estudio Infantes y Salud Ambiental (ISA). Luego, evaluamos el neurodesarrollo en infantes de un año de edad utilizando las Escalas Bayley para el Desarrollo de Infantes y Niños (Bayley Scales of Infant and Toddler Development), 3ra edición. Estimamos las asociaciones de exposición-efecto mediante modelos de regresión lineal ajustados por educación materna, paridad, edad gestacional al nacer, edad del infante, calidad del ambiente familiar y lugar de la evaluación del neurodesarrollo.

Resultados. Las medianas (P25-P75) de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre medidos durante el embarazo fueron 3.3 $\mu\text{g/L}$ (2.4-4.9; corregido por gravedad específica), 1.7 $\mu\text{g/g}$ (0.9-4.1) y 24.0 $\mu\text{g/L}$ (20.3-28.0), respectivamente. En niñas, concentraciones más altas de ETU se asociaron con puntajes socio-emocionales más bajos [β por aumento de 10-veces = -7.4 puntos (95% CI: -15.2, 0.4)], y concentraciones más altas de Mn en cabello se asociaron con puntajes cognitivos más bajos [-3.0 (-6.1, 0.1)]. En niños, concentraciones más altas de Mn en cabello se asociaron con puntajes socio-emocionales más bajos [-4.6 (-8.5, -0.8)]. Observamos asociaciones nulas para las concentraciones de Mn en sangre y las escalas de lenguaje y motora.

Conclusiones. Nuestros resultados indican que las niñas de madres con concentraciones más altas de Mn y ETU durante el embarazo tenían un desarrollo cognitivo y socio-emocional más bajo al año de edad, respectivamente, que las niñas cuyas madres tenían concentraciones más bajas. Por su parte, los niños varones de madres con concentraciones más altas de Mn durante el embarazo tenían un desarrollo socio-emocional más bajo que los niños de madres con concentraciones más bajas.

Introducción

Los fungicidas de etilenobisditiocarbamatos (EBDC) que contienen manganeso (Mn), tales como el mancozeb y maneb, se utilizan ampliamente en la agricultura y en el manejo profesional de la hierba (U.S. EPA 2005). Los EBDCs contienen aproximadamente 21% de Mn por peso (FAO 1980), y estudios recientes sugieren que su uso puede constituir una fuente de etilentiourea (ETU) (van Wendel de Joode et al. 2014), el metabolito principal de los EBDCs, y de Mn (Gunier et al. 2013; Mora et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2016a) elevados en comunidades agrícolas. El Mn que se encuentra de forma natural en el agua subterránea también constituye una fuente de exceso de Mn para estas comunidades, cuyo suministro de agua son principalmente los pozos artesanales (van Wendel de Joode et al. 2016a).

Estudios en animales han mostrado que la exposición a fungicidas que contienen Mn y/o ETU en las etapas tempranas de la vida alteran el neurodesarrollo (Jacobsen et al. 2012; Miranda-Contreras et al. 2005). Sin embargo, los pocos estudios epidemiológicos que han examinado esta asociación en niños han encontrado resultados inconsistentes (Gunier et al. 2015; Mora et al. 2015; van Wendel de Joode et al. 2016b). Un estudio transversal en niños de 6 a 9 años que vivían cerca de plantaciones de banano y plátano en el cantón de Talamanca, Costa Rica, observó que concentraciones más altas de ETU en orina se asociaban con un aprendizaje verbal más pobre (van Wendel de Joode et al. 2016b). Además, un estudio del Centro para la Evaluación de la Salud de Madres y Niños de Salinas (CHAMACOS) que midió el Mn en dientes de leche de niños que vivían cerca de campos agrícolas en el Valle de Salinas, California, reportó una asociación entre niveles posnatales más altos de Mn en dentina y puntajes de desarrollo mental más bajos en las Escalas Bayley de Desarrollo Infantil, 2da edición (BSID-II, por sus siglas en inglés), a los 6 y 12 meses de edad, pero no a los 24 meses de edad (Gunier et al. 2015). Otro estudio dentro de CHAMACOS encontró asociaciones entre niveles prenatales y postnatales más altos de Mn en dentina con más problemas de comportamiento en niños y niñas en edad escolar (7-10.5 años), pero mejores habilidades cognitivas, de memoria y/o de función motora en niños varones (Mora et al. 2015).

Múltiples estudios prospectivos y transversales han evaluado los efectos neuroconductuales del exceso de Mn de otras fuentes diferentes a los fungicidas que contienen Mn. La mayoría de estos estudios han asociado, de forma consistente, la exposición a Mn a través del aire o del agua con habilidades cognitivas alteradas (Bouchard et al. 2011; Carvalho et al. 2014; do Nascimento et al. 2016; Haynes et al. 2015; Kim et al. 2009; Menezes-Filho et al. 2011; Rahman et al. 2017; Rojas-Rodríguez et al. 2010; Wasserman et al. 2006; Wright et al. 2006), problemas de conducta (Bouchard et al. 2007; Khan et al. 2012; Menezes-Filho et al. 2014; Oulhote et al. 2014a; Rahman et al. 2017), y trastornos de memoria (Carvalho et al. 2014; He et al. 1994; Hernández-Bonilla et al. 2011; Lucchini et al. 2012a; Oulhote et al. 2014a) en niños en edad escolar y/o adolescentes. Los hallazgos de los estudios en infantes no han sido tan consistentes como los realizados en niños de mayor edad. Por ejemplo, la exposición prenatal a Mn ha sido asociada con destrezas mentales, psicomotoras y/o de lenguaje alteradas a los 1 y 2 años de edad (Claus Henn et al. 2017; Lin et al. 2013; Yu et al. 2016); y

con comportamiento (Ericson et al. 2007) y memoria no verbal más pobres a los 3 años (Takser et al. 2003). Algunos estudios también han reportado asociaciones en forma de U invertida entre la exposición prenatal o posnatal temprana a Mn y los puntajes de desarrollo mental y/o psicomotor en BSID-II a los 6 meses (Chung et al. 2015) y al año (Claus Henn et al. 2010), y los puntajes de motora fina en las Escalas Bayley de Desarrollo del Infante y del Niño, 3ra edición (BSID-III, por sus siglas en inglés) a los 2-3 años de edad (Rodríguez et al. 2016).

El estudio de Infantes y Salud Ambiental (ISA) es un estudio comunitario de tipo cohorte de nacimiento que examina los efectos de los plaguicidas y el Mn en la salud de las mujeres embarazadas y sus niños que viven cerca de plantaciones de banano con fumigación aérea extensiva de fungicidas que contienen Mn (Bravo et al. 2013) en el cantón de Matina, Costa Rica. Reportes previos de la cohorte ISA mostraron concentraciones elevadas de ETU en la orina de mujeres que vivían cerca de plantaciones de banano, lavaban ropa de trabajo de agricultura y trabajaban en agricultura durante el embarazo (van Wendel de Joode et al. 2014). Se observaron concentraciones más altas de Mn en el cabello de mujeres que vivían cerca de las plantaciones, trabajaban en agricultura antes del embarazo, o tenían concentraciones elevadas de Mn en el agua de consumo; asimismo, se encontraron concentraciones más altas de Mn en la sangre de mujeres que vivían en casas hacinadas y en casas hechas con materiales permeables y difíciles de limpiar (Mora et al. 2014). En el estudio ISA se encontraron concentraciones más altas de Mn en el agua de consumo de casas más cercanas a las plantaciones de banano (van Wendel de Joode et al. 2016a).

En el presente estudio examinamos la asociación entre la exposición prenatal a mancozeb y al exceso de Mn, indicadas por las concentraciones de ETU en orina y las concentraciones de Mn en cabello y sangre medidas en muestras maternas tomadas durante el embarazo, y sus efectos en el neurodesarrollo de infantes de un año de edad del estudio ISA.

Métodos

Población de estudio

Los métodos detallados del estudio ISA han sido descritos previamente (Mora et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2014). Brevemente, entre marzo de 2010 y junio 2011, reclutamos a mujeres embarazadas a través de reuniones en escuelas locales, grupos comunales, anuncios y referencias de amigos. Las mujeres elegibles eran ≥ 15 años, <33 semanas de gestación, y vivían a ≤ 5 km de una plantación de banano en el cantón de Matina. Un total de 451 mujeres fueron incluidas en el estudio ISA. Para el presente estudio, incluimos a 355 (79%) niños que completaron la administración de una o más escalas neuroconductuales al año de edad y cuyas madres nos suministraron al menos una muestra de orina, cabello o sangre durante el embarazo. Las parejas madre-hijo incluidas en estos análisis ($n = 355$) no difirieron significativamente de la cohorte inicial ($n = 451$) en sus atributos, incluyendo educación de la madre, paridad, ingresos del hogar, y concentraciones urinarias prenatales corregidas por

gravedad específica de ETU, Mn en cabello y sangre (Mora et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2014).

Se obtuvo el consentimiento informado escrito de todas las mujeres antes de su participación. Se obtuvo un consentimiento adicional de los padres o representantes legales de las participantes <18 años. El Comité Ético Científico de la Universidad Nacional (CECUNA) aprobó el material y los procedimientos del estudio.

Entrevistas maternas

Las mujeres fueron entrevistadas en sus hogares de una a tres veces durante el embarazo, dependiendo de su edad de gestación en el momento de su inclusión en el estudio (mediana en la primera, segunda y tercera visita = 19, 30 y 33 semanas, respectivamente), después del parto (mediana = 7 semanas postparto) y cuando sus hijo(as) cumplieron el año de edad (mediana = 1.1 años). La información sociodemográfica y ocupacional, incluyendo edad de la madre, educación, paridad e ingresos del hogar, fue recolectada en la entrevista inicial. Los datos sobre el crecimiento fetal fueron extraídos de los registros médicos de control prenatal y del parto completados por el personal del hospital/clínica y suministrados a las participantes del estudio.

En la visita del año, las madres y sus hijos(as) fueron entrevistados y/o evaluados en la casa que fue alquilada por el estudio ISA (80%) u otro establecimiento comunal (e.g., iglesia, centro comunal, escuela o centro diurno; 20%). Durante esta visita, se les administró a las madres la versión abreviada del Inventario de Observación del Hogar de Bebé-Niño para la Medición del Ambiente (HOME, por sus siglas en inglés) (Caldwell and Bradley 1984), la Escala de Seguridad Alimenticia del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (versión abreviada de 6 ítems) (Bickel et al. 2000), y la Escala de Depresión del Centro de Estudios Epidemiológicos (CES-D, por sus siglas en inglés) (Radloff 1977). El cuestionario de la versión en español de la escala social-emocional BSID-III (Bayley 2006) también fue completado por las madres en la visita del primer año.

Mediciones de ETU en orina

Las muestras de orina de las madres fueron recolectadas de una a tres veces durante el embarazo (de forma simultánea a las entrevistas). Los especímenes fueron divididos y almacenados a -20°C hasta su envío a la Universidad de Lund en Suecia. Luego las muestras fueron analizadas por ETU utilizando un espectrómetro de masas de cromatografía líquida bidimensional (LC-MS/MS; UFLCRX; Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) con triple cuadrupolo y trampa lineal de iones (QTRAO 5500; AB Sciex, Foster City, CA, Estados Unidos) (Ekman et al. 2013). La gravedad específica (kg/L) urinaria se determinó utilizando un refractómetro manual y las concentraciones de ETU fueron ajustadas por dilución utilizando la fórmula $ETU_{SG} - ETU \times [(1,017 - 1)]$, donde ETU_{SG} representaba las concentraciones de ETU corregidas por gravedad específica ($\mu\text{g/L}$), ETU eran las concentraciones de ETU observadas ($\mu\text{g/L}$), SG era la gravedad específica de la muestra de orina y 1.017 kg/L representaba la gravedad específica promedio de la población de estudio. Todas las muestras de orina procesadas fueron analizadas en duplicados con un coeficiente de

varianza de un 10%. Los detalles de la recolección de orina, el análisis y los procedimientos de control de calidad fueron descritos previamente (van Wendel de Joode et al. 2014). Todas las concentraciones de ETU en orina estuvieron por encima del límite analítico de detección (LOD = 0.08 µg/L).

Mediciones de Mn en cabello

Las muestras de cabello (-20-30 hebras) fueron tomadas de la región occipital, a 2mm del cuero cabelludo, en una o dos de las visitas durante el embarazo (de forma simultánea con las entrevistas y la toma de muestras de orina). Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente y enviadas a la Universidad Federal de Bahía, Brasil. El centímetro más cercano al cuero cabelludo de cada muestra de cabello fue limpiado según ha sido descrito anteriormente (Menezes-Filho et al. 2009) y analizado por Mn utilizando espectrometría atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman (GTA-120, Varian Inc.). Las muestras de cabello procesadas y los materiales de referencia fueron analizados en duplicado con coeficientes de varianza que oscilaron entre 1.5 y 7.3%. Solamente dos muestras de cabello tuvieron concentraciones de Mn por debajo del LOD analítico (0.1 µg/L) y sus valores fueron fijados en $LOD\sqrt{2}$.

Mediciones de Mn en sangre

Las muestras de sangre venosa fueron recolectadas en una o dos de las visitas realizadas durante el embarazo (de forma simultánea con las entrevistas y la toma de muestras de orina y cabello) y fueron congeladas a -20°C. Las muestras fueron enviadas a la Universidad de California en Santa Cruz, donde fueron analizadas por Mn utilizando espectrometría de masas de alta resolución con plasma acoplado inductivamente (Finnigan XR ICP-MS) (Smith et al. 2007). El coeficiente de varianza de las mediciones de Mn en sangre, basado en muestras triplicadas analizadas con cada lote analítico, fue de 3.8%. La recolección de las muestras de sangre, análisis y procedimientos de control de calidad han sido descritos previamente (Mora et al. 2014). Todas las concentraciones de Mn en sangre estuvieron por encima del LOD analítico (0.03 µg/L).

El plomo también fue medido en las muestras de sangre maternas recolectadas durante el embarazo (las mismas muestras utilizadas para la cuantificación de Mn), utilizando espectrometría de masas de alta resolución con plasma acoplado inductivamente (Gwiazda et al. 2005; Lucchini et al. 2012b). Todas las concentraciones de plomo estuvieron por encima del LOD analítico (0.0016 µg/L).

Efectos neuroconductuales

Evaluamos el neurodesarrollo de los niños en la visita del año utilizando una versión traducida al español del BSID-III (Bayley 2006). La versión en inglés fue traducida al español por psicólogos especializados en desarrollo infantil (LS y su equipo) del Instituto Nacional de Perinatología en México y fue revisada por investigadores costarricenses para asegurar que el vocabulario fuera apropiado para la población de estudio. Se evaluaron cuatro dominios: función cognitiva, función motora (compuesto por las subpruebas de motora fina y

gruesa), lenguaje (subpruebas de lenguaje receptivo y expresivo) y desarrollo socio-emocional. Los primeros tres dominios fueron evaluados a través de una valoración infantil directa y el cuarto utilizando un cuestionario para las madres. Un único psicometrista, quien fue entrenado y supervisado por un neuropsicólogo pediatra, condujo todas las evaluaciones. Los controles de calidad incluyeron pruebas piloto extensas y la revisión de evaluaciones grabadas en video. Puntajes compuestos estandarizados [derivados de la suma de los puntajes escalares de las subpruebas (dominios de lenguaje y motor) o equivalentes a puntajes escalares (dominios de función cognitiva y socio-emocional) corregidos por edad: promedio \pm DE = 100 ± 15 , rango = 40-160] fueron calculados para los cuatro dominios utilizando normas basadas en una muestra representativa de la población infantil de los Estados Unidos con edades de 1 mes hasta 42 meses (Bayley 2006). Los puntajes z de BSID-III (promedio \pm DE = 0 ± 1) también fueron calculados estandarizando puntajes brutos para cada subprueba (e.g., función cognitiva, motora fina, motora gruesa, lenguaje receptivo, lenguaje expresivo y socio-emocional) dentro de nuestra población de estudio.

Análisis estadísticos

Se generaron gráficos de distribución y se calcularon estadísticas descriptivas para todas las variables. Se evaluaron las asociaciones bivariadas entre biomarcadores de exposición, efectos y covariables utilizando pruebas t-Student para las variables continuas y pruebas de chi-cuadrado para las variables categóricas. Las correlaciones entre las concentraciones urinarias de ETU corregidas por gravedad específica y concentraciones de Mn en cabello y en sangre fueron estimadas utilizando coeficientes de correlación de Spearman (r_s). Para evaluar la variabilidad y reproducibilidad dentro y entre mujeres de las concentraciones de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre, calculamos coeficientes de correlación intraclase (CCI) utilizando modelos de efectos mixtos (McGraw y Wong 1996).

Promediamos, para cada mujer, las concentraciones de ETU en orina corregidas por gravedad específica, Mn en cabello y Mn en sangre de las muestras repetidas recolectadas a lo largo del embarazo. Luego examinamos las asociaciones de las concentraciones prenatales promediadas de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre con los puntajes compuestos estandarizados BSID-III utilizando modelos de regresión lineal multivariados. Debido a que los biomarcadores se correlacionaban débilmente [r_s osciló entre -0.10 y 0.21; correlación más fuerte para ETU en orina y Mn en cabello], incluimos las concentraciones de ETU en orina, Mn en sangre y Mn en cabello de forma simultánea y modeladas como variables continuas en los modelos. Las concentraciones de ETU en orina corregidas por gravedad específica y de Mn en cabello fueron transformadas a la escala \log_{10} para normalizar los residuos y reducir la influencia de los valores atípicos.

Identificamos confusores potenciales y predictores conocidos del neurodesarrollo infantil [i.e., educación de la madre, paridad, edad gestacional al nacimiento, y edad del niño y puntaje HOME (bruto) en la visita de 1 año] utilizando gráficos acíclicos dirigidos y los incluimos *a priori* en nuestros modelos de regresión. A pesar de que los puntajes compuestos BSID-III fueron corregidos por prematuridad (≤ 36 semanas de gestación) y edad del niño en el momento de la evaluación durante el proceso de calificación, decidimos ajustar nuestros

modelos para ambas variables porque los puntajes compuestos habían sido estandarizados utilizando estándares estadounidenses debido a que no se habían publicado estándares latinoamericanos a la fecha. Evaluamos otros factores potenciales de confusión [i.e., edad de la madre, duración de la lactancia, ingresos en el hogar, depresión materna (puntaje CES-D), estado de seguridad alimentaria en la visita del año y el lugar de la evaluación del neurodesarrollo] al añadirlos, uno por uno, a los modelos finales (modelos con covariables definidas *a priori*). Las covariables adicionales (i.e., lugar de la evaluación) fueron incluidas en el modelo final si cambiaban materialmente la magnitud de uno o más coeficientes de exposición (>10%). Los valores faltantes (>10%) de las covariables fueron atribuidos seleccionando aleatoriamente un valor del subconjunto de observaciones con valores conocidos de la covariable (Lubin et al. 2004).

Evaluamos la modificación del efecto de las asociaciones exposición-efecto por el sexo del niño utilizando términos de productos cruzados y estratificando por sexo. Asimismo, evaluamos términos de interacción de dos variables para los tres biomarcadores (concentraciones de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre) para determinar si los efectos estimados para un solo biomarcador diferían según variaciones en las concentraciones de otros biomarcadores. Las interacciones se consideraron significativas si $p < 0.15$.

Realizamos varios análisis de sensibilidad para evaluar la solidez de nuestros resultados. Primero, corrimos modelos aditivos generalizados ajustados por covariables con términos suavizados de *splines* penalizados para las exposiciones continuas (restringidas a un máximo de 3 nudos) y evaluamos visualmente los *splines* graficados para identificar asociaciones no lineales entre la exposición y los efectos de interés. Segundo, corrimos nuestros modelos de regresión lineales (a) ajustando por covariables cuyos valores faltantes fueron imputados utilizando imputaciones simples [ya sea asignando la categoría con el mayor número de observaciones para las variables categóricas (i.e., paridad y lugar de la evaluación) o el promedio de la distribución para las variables continuas (i.e., edad gestacional y la edad del niño al momento de la evaluación)] y (b) utilizando únicamente los casos completos y comparando los resultados con los de los modelos con covariables imputadas al azar. Tercero, ajustamos nuestros modelos de regresión lineal multivariados utilizando las puntajes z de las subpruebas BSID-III en lugar de las puntajes compuestas estandarizadas, dado que puntajes compuestas estandarizadas estaban basadas en normas estadounidenses, lo que podría eventualmente dar como resultado una clasificación errónea de los puntajes del desarrollo neurológico de los niños costarricenses (Cromwell et al. 2014). Cuarto, para explorar si nuestros hallazgos eran sensibles a las diferencias en las etapas de desarrollo del sistema nervioso central (Donders y Hunter 2010, Semrud-Clikeman y Ellison 2009) o al momento en que se realizaron las mediciones de la exposición (Mora et al 2014), corrimos nuestros análisis utilizando las concentraciones de ETU en orina corregidas por gravedad específica, Mn en sangre y Mn en el cabello para la primera (<20 semanas de gestación) y la segunda (≥ 20 semanas) mitad del embarazo. Quinto, examinamos el efecto de confusión de las concentraciones prenatales promedio de plomo en sangre al agregar esta variable a los modelos finales. Todos los análisis estadísticos se realizaron en Stata (versión 14.2, StataCorp LLC) y R (versión 3.1.2; R Foundation for Statistical Computing).

Resultados

Las madres del estudio ISA eran relativamente jóvenes al momento de su inclusión (edad promedio \pm DE = 22.4 ± 6.6 años; 17% eran ≤ 18 años) y la mayoría habían nacido en Costa Rica (84%), estaban casadas o viviendo con su pareja (74%) y eran multíparas (65%; Cuadro 1). Aproximadamente la mitad de ellas había completado la educación primaria (51%). Solamente un 9% de las madres trabajó en labores agrícolas durante el embarazo (8% de todas las madres incluidas en estos análisis trabajó en plantaciones de banano durante el embarazo), mientras que el 24% lo hacía al momento de la visita del año (22% trabajaba en plantaciones de banano). Aproximadamente el 65% de las familias vivían debajo de la línea de pobreza costarricense y el 25% de las madres estaban "en riesgo" de depresión durante la visita del año (Cuadro 1). La mayoría de los niños nacieron a término (94%) y tuvieron un peso al nacer $>2,500$ gramos (97%). La edad promedio de los niños al momento de la evaluación del desarrollo neurológico era de 1.1 años (rango = 0.9-1.6). Los datos de las covariables estaban completos para la mayoría de las participantes; la covariable "ingresos en el hogar" durante la visita del año era la que poseía el mayor número de valores faltantes antes de la imputación ($n = 36$, 10%; Cuadro 1).

Las medianas (percentiles 25-75) de las concentraciones de ETU en orina corregidas por gravedad específica, Mn en cabello y Mn en sangre en las muestras maternas recolectadas durante el embarazo eran 3.3 (2.4 - 4.9) $\mu\text{g/L}$, 1.7 (0.9 - 4.1) $\mu\text{g/g}$ y 24.0 (20.3 - 28.0) $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Cuadro 2). Las concentraciones de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre fueron similares para niños y niñas (datos no mostrados). Las concentraciones prenatales promediadas de ETU en orina se correlacionaron débilmente con las de Mn en cabello ($r_s = 0.21$, $p < 0.01$) y no se correlacionaron con las concentraciones de Mn en sangre ($r_s = -0.10$, $p = 0.06$); concentraciones prenatales promediadas de Mn en sangre y de Mn en cabello no se correlacionaron ($r_s = -0.06$, $p = 0.29$). Las concentraciones de ETU en orina y de Mn en sangre variaron más dentro que entre mujeres (CCI = 0.17 y 0.43 , respectivamente), mientras que las concentraciones de Mn en cabello variaron más entre mujeres (CCI = 0.59 ; Cuadro 2).

Los puntajes compuestos estandarizados promedio (\pm DE) BSID-III para los dominios cognitivo, de lenguaje, motor y socio-emocionales fueron 98.2 ± 9.5 , 90.1 ± 7.1 , 97.3 ± 8.9 y 90.3 ± 11.9 puntos, respectivamente (Cuadro 2). En los niños varones, observamos puntajes compuestos estandarizados de lenguaje (promedio \pm DE = 88.6 ± 6.8 puntos) y socio-emocionales (88.8 ± 11.6 puntos) inferiores a los de las niñas (91.7 ± 7.1 y 91.7 ± 12.2 puntos, respectivamente, $p < 0.05$; ver Cuadro S1). Asimismo, los niños varones mostraron puntajes z más bajos en las subpruebas de motora fina, lenguaje receptivo y lenguaje expresivo que las niñas ($p < 0.01$); no obstante, los puntajes socio-emocionales z fueron similares para niños varones y niñas (ver Cuadro S1).

Aunque la mayoría de las asociaciones entre las concentraciones prenatales promediadas de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre con los puntajes compuestos estandarizados BSID-III para todos los niños oscilaron alrededor del valor nulo, observamos puntajes socio-emocionales compuestos consistentemente más bajos ante la presencia de concentraciones

más altas de Mn en cabello [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -2.3 puntos (intervalo de confianza [IC] del 95%: -5.0, 0.4)], después de ajustar simultáneamente por las concentraciones de ETU en orina y Mn en sangre (Cuadro 3). Cuando estratificamos por sexo del niño, encontramos que las concentraciones prenatales promediadas de Mn en cabello más altas se asociaban con puntajes socio-emocionales más bajos en los niños varones [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -4.6 puntos (IC 95%: -8.5, -0.8)] pero no en las niñas [β = -0.2 puntos (IC 95%: -4.2, 3.9); p_{INT} = 0.17]. Además, las concentraciones prenatales promediadas de Mn en cabello más altas se asociaron con puntajes cognitivos más bajos en las niñas [β = -3.0 puntos (IC 95%: -6.1, 0.1)] pero no en los niños varones [β = 2.5 puntos (IC 95%: -0.4, 5.4; p_{INT} = 0.01)]. Nosotros también observamos que las concentraciones prenatales promediadas de ETU en orina corregidas por gravedad específica más altas se asociaban de forma marginal con puntajes socio-emocionales compuestos más bajos en las niñas [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -7.4 puntos (IC 95%: -15.2, 0.4)] pero no en los niños varones [β = 0.0 puntos (IC 95%: -6.9, 7.0); p_{INT} = 0.11]. Observamos asociaciones nulas para Mn en sangre y los dominios de lenguaje y motor (Cuadro 3) y no encontramos evidencia de interacciones entre biomarcadores (ver Cuadro S2).

Cuando corrimos nuestros modelos aditivos generalizados ajustados por covariables con términos suavizados de *splines* penalizados para las exposiciones continuas, se observamos que la mayoría de las asociaciones exposición-efecto eran lineales (ver Figura S1). Encontramos algunos estimados no lineales en los modelos de *spline* penalizados (i.e., grados de libertad estimados >1), pero en general éstos fueron consistentes con los estimados de efecto de los modelos de regresión lineal. Por ejemplo, la asociación entre las concentraciones prenatales de Mn en cabello prenatal y puntajes socio-emocionales más bajos en los niños varones fue estadísticamente significativa en nuestros modelos aditivos generalizados (p = 0.02), pero esta asociación fue inversa en la mayor parte del rango de exposición y solamente nula para las exposiciones superiores a ~ 10 $\mu\text{g/g}$ (ver Figura S1B).

Cuando ajustamos nuestros modelos de regresión por las covariables imputadas utilizando la imputación simple y utilizando únicamente los casos completos (ver Cuadro S3), se observaron resultados similares a los de los análisis que incluían datos imputados al azar. Cuando corrimos modelos de regresión separados para las concentraciones de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre (ver Cuadro S4), encontramos asociaciones exposición-efecto similares a las de los modelos principales (Cuadro 3). Cuando corrimos nuestros modelos utilizando puntajes z (estandarizados dentro de nuestra población de estudio) para los niños y niñas combinados (ver Cuadro S5), observamos asociaciones similares a las encontradas usando puntajes compuestos estandarizados basados en normas de los Estados Unidos. Sin embargo, encontramos que, en las niñas, la asociación inversa entre las concentraciones de Mn en el cabello y los puntajes cognitivos se fortaleció [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -0.40 (IC 95%: -0.70, -0.09)], mientras que la asociación entre las concentraciones de ETU en orina y los puntajes socio-emocionales se atenuó [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -0.28 (IC 95%: -0.78, 0.22)] en comparación con las asociaciones observadas en los modelos principales. En los niños varones, las

concentraciones prenatales promediadas de Mn en cabello más altas permanecieron asociadas con puntajes socio-emocionales más bajos [$\beta = -0.31$ (IC 95%: -0.57, -0.06)].

Cuando incluimos las concentraciones prenatales promedio de ETU en orina, Mn en cabello y Mn en sangre para la primera o segunda mitad del embarazo en los modelos ajustados en lugar de las concentraciones promediadas a lo largo del embarazo, observamos que las asociaciones entre las concentraciones de Mn en cabello, los puntajes socio-emocionales más bajos en los niños varones y los puntajes cognitivos más bajos en las niñas eran más fuertes para la segunda mitad del embarazo [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -3.9 (IC 95%: -7.6, -0.2) y -2.3 (IC 95%: -5.7, 1.1), respectivamente; ver Cuadro S6 y Figura S2] que para la primera mitad [$\beta = -2.5$ (IC 95%: -8.1, 3.1) y -0.7 (IC 95%: -4.4, 3.1), respectivamente; ver Cuadro S7 y la Figura S2]. En contraste, encontramos que la asociación entre las concentraciones de ETU en orina y los puntajes de desarrollo socio-emocional más bajos en las niñas, aunque imprecisa, era más fuerte para la primera mitad del embarazo [β por cada incremento de 10 veces en las concentraciones = -8.6 (IC 95%: -20.5, 3.3); ver Cuadro S7 y Figura S2] que para la segunda mitad [$\beta = -2.7$ (IC 95%: -10.9, 5.6); ver Cuadro S6 y Figura S2]. Por último, la adición de las concentraciones prenatales promediadas de plomo en sangre en los modelos no cambió los estimados de efecto observados en los análisis principales (ver Cuadro S8); esto probablemente se deba a las bajas concentraciones detectadas en la población del estudio (mediana = 6.5 $\mu\text{g/L}$; percentiles 25-75 = 5.0-8.6).

Discusión

En una cohorte prospectiva de pares de madres e hijos que viven cerca de plantaciones de banano en Costa Rica, observamos que un Mn prenatal más alto, como lo indicaban las concentraciones de Mn en cabello medidas en mujeres durante el embarazo, se asociaba con puntajes cognitivos más bajos en las niñas y puntajes socio-emocionales más bajos en niños al año de edad. También encontramos que concentraciones prenatales más altas de ETU en orina se asociaban con puntajes socio-emocionales más bajos en niñas. No encontramos asociaciones para las concentraciones prenatales de Mn en sangre, el lenguaje ni la función motora.

Nuestros hallazgos son consistentes con estudios sobre el exceso de Mn en la vida temprana que han reportado asociaciones inversas con efectos cognitivos y conductuales en infantes (Claus Henn et al., 2017, Ericson et al., 2007, Lin et al., 2013). Sin embargo, a diferencia de algunos estudios que observaron relaciones dosis-respuesta bifásicas entre la exposición prenatal y postnatal temprana con el neurodesarrollo infantil (Chung et al., 2015; Claus Henn et al., 2010; Rodrigues et al., 2016), en el presente estudio encontramos asociaciones exposición-efecto lineales. Recientemente, un estudio de cohorte de nacimiento de 232 parejas madre-hijo coreanas midió las concentraciones de Mn en muestras de sangre materna recolectadas durante el parto y observó asociaciones en forma de U invertida tanto para el índice de desarrollo mental como para el índice de desarrollo psicomotor a los 6 meses de

edad (Chung et al., 2015). Un estudio transversal de 270 niños mexicanos de 12 meses de edad reportó una asociación en forma de U invertida entre las concentraciones de Mn en sangre y el desarrollo mental (Claus Henn et al., 2010). Además, un estudio en 524 niños de Bangladesh de 2-3 años de edad observó una relación en forma de U invertida entre las concentraciones de Mn en el agua potable y los puntajes de motora fina medidos de forma simultánea (Rodrigues et al., 2016). Las discrepancias entre los resultados de estos estudios y los nuestros podrían deberse al hecho de que las concentraciones de Mn en nuestra población de estudio podrían estar dentro del rango en el que Mn actúa como un neurotóxico en lugar de un nutriente con una capacidad beneficiosa, lo que daría como resultado un deterioro del neurodesarrollo. Las concentraciones de Mn en sangre de las madres del estudio ISA fueron más altas que las reportadas en madres coreanas (Chung et al. 2015) y francesas (Takser et al. 2003), pero similares a las observadas en madres que vivían cerca de un sitio *Superfund* en Oklahoma (Claus Henn et al. 2017); las concentraciones de Mn en el cabello de las madres ISA fueron más altas que las reportadas para las madres francesas (Takser et al., 2003). Los hallazgos inconsistentes entre estudios previos y los nuestros, incluyendo las asociaciones nulas del exceso prenatal de Mn con la función motora y el lenguaje, también podrían deberse a diferencias en las fuentes y las rutas de contacto con el exceso de Mn [e.g., en el aire en México (Claus Henn et al., 2010) vs. principalmente en el agua en Costa Rica] así como la edad a la que se completaron las evaluaciones del neurodesarrollo [e.g., efectos en el lenguaje y función motora fueron evaluados principalmente a los 2 y/o 3 años de edad en otros estudios (Lin et al., 2013; Takser et al., 2003; et al. 2016) vs. evaluado al año en el estudio ISA].

En nuestros análisis, observamos diferencias específicas por sexo y dominio en las asociaciones entre las concentraciones de ETU en orina, Mn en cabello, y Mn en sangre con el neurodesarrollo de los infantes. Estas diferencias en las asociaciones exposición-efecto, así como la falta de correlación entre los biomarcadores, podrían explicarse por diversos factores: *a*) diferencias en las fuentes de exposición [es probable que el exceso de Mn se haya originado a partir de la fumigación aérea con mancozeb y de la presencia natural del Mn en las aguas subterráneas (Mora et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2016a), mientras que el ETU urinario solamente se haya originado a partir de la fumigación con mancozeb/ETU (van Wendel de Joode et al. 2014); el ETU no se encuentra en el ambiente de forma natural]; *b*) diferencias en las rutas de exposición [es probable que el exceso de Mn se deba a la ingesta del Mn presente en agua y la inhalación del Mn en el aire (van Wendel de Joode et al. 2014); mientras que se piensa que el ETU en orina refleja exposiciones por la vía inhalatoria (van Wendel de Joode et al. 2014); o *c*) diferencias en las ventanas de exposición [las concentraciones de Mn en cabello medidas en el centímetro de cabello más cercano al cuero cabelludo reflejan exposiciones durante los últimos 30 días (van Wendel de Joode et al. 2014); las concentraciones de Mn en sangre y de ETU en orina reflejan exposiciones durante los últimos días (ATSDR 2012; WHO 1988)]. Diferencias específicas entre biomarcadores por dominio de neurodesarrollo podrían deberse al hecho de que el ETU y el Mn podrían tener distintos mecanismos biológicos para sus efectos neurotóxicos y, consecuentemente, afectar los dominios de distintas formas. Estudios han mostrado que la neurotoxicidad del mancozeb/ETU podría estar mediada por el estrés oxidativo (Domico et al. 2007),

interferencia en el transporte vesicular del glutamato (Vaccari et al. 1999) y disfunción de la homeostasis de la tiroides (Doerge and Takazawa 1990). Por el contrario, algunos estudios han sugerido que la neurotoxicidad del Mn podría estar mediada por una disfunción dopaminérgica (Racette et al. 2012) y disrupción de la homeostasis de la tiroides (Soldin and Aschner 2007). Por último, es posible que tanto los fungicidas que contienen Mn como el exceso de Mn puedan provocar diferencias dimórficas sexuales en el neurodesarrollo de los niños. Por ejemplo, estudios en animales y humanos indican que podrían existir diferencias sexuales biológicas en la respuesta al Mn (Dorman et al. 2004; Madison et al. 2011), tales como variaciones metabólicas en los mecanismos homeostáticos que regulan las concentraciones de Mn en el cuerpo humano (Oulhote et al. 2014b) Adicionalmente, se sospecha que algunos plaguicidas, incluyendo EBDCs, son disruptores endocrinos que podrían ocasionar diferentes patrones de asociación con el neurodesarrollo para niños varones y niñas (Kjeldsen et al. 2013; Rosenfeld and Trainor 2014). Estudios epidemiológicos y toxicológicos adicionales son necesarios para determinar cómo los fungicidas que contienen Mn y el exceso de Mn afectan los diferentes dominios del neurodesarrollo y si éstos causan efectos específicos asociados al sexo.

A la fecha, no existe consenso sobre cuál es el mejor biomarcador para medir la exposición a Mn en humanos (Coetzee et al. 2016). Las concentraciones de Mn en cabello podrían ser afectadas por contaminación externa (Eastman et al. 2013; Skroder et al. 2017) y por variabilidad entre individuos producto de las diferencias en las características del cabello y hábitos personales (Chojnacka et al. 2006; Kempson and Lombi 2011). Notablemente, las concentraciones de Mn en sangre son reguladas homeostáticamente por el sistema portal hepático (ATSDR 2012) y aumentan durante el embarazo (Mora et al. 2014; Spencer 1999; Takser et al. 2004); por lo tanto, podrían no reflejar de la mejor manera la carga materna de Mn o la exposición fetal. Investigaciones adicionales son requeridas para comprender mejor las conexiones entre las fuentes ambientales y dosis internas de estos biomarcadores, así como la confiabilidad de los biomarcadores de exposición materna a fungicidas que contienen Mn y exceso de Mn para evaluar la exposición prenatal del feto.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Primero, no podemos descartar la posibilidad de un sesgo de selección que pudo haber surgido debido a la pérdida de seguimiento de algunas participantes. Segundo, reconocemos que hemos realizado comparaciones múltiples y esto podría generar asociaciones estadísticamente significativas al azar, pero intentamos identificar patrones en nuestros resultados en lugar de resaltar hallazgos aislados. Tercero, evaluamos el neurodesarrollo de los niños mediante una prueba que no ha sido estandarizada en poblaciones latinoamericanas; sin embargo, nuestros puntajes compuestos estandarizados se encontraban dentro del rango esperado (Bayley 2006) y observamos asociaciones exposición-efecto similares cuando utilizamos los puntajes compuestos estandarizados con base a la normativa de los Estados Unidos y los puntajes z en nuestros modelos. Cuarto, debido a que los puntajes de desarrollo socio-emocional se basaron en el reporte materno, no podemos excluir la posibilidad de que exista un sesgo de información en las respuestas de las madres; no obstante, no esperamos que las madres que tenían concentraciones altas de ETU o Mn durante el embarazo hayan respondido de forma distinta que las madres que tenían

concentraciones bajas pues ninguna de ellas tenía conocimiento de sus concentraciones prenatales al momento de la visita del estudio al año de edad. Quinto, es posible que el año sea una edad muy corta para poder identificar efectos duraderos en el neurodesarrollo asociados con la exposición prenatal a tóxicos ambientales; en este momento, se están realizando evaluaciones adicionales del neurodesarrollo de los participantes del estudio ISA con el fin de determinar si las asociaciones exposición-efecto observadas en la infancia persisten hasta la niñez temprana y tardía.

Este es uno de los primeros estudios en examinar el impacto potencial de la exposición a fungicidas que contienen Mn en el neurodesarrollo de infantes que viven en comunidades agrícolas. También es uno de los pocos estudios prospectivos que ha evaluado la asociación entre el exceso prenatal al Mn y el neurodesarrollo, lo cual fortalece la creciente literatura sobre este tema. En nuestros análisis, nos fue posible examinar y/o ajustar por diversos factores prenatales y postnatales importantes, como por ejemplo la exposición a plomo, indicadores socioeconómicos, educación materna y estimulación del niño.

Nuestros hallazgos indican que la exposición prenatal a mancozeb y el exceso de Mn, medidos a través de las concentraciones de ETU en orina y las concentraciones de Mn en cabello durante el embarazo, podrían estar asociados con habilidades cognitivas más pobres en niñas y un peor desarrollo socio-emocional en niños varones y niñas al año de edad. En vista de tales resultados y del principio de precaución, recomendamos mejorar la infraestructura y el manejo de las fuentes de agua para reducir las concentraciones elevadas de Mn en el agua potable (van Wendel de Joode et al. 2016a) e implementar medidas para reducir la exposición ambiental al mancozeb/ETU [e.g., incrementar la distancia entre las plantaciones de banano y las áreas residenciales, lavar la ropa de trabajo en el lugar de trabajo (Mora et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2014; van Wendel de Joode et al. 2016a)] de mujeres y niños que viven cerca de las plantaciones de banano con el fin de prevenir efectos adicionales en el neurodesarrollo y otros resultados adversos para la salud que podrían producirse a raíz de estas exposiciones.

Referencias

- ATSDR. 2012. Toxicological Profile for Manganese. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA , 2012.
- Bayley N. 2006. *Bayley Scales of Infant Development*. 3rd ed. San Antonio, TX:Psychological Corp.
- Bickel G, Nord M, Price C, Hamilton W, Cook J. 2000. Guide to measuring household food security. U.S. Department of Agriculture (USDA). Available: <http://www.fns.usda.gov/sites/default/files/FSGuide.pdf> [accessed 17 February 2017].
- Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D. 2007. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect* 115:122-127.
- Bouchard MF, Sauve S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur ME, Bouffard T, et al. 2011. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect* 119:138-143.
- Bravo V, de la Cruz E, Herrera G, Ramírez F. 2013. Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud [in Spanish]. *Uniciencia* 27:351–376.
- Caldwell BM, Bradley RH. 1984. Home observation for measurement of the environment: University of Arkansas at Little Rock Little Rock.
- Carvalho CF, Menezes-Filho JA, de Matos VP, Bessa JR, Coelho-Santos J, Viana GF, et al. 2014. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. *Neurotoxicology* 45:301-308.
- Chojnacka K, Gorecka H, Gorecki H. 2006. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Environ Toxicol Pharmacol* 22:52-57.
- Chung SE, Cheong HK, Ha EH, Kim BN, Ha M, Kim Y, et al. 2015. Maternal blood manganese and early neurodevelopment: the Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *Environ Health Perspect* 123:717-722.
- Claus Henn B, Ettinger AS, Schwartz J, Tellez-Rojo MM, Lamadrid-Figueroa H, Hernandez-Avila M, et al. 2010. Early postnatal blood manganese levels and children's neurodevelopment. *Epidemiology* 21:433-439.
- Claus Henn B, Bellinger DC, Hopkins MR, Coull BA, Ettinger AS, Jim R, et al. 2017. Maternal and cord blood manganese concentrations and early childhood neurodevelopment among residents near a mining-impacted superfund site. *Environ Health Perspect* 125:067020.
- Coetzee DJ, McGovern PM, Rao R, Harnack LJ, Georgieff MK, Stepanov I. 2016. Measuring the impact of manganese exposure on children's neurodevelopment: advances and research gaps in biomarker-based approaches. *Environ Health* 15:91.
- Cromwell EA, Dube Q, Cole SR, Chirambo C, Dow AE, Heyderman RS, et al. 2014. Validity of U.S. norms for the Bayley Scales of Infant Development-III in Malawian children. *Eur J Paediatr Neurol* 18:223-230.
- do Nascimento S, Baierle M, Goethel G, Barth A, Brucker N, Charao M, et al. 2016. Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environ Res* 147:32-43.

- Doerge DR, Takazawa RS. 1990. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem Res Toxicol* 3:98-101.
- Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD. 2007. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology* 28:1079-1091.
- Donders J, Hunter SJ. 2010. Principles and practice of lifespan developmental neuropsychology: Cambridge University Press.
- Dorman DC, McManus BE, Marshall MW, James RA, Struve MF. 2004. Old age and gender influence the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate and manganese phosphate in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 197:113-124.
- Eastman RR, Jursa TP, Benedetti C, Lucchini RG, Smith DR. 2013. Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environ Sci Technol* 47:1629-1637.
- Ekman E, Maxe M, Littorin M, Jönsson BA, Lindh CH. 2013. High-throughput method for the analysis of ethylenethiourea with direct injection of hydrolysed urine using online on-column extraction liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B* 934:53-59.
- Ericson JE, Crinella FM, Clarke-Stewart KA, Allhusen VD, Chan T, Robertson RT. 2007. Prenatal manganese levels linked to childhood behavioral disinhibition. *Neurotoxicol Teratol* 29:181-187.
- FAO. 1980. Mancozeb. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Old_specs/Mancozeb.pdf [accessed 17 February 2017].
- Gunier RB, Bradman A, Jerrett M, Smith DR, Harley KG, Austin C, et al. 2013. Determinants of manganese in prenatal dentin of shed teeth from CHAMACOS children living in an agricultural community. *Environ Sci Technol* 47:11249-11257.
- Gunier RB, Arora M, Jerrett M, Bradman A, Harley KG, Mora AM, et al. 2015. Manganese in teeth and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Res* 142:688-695.
- Gwiazda R, Campbell C, Smith D. 2005. A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implications for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ Health Perspect* 113:104-110.
- Haynes EN, Sucharew H, Kuhnell P, Alden J, Barnas M, Wright RO, et al. 2015. Manganese exposure and neurocognitive outcomes in rural school-age children: the Communities Actively Researching Exposure Study (Ohio, USA). *Environ Health Perspect* 123:1066-1071.
- He P, Liu DH, Zhang GQ. 1994. [Effects of high-level-manganese sewage irrigation on children's neurobehavior]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 28:216-218.
- Hernandez-Bonilla D, Schilman A, Montes S, Rodriguez-Agudelo Y, Rodriguez-Dozal S, Solis-Vivanco R, et al. 2011. Environmental exposure to manganese and motor function of children in Mexico. *Neurotoxicology* 32:615-621.
- Houeto P, Bindoula G, Hoffman JR. 1995. Ethylenbisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards. *Environ Health Perspect* 103:568-573.
- Jacobsen PR, Axelstad M, Boberg J, Isling LK, Christiansen S, Mandrup KR, et al. 2012. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of

endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol* 34:237-250.

Kempson IM, Lombi E. 2011. Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status. *Chem Soc Rev* 40:3915-3940.

Khan K, Wasserman GA, Liu X, Ahmed E, Parvez F, Slavkovich V, et al. 2012. Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *Neurotoxicology* 33:91-97.

Kim Y, Kim BN, Hong YC, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, et al. 2009. Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children. *Neurotoxicology* 30:564-571.

Kjeldsen LS, Ghisari M, Bonfeld-Jørgensen EC. 2013. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxic Appl Pharmacol* 272:453-464.

Lin CC, Chen YC, Su FC, Lin CM, Liao HF, Hwang YH, et al. 2013. In utero exposure to environmental lead and manganese and neurodevelopment at 2 years of age. *Environ Res* 123:52-57.

Lubin JH, Colt JS, Camann D, Davis S, Cerhan JR, Severson RK, et al. 2004. Epidemiologic evaluation of measurement data in the presence of detection limits. *Environ Health Perspect* 112:1691-1696.

Lucchini RG, Guazzetti S, Zoni S, Donna F, Peter S, Zacco A, et al. 2012a. Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *Neurotoxicology* 33:687-696.

Lucchini RG, Zoni S, Guazzetti S, Bontempi E, Micheletti S, Broberg K, et al. 2012b. Inverse association of intellectual function with very low blood lead but not with manganese exposure in Italian adolescents. *Environ Res* 118:65-71.

Madison JL, Wegrzynowicz M, Aschner M, Bowman AB. 2011. Gender and manganese exposure interactions on mouse striatal neuron morphology. *Neurotoxicology* 32:896-906.

McGraw K, Wong S. 1996. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. *Psychol Methods* 1:30.

Menezes-Filho JA, Paes CR, Pontes AM, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. 2009. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *Neurotoxicology* 30:1207-1213.

Menezes-Filho JA, Novaes Cde O, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. 2011. Elevated manganese and cognitive performance in school-aged children and their mothers. *Environ Res* 111:156-163.

Menezes-Filho JA, de Carvalho-Vivas CF, Viana GF, Ferreira JR, Nunes LS, Mergler D, et al. 2014. Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: a gender-stratified analysis. *Neurotoxicology* 45:293-300.

Miranda-Contreras L, Davila-Ovalles R, Benitez-Diaz P, Pena-Contreras Z, Palacios-Pru E. 2005. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 160:19-27.

Mora AM, van Wendel de Joode B, Mergler D, Cordoba L, Cano C, Quesada R, et al. 2014. Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from the infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. *Environ Sci Technol* 48:3467-3476.

- Mora AM, Arora M, Harley KG, Kogut K, Parra K, Hernandez-Bonilla D, et al. 2015. Prenatal and postnatal manganese teeth levels and neurodevelopment at 7, 9, and 10.5 years in the CHAMACOS cohort. *Environ Int* 84:39-54.
- Oulhote Y, Mergler D, Barbeau B, Bellinger DC, Bouffard T, Brodeur ME, et al. 2014a. Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. *Environ Health Perspect* 122:1343-1350.
- Oulhote Y, Mergler D, Bouchard MF. 2014b. Sex- and age-differences in blood manganese levels in the U.S. general population: National Health and Nutrition Examination Survey 2011-2012. *Environ Health* 13:87.
- Racette BA, Aschner M, Guilarte TR, Dydak U, Criswell SR, Zheng W. 2012. Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33:881-886.
- Radloff LS. 1977. The CES-D scale a self-report depression scale for research in the general population. *Appl Psychol Meas* 1:385-401.
- Rahman SM, Kippler M, Tofail F, Bolte S, Derakhshani Hamadani J, Vahter M. 2017. Manganese in drinking water and cognitive abilities and behavior at 10 years of age: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect* 125:057003.
- Riojas-Rodriguez H, Solis-Vivanco R, Schilman A, Montes S, Rodriguez S, Rios C, et al. 2010. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environ Health Perspect* 118:1465-1470.
- Rodrigues EG, Bellinger DC, Valeri L, Hasan MO, Quamruzzaman Q, Golam M, et al. 2016. Neurodevelopmental outcomes among 2- to 3-year-old children in Bangladesh with elevated blood lead and exposure to arsenic and manganese in drinking water. *Environ Health* 15:44.
- Rosenfeld CS, Trainor BC. 2014. Environmental health factors and sexually dimorphic differences in behavioral disruptions. *Curr Environ Health Rep* 1:287-301.
- Semrud-Clikeman M, Ellison PAT. 2009. *Child neuropsychology: Assessment and interventions for neurodevelopmental disorders*: Springer Science & Business Media.
- Skroder H, Kippler M, Nermell B, Tofail F, Levi M, Rahman SM, et al. 2017. Major limitations in using element concentrations in hair as biomarkers of exposure to toxic and essential trace elements in children. *Environ Health Perspect* 125:067021.
- Smith D, Gwiazda R, Bowler R, Roels H, Park R, Taicher C, et al. 2007. Biomarkers of Mn exposure in humans. *Am J Ind Med* 50:801-811.
- Soldin OP, Aschner M. 2007. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links. *Neurotoxicology* 28:951-956.
- Spencer A. 1999. Whole blood manganese levels in pregnancy and the neonate. *Nutrition* 15:731-734.
- Takser L, Mergler D, Hellier G, Sahuquillo J, Huel G. 2003. Manganese, monoamine metabolite levels at birth, and child psychomotor development. *Neurotoxicology* 24:667-674.
- Takser L, Lafond J, Bouchard M, St-Amour G, Mergler D. 2004. Manganese levels during pregnancy and at birth: relation to environmental factors and smoking in a Southwest Quebec population. *Environ Res* 95:119-125.
- U.S. EPA. 2005. Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb. Available: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/mancozeb_red.pdf [accessed 17 February 2017].

- Vaccari A, Saba P, Mocci I, Ruiu S. 1999. Dithiocarbamate pesticides affect glutamate transport in brain synaptic vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1-5.
- van Wendel de Joode B, Mora AM, Córdoba L, Cano JC, 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). *Environ Health Perspect* 122:1321.
- van Wendel de Joode B, Barbeau B, Bouchard MF, Mora AM, Skytt A, Cordoba L, et al. 2016a. Manganese concentrations in drinking water from villages near banana plantations with aerial mancozeb spraying in Costa Rica: Results from the Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environ Pollut* 215:247-257.
- van Wendel de Joode B, Mora AM, Lindh CH, Hernandez-Bonilla D, Cordoba L, Wesseling C, et al. 2016b. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6-9 years from Talamanca, Costa Rica. *Cortex* 85:137-150.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Levy D, Factor-Litvak P, et al. 2006. Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 114:124-129.
- WHO. 1988. Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. *Environmental Health Criteria 78 Geneva:World Health Organization:17-102.*
- Wright RO, Amarasinghe C, Woolf AD, Jim R, Bellinger DC. 2006. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Neurotoxicology* 27:210-216.
- Xu S. 2000. Environmental fate of mancozeb. *Environmental monitoring and pest management Sacramento, United States.*
- Yu X, Chen L, Wang C, Yang X, Gao Y, Tian Y. 2016. The role of cord blood BDNF in infant cognitive impairment induced by low-level prenatal manganese exposure: LW birth cohort, China. *Chemosphere* 163:446-451.

Cuadros y figuras

Cuadro 1. Características de la población de estudio, Estudio ISA ($n = 355$).

| Características | <i>n</i> (%) | <i>n</i> (%) imputado ^a |
|---|--------------|---------------------------------------|
| <i>Maternas/Familiares</i> | | |
| Edad (años) ^b | | |
| <18 | 60 (16.9) | 60 (16.9) |
| 18-24 | 165 (46.5) | 165 (46.5) |
| 25-29 | 64 (18.0) | 64 (18.0) |
| 30-34 | 36 (10.1) | 36 (10.1) |
| ≥35 | 30 (8.5) | 30 (8.5) |
| Educación (años completos) ^c | | |
| ≤6 grado | 180 (50.7) | 180 (50.7) |
| 7-11 grado | 165 (46.5) | 165 (46.5) |
| Secundaria completa | 10 (2.8) | 10 (2.8) |
| Paridad | | |
| 0 | 121 (35.1) | 123 (34.7) |
| ≥1 | 224 (64.9) | 232 (65.3) |
| Datos faltantes | 10 | 0 |
| Fumado durante el embarazo | | |
| No | 336 (94.7) | 336 (94.7) |
| Si | 19 (5.3) | 19 (5.3) |
| Trabajo agrícola al momento de la visita de un año | | |
| No | 270 (76.1) | 270 (76.1) |
| Si | 85 (23.9) | 85 (23.9) |
| Depresión al momento de la visita de un año (puntaje CES-D) | | |
| No (<24) | 257 (73.6) | 262 (73.8) |
| Si (≥24) | 92 (26.4) | 93 (26.2) |
| Datos faltantes | 6 | 0 |
| Ingreso familiar al momento de la visita de un año | | |
| Por encima de la línea de pobreza | 107 (33.6) | 120 (33.8) |
| Por debajo de la línea de pobreza y por encima de la línea de pobreza extrema | 144 (45.1) | 156 (43.9) |
| Por debajo de la línea de pobreza extrema | 68 (21.3) | 79 (22.3) |
| Datos faltantes | 36 | 0 |
| Estado de la seguridad alimentaria al momento de la visita de un año | | |
| Alta o marginal | 220 (62.0) | 220 (62.0) |
| Baja | 101 (28.4) | 101 (28.4) |
| Muy baja | 34 (9.6) | 34 (9.6) |
| Lugar de la evaluación del neurodesarrollo | | |
| Oficina de campo | 285 (80.5) | 285 (80.3) |
| Otros | 69 (19.5) | 70 (19.7) |
| Datos faltantes | 1 | 0 |

Infantiles

| | | | |
|------------------------------------|------------|------------|--|
| Sexo | | | |
| Masculino | 178 (50.1) | 178 (50.1) | |
| Femenino | 177 (49.9) | 177 (49.9) | |
| Bajo peso al nacer (<2,500 gramos) | | | |
| No | 340 (97.1) | 345 (97.2) | |
| Si | 10 (2.9) | 10 (2.8) | |
| Datos faltantes | 5 | 0 | |
| Parto pretérmino (<37 semanas) | | | |
| No | 326 (93.7) | 333 (93.8) | |
| Si | 22 (6.3) | 22 (6.2) | |
| Datos faltantes | 7 | 0 | |

Abreviaciones: n, número de participantes; CES-D, Escala de Depresión del Centro de Estudios Epidemiológicos.

^aNumero de observaciones para cada característica después de imputar los valores faltantes al seleccionar al azar de los datos observados para cada covariable. Los datos imputados fueron utilizados en los modelos analíticos.

^bModelada como una variable continua en los modelos de regresión.

^cModelada como una variable dicotómica (≤ 6 grado y >6 grado) en los modelos de regresión.

Cuadro 2. Distribución de biomarcadores prenatales de exposición y resultados de efectos en neurodesarrollo de los niños en la población de estudio, Estudio ISA ($k = 355$ pares madre-niño).

| Exposiciones y efectos | <i>n</i> | <i>k</i> | Media (DE) | Min | Percentil | | | Max | σ^2_{entre} | σ^2_{dentro} | CCI |
|--|----------|----------|---------------|------|-----------|-------|-------|-------|---------------------------|----------------------------|------|
| | | | | | 25 | 50 | 75 | | | | |
| <i>Biomarcadores prenatales de exposición^a</i> | | | | | | | | | | | |
| ETU _{GS} en orina ($\mu\text{g/L}$) ^{b,c} | 764 | 355 | 4.4 (7.1) | 0.8 | 2.4 | 3.3 | 4.9 | 127.4 | 0.02 | 0.08 | 0.17 |
| Mn en cabello ($\mu\text{g/g}$) ^{c,d} | 661 | 355 | 3.7 (5.4) | 0.1 | 0.9 | 1.7 | 4.1 | 53.3 | 0.16 | 0.11 | 0.59 |
| Mn en sangre ($\mu\text{g/L}$) ^c | 571 | 349 | 24.4 (6.2) | 9.1 | 20.3 | 24.0 | 28.0 | 50.6 | 19.92 | 26.45 | 0.43 |
| <i>Efectos en neurodesarrollo^f</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Puntajes compuestos BSID-III</i> | | | | | | | | | | | |
| Cognitivo | -- | 355 | 98.2 (9.5) | 70.0 | 90.0 | 100.0 | 105.0 | 130.0 | -- | -- | -- |
| Lenguaje | -- | 346 | 90.1 (7.1) | 68.0 | 86.0 | 90.0 | 94.0 | 109.0 | -- | -- | -- |
| Motor | -- | 338 | 97.3 (8.9) | 76.0 | 91.0 | 97.0 | 103.0 | 124.0 | -- | -- | -- |
| Socio-emocional | -- | 352 | 90.3 (11.9) | 60.0 | 80.0 | 90.0 | 100.0 | 130.0 | -- | -- | -- |

Abreviaciones: *n*, número de muestras; *k*, número de mujeres; DE, desviación estándar; CCI, coeficiente de correlación intraclase; ETU_{GS}, etilentiourea ajustada por gravedad específica; Mn, manganeso; BSID-III, Escala Bayley de Desarrollo de Infantes y Niños Pequeños, Tercera Edición.

^aLos análisis descriptivos fueron realizados con las concentraciones promediadas de las muestras de embarazo, mientras que los análisis de CCI fueron realizados con las concentraciones no promediadas (individuales). En las mujeres para quienes solamente se disponía de una medición de Mn o ETU, se utilizó esta medición única en lugar del promedio.

^bETU fue medido en 764 muestras de orina recolectadas de 355 participantes: 93 mujeres facilitaron tres muestras de orina durante el embarazo, 223 facilitaron dos muestras y 39 facilitaron una muestra.

^cLa varianza dentro y entre mujeres y el CCI fueron calculados y reportados para las concentraciones de ETU en orina ajustadas por gravedad específica y concentraciones de Mn en cabello transformadas a \log_{10} .

^dMn fue medido en 661 muestras de cabello recolectadas de 355 participantes: 306 mujeres facilitaron dos muestras de cabello y 49 facilitaron una muestra.

^eSe consiguieron 571 muestras de sangre completa recolectadas de 349 mujeres: a un total de 222 mujeres se les tomaron dos muestras durante el embarazo y a 127 solamente una muestra.

^fNo a todos los 355 infantes se les administraron las cuatro escalas del BSID. Por ejemplo, solamente a 346 infantes se les administró la escala de lenguaje, mientras que solamente a 338 se les administró la escala motora.

Cuadro 3. Asociaciones ajustadas entre las concentraciones prenatales de logETUGS ($\mu\text{g/L}$), logMnC ($\mu\text{g/g}$), y MnS ($\mu\text{g/L}$) y los puntajes compuestos estandarizados del BSID-III al año de edad para todos los niños y estratificadas por sexo (modelos ajustados de manera simultanea por los tres biomarcadores), Estudio ISA.

| Efectos en neurodesarrollo ^a | Todos los infantes | | Niños | | Niñas | | <i>p</i> _{INT} |
|---|--------------------|------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|-------------------------|
| | <i>n</i> | β (95% CI) | <i>n</i> | β (95% CI) | <i>n</i> | β (95% CI) | |
| <i>Cognitivo</i> | | | | | | | |
| LogETUGS | 349 | -1.1 (-4.9, 2.8) | 174 | -1.8 (-7.1, 3.4) | 175 | -1.4 (-7.3, 4.5) | 0.60 |
| LogMnC | 349 | -0.2 (-2.3, 1.8) | 174 | 2.5 (-0.4, 5.4) | 175 | -3.0 (-6.1, 0.1) | 0.01 |
| MnS | 349 | 0.1 (-0.1, 0.2) | 174 | 0.1 (-0.1, 0.3) | 175 | 0.0 (-0.2, 0.2) | 0.33 |
| <i>Lenguaje</i> | | | | | | | |
| LogETUGS | 340 | -0.6 (-3.6, 2.5) | 169 | -1.3 (-5.4, 2.9) | 171 | 0.1 (-4.5, 4.6) | 0.79 |
| LogMnC | 340 | 0.0 (-1.7, 1.6) | 169 | 0.8 (-1.5, 3.1) | 171 | -0.6 (-2.9, 1.8) | 0.46 |
| MnS | 340 | 0.0 (-0.1, 0.1) | 169 | 0.0 (-0.2, 0.1) | 171 | 0.1 (-0.1, 0.3) | 0.26 |
| <i>Motor</i> | | | | | | | |
| LogETUGS | 332 | -0.3 (-4.3, 3.7) | 162 | 1.2 (-4.3, 6.6) | 170 | -2.4 (-8.6, 3.8) | 0.34 |
| LogMnC | 332 | 0.6 (-1.6, 2.7) | 162 | 0.3 (-2.8, 3.4) | 170 | 1.4 (-1.8, 4.6) | 0.99 |
| MnS | 332 | 0.0 (-0.1, 0.2) | 162 | 0.1 (-0.1, 0.3) | 170 | 0.0 (-0.3, 0.2) | 0.52 |
| <i>Socio-emocional</i> | | | | | | | |
| LogETUGS | 346 | -3.9 (-9.0, 1.2) | 173 | 0.0 (-6.9, 7.0) | 173 | -7.4 (-15.2, 0.4) | 0.11 |
| LogMnC | 346 | -2.3 (-5.0, 0.4) | 173 | -4.6 (-8.5, -0.8) | 173 | -0.2 (-4.2, 3.9) | 0.17 |
| MnS | 346 | 0.1 (-0.1, 0.3) | 173 | 0.1 (-0.2, 0.3) | 173 | 0.1 (-0.2, 0.4) | 0.89 |

Los modelos fueron ajustados por educación materna, paridad, edad gestacional al momento del nacimiento y la edad del niño, puntaje HOME, lugar de la evaluación al momento de la visita de un año y exposición a los tres biomarcadores.

Abreviaciones: *n*, número de muestras; LogETUGS, etilentiourea urinaria ajustada por gravedad específica y transformada a log₁₀; LogMnC, manganeso en cabello transformado a log₁₀; MnS, manganeso en sangre; BSID-III, Escala Bayley de Desarrollo de Infantes y Niños Pequeños, Tercera Edición.

^aLos tamaños de muestras varían entre los dominios de neurodesarrollo y con respecto al Cuadro 2 debido a que no todos los infantes completaron las cuatro escalas BSID-III y no de todas las madres se recolectaron muestras de orina, cabello y sangre durante el embarazo. Por ejemplo, 355 infantes completaron la escala cognitiva de BSID-III y todas las madres de estos infantes facilitaron muestras de orina durante el embarazo (véase Cuadro 2), pero solamente 349 madres de estos infantes contribuyeron con muestras de cabello y sangre.