

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctora en Ciencias Biológicas

Vigilancia sanitaria de anomalías congénitas en la provincia de Santa Fe: evaluación de factores de riesgos maternos y ambientales.

Mg. Carlina Leila Colussi

Director de Tesis: Dra. María Fernanda Simoniello

Co-director de Tesis: Dra. Gisela Laura Poletta

Lugar de realización: Cátedra de Toxicología, Farmacología y
Bioquímica Legal – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
- Universidad Nacional del Litoral.

-2023-

2. Agradecimientos

Este trabajo de tesis no es más que la sumatoria de la colaboración de muchísimas personas e instituciones, que hicieron posible el recorrido de este largo camino de desarrollo personal y profesional. No hay palabras que puedan expresar tanta gratitud y cariño hacia todas ellas.

A la Universidad Nacional del Litoral por darme la oportunidad de formarme no solo en mi carrera de grado, sino también de permitir y apostar a mi perfeccionamiento a través de dos posgrados.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, y a la Secretaría de Posgrado por admitirme en la Carrera de Doctorado, y así secundar la oportunidad que me brindó la Universidad.

A los proyectos de investigación que financiaron esta tesis: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (PICT 2017-0980, PICT 2017-1069), CAID 50520190100077LI Universidad Nacional del Litoral, Ministerio de Producción, Ciencia y Tecnología de la Provincia de Santa Fe (Res. M.P.C.yT. N° 879-21).

A mis directoras Fer y Gise, por su compromiso, alegría, comprensión e infinita paciencia. Por la posibilidad de poder elegir hacer aquello que me apasiona, el acompañamiento, y la dedicación muchas veces “exclusiva” que han tenido conmigo. Por guiarme hacia la concreción de los objetivos.

A la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, un maravilloso grupo humano, siempre predispuesto al trabajo en equipo, y con mucha alegría y pasión por lo que hacen.

Al Laboratorio de Biogeoquímica Boreal, de la Universidad de Sherbrooke, Canadá, y a su director, Prof. PhD Jean-Philippe Bellenger, por su invaluable generosidad al recibirme en la estancia doctoral, y a todo su equipo de trabajo.

A Priscila, Enrique y Lucía; a Candela, Agustín y Ana Paula, por su colaboración en esta tesis, por la escucha atenta, el intercambio, la calidez y por ser esos hermanos que uno elige en el camino.

A Ma. Rosa Baroni, por ese simple consejo en el momento justo, por despuntar su maternidad conmigo, por su apoyo y aliento incondicional.

A la Dra. Nora Racigh, ¡la llave maestra que me abrió todas las puertas! Sin ella, esta tesis sólo hubiese sido un sueño.

A la Dra. Olga Ávila y Mg. Liliana Contini, del Laboratorio de Investigación y Servicio en Estadística (Departamento de Matemática), y a la Dra. Carla Teglia, por su invaluable ayuda en la parte estadística y analítica.

A todos los hospitales públicos colaboradores con este trabajo, a todo el personal sanitario participante: bioquímicos, pediatras, neonatólogos, obstetras, enfermeras, personal de seguridad, de archivo, administrativo.

A todas las madres participantes del estudio y sus bebés, que tanto me han enseñado de la vida y el dolor.

Al jurado, por su tiempo y correcciones, especialmente a mi consejero de estudios, Dr. Pablo Barbero.

A mi familia, Ma, Pa y San, por el apoyo incondicional, a mi tía Titi y mi tío Negro, que fueron mis padres en el desarraigo, y a mi sobrino Francisco.

A mis madres y amigas de la vida, Graciela B, Graciela P, Nelly, Isabel, Meli, Cati, Magui, Vicky y Virgi, por comprender mis ausencias, por las alegrías de cada encuentro, y por el aguante de siempre.

A papucho Dios, mi luz, mi guía, mi sostén, mi TODO.

3. Aportes científicos-tecnológicos

1. Colussi C, Racigh N, Poletta G, Simoniello MF. "Prenatal risk factors for selected congenital anomalies development: a case-control pilot study in postpartum women from Argentina". J Pediatr Neonat Individual Med. 2023; 12 (1): e120109. Doi: 10.7363/120109.

4. Índice

2. Agradecimientos.....	1
3. Aportes científicos-tecnológicos.....	3
4. Índice	4
5. Abreviaturas y símbolos	7
6. Resumen.....	10
Abstract	12
7. Introducción	14
7.1 Anomalías congénitas	14
7.1.1 Causas	14
7.1.2 Estadísticas	21
7.2 Salud pública y ambiental.....	23
7.3 Vigilancia sanitaria de AC.....	24
7.4 Biomonitordeos humanos	25
7.5 Biomarcadores	25
7.5.1 De exposición	26
7.5.2 De efecto	29
7.5.3 Marcadores bioquímicos	36
8. Objetivos	39
8.1 Generales.....	39
8.2 Específicos:.....	39
9. Materiales y métodos.....	40
9.1 Tipo de estudio:.....	40
9.2 Universo	40
9.3 Área de estudio	40
9.4 Población objetivo	40
9.5 Muestra	40
9.5.1 Definición de casos y controles.....	41
9.5.2 Criterios de inclusión.....	42
9.5.3 Criterios de exclusión.....	42
9.6 Instrumentos de recolección de datos	42
9.6.1 Evaluación de factores de riesgo maternos.....	42
9.6.2 Determinación de biomarcadores de exposición	43
9.6.3 Determinación de biomarcadores de efecto:	45
9.6.4 Determinación de marcadores bioquímicos	49
9.7 Operacionalización de las variables	50

9.7.1 Datos obtenidos a través de las encuestas	50
9.7.2 Datos obtenidos por fuentes secundarias (historias clínicas)	55
9.8 Análisis estadístico de los datos	56
9.9 Consideraciones éticas	57
10. Resultados	58
10.1 Evaluación de factores de riesgo maternos potencialmente implicados en el desarrollo de las ACS.....	59
10.1.1 Datos sociodemográficos.....	59
10.2 Descripción de la prevalencia de AC relacionadas con factores de exposición ambiental maternos en la provincia de Santa Fe.....	66
10.3 Determinación de la presencia de analitos de sustancias xenobióticas en muestras maternas.....	67
10.3.1 Cantidades de xenobióticos detectados y cuantificados por casos y controles.....	68
10.3.2 Cantidades de xenobióticos detectados y cuantificados por lugar de residencia materno.	69
10.3.3 Clasificación y frecuencia de cuantificación de los xenobióticos evaluados.	69
10.3.4 Concentraciones de xenobióticos por grupos de casos y controles.....	70
10.3.5 Concentraciones de xenobióticos por lugar de residencia.....	72
10.3.6 Concentraciones de xenobióticos más frecuentemente cuantificados por clasificación de AC	74
10.3.7 Identificación y cuantificación de xenobióticos hallados por casos y controles.....	75
10.3.8 Identificación y cuantificación de xenobióticos hallados por lugar de residencia.	77
10.3.9 Frecuencia de cuantificación de xenobióticos por departamento	79
10.4 Evaluación del daño genotóxico por biomarcadores de efecto	79
10.4.1 Ensayo cometa alcalino y modificado con Endonucleasa III.....	79
10.4.2 Ensayo Citoma.....	80
10.5 Determinación de marcadores bioquímicos	81
10.6 Determinación de correlación entre la presencia de analitos ambientales y daño genotóxico.....	82
11. Discusión.....	86
11.1 Descripción de la prevalencia de AC relacionadas con factores de exposición ambiental maternos en la provincia de Santa Fe.	86
11.2 Evaluación de factores de riesgos maternos y ambientales.....	87
11.3 Determinación de la presencia de analitos de sustancias xenobióticas en las muestras maternas.....	90
11.4 Evaluación del daño genotóxico por biomarcadores de efecto	96

11.5 Determinación de asociación entre la presencia de analitos ambientales y daño genotóxico.....	98
11.6 Evaluación de los factores de riesgo maternos y construcción de una herramienta sanitaria.....	100
12. Conclusión	103
13. Bibliografía	105
14. Anexos.....	123
14.1 Instrumentos de recolección de datos sociodemográficos y de factores de riesgo	123
14.2 Protocolo Ensayo Cometa	126
14.3 Protocolo Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de citocinesis	127

5. Abreviaturas y símbolos

°C: grados Celsius

μmol/L: micromol por litro

ABPF: Agarosa de Bajo Punto de Fusión

ACS: Anomalías Congénitas Seleccionadas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APCI: Ionización Química a Presión Atmosférica

APFN: Agarosa de Punto de Fusión Normal

API: Ionización a Presión Atmosférica

ATZ: Atrazina

BN: Células Binucleadas

CBZ: Carbendazim

CE: Contaminantes Emergentes

CIA: Comunicación Interauricular

CIV: Comunicación Interventricular

DDT: Diclorodifeniltricloroetano (insecticida organoclorado)

DM: Diabetes Mellitus

DPA: Defectos de la Pared Abdominal

Dptos.: Departamentos

DS: Desvío Estándar

EC: Ensayo cometa

ECLAMC: Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas

ECNT: Enfermedades Crónicas No Transmisibles

EE: Error Estándar

ENDO III: Endonucleasa III

ESI: Ionización por Electrospray

FE: Fase Estacionaria

FM: Fase Móvil

g: Gramos

GC: Cromatografía Gaseosa

GC-μECD: Cromatografía Gaseosa con Detector de micro Captura de Electrones

GC-MS-EI: Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas en Tándem

HCB: Hexaclorobenceno

Hcy: Homocisteína

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

HTA: Hipertensión Arterial

IC: Intervalo de Confianza

IDEC: Índice de daño de Ensayo Cometa

IgM: Inmunoglobulina M

IPEC: Instituto Provincial de Estadísticas y Censos

KCl: Cloruro de Potasio

LOD: Límite de Detección

LOQ: Límite de Cuantificación

m/z: masa/carga

Min: minutos

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

MN: Micronúcleos

MNBN: Micronúcleos en Células Binucleadas

MNMO: Micronúcleos en Células Mononucleadas

MO: Células Mononucleadas

MRM: Monitoreo de Reacciones Múltiples

N= número de muestras

NaCl: Cloruro de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

NBI: Necesidades Básicas Insatisfechas

NBUD: Brotes Nucleares

NC: No Cuantificado

NDI: Índice de División Nuclear

ng/mL: nanogramos/mililitros

NPB: Puentes Nucleoplásmicos

o,p'-DDD: isómero de diclorodifenildicloroetano (derivado del DDT)

o,p'-DDE: clorofeniletieno (derivado del DDT)

o,p'-DDT: isómero de diclorodifeniltricloroetano

OC: Pesticidas Organoclorados

OF: Pesticidas Organofosforados

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

p,p'-DDD: isómero de diclorodifenildicloroetano

p,p'-DDE: isómero de diclorodifenildicloroetileno

p,p'-DDT: isómero de diclorodifeniltricloroetano

PHA: Fitohemoaglutinina

PLS: Regresión por mínimos cuadrados parciales

ppb: Partes por Billón

PYR: Piretroides

R²: Coeficiente de Regresión

RCIU: Retraso del Crecimiento Intrauterino

RENAC: Red Nacional de Anomalías Congénitas

RN: Recién Nacido

RPMI: Medio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)

SFB: Suero Fetal Bovino.

SNC: Sistema Nervioso Central

SPE: Extracción en Fase Sólida Dispersiva

SPSS: Software estadístico (Statistical Package for Social Sciences)

TGV: Transposición de los Grandes Vasos

TORCH: Toxoplasmosis, Rubeola, Citomegalovirus, Herpes

UHPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

α-HCH: alfa Hexaclorohexano

β-HCH: beta Hexaclorohexano

γ-HCH: gamma Hexaclorohexano

δ-HCH: delta Hexaclorohexano

6. Resumen

Las anomalías congénitas (AC) son anormalidades estructurales o funcionales que ocurren durante la vida intrauterina. A pesar de que aproximadamente el 50% de ellas no pueden ser asociadas a una causa específica, su investigación epidemiológica representa un desafío debido a la multiplicidad de factores de riesgo asociados. Por lo general, obedecen a una etiología mixta, multifactorial, genética, o predominantemente ambiental. A nivel global, la prevalencia de AC en recién nacidos es del 1 al 5%. Estudios en diferentes partes del mundo, refieren la posible relación entre diversas AC y la exposición de sus madres a factores ambientales. En las últimas décadas, en Argentina, las AC fueron aumentando su importancia relativa como causa de defunciones infantiles. Por su parte, la provincia de Santa Fe no registra hasta la actualidad informes sobre la morbilidad en los menores de edad debido a AC.

Por otro lado, es importante destacar que el seguimiento del efecto genotóxico en las distintas poblaciones es una herramienta útil en biomonitoreos humanos y de gran importancia biológica para estimar el riesgo de la exposición a mezclas complejas de sustancias químicas. En este sentido, el Ensayo Cometa (EC) es un método sensible y rápido para la detección de roturas de ADN de cadena simple y reparación por escisión incompleta. La enzima Endonucleasa III (Endo III) combinada con el EC, evalúa la presencia de pirimidinas oxidadas, aumentando la sensibilidad del ensayo. Por su parte, el Test de Micronúcleo (MN) con Bloqueo de Citocinesis (MNBC), tiene un alto valor predictivo para detectar precozmente efectos clastogénicos y aneugénicos en poblaciones humanas, y es un ensayo validado internacionalmente para evaluación genotóxica.

Por todo lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue describir la prevalencia de AC relacionada con factores de exposición maternos y ambientales en la provincia de Santa Fe, a través de la determinación de biomarcadores de exposición y genotoxicidad en muestras maternas.

Para ello se desarrolló un estudio descriptivo de corte transversal, de casos y controles, en mujeres puérperas, madres de niños con y sin AC (casos y controles, respectivamente). A través de un muestreo por conveniencia, aquellas que desearon participar del estudio, firmaron previamente un consentimiento informado, y posteriormente se les realizó una encuesta semi-estructurada sobre variables relevantes. Posteriormente se obtuvieron muestras sanguíneas, para la determinación de biomarcadores de exposición (analitos de sustancias xenobióticas ambientales) y de genotoxicidad (EC y MNBC).

Participaron del estudio 290 mujeres, 66 madres de casos y 224 de controles. Se observó diferencias significativas entre ambos grupos, y entre los lugares de residencia (urbano y rural), en los parámetros de edad gestacional, el tipo de parto y el peso del RN. En cuanto a los biomarcadores de exposición, se detectaron metabolitos de pesticidas organoclorados (OC), organofosforados (OF) y piretroides (PIR). Los compuestos cuantificados con mayor frecuencia fueron atrazina (ATZ) (57,14%), carbendazim (CBZ) (46,42%), metil parabeno (46,42%), epóxido de exo-heptacloro (45,58%) y δ -HCH (39,70%). Respecto a los biomarcadores de genotoxicidad, se encontró una correlación positiva entre la cantidad de pesticidas en sangre y las variables del MNBC. La variable de Índice de División Nuclear (NDI) pareció ser más sensible a las altas concentraciones de contaminantes emergentes (CE) en aquellas madres de niños con cardiopatías y anomalías digestivas. Por otro lado, las madres de niños con anomalías genitourinarias fueron las que presentaron mayores concentraciones de ATZ y OF. Algunas variables del MNBC fueron más sensibles a la variable de Necesidades Básicas Insatisfechas (NBI), en el caso de las anomalías craneofaciales.

Los resultados mostraron, por un lado, que el lugar de residencia materno resultó un factor de diferenciación en términos de variables ginecológicas, lo cual describe un profundo trasfondo en la realidad sanitaria de la provincia de Santa Fe, que podría tener un gran impacto en la salud de los futuros adultos, que han nacido pre término. Por otro lado, la detección de contaminantes ambientales, entre ellos pesticidas de uso actual y otros ya prohibidos, en mujeres puérperas plantea cuestionamientos sociosanitarios importantes. No solo muestra las condiciones de saneamiento ambiental en las cuales se encuentran viviendo las mujeres de toda la provincia, sino también el riesgo de exposición transplacentaria a dichos compuestos en cada gestante, los potenciales efectos en su salud a largo plazo, desconocidos e impredecibles, y en el caso de los niños con AC, un probable mayor riesgo de morbimortalidad.

Todo esto, resalta la necesidad de que se generen políticas de salud focalizando también en la esfera socioambiental, minimizando, en lo posible, los consecuentes costos sociosanitarios. Por ello, estudios como el presente, intentan poner a disposición de los tomadores de decisiones, información específica que constituyan herramientas sanitarias a tener en cuenta para mejorar la salud materno-infantil, en el contexto ambiental en el que viven, como un determinante de salud clave para la salud de las actuales y futuras generaciones.

Abstract

Congenital anomalies (CA) are structural or functional abnormalities that occur during intrauterine life. Despite the fact that approximately 50% of them cannot be associated to a specific cause, their epidemiological investigation represents a challenge due to the multiplicity of associated risk factors. In general, they obey a mixed, multifactorial, genetic, or predominantly environmental etiology. Globally, the prevalence of CA in newborns is between 1 and 5%. Studies in different parts of the world refer to the possible relationship between various CAs and the exposure of their mothers to environmental factors. In recent decades, in Argentina, CAs have been increasing their relative importance as a cause of infant deaths. For its part, the Santa Fe province does not register to date reports on morbidity and mortality in children due to CA.

On the other hand, it is important to highlight that the monitoring of genotoxic effects in different populations is a useful tool in human biomonitoring, and of great biological importance to estimate the exposure risks to complex mixtures of chemical substances. In this sense, the Comet Assay (CA) is a sensitive and rapid method for the detection of single-strand DNA breaks and incomplete excision repair. The Endonuclease III (Endo III) enzyme combined with CA evaluates the presence of oxidized pyrimidines, increasing the sensitivity of the assay. On the other hand, the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) has a high predictive value for early detection of clastogenic and aneugenic effects in human populations, and is an internationally validated assay for genotoxic evaluation.

For all of the above, the objective of this study was to describe the prevalence of CA related to maternal and environmental exposure factors in Santa Fe province through the determination of exposure and genotoxicity biomarkers in maternal samples.

A descriptive case and control cross-sectional study was developed in postpartum women, mothers of children with and without CA (cases and controls, respectively). Women who wished to participate in the study, first signed an informed consent, then answered a semi-structured survey on relevant variables, and finally, blood samples were obtained for the determination of exposure (analytes of environmental xenobiotic substances) and genotoxicity (EC and CBMN) biomarkers.

As results, 290 women participated in the study, 66 mothers of cases and 224 of controls. Significant differences were observed between both groups, and between the places of residence (urban and rural), in the parameters of gestational age, the type of delivery and the weight of the newborn. Regarding exposure biomarkers, metabolites of organochlorine (OC), organophosphate (OF) and pyrethroid (PI R) pesticides were

detected. The most frequently quantified compounds were atrazine (ATZ) (57.14%), carbendazim (CBZ) (46.42%), methyl paraben (46.42%), exo-heptachlor epoxide (45.58%), and δ -HCH (39.70%). Regarding genotoxicity biomarkers, a positive correlation was found between the number of pesticides in blood and the CBMN variables. The Nuclear Division Index (NDI) variable appeared to be more sensitive to high concentrations of emerging contaminants (EC) in those mothers of children with heart and digestive abnormalities. On the other hand, mothers of children with genitourinary anomalies were the ones with the highest concentrations of ATZ and OF. Some MNBC variables were more sensitive to the Unsatisfied Basic Needs (UBN) variable, in the case of craniofacial anomalies.

The results showed, on the one hand, that the maternal place of residence was a differentiating factor in terms of gynecological variables, which describes a deep background in the health reality of Santa Fe province, which could have a great impact on the health of future adults, who have been born preterm. On the other hand, the detection of environmental contaminants, among them currently used pesticides and others already prohibited, in postpartum women raises important socio-sanitary questions. It not only shows the environmental sanitation conditions in which women throughout the province are living, but also the risk of transplacental exposure to these compounds in each pregnant woman, the potential effects on their long-term health, unknown and unpredictable, and in the case of children with CA, a probable increased risk of morbidity and mortality.

All of this highlights the need for health policies to be generated, that also focus on the socio-environmental sphere, minimizing, as far as possible, the consequent socio-sanitary costs. For this reason, studies such as this one, try to make available to decision-makers, specific information that constitutes health tools, to take into account to improve maternal and child health, in the environmental context in which they live, as a determinant of health, a key to the health of current and future generations.

7. Introducción

7.1 Anomalías congénitas

Durante el embarazo, se producen numerosos cambios anatómicos, fisiológicos, y metabólicos en el cuerpo de la madre. El desarrollo de los tejidos y órganos fetales requiere el suministro de una cantidad adecuada de nutrientes y oxígeno. Sin embargo, formas reactivas de oxígeno producidas en ambos (madre y niño) afectan la replicación, diferenciación y maduración de las células en desarrollo (Bak & Roszkowski, 2013).

Las anomalías congénitas (AC) pueden ser definidas como anormalidades estructurales o funcionales que ocurren durante la vida intrauterina y pueden ser identificadas prenatalmente, al momento del nacimiento, o a veces solo posteriormente (Neira & Prüss-Ustün, 2016).

Según la Red Nacional de Anomalías Congénitas (RENAC), las AC pueden ser mayores o menores, y los casos se pueden clasificar según su presentación clínica en:

- Casos aislados: presentan una AC mayor única, o dos o más AC mayores solo si corresponden a una secuencia o se encuentran en la misma estructura corporal.
- Casos con AC múltiples: presentan dos o más AC mayores que afectan estructuras corporales diferentes, no relacionadas, de etiología desconocida, que pueden corresponder a un patrón conocido (asociaciones) o no.
- Síndromes: casos que presentan una causa definida sea genética o no. (Barbero et al., 2020).

Las anomalías menores únicas están presentes en aproximadamente el 14% de neonatos. Los defectos mayores son mucho más comunes en los embriones tempranos (10% a 15%), pero la mayoría de ellos se abortan espontáneamente durante las primeras 6 semanas. Cuando un niño tiene más de una anomalía ("múltiples malformaciones"), puede deberse a que la exposición ha cubierto una serie de períodos sensibles para diferentes AC, o porque la exposición en una etapa del desarrollo tiene una serie de efectos diferentes en la organogénesis (Dolk & Vrijheid, 2003).

7.1.1 Causas

Los defectos congénitos afectan aproximadamente al 4-6% de los recién nacidos vivos, y a la mayoría de los abortos espontáneos en el primer trimestre del embarazo, cuyo número exacto no se puede determinar. También son la causa más común de mortalidad infantil y discapacidad en el siglo XXI (Tobola-Wróbel et al., 2020).

Son un grupo muy complejo y heterogéneo de cambios simples o múltiples de etiología mixta, multifactorial, genética, o predominantemente ambiental (Eurocat

Central, 2004). Las causas genéticas son relativamente conocidas, e incluye las monogénicas (aproximadamente el 20% de los casos), las alteraciones cromosómicas (numéricas estructurales -cerca del 25%-), y causas multifactoriales (50% de los casos) (Toboła-Wróbel et al., 2020). A pesar de tan alto porcentaje de causas multifactoriales, su investigación epidemiológica representa un desafío debido a la multiplicidad de factores de riesgo asociados (Rojas et al., 2000).

La etiología de los factores ambientales es responsable de efectos disruptivos en el 5% de los casos y esos casos son los más difíciles de investigar (Oliveira & Fett-Conte, 2013).

La contaminación ambiental, el estrés crónico, los bajos niveles de actividad física, el efecto teratogénico de drogas y algunos medicamentos, los productos químicos, o la nutrición inadecuada, son determinantes de la producción de un mayor número de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los trastornos causados por ellos, como se puede observar en la Figura 1. El estrés oxidativo, principalmente en las mitocondrias, ataca a las células en crecimiento. Daña sus estructuras probablemente ya en una etapa temprana de la embriogénesis, y provoca anomalías en la estructura del ADN que pueden desencadenar abortos espontáneos, preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y AC (Toboła-Wróbel et al., 2020).

Numerosos estudios demuestran que el estrés oxidativo, tiene efectos adversos sobre el embarazo, la salud de la embarazada y el desarrollo fetal. Es la causa de incorrecta implantación de embriones, abortos espontáneos, partos prematuros, bajo peso al nacer y malformaciones (Pietryga et al., 2017).



Figura 1. Factores de riesgo maternos y ambientales para el desarrollo del embarazo.

7.1.1.1 Factores de riesgo maternos

De salud

Un teratógeno es cualquier agente que actúa alterando irreversiblemente el crecimiento, la estructura o función del embrión en desarrollo o el feto. Estos incluyen medicamentos, infecciones, y los agentes físicos tales como las radiaciones ionizantes (Morgan-Ortiz et al., 2016). La duración de la exposición, la concentración de la sustancia teratogénica presente y la etapa de desarrollo embrionario en el momento de la exposición, tienen efecto sobre el embrión (Sambu et al., 2022).

Factores ambientales, infecciones y consumo de ciertas drogas (lícitas e ilícitas), pueden mimetizar condiciones fisiológicas. Los órganos de un embrión son más sensibles a los agentes teratogénicos durante los períodos de diferenciación rápida. Debido a que la señalización molecular y la inducción embrionaria preceden a la diferenciación morfológica, el período durante el cual las estructuras son sensibles a la interferencia de los teratógenos suele preceder a la etapa de su desarrollo visible (Moore et al., 2016).

La diabetes mellitus (DM) mal controlada en la madre con hiperglucemia y cetosis persistentes, particularmente durante la embriogénesis, se asocia con una incidencia

dos a tres veces mayor de malformaciones congénitas (Zhang et al., 2022). Los recién nacidos de una madre diabética suelen ser grandes (macrosomía), y presentan mayor riesgo de padecer defectos congénitos del sistema nervioso central (SNC), craneofaciales, cardiovasculares, gastrointestinales, genitourinarias y del sistema músculo-esquelético (Kokhanov, 2022).

La hipertensión arterial (HTA) materna es otra de las complicaciones más frecuentes durante el embarazo, y múltiples estudios han informado sobre una asociación entre la HTA materna y los defectos cardíacos congénitos en la descendencia (Caton et al., 2009; Roberts et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2015). Cuando se planifica el embarazo, es el momento de modificar el tratamiento para la hipertensión, para evitar los efectos teratogénicos de algunas drogas (Asprea et al., 2013).

Por otro lado, las hormonas tiroideas son importantes para el metabolismo energético y para la estimulación del crecimiento y desarrollo, particularmente del cerebro, tanto en el feto como en el recién nacido. Las anomalías de la función tiroidea; tanto el hipo como el hipertiroidismo, durante el período neonatal se asocian con una morbilidad significativa que incluye daño cerebral irreversible (Ogilvy-Stuart & James, 2022).

El hipotiroidismo en el embarazo puede tener resultados obstétricos y neonatales adversos, según la gravedad de las anomalías bioquímicas (Wahaibi et al., 2022). Algunos de los síntomas y signos de tirotoxicosis neonatal pueden ser retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), craneosinostosis, y microcefalia, entre otras (Ogilvy-Stuart & James, 2022).

Respecto a infecciones agudas durante el embarazo, las del complejo TORCH - Toxoplasmosis, Rubéola, Citomegalovirus y Herpes virus simple-, están relacionadas con trastornos congénitos, como anomalías craneofaciales, cardíacas y del SNC, consecuencias fetales desfavorables, y sucesivas fallas reproductivas (Nayak et al., 2022).

Hábitos higiénico-dietarios

En general, el consumo de tabaco en el embarazo se asocia con algunos factores socio demográficos como bajo nivel socioeconómico, menor nivel educativo, ser madre soltera y tener una pareja fumadora (Vashishtha, 2022).

El tabaquismo activo y pasivo afecta tanto al feto, al recién nacido, como a la madre. Las mujeres fumadoras tienen mayor riesgo de complicaciones obstétricas, ya que el tabaquismo materno durante el embarazo, es causa de RCIU, bajo peso al nacer, prematuridad, defectos de nacimiento, crecimiento y desarrollo fetal anormal, síndrome de muerte súbita del lactante, obesidad, hipertensión, asma, DM tipo 2 y aumento de la mortalidad perinatal (Vashishtha, 2022).

El alcoholismo es un problema de abuso de drogas que afecta del 1% al 2% de las mujeres en edad fértil. Su consumo excesivo antes del embarazo ya es desaconsejable, y durante la gestación debería evitarse absolutamente (Asprea et al., 2013). Tanto niveles moderados como altos de su consumo durante el embarazo temprano se asocian con muerte intrauterina, restricción en el crecimiento pre y postnatal, bajo peso al nacer, alteraciones del SNC y de la conducta (Asprea et al., 2013). Los niños nacidos de madres con alcoholismo crónico exhiben un patrón específico de defectos, llamados síndrome alcohólico fetal (SAF), que se detecta en 1 a 2 lactantes por cada 1000 nacidos vivos. El período susceptible de desarrollo del cerebro abarca la mayor parte de la gestación; por lo tanto, el consejo más seguro es la abstinencia total de alcohol durante el embarazo (Moore et al., 2016).

Un estudio realizado en Santa Fe, para caracterizar el consumo de alcohol de mujeres antes y durante la gestación, mostró que 75,2% había consumido al menos un trago (unidad estándar) de alcohol durante la gestación. Solo 30,6% de las mujeres manifestó haber hecho algún cambio en el consumo durante el último año; de dicho porcentaje que cambió su patrón de consumo, el 55,6% sólo lo disminuyó, y 41,8% dejó de beber. López et al., (2015), mostraron que las mujeres que mayormente consumían alcohol antes y durante la gestación, también informaban consumos elevados en sus parejas; fumaban y tenían actitudes más permisivas respecto al consumo de alcohol durante la gestación. Por este motivo, las campañas de educación son de extrema importancia, ya que no existe demasiada noción de este riesgo en la población (Asprea et al., 2013). A su vez, debería estar ajustado a las características del consumo en el contexto local, con intervenciones que incluyan a las parejas, y familiares, y se focalicen en las mujeres más jóvenes y tabaquistas (López et al., 2015).

En cuanto a los medicamentos, el fármaco teratógeno más famoso es la talidomida. Esta fue sintetizada y comercializada en Alemania en la década de 1950, para el tratamiento sintomático de náuseas y vómitos durante la gestación. No obstante, en la década siguiente, se descubrieron y denunciaron AC en recién nacidos cuyas madres habían sido tratadas con dicha medicación durante el embarazo. A través de los años, se detectaron no sólo aumentos de casos de AC, con 40% de mortalidad en el primer año de vida, sino que las malformaciones se asociaban tanto a la afectación de las extremidades, como a alteraciones cardíacas, renales, digestivas oftálmicas y auditivas (Papaseit et al., 2013). Actualmente está indicada para el tratamiento del mieloma múltiple, combinada con otros medicamentos en personas mayores de 65 años o más, que no puedan recibir tratamiento quimioterápico a dosis altas (Agencia Europea de Medicamentos, 2020). Los derivados del ácido retinoico, utilizados en el tratamiento del acné, pueden producir una amplia gama de defectos en su descendencia, que incluyen

una variedad de anomalías esqueléticas faciales y cardíacas. Anticonvulsivos, como el ácido valproico, cuando se toman durante el embarazo, pueden causar defectos asociados al cierre del tubo neural, como espina bífida (Ibrahim et al., 2022). Los andrógenos y progestágenos pueden afectar al feto femenino y producir masculinización de los genitales externos. En el caso de la progestina, durante el período crítico del desarrollo también se asocia con una mayor prevalencia de defectos cardiovasculares, y la exposición de los fetos masculinos durante este período puede duplicar la incidencia de hipospadias (Moore et al., 2016).

7.1.1.2 Factores de riesgo ambientales

7.1.1.2.1 Exposición a xenobióticos ambientales

La exposición humana a los pesticidas puede ocurrir ambientalmente, a través del consumo de sus residuos en los alimentos y el agua, así como ocupacionalmente (Kalliora et al., 2018). Muchos de ellos actúan como disruptores endócrinos, tóxicos para el neurodesarrollo, el sistema inmune, y carcinógenos en animales y humanos (Blair et al., 2015).

El sistema nervioso es particularmente susceptible a muchos pesticidas de varias clases químicas distintas. Diferentes estudios muestran que, la exposición prenatal (Engel et al., 2011), en la primera infancia (Muñoz-Quezada et al., 2013) y adolescencia (van den Dries et al., 2020), a organofosforados (OF) en particular y a otros plaguicidas en general, está asociada con efectos en el desarrollo neurológico, muerte fetal, cánceres infantiles, RCIU, parto prematuro y defectos del nacimiento (Weselak et al., 2006). Aunque la mayoría de las AC no pueden vincularse a una causa específica, se ha sugerido que la exposición prenatal en interiores a plaguicidas (OF, dicarboximidas, triazinas, entre otros), aumenta el riesgo de teratogenicidad (Stillerman et al., 2008) debido a la alta susceptibilidad de la mayoría de los sistemas fetales durante ciertos períodos de desarrollo (Selevan et al., 2000).

Otros estudios epidemiológicos y experimentales, han mostrado evidencia de modificaciones genéticas, epigenéticas y enfermedades crónicas, por la exposición a plaguicidas (Mostafalou & Abdollahi, 2013), como se puede observar en la Figura 2.

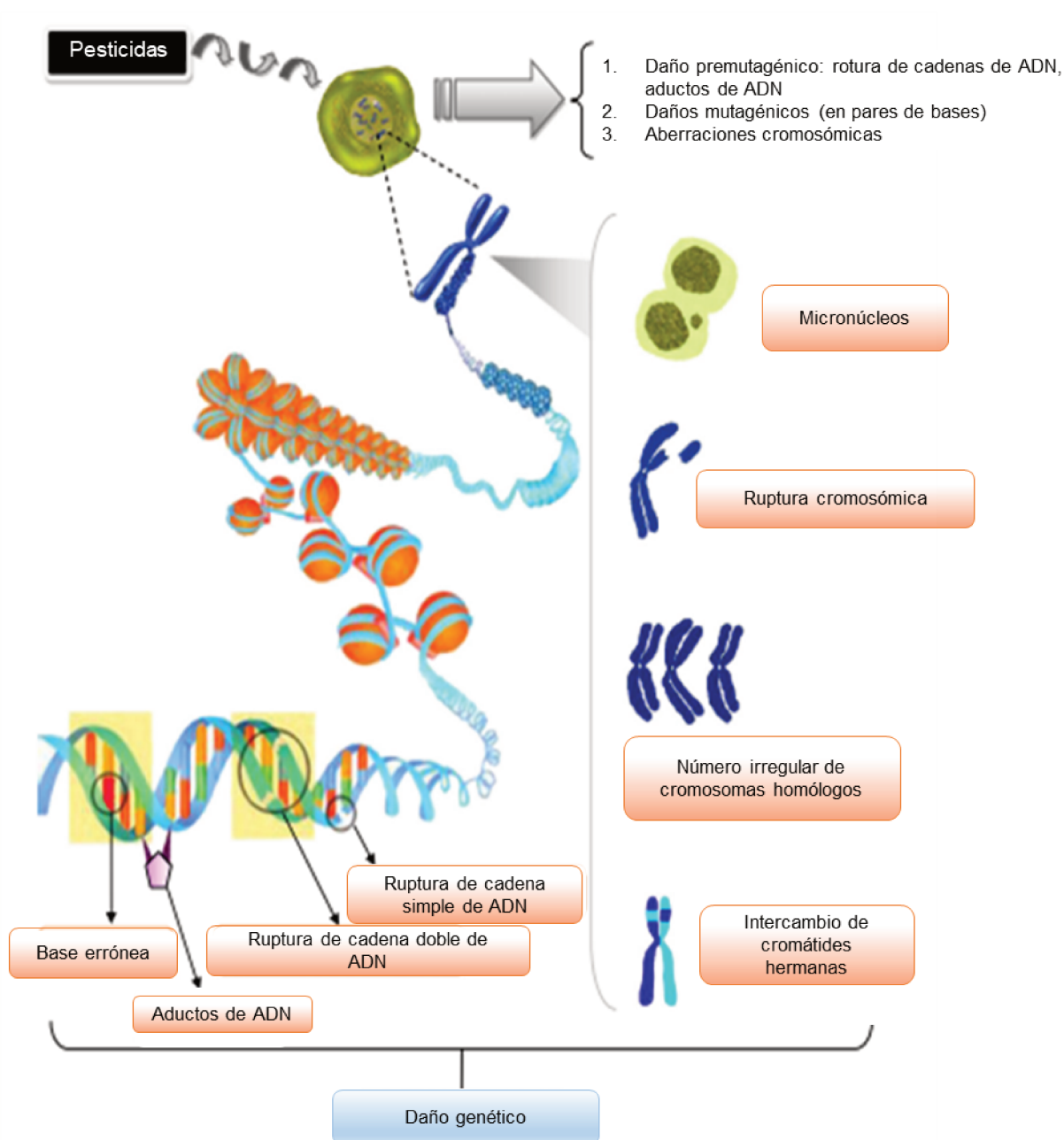


Figura 2. Modelo esquemático para la inducción de daños genéticos que incluyen efectos premutagénicos, mutagénicos y cromosómicos por exposición a pesticidas. Adaptado de Mostafalou & Abdollahi, 2013.

El término “contaminantes emergentes”, se refiere principalmente a contaminantes para los cuales actualmente no existe una regulación que requiera monitoreo, o informes públicos, de su presencia en el suministro de agua, o aguas residuales (Morin-Crini et al., 2022). Dentro de los considerados CE se encuentra una larga lista de sustancias químicas que incluyen pesticidas, productos farmacéuticos, medicamentos, cosméticos, productos para el cuidado personal, surfactantes, productos de limpieza, formulaciones y productos químicos industriales, aditivos alimentarios, envases de alimentos,

metaloides, elementos de tierras raras, nanomateriales, microplásticos y patógenos (Morin-Crini et al, 2022), como se puede observar en la Figura 3.

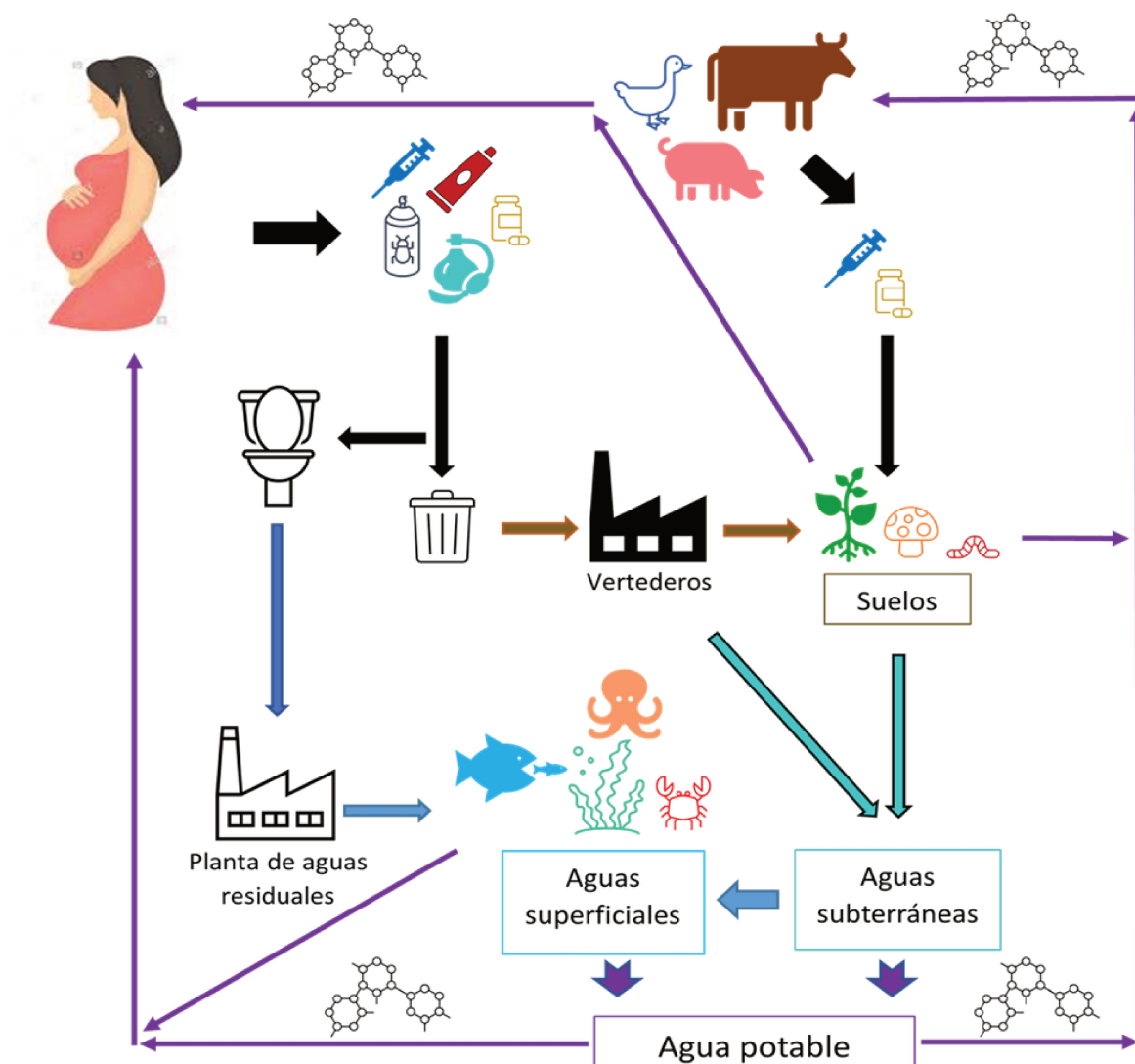


Figura 3. Representación de las rutas por las cuales los distintos CE llegan a los diversos ecosistemas. Adaptado de Rodríguez, 2021.

7.1.2 Estadísticas

Como problema global, se ha estimado que casi 8 millones de niños en todo el mundo nacen con un defecto de nacimiento grave, de origen genético, parcialmente genético, o de origen posterior a la concepción, incluida la exposición materna a agentes ambientales. Los defectos de nacimiento graves pueden ser letales. Para aquellos que sobreviven, estos trastornos pueden causar una discapacidad mental, física, auditiva o visual de por vida. Al menos 3,3 millones de niños menores de cinco años mueren a causa de defectos de nacimiento cada año, y se estima que 3,2 millones de los que sobreviven, pueden quedar discapacitados de por vida (Christianson et al., 2008).

A nivel mundial, los registros reportan 2-4% de los nacimientos con AC, dependiendo de los criterios de inclusión y de los métodos de comprobación. Los defectos genéticos o parcialmente genéticos (trisomías, talasemias, déficit de enzimas, etc.), representarían más del 25% de todos los casos de AC, las anomalías de miembros, una en cinco, del sistema urinario aproximadamente el 15, y hendiduras orales 7% (Christianson et al., 2008).

Según los últimos datos de la Vigilancia Europea de Anomalías Congénitas (EUROCAT), la prevalencia de AC (excluyendo las genéticas) en 2019, fue de 198,12 por cada 10.000 nacimientos (EUROCAT, 2022).

Estudios en diferentes partes del mundo, dan cuenta de la posible relación entre diversas AC, y la exposición de sus madres a factores ambientales (EUROCAT Central, 2004; Stillerman et al., 2008; Yang et al., 2012).

Estos defectos son un problema mundial, pero su impacto es particularmente severo en los países de medianos y bajos ingresos. La proporción y número absoluto de AC, son mucho más altos en dichos países que en aquellos de altos ingresos, debido a las marcadas diferencias en la salud materna, y otros factores de riesgo significativos, incluida la pobreza (Pawluk et al., 2014). En dichos países ocurren más del 94% de los nacimientos con defectos congénitos graves y el 95% de las muertes de estos niños (Christianson et al., 2008).

En Latinoamérica, en un estudio epidemiológico desarrollado por Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) de Chile, se observó que la tasa de defectos del tubo neural (DTN) entre 1969 y 1999, fue de 17,03 por 10.000, significativamente superior al resto de la ECLAMC (14,88 por 10.000). La prevalencia de dichas anomalías tenía una tendencia estadísticamente significativa a aumentar en el período estudiado, y era mayor entre los mortinatos, los recién nacidos con peso al nacer inferior a 1500 g, y los hijos de madres menores de 19 años (Nazer et al., 2001).

Respecto a la prevalencia de AC en recién nacidos, asociadas a la exposición prenatal a pesticidas, se halló una prevalencia del 41,24% en un período de 2 años en Chile (Rojas et al., 2000), y en Brasil se encontró asociación entre el uso de pesticidas y prematuridad, bajo peso y AC al nacer en 2001 (De Siqueira et al., 2010).

En Colombia, entre 2004 y 2008, se atendieron 32.995 nacimientos, de los cuales 735 presentaron al menos un defecto congénito, para una prevalencia de 2,22 por 10.000 nacimientos. Las prevalencias de AC relacionados con factores ambientales como hidrocefalia, defectos por reducción de extremidades, pie equinovaro, hidronefrosis, gastrosquisis, ciclopía y sirenomelia presentaron prevalencias más altas en comparación con lo reportado en la literatura (Pachajoa et al., 2011).

En las últimas décadas, en Argentina, las AC fueron aumentando su importancia relativa como causa de defunciones infantiles: en 1980, representaban el 11% de las muertes en menores de 1 año, mientras que, en 2014, el 28%. En función de esto, en el año 2009 se creó el Registro Nacional de Anomalías Congénitas, conformada como red a partir de 2014. Esta red fue fundada con el fin de contribuir a la prevención y vigilancia de las AC, ya que es la causa de mortalidad infantil que menos se redujo en los últimos años, respecto a otras patologías como las respiratorias, infecciosas y parasitarias (Barbero et al., 2020). La RENAC examina unos 270.000 nacimientos anuales en los cuales detecta aproximadamente 4.500 recién nacidos con AC, lo que representa una prevalencia al nacimiento de aproximadamente 1,6%. A partir de estas cifras se estiman unos 11.000 casos por año en Argentina. La RENAC funciona en más de 160 maternidades del país, donde los referentes (neonatólogos, pediatras, enfermeras), detectan los recién nacidos y fetos muertos con AC (Barbero et al., 2020).

Según la información básica de las estadísticas vitales de Argentina, en el año 2020 hubo 533.299 nacimientos y 4.505 defunciones infantiles, que representan una tasa de mortalidad infantil (TMI) de 8,4 por 1000 nacidos vivos. Las 5 primeras causas de mortalidad infantil (MI), fueron las afecciones perinatales (2.439 defunciones; 48,7%), las AC (1.430 defunciones; 28,5%), los accidentes (208 defunciones; 4,2%), los tumores malignos (92 defunciones; 1,8%) y las neumonitis (78 defunciones; 1,6%) (Guevel et al., 2020). Las AC siguen siendo la 2^{da} causa de MI y, como se sabe, también impactan drásticamente en la morbilidad (Barbero et al., 2020).

Particularmente en Santa Fe, hasta diciembre de 2019, había diez hospitales públicos incorporados a la red, a través de los profesionales de la salud que registran los datos epidemiológicos sobre estos nacimientos (Barbero et al., 2020).

Por su parte, la provincia de Santa Fe ha creado el Sistema de Centros de Atención Primaria (SICAP) y la Sala de Situación Provincial (SaSiPro). En el primer caso, el sistema permite la automatización de diversos procesos administrativos y asistenciales llevados a cabo en los Centros de Atención Primaria de la Salud, mientras que, en el segundo, se trata de un espacio de integración de datos estadísticos, epidemiológicos, de producción de servicios y de recursos para la toma de decisiones, que proceden de distintas fuentes (Gobierno de Santa Fe, 2012).

7.2 Salud pública y ambiental

La investigación sobre la interacción entre las sustancias químicas ambientales y el desarrollo del niño es un área nueva de la salud pública (Tellerias & Paris E., 2008), ya que existe una creciente preocupación sobre la posible teratogenicidad de dichos compuestos (Moore et al., 2016). Ante sutiles cambios en las concentraciones de

hormonas, o la presencia de agentes tóxicos externos, también llamados xenobióticos, pueden producirse profundos y permanentes cambios, en el desarrollo del sistema nervioso, y llevar al deterioro, entre otros, del rendimiento mental y a alteraciones en el sistema reproductor (Tellerias & Paris E., 2008).

Estas situaciones deberían incorporar acciones específicas en la atención preconcepcional, como en la prenatal. Para prevenir AC, no solo se debe reducir la exposición a potenciales teratógenos, sino, además, favorecer el consumo de ácido fólico durante todo el período periconcepcional. Dicho período (de 5 a 6 meses), en las mujeres abarca desde el crecimiento del ovocito, la fertilización, la formación del embrión, y el desarrollo hasta la semana 10 de gestación (Steeegers-Theunissen et al., 2013). Respecto al consumo de ácido fólico, actualmente se recomienda que todas las mujeres en edad reproductiva aumenten su ingesta de folato, a por lo menos 400 mg diarios (Refsum, 2001). En éste sentido, en 2002 Argentina sancionó la ley 25.630, estableciendo normas *“para la prevención de las anemias y las malformaciones del tubo neural, a través del enriquecimiento de la harina de trigo destinada al consumo en el mercado nacional, con hierro, ácido fólico, tiamina, riboflavina y niacina”*, en las proporciones especificadas explícitamente (Honorable Congreso de la Nación Argentina, 2002).

Es precisamente en la atención primaria de la salud (APS) donde se debe promover la salud de la mujer y de su descendencia, a través de la consulta preconcepcional. Una de las acciones promotoras de salud más importantes de dicha asistencia es la prevención de defectos congénitos, a través de la suplementación periconcepcional con folatos (Dolk & Vrijheid, 2003; Ferrer et al., 2005).

7.3 Vigilancia sanitaria de AC

La vigilancia de la salud pública es la recopilación, el análisis y la interpretación continua de datos esenciales para la planificación, implementación y evaluación de las intervenciones en salud pública. La recopilación sistemática de datos sobre los nacimientos y la prevalencia de defectos congénitos en la población, es esencial para iniciar y desarrollar servicios de atención y prevención a nivel local, regional y nacional. Los datos sobre antecedentes de mortalidad y discapacidad debido a tales AC, dependen del monitoreo y la vigilancia continua de los diferentes tipos, la prevalencia, la gravedad y el resultado de los defectos congénitos. Esto también puede proporcionar un sistema de vigilancia epidemiológica, alertando a los observadores sobre las fluctuaciones geográficas y temporales en las frecuencias de diferentes defectos congénitos, que pueden arrojar luz sobre la posible causalidad de los mismos. Además, son necesarios para auditar la eficacia de las intervenciones de salud pública, y

proporcionar información sobre cómo estas intervenciones podría mejorarse (WHO, 2000).

En la provincia de Santa Fe se incorporó un módulo para la vigilancia de exposición/intoxicación aguda por plaguicidas (Gobierno de Santa Fe, 2012). Si bien existen datos epidemiológicos que surgieron de estos registros entre los años 2013 y 2015, que resumen los datos de mortalidad por cáncer, no se registran hasta la actualidad informes sobre la morbilidad en los menores de edad (Torres, 2017).

7.4 Biomonitoreos humanos

Comprender los riesgos para la salud humana, a la luz de las interacciones entre el genoma humano y el medio ambiente, es uno de los desafíos más apremiantes en la salud pública ambiental. Con la secuenciación del genoma humano ha surgido un renovado interés por comprender el papel del medio ambiente como causa de las enfermedades humanas (Olden & Guthrie, 2001).

El biomonitoreo humano tiene una gran utilidad al proporcionar un medio eficiente y rentable de medir la exposición humana a sustancias peligrosas, estableciendo evidencia de qué tanto, la exposición como la absorción han tenido lugar (Angerer et al., 2007). Este enfoque considera todas las rutas de captación y todas las fuentes que son relevantes, lo que lo convierte en un instrumento ideal para la evaluación y gestión de riesgos. Puede identificar nuevas exposiciones químicas, tendencias y cambios en la exposición, establecer la distribución de la exposición entre la población general, identificar grupos vulnerables, y poblaciones con mayor exposición, e identificar riesgos ambientales en sitios contaminados específicos con un costo relativamente bajo (Angerer et al., 2007).

Actualmente, la población sufre los efectos mutagénicos y cancerígenos de muchos agentes genotóxicos, en la vida cotidiana y en los entornos laborales, debido a cambios en los estilos de vida e innovaciones como medicamentos, aditivos alimentarios, pesticidas y nanomateriales (Ataseven et al., 2016). La contaminación antropogénica se ha vuelto inherente al medio ambiente moderno. Los productos químicos y contaminantes ambientales son ubicuos, y se encuentran en el agua, el aire, los alimentos y el suelo (Choi et al., 2015).

7.5 Biomarcadores

El Comité de Marcadores Biológicos de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos definió a los biomarcadores como una alteración en los componentes, procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicas que se pueden medir en un sistema biológico o muestra (Goldstein et al., 1987). Un biomarcador puede ser

cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda monitorearse en tejidos o fluidos, y que prediga o influya en la salud, o evalúe la incidencia o el comportamiento biológico de una enfermedad (Ladeira & Viegas, 2016).

La clasificación tradicional generalmente aceptada de biomarcadores los divide según su importancia toxicológica en tres categorías principales: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad (Manno et al., 2010).

7.5.1 De exposición

Un biomarcador de exposición se define como “una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula, o célula diana, que se mide en un compartimento dentro de un organismo” (Manno et al., 2010). Los biomarcadores, ya sea de compuestos originales o de sus metabolitos, presentan un perfil de concentración variable en el tiempo que se asocia con patrones temporales de exposición y cinética de eliminación (Ladeira & Viegas, 2016). Estos biomarcadores pueden incluir plaguicidas, sus metabolitos, y moléculas -o células modificadas- (por ejemplo, aductos de ADN y proteínas) en tejidos, líquidos biológicos o excretas (Manno et al., 2010; Boyd Barr & Buckley, 2011)

Los xenobióticos, ingresan principalmente al cuerpo humano a través de la exposición dérmica, oral e inhalatoria (Kim et al., 2017), aunque también pueden hacerlo por vía transplacentaria. Estos pueden acumularse en los tejidos, y su biotransformación ocurre principalmente a través de reacciones de oxidación e hidrólisis, y de la actividad de enzimas como las transferasas (Casarett & Doull, 2001).

La bioacumulación implica la acumulación de estas sustancias químicas tóxicas, como resultado de la absorción continua en el cuerpo, y a una velocidad a la que el cuerpo no puede metabolizarlas ni excretarlas (Kim et al., 2017). Este proceso se ha relacionado con defectos de nacimiento, tumores, cambios genéticos, infertilidad, e incluso coma o muerte (Boyd Barr et al., 2007; Suratman et al., 2015; He et al., 2022; Rebuzzini et al., 2022).

Es conocido que las concentraciones de insecticidas OC en medios biológicos, son dependientes de la edad, ya que estos compuestos se caracterizan por ser persistentes y bioacumulables (Lucero et al., 2008). Esto puede intensificarse por el continuo uso de pesticidas que no se descomponen en partes constituyentes más seguras, sino que permanecen intactos durante períodos de tiempo prolongados. Por ser compuestos lipofílicos, su bioacumulación se produce principalmente en tejido adiposo, por lo que, eventos en los que estos tejidos se movilizan, como el embarazo o la lactancia, generan una nueva biodisponibilidad, con el riesgo de la exposición prenatal y postnatal, respectivamente (Casarett & Doull, 2001).

7.5.1.2 Xenobióticos en matrices biológicas y sus efectos

La exposición a plaguicidas resulta en su permanencia y/o la de sus metabolitos en el organismo (Stenersen 2004). Los efectos son más dañinos según el nivel de toxicidad de la sustancia química, la duración y la magnitud de la exposición (Gilden et al., 2010).

Varios estudios demostraron la presencia de plaguicidas en matrices biológicas humanas, como sangre, orina, leche materna, semen, tejido adiposo, líquido amniótico, cabello, uñas y meconio (Zumbado et al., 2004; Muñoz-de-Toro et al., 2006; Cassoulet et al., 2019; Cano-Sancho et al., 2020; Peng et al., 2020; Agus et al., 2022; Giulioni et al., 2022; Henríquez-Hernández et al., 2022). Así mismo, también fueron hallados en Argentina en diversas matrices ambientales, como agua de lluvia, agua subterránea, y sedimentos (Alonso et al., 2018; Regaldo et al., 2018).

En lo que se refiere a estudios de biomonitorio en humanos en los Estados Unidos, indican que la mayoría de las personas tienen niveles detectables de DDT en sus cuerpos a pesar de que se prohibió su uso en 1972 (Gilden et al., 2010). Específicamente en muestras sanguíneas, se han detectado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y alguno de sus metabolitos (p,p'-DDE, p,p'-DDT), γ -HCH, β -HCH, β -endosulfan, y endrin aldehído en residentes de México, donde se había utilizado DDT para el control de vectores (Ruiz-Suárez et al., 2014). Dechiara et al., (2020) hallaron mezclas de plaguicidas y sus metabolitos (como p,p'-DDD, λ cihalotrina, cipermetrina y azoxistrobin) en habitantes de tres localidades de Santa Fe. También se informó de pesticidas OC y bifenilos policlorados en la leche materna humana de poblaciones en China (Kunisue et al., 2004; Lu et al., 2015), Alemania (Zietz et al., 2008), Francia (Cano-Sancho et al., 2020), Turquía (Agus et al., 2022), y Argentina (Økland et al., 2017).

Respecto a matrices ambientales, se encontraron residuos de ATZ en muestras de agua de lluvia, glifosato y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA) en muestras de suelo (Dechiara et al., 2020).

Los plaguicidas OC y OF han sido reportados como neurotóxicos del desarrollo, trastornos persistentes del desarrollo, malformación y formación de micronúcleos, y toxicidad materna que se dirigen específicamente al cerebro inmaduro que conduce a una variedad de cánceres infantiles y toxicidad hepática y renal (Kapeleka et al., 2019).

La separación, identificación y cuantificación de pesticidas y bifenilos policlorados (PCB), y sus metabolitos en muestras biológicas se realizan más comúnmente mediante cromatografía de gases con detección de micro captura de electrones (GC- μ ECD) (Fernández et al., 2022), y cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS-EI) (Cao et al., 2012).

La cromatografía de gases (GC), es una técnica de separación que se fundamenta en una distribución “asimétrica” de los analitos de una mezcla entre dos fases; una móvil (FM), -gaseosa-, y la otra estacionaria (FE) -sólida o líquida-. La elución de los componentes de la columna GC depende tanto de la naturaleza química del analito, como del tipo de ambas fases, pero principalmente, de la afinidad que tenga el analito por las moléculas de la FE. Cuando se utilizan FE sólidas, la separación de los analitos está relacionada con el fenómeno de la adsorción. En los detectores GC de ionización - como con captura de electrones (ECD)-, la señal se mide por captura de electrones “fríos”, y son sensibles al cambio de concentración del analito. Debido a que los volúmenes de los detectores GC son mayores que los de las columnas capilares unidas a éstos, el volumen muerto formado, puede generar el ensanchamiento de los picos cromatográficos, y así afectar su resolución. Esta diferencia de volúmenes se compensa con un gas auxiliar (make-up), generalmente nitrógeno, cuyo flujo es de 20-40 mL/min, según el tipo de detector. Los flujos altos de dicho gas, conducen a los picos cromatográficos más simétricos y delgados, pero comprometen la sensibilidad. Por ello, la tendencia en la instrumentación GC moderna es reducir el volumen del detector; existiendo hoy en día las versiones micro de varios detectores, por ejemplo, μ -ECD (Stashenko & Martínez, 2010).

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) es una técnica analítica que combina el poder de separación de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) con la gran selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa. Los componentes de la muestra separados en el HPLC pasan al espectrómetro de masas a través de una interfaz donde son ionizados. Los equipos de LC-MS pueden tener dos tipos distintos de interfases, que se incluyen dentro de la denominada ionización a presión atmosférica (API), llamada electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), ambas son compatibles con la mayoría de los solventes volátiles utilizados como fase móvil en HPLC. Los iones generados en la interfase son acelerados hacia un analizador, y separados en función de su relación masa/carga (m/z), mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas, y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados (Mezcua et al., 2006).

7.5.2 De efecto

Un biomarcador de efecto es una alteración bioquímica, estructural, funcional, conductual o de cualquier otro tipo medible en un organismo que, según su magnitud, puede estar asociada con un deterioro de la salud, o una enfermedad establecida o potencial (Manno et al., 2010). Ofrece la oportunidad de confirmar una vía propuesta de exposición-enfermedad en poblaciones humanas, ya que pueden ser el resultado de la interacción del sistema biológico con el medio ambiente (Ladeira & Viegas, 2016).

La creciente demanda de información sobre los riesgos para la salud, derivados de la exposición a mezclas complejas, exige la identificación de biomarcadores para evaluar, entre otros, los efectos genotóxicos asociados a la exposición ocupacional y ambiental, a sustancias químicas y otras posibles fuentes de daño (Ladeira & Smajdova, 2017). Considerando esto, es importante destacar que el seguimiento del efecto genotóxico en las distintas poblaciones es una herramienta útil en biomonitoreos humanos y de gran importancia biológica para estimar el riesgo de la exposición a mezclas complejas de sustancias químicas.

7.5.2.1 Biomarcadores de Genotoxicidad

Un grupo importante de biomarcadores de efecto son los biomarcadores de genotoxicidad, que se han desarrollado *in vitro* (células y líneas celulares), *in vivo* (animales) y *ex vivo* (células de seres humanos).

Actualmente, se aplican cada vez más a poblaciones tanto expuestas ocupacionalmente, como no expuestas; urbanas y rurales, niños y adultos, y binomios madre-hijo, entre otras (Rudzi et al., 2022), ya que la integridad genética de la población humana se encuentra comprometida; por lo que es importante determinar qué se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético, y realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria en poblaciones de riesgo (Zalacain et al., 2005).

Los biomarcadores de genotoxicidad permiten detectar efectos tempranos que resultan de la interacción entre el individuo y el ambiente; son por lo tanto, herramientas importantes en la epidemiología y se utilizan ampliamente en estudios de biomonitoreo humano (Ladeira & Smajdova, 2017).

Los biomarcadores citogenéticos (como MN, aberraciones cromosómicas, y la reparación del ADN medida por el ensayo del cometa), son los criterios de valoración más utilizados en los estudios de biomonitorización humana, y se utilizan ampliamente para evaluar el impacto de los factores ambientales, ocupacionales y de otro tipo en la (in)estabilidad genética (Battershill et al., 2008).

Las matrices biológicas más utilizadas para el estudio de efectos genotóxicos en biomonitorio humano son linfocitos sanguíneos y células exfoliadas, siendo ambos fáciles de muestrear. Los linfocitos circulan por todo el cuerpo, tienen una vida útil razonablemente larga y, por lo tanto, pueden dañarse en cualquier tejido objetivo específico por una sustancia tóxica (Cavallo et al., 2009). Por ello, los MN en los linfocitos proporcionan un enfoque prometedor para evaluar los riesgos para la salud (Knudsen & Hansen, 2007).

7.5.2.1.1 Ensayo cometa

Durante los últimos 30 años, el ensayo del cometa (EC) ha demostrado su utilidad y versatilidad en el biomonitorio humano, la ecotoxicología, las pruebas de genotoxicidad y la investigación básica sobre los mecanismos de daño y reparación del ADN (Collins, 2015).

Es un método simple para medir roturas de cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) en células eucariotas, que fue rápidamente adoptado para su utilización en pruebas de genotoxicidad, tanto *in vivo* como *in vitro*. En el primer caso, tiene la ventaja de que se puede aplicar a prácticamente cualquier tejido que se pueda desagregar en células individuales (Collins et al., 2014).

El fundamento de la técnica se basa en que las células se incrustan en una capa delgada de agarosa en un portaobjetos, y luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas se retiran, dejando el ADN superenrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina del ADN y posterior electroforesis a $\text{pH} > 13$, causa el desenrollamiento de los bucles y les permiten a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza generalmente por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se parecen a cometas, y el contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las roturas (Collins, 2004), como se puede observar en la Figura 4.

Los cometas de células expuestas a agentes que dañan el ADN, a menudo muestran una migración de ADN desde células con poca migración (pequeñas colas), hasta células con casi todo el ADN en la cola. Estos últimos se suelen denominar "nubes" o "erizos". Si bien en el pasado se suponía que tales cometas representaban células muertas (apoptóticas/necróticas), ahora está claro que simplemente representan células con niveles relativamente altos de daño pero aun potencialmente reparables y consistentes con la viabilidad (Lorenzo et al., 2013).

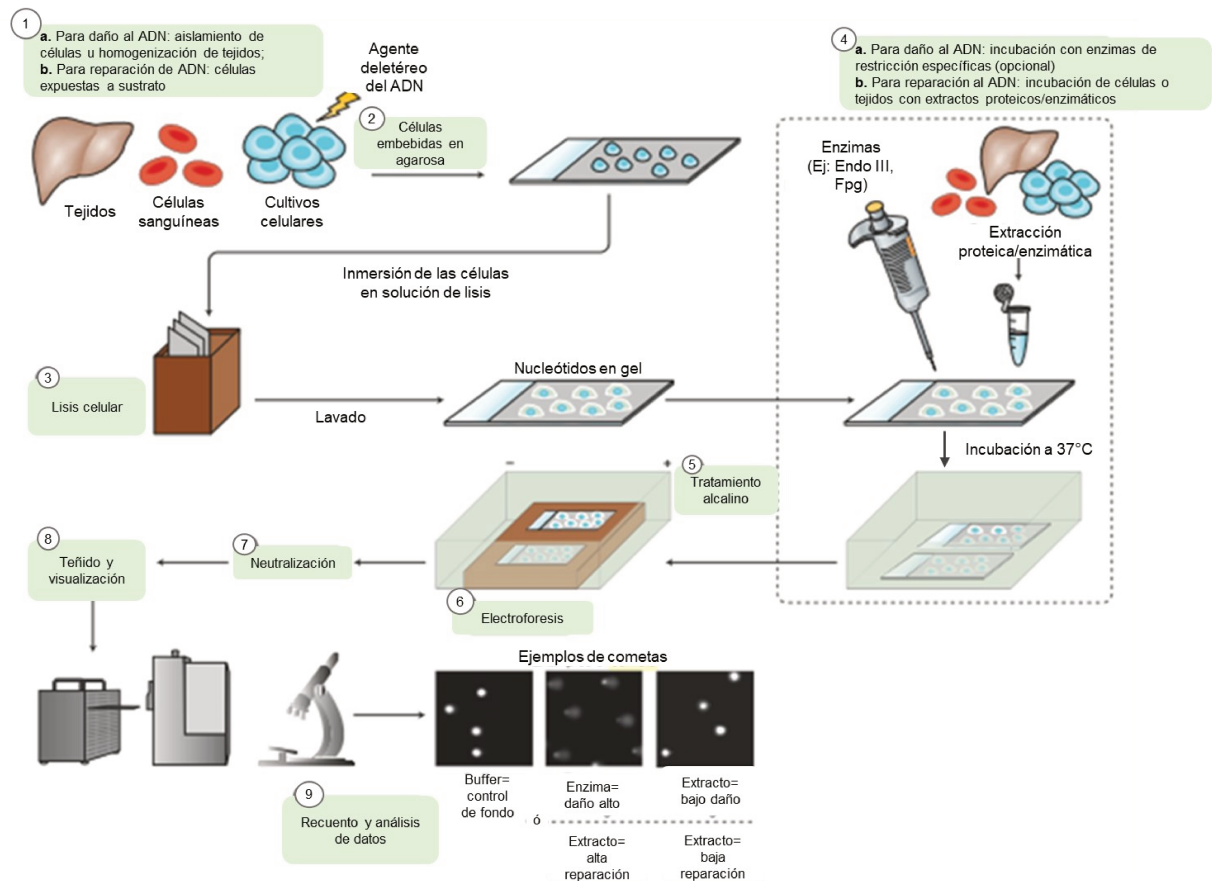


Figura 4. Esquema del protocolo del Ensayo Cometa. Adaptado de Møller et al., 2020.

Posteriormente, se introdujo un paso adicional en el ensayo, para permitir detección de bases purínicas o pirimidínicas dañadas. Para ello, después de la lisis, los nucleoides se incuban con una endonucleasa específica que convierte las lesiones de base en roturas. La enzima Endonucleasa III (Endo III), detecta las pirimidinas oxidadas, y la Formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG) permite la estimación de purinas oxidadas (principalmente 8-oxoguanina) en células humanas, lo que ha sido particularmente útil en estudios de biomonitorio, como se puede observar en la Figura 5 (Dusinska & Collins, 2008). Particularmente, el EC modificado con el agregado de distintas enzimas, en linfocitos de sangre periférica, orina y tejidos, es una metodología que se utiliza cada vez más, como marcador del daño oxidativo del ADN (Ersson, 2011).

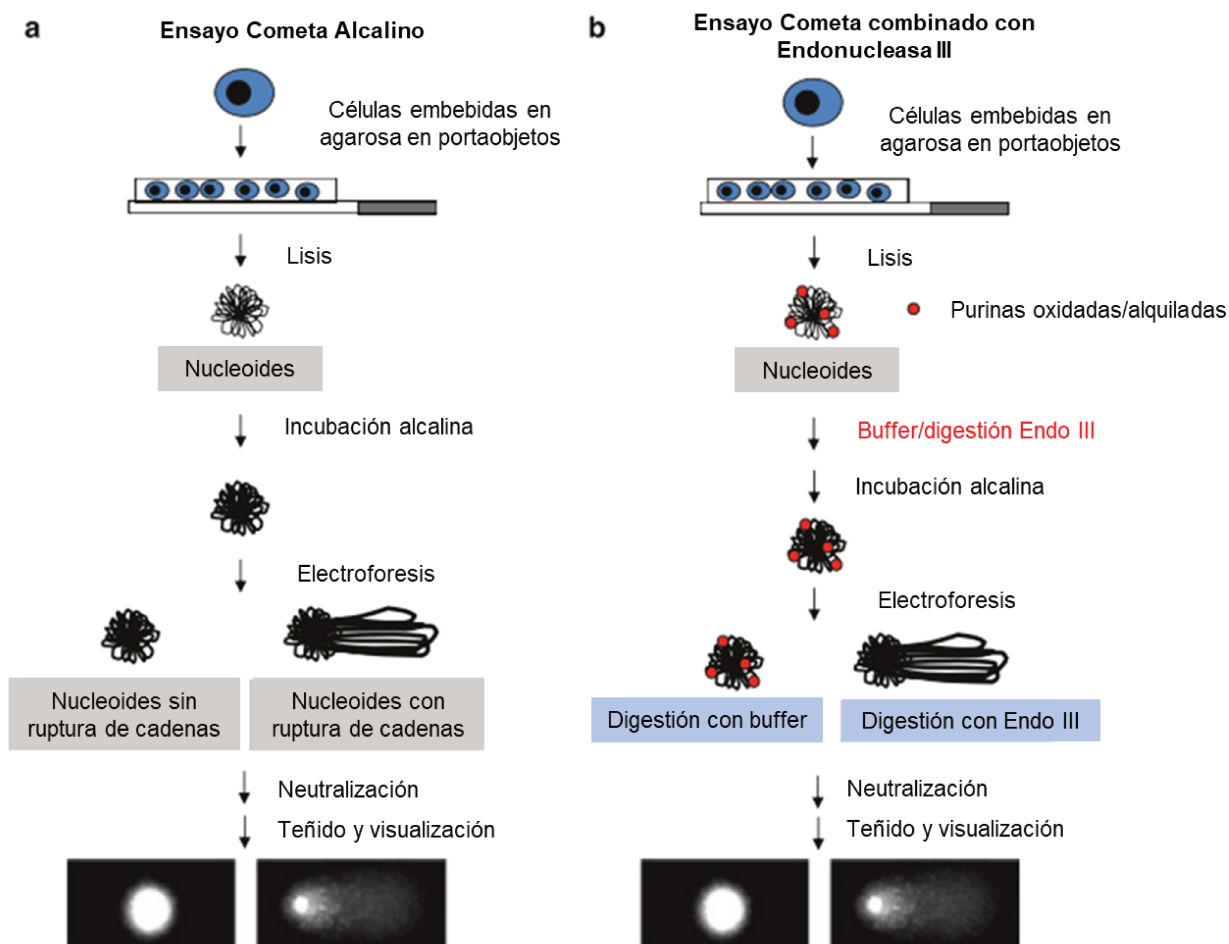


Figura 5: Esquemas del (a) ensayo cometa estándar y (b) ensayo cometa en combinación con Endonucleasa III. Adaptado de Azqueta & Collins, 2014).

La aplicación del EC en estudios humanos, y específicamente en exposición ocupacional a distintos xenobióticos, mostró un aumento en el daño al ADN en aquellas poblaciones expuestas a la contaminación aérea, a la radiación (como el accidente de Chernobyl), y a los plaguicidas (Valverde & Rojas, 2009). En ese mismo sentido, el EC permitió revelar que los plaguicidas OF y PIR, además de ser bloqueadores de neurotransmisores, también poseen potencial efecto genotóxico (Valverde & Rojas, 2009).

Otras aplicaciones del EC incluyen estudios de intervenciones nutricionales, donde la ingesta de frutas, verduras y suplementos vitamínicos estarían inversamente correlacionados con el daño oxidativo al ADN (Staruchova et al., 2008).

La utilidad del EC también se puso de manifiesto en estudios recientes sobre daño al ADN y cáncer, donde se demostró la asociación entre los altos niveles de daño al ADN con diferentes tipos de cáncer (de mama, de cervix, de esófago, Hodgkin, entre otros) (McKenna et al., 2008).

La importancia de su aplicación en el presente trabajo de tesis radica, entonces, no sólo en su ya comprobada utilización para estudios de biomonitoreos humano, sino también, y específicamente, en resultados de estudios previos en población objetivo similar, donde se compararon mujeres embarazadas expuestas a niveles variables de contaminación ambiental. Los resultados mostraron que el estrés oxidativo y los marcadores de daño en el ADN, fueron significativamente más altos en aquellas expuestas a niveles más altos de contaminantes (Nagiah et al., 2015), y además estuvieron correlacionados con embarazos pretérmino (Dwivedi et al., 2022).

Todo esto indica que la exposición a la polución ambiental durante el embarazo, aumenta la susceptibilidad de las madres al estrés oxidativo, lo que podría contribuir a la comprensión de la etiología de algunas patologías asociadas con dicha exposición. La integridad de la función mitocondrial y los sistemas antioxidantes endógenos, son imprescindibles para mantener los niveles celulares de ROS, que pueden elevarse en presencia de contaminantes (Nagiah et al., 2015).

Así como el ensayo de MN se utiliza para detectar precozmente efectos clastogénicos y aneugénicos, el EC estima el posible daño y daño oxidativo en el ADN (Vivien et al., 2013), evaluando citológicamente la inestabilidad cromosómica (Gundogan et al., 2018).

7.5.2.1.2 Ensayo Citoma

Los MN son material genético, de naturaleza nuclear, dispuestos como cuerpos citoplasmáticos, que no fueron incorporados correctamente a las células hijas durante la división celular. Reflejan aberraciones cromosómicas, y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN, y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Fenech, 2007). La formación de MN es un indicador alternativo del daño cromosómico. Esto surge de, ya sea fragmentos de cromosomas o de cromosomas completos perdidos, durante la división nuclear en la etapa de anafase (Kahl et al., 2018). La frecuencia de MN es una medida fiable tanto de la pérdida como de la rotura cromosómica (Zalacain et al., 2005).

Además, se ha observado que los MN aumentan con el envejecimiento, y se asocian transversal y prospectivamente con infertilidad, complicaciones del embarazo, defectos del desarrollo, obesidad, diabetes, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, una amplia gama de cánceres, deterioro cognitivo y trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Bonassi & Fenech, 2019). Así mismo, su frecuencia es modificable mediante una dieta adecuada, y una intervención en el estilo de vida, resultando así un biomarcador importante para monitorear la eficacia y

seguridad de las intervenciones destinadas a mejorar la salud a nivel genómico (Thomas et al., 2011).

Con el aumento de la demanda de un ensayo eficaz, que permita la detección de daños en el ADN, y que complemente la información obtenida por el método de MN, se utiliza el Test de MN con Bloqueo de Citocinesis (MNBC), también llamado Ensayo Citoma. El desarrollo de esta técnica, ha transformado el ensayo de MN en un método fiable y preciso para evaluar el daño cromosómico.

Un análisis sistemático reveló una serie de asociaciones positivas de frecuencias de MN, como marcador de aumento riesgo para la salud, en relación con la reproducción y la salud infantil en exposiciones neonatales, infantiles, maternas (Knudsen & Kirsch-Volders, 2021). Estos datos respaldan su utilización como un biomarcador relevante para la salud de los niños (Knudsen & Kirsch-Volders, 2021). Es un sistema integral que permite la evaluación del daño, la citostasis y la citotoxicidad del ADN (Fenech, 2006). Los eventos de daño en el ADN se puntúan específicamente en células binucleadas (BN) una vez divididas, e incluyen (a) micronúcleos (MN), un biomarcador de rotura de cromosomas y/o pérdida de cromosomas completos, (b) puentes nucleoplásmicos (NPB), un biomarcador de reparación incorrecta del ADN y/o fusiones de extremos teloméricos y (c) brotes nucleares (NBUD), un biomarcador de eliminación de ADN amplificado y/o complejos de reparación de ADN como pueden observarse en la Figura 6 (Kahl et al., 2018).

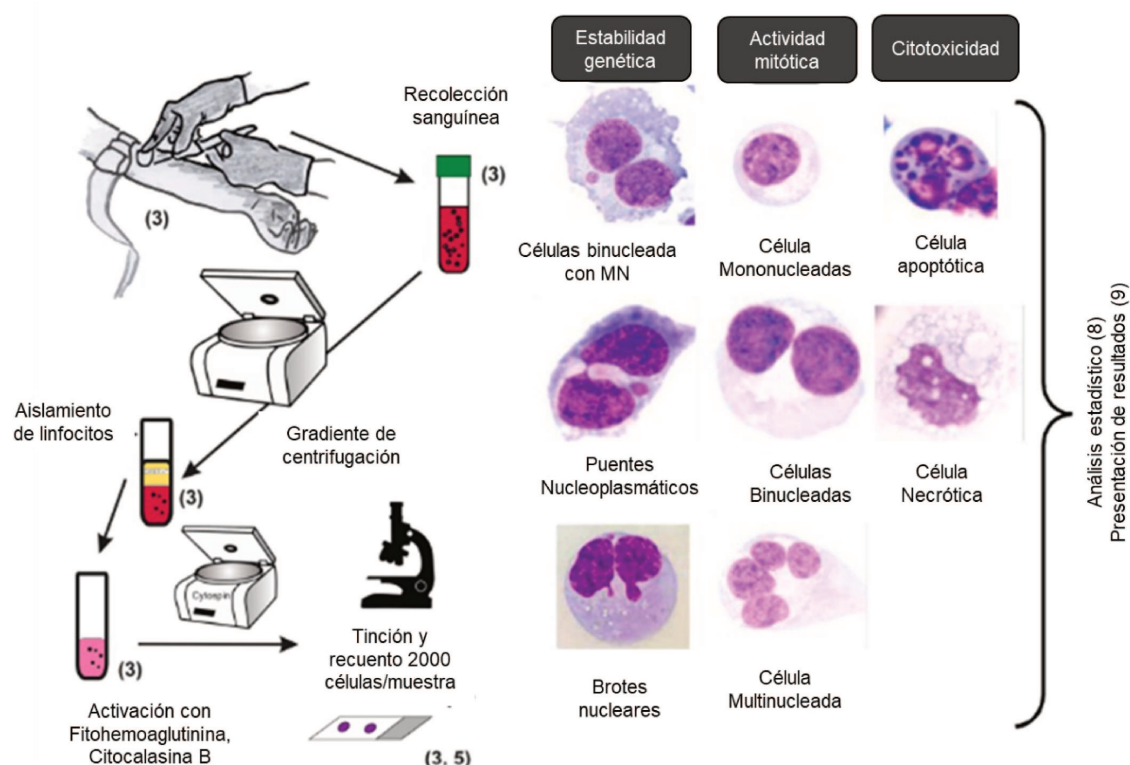


Figura 6: Esquema de los diferentes pasos de los experimentos de MN con linfocitos de sangre periférica. Adaptado de Nersesyan et al., 2022.

Los efectos citostáticos se miden a través de la proporción de células mono, bi y multinucleadas, y la citotoxicidad a través de las proporciones de células necróticas y/o apoptóticas (Fenech, 2007).

El ejemplo que se muestra en la Figura 7, es el de una exposición crónica *in vivo* a una genotoxina (durante varios días, semanas o meses) que permite suficiente tiempo para que las células dañadas de la médula ósea, el bazo y el timo ingresen al torrente sanguíneo. En este caso, el MN inducido en linfocitos en división *in vivo* será evidente en el ensayo de MNBC en células mononucleadas. Así mismo, detectará la conversión de lesiones de ADN *in vivo* en linfocitos de sangre periférica que conducen a aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en cultivo *ex vivo*, y se expresan como MN y otras anomalías nucleares (Fenech et al., 2016).

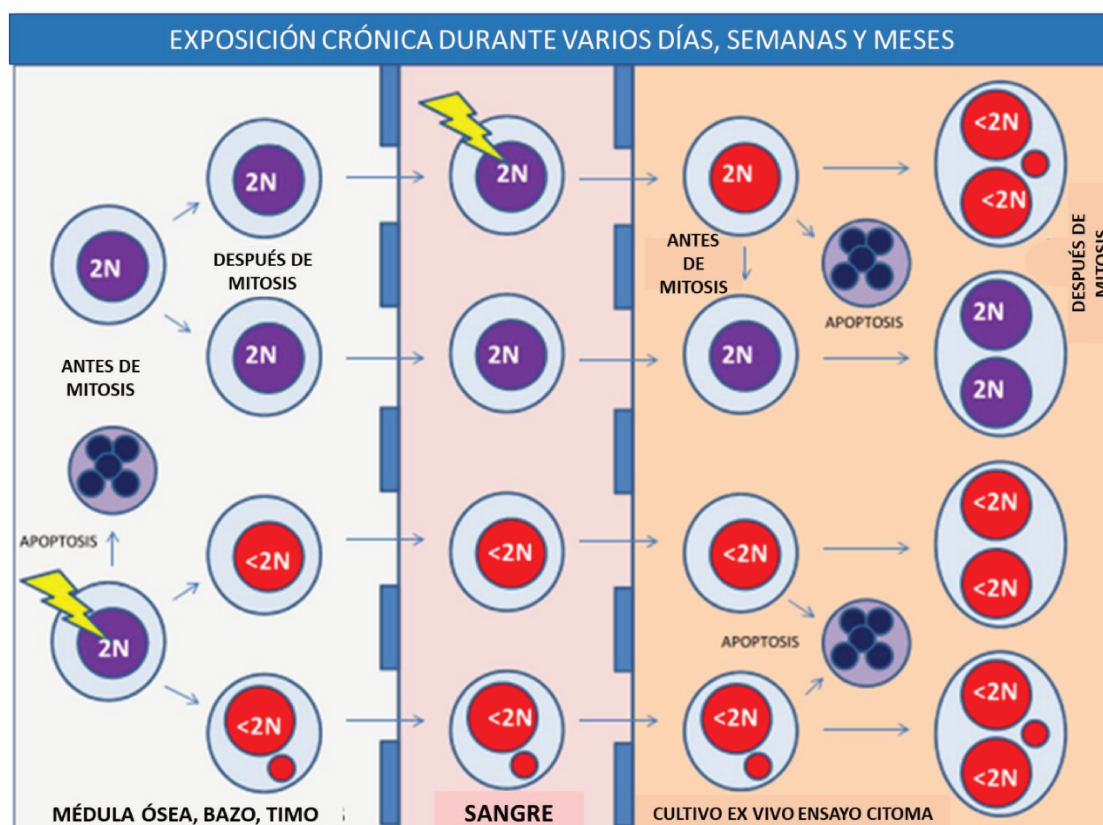


Figura 7: Cinética de formación de micronúcleos en linfocitos *in vivo* (en médula ósea, bazo o timo), su migración a sangre periférica y expresión *ex vivo* de daño en el ADN en el ensayo MNBC. Adaptado de Fenech et al., 2016.

En adultos, es bien conocido un aumento de MN relacionado con la edad, así como asociaciones con exposiciones ambientales, especialmente la contaminación del aire por el tráfico y el tabaquismo (Knudsen & Kirsch-Volders, 2021).

En consecuencia, el ensayo MNBC se utiliza para medir no solo la pérdida de cromosomas completos o sus roturas, sino también los eventos de reparación por escisión. Su versatilidad y simplicidad junto con los nuevos desarrollos en automatización, deberían garantizar su aplicación exitosa en el monitoreo de poblaciones expuestas, así como en la identificación de individuos sensibles a mutágenos dentro de una población (Fenech, 1993).

7.5.3 Marcadores bioquímicos

Las alteraciones en el metabolismo materno del folato y la homocisteína están asociados con los DTN, cardiopatías y al síndrome de Down, aunque su rol en el desarrollo de estos defectos no está completamente dilucidado (Ferrer et al., 2005; Zhao et al., 2006). La creciente evidencia apunta hacia una alteración de la actividad de la transmetilasa dependiente de S-adenosilmetionina (AdoMet), variación de la función de la metionina sintasa e hiperhomocisteinemia (Refsum, 2001).

Numerosos estudios han sugerido el posible papel de la mayor concentración de homocisteína en plasma materno, y la baja concentración de folato y cobalamina en el desarrollo de DTN, y ciertas cardiopatías (Refsum, 2001; Hobbs et al., 2005; Zhao et al., 2006; Yadav et al., 2021). El ácido fólico es un cofactor utilizado en la conversión esencial de homocisteína a metionina, como se indica en la Figura 8, y la evidencia indica que esta vía metabólica es crítica en el desarrollo de los DTN (Morgan-Ortiz et al., 2016).

La homocisteína (Hcy), se forma a partir de la metionina como producto de numerosas reacciones de transmetilación dependientes de AdoMet, como se puede observar en la Figura 8. Así formada, por trans-sulfuración se convierte irreversiblemente en cisteína. Alternativamente, se remetila a metionina, a través de la metionina sintasa, que utiliza la vitamina B12 como cofactor y el metiltetrahidrofolato (metil-THF) como sustrato. Esto explica la estrecha relación entre el folato, la vitamina B12 y la Hcy. Por ello, la deficiencia de cualquiera de las vitaminas conduce a un nivel elevado de Hcy total (tHcy), en plasma o suero (Refsum, 2001).

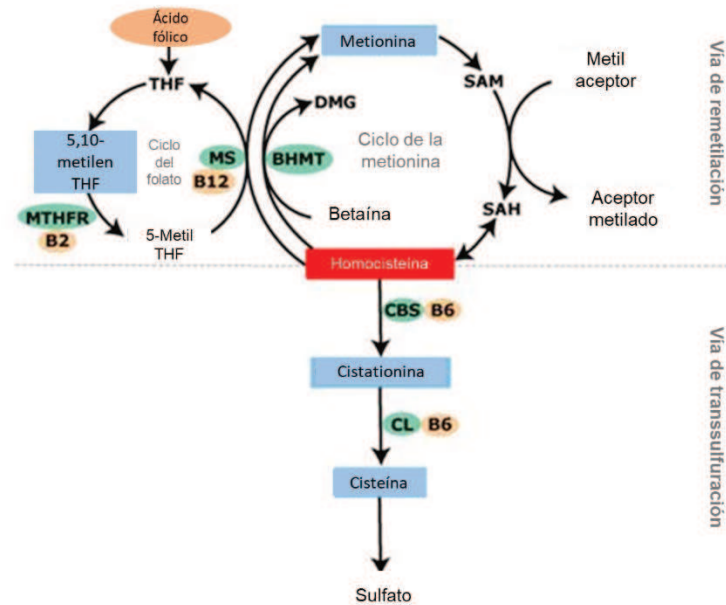


Figura 8. Metabolismo de la homocisteína y el ácido fólico. Referencias: MS: metionina sintasa, MTHFR: metilen tetrahidrofolato reductasa, CBS: cistationina-β-sintasa, CL: cistationina-γ-liasa, BHMT: Betaína-homocisteína-metiltransferasa, DMG: dimetilglicina, B2: riboflavina, THF: tetrahidrofolato, SAM: S-adenosil metionina, SAH: S-adenosil homocisteína. Adaptado de Ammouri et al., 2017.

Tradicionalmente, la ingesta de frutas y verduras se ha estimado utilizando cuestionarios de frecuencia de alimentos, y registros y recordatorios dietéticos. No obstante, debido a los errores asociados con este tipo de evaluación, dichos métodos han sido validados y complementados con la medición de biomarcadores, como los carotenoides y folatos plasmáticos, investigados ampliamente como biomarcadores potenciales de la ingesta de frutas y verduras (Brevik et al., 2005). De esta forma, los biomarcadores nutricionales se pueden utilizar para evaluar el consumo dietético, sin los errores comúnmente asociados a los datos autoinformados. Más específicamente, la concentración de ácido fólico en plasma puede ser un biomarcador útil para la ingesta de frutas y verduras (Brevik et al., 2005).

La metionina se requiere para la síntesis de proteínas y es el precursor de AdoMet, que se requiere en la síntesis de poliaminas, y en las numerosas reacciones de transmetilación. Respecto a las AC, es particularmente importante el papel de AdoMet en las reacciones de transmetilación, ya que se utiliza en la metilación de fosfolípidos, proteínas, ADN, ARN, aminoácidos, neurotransmisores y otras moléculas pequeñas. Además, la metilación de los ARN ribosómicos juega un papel importante en la función e integridad del ARNm, por lo que, una actividad de metilación alterada puede interferir con el crecimiento y desarrollo fetal normal de varias maneras diferentes (Refsum, 2001).

Por todo lo anteriormente descripto, se observa la necesidad de analizar la información de AC registrada a nivel sanitario y las tendencias de morbi-mortalidad en la provincia de Santa Fe. Esto permitirá identificar posibles factores desencadenantes, su relación con la exposición materna y prenatal a contaminantes ambientales, sus mezclas, y la utilización de marcadores biológicos tempranos de efectos en la salud, como son los biomarcadores bioquímicos y de efectos genotóxicos. La integración de toda esta información proporcionaría una herramienta sanitaria disponible para los tomadores de decisiones, que permita no sólo prevenir y/o disminuir el impacto de las AC en la salud pública, sino también mejorar la salud de las mujeres gestantes, puérperas y su descendencia.

8. Objetivos

8.1 Generales

Describir la prevalencia de Anomalías Congénitas (AC) en la provincia de Santa Fe, y evaluar el efecto genotóxico materno debido a xenobióticos ambientales, en madres de niños menores de 6 meses con Anomalías Congénitas Seleccionadas (ACS), de la provincia de Santa Fe.

8.2 Específicos:

- Describir la prevalencia de AC relacionada con factores de exposición ambiental maternos o ACS en la provincia de Santa Fe.
- Determinar la presencia de analitos de sustancias xenobióticas en muestras maternas de casos (ACS) y controles (madres de niños nacidos antes y después de un caso).
- Evaluar la existencia de daño genotóxico, en las muestras maternas de casos y controles.
- Determinar si existe asociación entre la presencia de analitos ambientales y daño genotóxico en las muestras maternas de casos y controles.
- Evaluar los factores de riesgo maternos potencialmente implicados en el desarrollo de las ACS
- Constituir una herramienta sanitaria que contribuya a disminuir el impacto de los determinantes ambientales en la Salud Pública de la provincia de Santa Fe.

9. Materiales y métodos

9.1 Tipo de estudio:

Se llevó a cabo un estudio analítico observacional, de casos y controles.

9.2 Universo

Mujeres en puerperio, que hayan cursado su gestación en la provincia de Santa Fe.

9.3 Área de estudio

El estudio se desarrolló en la provincia de Santa Fe, ubicada en el centro este de Argentina. La provincia está dividida geográficamente en dos zonas; la chaqueña al norte y la pampeana al sur; y administrativamente en 19 departamentos. Su clima es templado sin estación fría en el sur, y templado y cálido en el norte; con un régimen hídrico que varía de húmedo a sub-húmedo de este a oeste (Arzamendia & Giraudo, 2004). La media anual de precipitaciones es de 940 mm y disminuyen del nordeste al sudoeste. La situación climática también difiere si se compara el oeste seco y el este húmedo; a medida que se avanza hacia el Paraná el clima se va volviendo ostensiblemente más húmedo (Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado, 2011).

Por presentar estas características climatológicas, la provincia presenta condiciones óptimas para una fuerte presencia de actividades agrícolas y ganaderas. Del total de la superficie provincial, el 26% es de neta capacidad de uso agrícola (mitad del sur provincial), el 31,5% exclusivamente ganadera (mitad del norte provincial) y el 32,4% posee aptitud ganadero-agrícola (Castignani, 2011).

9.4 Población objetivo

En el presente trabajo se incluyeron las mujeres gestantes que concurrieron a los hospitales públicos de la provincia de Santa Fe para dar a luz.

Los hospitales participantes fueron: Hospital Provincial de Rosario, “Dr. J.M. Cullen”, “Dr. J. Iturraspe” y de Niños “Dr. O. Alassia”, de la ciudad de Santa Fe; “Dr. D. Criado” de Esperanza, “Dr. Jaime Ferré” de Rafaela, “Olga Stucky de Rizzi” de Reconquista y Hospital de Ceres.

9.5 Muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia, entre las madres que aceptaron participar voluntariamente del estudio, mediante la firma del consentimiento informado. Se las convocó a participar a través del contacto mediado por médicos ginecólogos, obstetras

y pediatras neonatólogos, pertenecientes a los hospitales públicos participantes, que colaboraban con el estudio.

Cuando la edad materna fue entre 14 y 17 años, se incorporó el consentimiento de un adulto responsable (padre, madre o tutor), además de su propio consentimiento.

Para determinar los factores de riesgos maternos y ambientales implicados en el desarrollo de las AC, se aplicó un instrumento de evaluación de factores de riesgo maternos (Anexo I).

La encuesta, fue desarrollada en función de la bibliografía consultada, de instrumentos utilizados previamente por el ECLAMC y la OMS, y los contactos realizados con el personal de salud de distintos hospitales. De esta forma, el cuestionario permitió recabar datos sociodemográficos, de exposición doméstica, laboral directa e indirecta a sustancias químicas, hábitos conductuales, higiénico-dietarios y del estado de salud de las participantes. Posteriormente, para su validación, fue puesto a consideración de tres expertos, uno de ellos internacional, y finalmente, fue probado a través de entrevistas personales (Prueba Piloto, N=30) a mujeres puérperas, de dos hospitales públicos de referencia de la ciudad de Santa Fe (Colussi et al., 2018).

Dado que se trataba de un estudio de participación voluntaria, no se definió un número muestral mínimo, sino una proporción de cuatro controles por cada caso.

9.5.1 Definición de casos y controles

- ✓ **Casos:** Madres, mayores de 18 años, de niños recién nacidos y hasta los 6 meses de edad, con diagnóstico de AC seleccionadas (ACS).
- ✓ **Controles:** Madres, mayores de 18 años, de niños recién nacidos y hasta los 6 meses de edad, sanos, que hayan nacido antes y después del caso (n=4 por cada caso).
- ✓ **Anomalías congénitas seleccionadas (ACS):** corresponden a todas aquellas AC mayores de etiología no genética (se excluyen Síndrome de Down, Síndrome de Patau, Síndrome de Edwards, entre otros).
 - Clasificación de las AC registradas según Atlas de RENAC (Bidondo et al., 2015):
 - Anomalías de cráneo y cara: incluye fisura alveolo-palatina, fisura palatina, microtia, asimetría facial.
 - Anomalías digestivas: incluye páncreas anular, atresia esofágica III y atresias intestinales.
 - Anomalías genitourinarias: incluye extrofia vesical, hipospadias, agenesia renal, y genitales ambiguos.

- Anomalías de miembros: incluye polidactilia, sindactilia, talipes, artrogrifosis, agenesia del hallux.
- Anomalías cardiovasculares: incluye Transposición de los Grandes Vasos (TGV), Comunicación Interventricular (CIV), Estenosis congénita de la válvula pulmonar, Comunicación Interauricular (CIA).
- Anomalías del SNC: incluye anencefalia, hidrocefalia, mielomeningocele, macrocefalia, holoprosencefalia, espina bífida (mielosquisis), hipoplasia de cuerpo calloso, hipoplasia de fosa posterior, ventriculomegalia.
- Defectos de la pared abdominal: incluye gastrosquisis, y onfalocele.
- Polimalformados: Malformaciones mayores que se encuentren en distintos órganos: Dos o más (que no forman parte de un síndrome asociación o secuencia conocidos).

9.5.2 Criterios de inclusión

- ✓ **Casos:** Madre mayor de 18 años, de un niño con ACS, que haya sido gestado en la provincia y que deseen participar del estudio, mediante la firma del consentimiento informado.
- ✓ **Controles:** Madre mayor de 18 años, de un niño sin ACS, -cuatro por cada caso, gestados en la provincia- y que deseen participar del estudio, mediante la firma del consentimiento informado.

9.5.3 Criterios de exclusión

- ✓ Madres de niños con ACS o controles que hayan sido gestados fuera de la Provincia Santa Fe.
- ✓ Madres menores de 18 años que no tuvieran un adulto o tutor acompañante.
- ✓ Madres que no deseen firmar el consentimiento informado.

9.6 Instrumentos de recolección de datos

9.6.1 Evaluación de factores de riesgo maternos

Para determinar la presencia de factores de riesgos maternos y ambientales, se realizó la encuesta a cada participante, y además se contaron con las historias clínicas de las madres y los niños.

Por otro lado, se realizaron tomas de muestras sanguíneas con material estéril (siguiendo las normas de bioseguridad en el manejo de muestras biológicas), para la determinación de los biomarcadores de exposición (metabolitos de xenobióticos ambientales), y de efecto (Ensayo Cometa y Ensayo Citoma).

9.6.2 Determinación de biomarcadores de exposición

Para determinar la presencia de analitos de xenobióticos, se seleccionaron aquellos ya encontrados por otros trabajos en la región y en diferentes matrices ambientales (Iturburu et al., 2019). Las muestras biológicas (suero y plasma), fueron analizadas; por un lado, en el CENATOXA-Laboratorio de Asesoramiento Toxicológico Analítico, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires; y por otro - mediante un intercambio académico- en el Laboratorio de Biogeoquímica Boreal, Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Sherbrooke, en Quebec, Canadá.

9.6.2.1 Análisis de compuestos

Las muestras de sueros se analizaron utilizando un método adaptado del descripto por Dale et al. (1967). El procedimiento utiliza una extracción simple líquido-líquido y limpieza con carbonato de potasio para determinar pesticidas OC, OF y PIR, como se muestran en la Tabla 1 (Fernández et al., 2022). Luego, las muestras se inyectaron en el detector de micro captura de electrones, de cromatografía de gases (GC- μ ECD), utilizando un análisis de doble columna y un programa de temperatura del horno.

El control de calidad externo se obtuvo de una fuente externa al laboratorio, y se utiliza para verificar el desempeño del laboratorio con materiales de prueba preparados externamente (Programa de control de calidad externo).

Por otro lado, en base a trabajos previos desarrollados en el Laboratorio de Biogeoquímica Boreal, se seleccionaron compuestos representativos de distintas familias químicas en función de su acción plaguicida (herbicidas, insecticidas y fungicidas) y otros compuestos considerados también CE, que se muestran en la Tabla 2. En cuanto al procedimiento analítico, para la cuantificación de plaguicidas en plasma de las muestras sanguíneas de las pacientes, se siguió el protocolo Cassoulet et al., (2019). Para estas determinaciones se utilizó la técnica de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), acoplada a espectrometría de masas en cuadrupolo.

Tabla 1. Límite de detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ), y tiempo de retención (RT) para las columnas de los canales A y B, en la determinación de plaguicidas OC, OF, y PIR por GC- μ ECD, utilizando un análisis de doble columna. Canal A: Agilent DB-XLB (30 m longitud x 0,25 diam); Canal B: Agilent DB-1701P (25 m longitud x 0,25 diam). UBA-CENATOXA.

COMPUESTOS	Columna A			Columna B		
	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Tiempo de retención (RT) (min)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Tiempo de retención (RT) (min)
Organoclorados						
Aldrin	0,05	0,07	21,243	0,036	0,046	17,246
Dieldrin	0,05	0,07	26,406	0,047	0,057	22,822
Endosulfan sulfato	0,07	0,08	31,558	0,075	0,087	24,323
Endrin	12,78	14,33	27,569	12,543	14,027	19,180
Epóxido de Heptacloro (exo)	0,05	0,06	23,140	0,046	0,059	15,297
Epóxido de Heptacloro (endo)	0,07	0,09	23,378	0,063	0,074	15,457
HCB	0,05	0,06	16,282	0,058	0,069	12,327
Heptacloro	0,11	0,12	19,789	0,101	0,108	15,780
Metoxicloro	0,12	0,15	33,284	0,164	0,205	28,001
Mirex	0,06	0,08	38,613	0,048	0,064	31,466
o,p'-DDD	0,13	0,14	24,059	0,135	0,157	23,549
o,p'-DDE	0,07	0,08	24,202	0,071	0,086	16,351
o,p'-DDT	0,07	0,09	27,936	0,066	0,080	19,521
p,p'-DDD	0,13	0,16	28,399	0,116	0,129	25,017
p,p'-DDE	0,07	0,08	25,944	0,067	0,079	17,696
p,p'-DDT	0,07	0,09	30,346	0,062	0,070	21,719
α-Clordano	0,05	0,07	24,918	0,052	0,067	17,077
α-Endosulfán	0,06	0,08	25,319	0,072	0,086	16,903
α-HCH	0,07	0,08	16,029	0,065	0,074	10,634
β-Endosulfán	0,06	0,07	28,946	0,060	0,086	25,470
β-HCH	0,05	0,07	18,307	0,062	0,091	14,799
γ-HCH	0,07	0,08	17,328	0,070	0,083	11,801
δ-Clordano	0,06	0,08	25,004	0,066	0,076	20,472
δ-HCH	0,07	0,08	19,546	0,071	0,082	15,109
Organofosforados y Piretroides						
Bifentrina	0,61	0,70	31,688	0,874	1,137	22,723
Cipermetrina (y sus isómeros)	3,33	3,89	47,840	3,392	4,168	32,148
			48,900			32,911
			49,411			33,059
			49,881			33,504
Deltametrina	3,39	3,94	69,121	3,311	4,093	42,417

Etil clorpirifos	0,12	0,13	20,854	0,115	0,140	14,240
Fenvalerato (y sus isómeros)	3,50	4,22	58,546 60,952	3,446	4,618	36,470 37,835
Metil clorpirifos	0,10	0,12	19,073	0,112	0,131	12,938
Permetrina	3,00	3,36	41,961	3,176	3,883	28,104
Terflutina	0,13	0,16	16,580	0,232	0,295	10,825
λ cihalotrina	0,61	0,70	36,265	0,974	1,283	27,428

Tabla 2. Compuestos evaluados, coeficiente de regresión (R²), concentración mínima probada y rango de concentración analizado (ppb), a través de UHPLC-MS/MS.

Compuesto	Coeficiente de regresión R ²	N° puntos de la curva de calibración	Mínima concentración (ppb)	Rango de concentraciones analizadas (ppb)
1- Naftol	0,9997	P9-P3	0,111	0,11-11
Acetaminofeno	1,0000	P7-P1	0,465	0,465-93
ATZ	0,9998	P6-P3	0,777	0,77-10
Butóxido de piperonilo	0,9998	P12-P3	0,033	0,033-13
Carbaril	1,0000	P9-P2	0,11	0,11-55
Carbendazim	0,9995	P12-P5	0,027	0,027-1
Carbofuran	1,0000	P12-P2	0,025	0,025-51
Diazinon	1,0000	P12-P1	0,022	95-544030
Dicloroetil ftalato	0,9998	P9-P3	0,115	0,115-12
Dimetoato	1,0000	P12-P1	0,023	0,023-92
Diuron	1,0000	P9-P1	0,122	0,122-122
Imidacloprid	0,9843	P11-P5	0,049	0,049-0,98
Metil parabeno	0,9992	P7-P1	0,545	0,545-109
Simazina	1,0000	P9-P1	0,095	0,095-95

9.6.3 Determinación de biomarcadores de efecto:

9.6.3.1 Biomarcadores de genotoxicidad

Todos los preparados del EC y MNBC fueron codificados para el análisis a ciegas y los resultados se decodificaron previo al análisis estadístico.

9.6.3.1.1 Ensayo Cometa Alcalino y Ensayo Cometa modificado

La técnica se encuentra descripta en el Anexo I, pero brevemente, las células se incrustan en una capa delgada de agarosa en un portaobjetos, y luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas se retiran, dejando el ADN superenrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina del ADN y posterior electroforesis, causa el desenrollamiento de los bucles y les permiten a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza generalmente por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se parecen a cometas, y el contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las roturas (Singh et al., 1988).

Para los cálculos y calibraciones, se cuantificaron 100 células por muestra, 50 en cada réplica. Se determinaron la cantidad de células en cada nivel de daño considerando: nivel 0= sin daño, sin migración de fragmentos (sin cola); nivel 1= daño leve (cola de longitud menor al diámetro del nucleóide); nivel 2= daño moderado (longitud de la cola mayor al diámetro de un nucleóide pero menor al diámetro de dos; nivel 3= daño alto (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleóides y menor al de tres) y nivel 4= daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleóides). A medida que aumenta la longitud de la cola y por ende la cantidad de ADN en la misma, el nucleóide ("cabeza del cometa") va perdiendo intensidad y tamaño. Se calcula el Índice de daño EC: $IDEC = n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4$, donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño. La categoría 0 no se incluyó en el índice. Los resultados se expresan como IDEC (Dusinska & Collins, 2008).

La presente técnica del ensayo cometa alcalino y su modificación con enzimas que detectan específicamente la presencia de bases nitrogenadas oxidadas, como la Endonucleasa III (Collins et al., 1997), fueron puestas a punto y calibradas anteriormente en el laboratorio (Simoniello, 2011).

9.6.3.1.2 Test de Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis (MNBC) en linfocitos humanos

El ensayo citogenético (descrito en Anexo I) para la detección MNBC, se basa en la utilización de un agente químico, Citocalasina-B, permitiendo la división nuclear, pero impidiendo la citocinesis, y proporcionando así a las células, un aspecto de células binucleadas. El recuento de micronúcleos se realiza sobre 1.000 de dichas células (linfocitos de sangre periférica). Brevemente, la sangre entera heparinizada se mezcla con medio de cultivo RPMI 1640, suero fetal bovino y fitohemoaglutinina, y se incuba a 37°C por 44 hs. Al cabo de ese tiempo, se agrega Citocalasina B, y se continua la incubación. Al cabo de 72 hs se realiza la cosecha, retirando los tubos de la estufa, y

agregándoles una solución hipotónica de KCl. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución Carnoy (mezcla de alcohol metílico y ácido acético), para finalmente realizar los extendidos a partir del pellet restante, por citocentrifugación. Se tiñen con colorante Giemsa, se dejan secar y se observan al microscopio óptico.

Para los cálculos y la calibración de la técnica, se utilizó como control positivo una solución de Ciclofosfamida en una concentración de 0,5 mg/mL, y se probaron *in vitro*, tres concentraciones: 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL y 5 µg/mL. Las Figuras 9 y 10 muestran los gráficos de las curvas de calibración de la técnica para dos de las variables del MNBC.

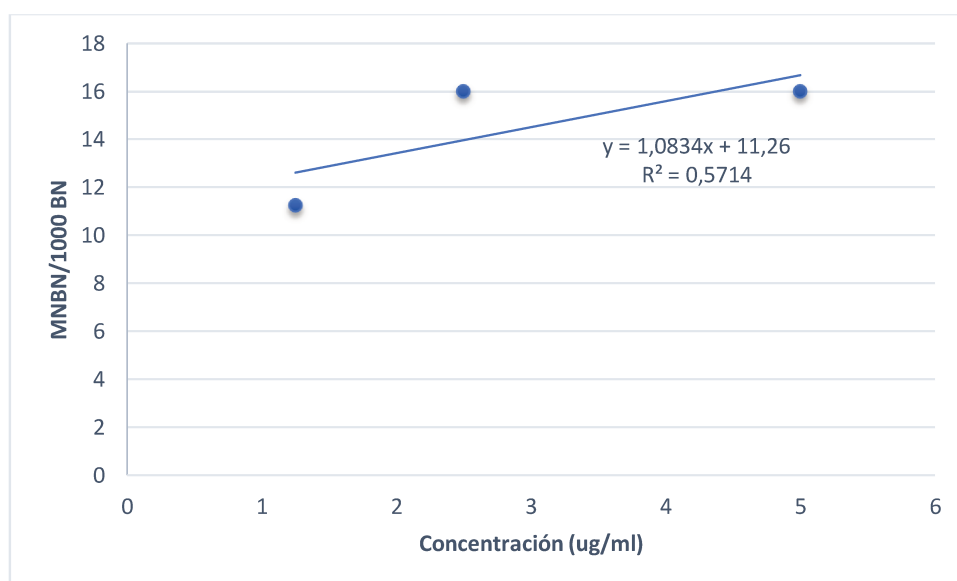


Figura 9. Curva de calibración del Ensayo Citoma para MNBN/1000BN. Control positivo: Ciclofosfamida 0,5 mg/mL.

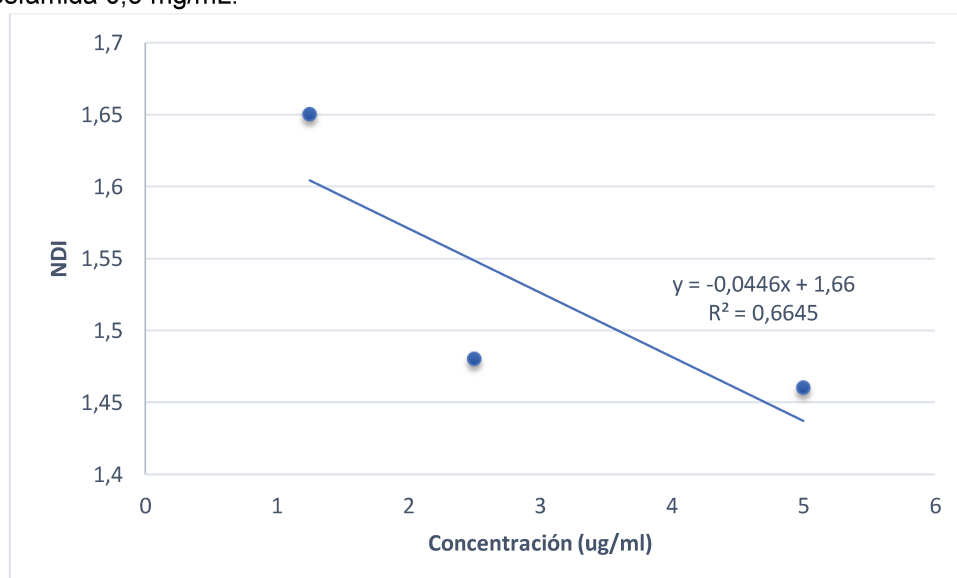


Figura 10. Curva de calibración del Ensayo Citoma para NDI. Control positivo: Ciclofosfamida 0,5 mg/mL.

Para la clasificación de las células BN, y su recuento para la frecuencia de MN, NPB y NBUD, se siguieron los criterios de (Fenech, 2007):

- Las células deben ser binucleadas.
- Los dos núcleos de una célula binucleada deben tener membranas nucleares intactas y estar situados dentro del mismo límite citoplasmático.
- Los dos núcleos de una célula binucleada deben tener aproximadamente el mismo tamaño, patrón de tinción e intensidad de tinción.
- Los dos núcleos dentro de una célula BN pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico, que no es más ancho que 1/4 del diámetro del núcleo.
- Los dos núcleos principales de una célula BN pueden tocarse, pero lo ideal es que no se superpongan entre sí. Una célula con dos núcleos superpuestos solo se puede puntuar si los límites nucleares de cada núcleo son distinguibles.
- El límite citoplasmático o membrana de una célula binucleada debe estar intacto y claramente distinguible del límite citoplasmático de las células adyacentes.

Los MN son morfológicamente idénticos, pero más pequeños que los núcleos. También tienen las siguientes características:

- El diámetro de MN en linfocitos humanos suele variar entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio de los núcleos principales, lo que corresponde a 1/256 y 1/9 del área de uno de los núcleos principales en una célula BN, respectivamente.
- Los MN no son refractarios y, por lo tanto, se pueden distinguir fácilmente de artefactos como las partículas de tinción.
- MN no están vinculados o conectados a los núcleos principales.
- MN puede tocar, pero no superponerse a los núcleos principales y el límite micronuclear debe distinguirse del límite nuclear.
- Los MN suelen tener la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero en ocasiones la tinción puede ser más intensa.

Cálculo del NDI: Esta variable proporciona una medida del estado proliferativo de la fracción de células viables. Es por tanto un indicador de los efectos citostáticos y, en el caso de los linfocitos, también es una medida de la respuesta mitogénica, lo que resulta útil como biomarcador de la función inmunitaria (Fenech, 2006). El NDI se calcula según el método de (Eastmond & Tucker, 1989). Se cuentan 500 células viables para determinar la frecuencia de células con 1, 2, 3 o 4 núcleos y se calcula el NDI utilizando la fórmula $NDI = \frac{M + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N}$, donde M1–M4 representan el número de células con 1–4 núcleos y N es el número total de células viables contabilizadas (excluyendo las células necróticas y apoptóticas). Su valor puede variar entre 1,0 y 2,0 (Fenech, 2007).

9.6.4 Determinación de marcadores bioquímicos

9.6.4.1 Ácido fólico

El ácido fólico se determinó por el método de quimioluminiscencia con el equipo Alinity i Abbott. Brevemente, este ensayo de inmunoanálisis es de dos pasos, para la determinación cuantitativa de folato en suero, plasma y eritrocitos humanos, y utiliza la tecnología de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA, por sus siglas en inglés). Dos pasos de pre-tratamiento producen la liberación del folato de la proteína folato-ligante endógena. Se combinan la muestra y el reactivo de pretratamiento 2 (ditio-treitol o DTT). Se añade el reactivo de pretratamiento 1 -hidróxido de potasio (KOH)-, a una alícuota de la muestra/reactivo de pretratamiento 2. Se combinan y se incuban una alícuota de la muestra pretratada, micropartículas paramagnéticas recubiertas de proteína folato-ligante (FBP), y diluyente de ensayo específico. El folato presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas de FBP. Se lava, y se añade el conjugado de ácido pterico marcado con acridinio para crear una mezcla de reacción y se incuban. Después de un ciclo de lavado, se añaden las soluciones pre-activadora y activadora. La reacción quimioluminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (URL). La cantidad de folato en la muestra es inversamente proporcional a las URL detectadas por el sistema óptico (Abbott Laboratories, 2010).

9.6.4.2 Homocisteína

La determinación de Hcy se realizó por método de ciclado enzimático (ECA, por sus siglas en inglés), con un equipo COBAS 502 ROCHE, donde se determina el producto de conversión del co-substrato. Brevemente, en él, la Hcy oxidada se reduce a Hcy libre la cual, reacciona con un cosubstrato, la S-adenosilmetionina (SAM) para formar metionina (Met) y S-adenosilhomocisteína (SAH). Esta última se determina por una serie de reacciones enzimáticas acopladas en las cuales la SAH es hidrolizada para transformarse en adenosina (Ado) y Hcy en presencia de hidrolasa de SAH. En una reacción de conversión, la Hcy formada es reincorporada a un ciclo de reacción que amplifica la señal de detección.

La adenosina formada se hidroliza inmediatamente a inosina y amoníaco. En el último paso, la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la reacción del amoníaco con el 2-oxoglutarato y NADH para formar NAD⁺, como se puede observar en la Figura 11. La concentración de Hcy de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de NADH convertida a NAD⁺ (ΔA_{340nm}) (Roche Diagnostics, 2019).

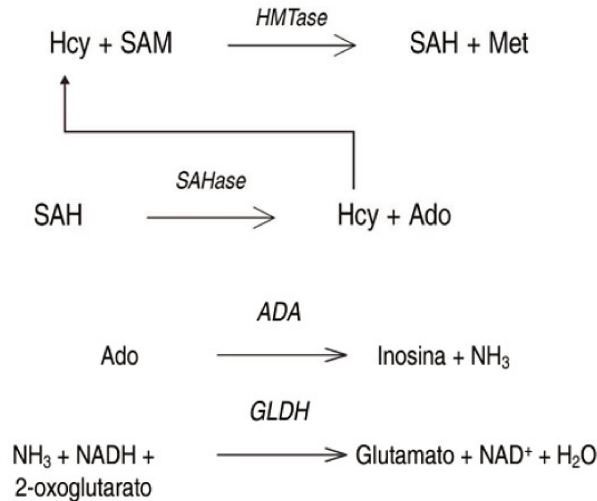


Figura 11. Diagrama esquemático del ensayo de ciclado de enzimas para la Hcy. Adaptado de Roche Diagnostics, 2019.

9.7 Operacionalización de las variables

9.7.1 Datos obtenidos a través de las encuestas

9.7.1.1 Variables independientes:

a) Del niño:

- Edad: se refiere a la edad gestacional a la cual nació (en semanas).
- Sexo: se refiere al sexo del recién nacido con o sin ACS.
- Peso: peso del niño al nacer (en gramos).

b) De la madre:

• Variables sociodemográficas

- Edad: Se refiere a la edad materna al momento de su participación en el estudio.
- Nivel de instrucción: Se refiere al nivel de escolaridad que ha alcanzado la persona, de acuerdo con los niveles del sistema educativo argentino.

Clasificación:

- Analfabeta
- Primaria incompleta
- Primaria completa
- Secundaria incompleta
- Secundaria completa
- Terciario incompleto
- Terciario completo
- Universitario incompleto

- Universitario completo
- Lugar de residencia: se refiere al lugar donde tiene domicilio habitual (localidad, municipio, ciudad). Clasificación:

- Actual
- Durante el embarazo

Teniendo en cuenta un trabajo anterior en el grupo de investigación (Simoniello et al., 2017), donde se consideraba a la población radicada en alguna de las dos principales ciudades de la Provincia, -Santa Fe y Rosario-, como “urbana”, y al resto de la población de la provincia, como “rural”, se eligió nuevamente continuar con ese criterio de clasificación a los fines de agrupar esta variable en dos grupos con suficiente cantidad de datos. En este sentido, se sumó al criterio el departamento al que corresponden. Por lo cual se consideró:

- Departamentos La Capital y Rosario: “urbano”
- Resto de departamentos: “rural”
- Variables de factores de riesgo por exposición:
 - Utilización de productos químicos en el domicilio: se refiere al uso de productos químicos domésticos para la erradicación de plagas (insectos y malezas). Categorías:
 - No
 - Si
 - Actividad laboral: se refiere al trabajo que realiza habitualmente.
 - Tiempo en dicha actividad laboral (años)
 - Cambio de actividad durante el embarazo
 - No
 - Si
 - Actividad laboral anterior
 - Actividad laboral del convivente: se refiere a la actividad laboral que desarrolla el convivente de la mujer (pareja, cónyuge, hijos, padre, madre, etc.).
 - Tipos de exposición: se refiere a la exposición inadvertida a ciertas sustancias químicas de la que puede estar siendo objeto.
 - Directa
 - Por contacto directo accidental
 - Por ausencia de equipo de protección durante la jornada

- Por almacenamiento en la casa o habitación
 - Trabajo de campo
 - Comer en lugar de trabajo
 - Utilización de envases vacíos de contenedores de agua para consumo
- Indirecta
 - Convivencia con trabajadores
 - Lavado de ropa contaminada
 - Vivir cerca del lugar de trabajo
- Variables de factores de riesgo maternos:
 - Por hábitos conductuales
 - Consumo de frutas y verduras: se refiere al consumo de frutas y verduras habitual. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
 - Consumo de bebidas no alcohólicas: se refiere al consumo de bebidas cola o azucaradas, en reemplazo de agua. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
 - Actividad física: se refiere a algún tipo de actividad física que realice habitualmente la paciente (caminatas, gimnasio, etc.) Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
 - Tabaquismo activo: se refiere al hábito de fumar habitualmente. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo

- 2° trimestre del embarazo
- 3° trimestre del embarazo
- Tabaquismo pasivo: se refiere al humo de cigarrillo a la que puede estar expuesta por convivencia habitual u ocasional con personas fumadoras. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
- Consumo de alcohol: se refiere al consumo de alcohol que pueda haber realizado en el último año. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
- Consumo de drogas activo: se refiere al consumo de algún tipo de droga ilícita que pueda haber realizado en el último año. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
- Consumo de drogas pasivo: se refiere al humo de drogas ilegales al que puedan llegar a estar expuestas por convivencia habitual u ocasional con personas consumidoras activas. Categorías: si/no. Clasificación:
 - Antes del embarazo
 - 1° trimestre del embarazo
 - 2° trimestre del embarazo
 - 3° trimestre del embarazo
- Por hábitos higiénico-dietarios
 - Tipo de agua que consume: se refiere al agua que utiliza para beber y preparación de infusiones y alimentos. Clasificación:
 - De pozo/bomba.
 - Potable

- Estado de salud
 - Cantidad de gestas previas: se refiere al número de embarazos previos que tuvo la paciente.
 - Abortos espontáneos: se refiere al número de abortos espontáneos, o pérdidas que haya registrado la mujer.
 - Partos
 - Tipo: se refiere al tipo de parto que haya tenido previamente. Categorías:
 - Vaginal
 - Cesárea
 - Número: se refiere a la cantidad de partos anteriores.
 - Edad gestacional (en semanas): se refiere a la edad del recién nacido desde el primer día desde la última menstruación materna. Clasificación:
 - Pretérmino: aquellos nacidos antes de las 37 semanas.
 - A término: aquellos nacidos entre las semanas 37 y 40 de embarazo.
 - Embarazo planeado: se refiere a si el embarazo fue planificado con una consulta preconcepcional. Categorías: si/no.
 - Cantidad de semanas al momento de conocer el estado de gravidez. Variable cuantitativa numérica.
 - Controles de embarazo: se refiere a si se realizó los controles durante el embarazo. Categorías: si/no.
 - Exposición a Rayos X: se refiere a la realización de algún estudio radiográfico durante el embarazo o las semanas previas a saber del mismo. Categorías: si/no
 - Antecedentes de Enfermedades Crónicas No Transmisibles: se refiere a los antecedentes personales, familiares o del padre biológico del niño, de enfermedades crónicas. Categorías:
 - Personales
 - Familiares o del padre biológico del niño
 - Consumo de medicamentos: se refiere al consumo de medicamentos antes del embarazo y/o en el 1° trimestre del mismo. Categorías:
 - Hierro
 - Ácido fólico

- Antibióticos
- Analgésicos
- Otros
- Consanguinidad: se refiere al parentesco conocido con el padre biológico del niño. Categorías: si/no

9.7.2 Datos obtenidos por fuentes secundarias (historias clínicas)

9.7.2.1 Variables independientes

- Antecedentes de infecciones agudas durante el embarazo: se refiere a infecciones agudas que se hayan cursado antes o durante el embarazo. Clasificación: si/no/trimestre. Categorías:
 - TORCH
 - Sífilis
- Necesidades Básicas Insatisfechas: % de hogares con NBI: a partir del georreferenciamiento de cada participante, se determinó el % de NBI correspondiente, teniendo en cuenta la fracción y radio censal, o el distrito que corresponda al domicilio, según disponibilidad de datos del Instituto Provincial de Estadísticas y Censos (Gobierno de Santa Fe, 2022) .

9.7.2.2 Variables dependientes

9.7.2.2.1 A partir de fuentes secundarias

- Diagnóstico del recién nacido: se refiere a la descripción de la anomalía congénita registrada en su historia clínica. Según su presentación los casos fueron clasificados en:
 - Casos aislados
 - Casos con AC múltiples
 - Síndromes (Barbero et al., 2021).
 - Polimalformados (Dolk & Vrijheid, 2003).

9.7.2.2.2 A partir de fuentes primarias

- Biomarcadores de exposición
 - Determinación de xenobióticos ambientales
 - Cantidades detectadas y cuantificadas por muestra
 - Concentraciones cuantificadas en cada muestra
- Biomarcadores de efecto (genotóxicos)

- De daño al ADN y daño oxidativo
 - Ensayo cometa alcalino
 - Ensayo cometa modificado para bases pirimidínicas (Endonucleasa III)
 - Sitios Endo
- De inestabilidad genética
 - Micronúcleos en células binucleadas/ 1000 células binucleadas (MNBn)
 - Micronúcleos en células mononucleadas/1000 células mononucleadas (MNMO)
 - Índice de división nuclear (NDI)
- Marcadores Bioquímicos
 - Determinación de ácido fólico. Valores de referencia: 3,00-20,00 ng/mL
 - Determinación de Hcy. Valores de referencia: adultos (15-35 años): menor a 15 umol/L.

9.8 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos en las encuestas, se analizaron de acuerdo a la naturaleza de las variables que los originaron, utilizando el Software SPSS® 25 para Windows e InfoStat®, con un nivel de significación de 0,05.

Las variables mensurables fueron descriptas a partir de sus medidas de resumen - media ($\bar{X}$), mediana, valores máximos y mínimos, error estándar (EE), y desvío estándar (DS)-, según correspondiera a su distribución paramétrica o no. Las variables categóricas, a partir de la distribución de su frecuencia (%).

En el caso de los datos obtenidos a partir de los análisis de biomarcadores, en principio se determinó la normalidad de las variables, utilizando el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, dado el $N > 50$ para los grupos evaluados. Posteriormente, se utilizó el análisis de la varianza para efectuar las comparaciones. En el caso de las variables mensurables de distribución simétrica (prueba “t” de Student para muestras independientes), y los test no paramétricos (Test U Mann Whitney modificado, y Kruskal Wallis), para las que no se ajustaban a esa distribución.

Se utilizó estadística bivariada (correlación de Spearman y regresión lineal simple), o multivariada -regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)- para analizar las variables dependientes e independientes o regresoras, según la clasificación por tipo de AC o departamentos provinciales.

9.9 Consideraciones éticas

El presente trabajo se enmarcó dentro del Proyecto CAID 2016 “Evaluación de efectos sinérgicos entre plaguicidas y arsénico y su relación con daño genotóxico”, que contó con el aval del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Posteriormente, fue evaluado y aprobado por los siguientes Comités de Ética y de Docencia:

- ✓ Comité de Ética de la Investigación de la Provincia de Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia e Investigación del Hospital Provincial “Dr. José M. Cullen”, de Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia e Investigación del Hospital “J.B. Iturraspe”, de Santa Fe,
- ✓ Dirección Asociada de Docencia e Investigación del Hospital de Niños “Dr. Orlando Alassia”, de Santa Fe,
- ✓ Comité de Ética en Investigación del Hospital Provincial de Rosario, de Rosario, Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia SamCo “Dr. Jaime Ferré”, de Rafaela, Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia SamCo “Dr. Daniel Criado”, de Esperanza, Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia e Investigación del Hospital de Ceres, Ceres, Santa Fe,
- ✓ Comité de Docencia e Investigaciones del Hospital Central de Reconquista “Olga Stuky de Rizzi”, de Reconquista, Santa Fe.

Se respetaron las normas nacionales e internacionales respecto al resguardo de la identidad de las personas intervinientes en el estudio (Ley 25326 de la Protección de Datos Personales, Declaración de Helsinki).

Los resultados parciales y totales fueron informados en forma de charlas de devolución en cada hospital participante, a las que fueron especialmente invitadas las madres participantes y el personal sanitario colaborador del proyecto.

10. Resultados

El trabajo de campo se desarrolló entre marzo de 2018 y noviembre de 2019. Debido a la pandemia de COVID-19, durante todo el año 2020 y hasta septiembre de 2021 las actividades de muestreo fueron suspendidas. Finalmente, entre octubre y diciembre de 2021, se retomaron las actividades de muestreo.

En el año 2018 la prevalencia de casos de AC reportadas en la provincia de Santa Fe, fue de 15,33/1000 nacimientos. En 2019, fue de 15,6/1000 y en el 2021 fue de 14,4/1000 (Barbero et al., 2019; Barbero et al., 2020; Barbero et al., 2022). En este trabajo en los mismos años, se logró la participación de 42, 21, y 2 madres de niños con AC, respectivamente, obteniendo una cobertura del 18,14%, 7,5% y 0,7%, respectivamente de casos registrados por RENAC aunque no necesariamente son los mismos casos, como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Número total de madres participantes, hospitales colaboradores, departamentos provinciales implicados y porcentaje de cobertura según datos de RENAC.

N (número)	2018	2019	2021	Total
Madres de niños con AC (casos)	43	21	2	66
Madres de niños sin AC (controles)	132	84	8	224
Total de madres participantes	175	105	10	290
Hospitales colaboradores	5	7	3	7
Departamentos / Total de la provincia	11/19	13/19	5/19	13/19
% de cobertura de casos según datos RENAC	18,14% (43/237) ¹	7,5% (21/280) ²	0,7% (2/274) ³	8,34% (66/791)

Fuentes: ¹ Barbero et al., (2019); ² Barbero et al., (2020); ³ Barbero et al., (2022).

En la Tabla 4, se muestran las categorías de AC descriptas por RENAC en la provincia de Santa Fe, el número de casos registrados por la institución y el número de casos incorporados.

Tabla 4. Frecuencia de AC registradas en esta tesis, y por la RENAC para el mismo período, clasificadas por categorías.

Clasificación	Reporte			Reporte		
RENAC	2018	RENAC 2019 ^a	2019	RENAC 2020 ^a	2021	RENAC 2022 ^a
Casos (N)						
• Aislados	35	174	12	196	1	210
• Múltiples	8	27	4	28	0	31

• Sindrómicos	0	29	5	48	1	33
• Total	43 ^b	230	21	272	2	274

^a Casos reportados de nacidos vivos (n) para los años 2018, 2019 y 2021, respectivamente.

^b Nota: el número de casos de niños difiere del de madres informado en la tabla 2, debido a un par de mellizas con AC.

10.1 Evaluación de factores de riesgo maternos potencialmente implicados en el desarrollo de las ACS.

10.1.1 Datos sociodemográficos

10.1.1.1 De las madres

Participaron del estudio 290 mujeres de $27,67 \pm 6,09$ años de edad, 66 madres de 67 niños con alguna AC, y 224 madres de 227 niños sin AC (se registraron 4 pares de mellizos, un par de ellos casos). La proporción de rangos etarios para ambos grupos se muestra en la Tabla 5.

En cuanto al nivel de instrucción, los resultados revelaron que el 5% de las mujeres no había terminado la escuela primaria, el 16% solo había terminado la escuela primaria, el 18% había terminado la educación obligatoria (enseñanza media), y el 0,7% tenía un título universitario. El nivel educativo se dicotomizó por educación obligatoria, como se muestra en la Tabla 5.

Considerando el lugar de residencia, las mujeres procedieron de 13 de los 19 departamentos de la provincia, como se puede observar en la Figura 12.

Teniendo en cuenta los conceptos anteriormente descriptos para los criterios de “urbanidad” y “ruralidad”, el 47,58% (138/290) provenían de La Capital y Rosario, -urbanos- y el 52,41% (152/290) del resto de los departamentos de la provincia –rural-. Entre las madres de los casos, 34,84% (23/66) provenían de la zona urbana y 65,15% (43/66) de la zona rural.

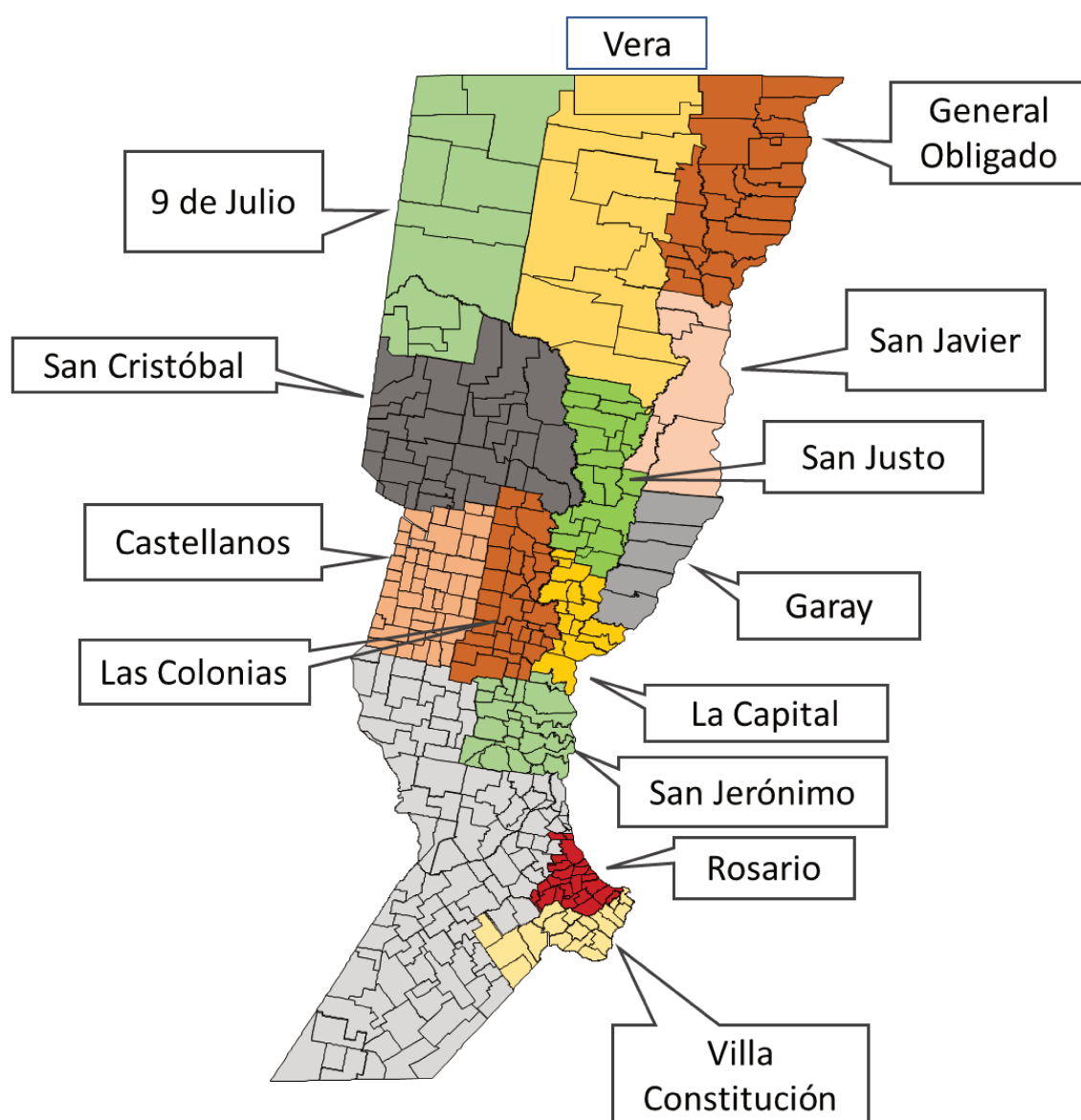


Figura 12. Mapa de la provincia de Santa Fe, mostrando los departamentos de origen de las participantes. Fuente: elaboración propia.

Respecto a la actividad laboral de las madres, el 72,75% eran amas de casa, el 9,65% trabajaban como empleadas en algún sector de la economía, el 7,93% eran estudiantes y el 9,65% tenían otras actividades. La tabla 5 muestra la frecuencia para cada grupo. La actividad laboral de los convivientes en un 28% se relacionaba a la construcción (albañiles) y sólo un 12% estaba relacionado a la exposición inadvertida a sustancias químicas (pintores y peones rurales), por lo que no se consideró que las mujeres hayan estado expuestas directa o indirectamente por causas laborales propias o del conviviente.

Considerando el estado de salud materno, en el cual se tuvieron en cuenta tanto los eventos ginecológicos, como la frecuencia de enfermedades infecciosas y crónicas no

transmisibles; el 18,27% de las pacientes tenían antecedentes de abortos espontáneos; la proporción de madres de casos y controles y por lugar de residencia se aprecian en la Tabla 5. En este sentido, aunque la diferencia entre los grupos no fue estadísticamente significativa, se encontró asociación positiva entre el antecedente de aborto espontáneo y el uso de pesticidas domésticos (OR: 1,96; IC 95%: 1,03-3,73, χ^2 : 4,22, $p=0,04$).

Las gestaciones previas fueron de $1,61 \pm 0,10$ en promedio. Es importante destacar que el 79% de las mujeres advirtieron su embarazo en el primer trimestre, el 20% en el segundo trimestre y el 1% en el tercero; por su parte, el 3,44% de las madres no realizaron consultas de control prenatal (Tabla 5).

La edad gestacional media fue de $36,53 \pm 0,21$ semanas; el 47,93% fueron partos prematuros y el 52,06% partos a término. Para los prematuros, el 68% de los casos y el 42% de los controles nacieron antes de las 37 semanas. La edad gestacional se asoció con el diagnóstico del recién nacido y el lugar de residencia de la madre. En el primer caso, un bebé con AC tiene casi el triple de probabilidades de nacer prematuro (OR: 2,96; IC 95%: 1,66-5,28; χ^2 : 14,04; $p=0,0002$). En el segundo caso, las mujeres provenientes de la zona rural tenían casi tres veces más riesgo de parto prematuro. (OR: 2,80; IC 95%: 1,74-4,50; χ^2 : 18,24; $p<0,0001$).

En cuanto al tipo de parto, el 37,93% fueron vaginales, el 51,37% fueron cirugías cesáreas y no se pudo obtener información para cerca del 10,68% de las participantes. En la Tabla 5 se muestra esto por casos y controles y por lugar de residencia materna.

Por otro lado, se halló asociación entre el parto por cesárea y los casos (OR: 2,29; IC 95%: 1,23-4,26; χ^2 : 6,96; $p=0,008$). Además, el tipo de parto se asoció con el lugar de residencia materno (OR: 2,26; IC 95%: 1,37-3,74; χ^2 : 10,16; $p=0,0014$). Las mujeres oriundas de la zona rural de la provincia, tienen el doble de probabilidades de tener una cesárea que las mujeres de la zona urbana. Los partos prematuros también se asociaron a la práctica de la cesárea (OR: 3,32; IC 95%: 1,98-5,56, χ^2 : 21,08 $p<0,0001$).

El estado de salud implica no solo infecciones agudas sino también Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) durante el embarazo. En general, las ECNT no mostraron diferencias significativas entre casos y controles o entre urbanas y rurales. Sin embargo, cuando se consideraron estas patologías por separado, hubo una ligera asociación entre la diabetes materna y los casos (OR: 2,36, IC 95%: 0,99-5,64, χ^2 : 3,76; $p=0,05$). En ese sentido, se observó DM en 7,93% de las madres, hipertensión arterial en 17,93% y 9,65% presentaban algún tipo de enfermedad tiroidea. Además, los partos prematuros se asociaron con ECNT materna (OR: 2,63; IC 95%: 1,54-4,47; χ^2 : 12,90; $p=0,0003$). Respecto a los antecedentes de enfermedades infecciosas y crónicas

no transmisibles durante el embarazo, y consumo de medicamentos en el periodo periconcepcional, los resultados pueden observarse en la Tabla 5. La consanguinidad como factor de riesgo para el desarrollo de ciertas AC, solo se presentó en una oportunidad, y era en una paciente control.

Como resumen, teniendo en cuenta el diagnóstico del recién nacido y el lugar de residencia materno, se halló diferencia significativa entre grupos en eventos ginecológicos como edad gestacional, tipo de parto y peso del recién nacido, pero no en factores sociodemográficos (edad, nivel educativo), estado de salud o hábitos de vida.

En cuanto a otros factores de riesgo por exposición a sustancias químicas, el 59% de las mujeres, respondió utilizar algún tipo de plaguicida doméstico. El porcentaje relevado para cada grupo puede observarse en la Tabla 6, donde también se incorporaron las variables vinculadas con hábitos conductuales y de estilo de vida.

En cuanto al período periconcepcional, es importante destacar que, el 57,21% de las mujeres declararon haber planificado su embarazo, sin embargo, solo el 8,43% declaró haber consumido ácido fólico antes del embarazo y el 66,86% durante el primer trimestre. Se halló que la falta de planificación del embarazo constituye un factor de riesgo si no se consume ácido fólico previo a la concepción (OR: 5,62; Chi^2 : 6,33; IC: 1,44-21,96; $p=0,011$) y durante el primer trimestre del embarazo (OR: 3,09; Chi^2 : 21,47; IC: 1,91-5,00; $p<0,0001$).

Respecto a factores relacionados a la nutrición, toda la población encuestada, declara haber consumido frutas y verduras en un 90% aproximadamente (teniendo en cuenta tanto el período preconcepcional como el primer trimestre de embarazo), y la actividad física antes del embarazo fue del 40,83%, que disminuyó al 23,18% en el primer trimestre. El 85,51% de las mujeres consumían agua potable, ya sea por red de distribución, o por compra de agua mineral en bidones. No obstante, el 82% respondió que consumió durante el primer trimestre bebidas azucaradas o gaseosas. El 56,89% de las mujeres bebía alcohol antes del embarazo, y durante el primer trimestre se redujo apenas al 49,65%. Mientras que, la proporción de actividad física y consumo de alcohol disminuyó desde antes del embarazo hasta el primer trimestre, el tabaquismo activo y pasivo se mantuvo casi sin cambios (35% y 50%, respectivamente). Por otro lado, la ingesta de frutas y verduras, así como el consumo de antibióticos, aumentó desde antes de la gestación hasta el primer trimestre. La suplementación de la dieta con hierro y ácido fólico aumentó a partir del primer trimestre en todos los grupos (Tabla 6).

Tabla 5: Factores sociodemográficos maternos, eventos ginecológicos y estado de salud por diagnóstico del recién nacido y lugar de residencia. Provincia de Santa Fe, Argentina. 2018-2019.

Variables	Diagnóstico del RN			Lugar de residencia materno		
	Caso (N=66)	Control (N=224)	p	URBANO (N=138)	RURAL (N=152)	p
Factores sociodemográficos						
• Edad (años) (media ± EE)	27,24 ± 0,79	27,74 ± 0,40	0,37	28,16 ± 0,49	27,14 ± 0,51	0,08
○ ≤20	9% (6/66)	7% (16/224)		4% (6/138)	11% (16/152)	
○ 21-25	38% (25/66)	37% (83/224)		36% (49/138)	39% (59/152)	
○ 26-35	39% (26/66)	43% (97/224)		46% (64/138)	39% (59/152)	
○ ≥36	14% (9/66)	13% (28/224)		14% (19/138)	12% (18/152)	
• Nivel de escolaridad			0,45			0,0479*
○ Secundaria incompleta o menos	73% (48/66)	77% (173/224)		71% (98/138)	81% (123/152)	
○ Secundaria completa o más	27% (18/66)	23% (51/224)		29% (40/138)	19% (29/152)	
• Ocupación materna						
○ Ama de casa	65% (43/66)	75% (168/224)		75% (103/138)	71% (108/152)	
○ Empleada	15% (10/66)	8% (18/224)		10% (14/138)	9% (14/152)	
○ Estudiante	12% (8/66)	7% (15/224)		7% (10/138)	9% (13/152)	
○ Otro	8% (5/66)	10% (23/224)		8% (11/138)	11% (17/152)	
Eventos ginecológicos						
• Abortos espontáneos	20% (13/66)	18% (40/224)	0,73	18% (25/138)	18% (28/152)	0,94
• Embarazos no controlados	6% (4/66)	3% (6/224)	0,18	5% (7/138)	2% (3/152)	0,14
• N° embarazos previos (media ± EE)	1,45 ± 0,20	1,66±0,11	0,36	1,60±0,14	1,60±0,14	0,63
○ 0-1	68% (45/66)	55% (118/224)		54% (74/138)	62% (94/152)	
○ 2-3	23% (15/66)	32% (69/224)		36% (49/138)	24% (37/152)	
○ ≥ 4	9% (6/66)	13% (29/224)		11% (15/138)	14% (21/152)	
• Edad gestacional (semanas)(media ± EE)	35,97±0,39	36,70±0,25	0,0018**	37,44±0,26	35,70±0,32	0,0001**
○ Pretérmino	68% (45/66)	42% (94/224)	0,0002**	35% (48/138)	60% (91/152)	0,0001**
○ A término	32% (21/66)	58% (130/224)		65% (90/138)	40% (61/152)	
• Tipo de parto (N= 259)			0,008*			0,0014**
○ Vaginal	28% (16/61)	47% (93/198)		52% (70/135)	32% (40/124)	

○ Cesárea	72% (44/61)	53% (105/198)	0,93	48% (65/135)	68% (84/124)	0,72
• Sexo del RN (N=282)						
○ Varón	51% (33/65)	50% (109/217)		49% (67/136)	51% (75/146)	
○ Mujer	49% (32/65)	50% (108/217)		51% (69/136)	49% (71/146)	
• Peso del RN (media±EE) (N=277)	2713,22 ± 93,42	2905,85 ± 63,10	0,0161*	3035,49 ± 65,55	2692,01 ± 80,91	0,0049*
○ <2500 g	37% (24/61)	27% (57/212)	0,11	19% (26/136)	39% (55/141)	0,0003**
○ ≥ 2500 g	63% (41/61)	73% (155/212)		81% (110/136)	61% (86/141)	
Estado de salud materno						
• Infecciones agudas durante el embarazo (N=221)	12% (6/49)	12% (20/172)	0,90	7% (8/108)	16% (18/113)	0,0494*
○ Toxoplasmosis IgM (N=219)	0% (0/49)	3% (5/170)		1% (1/108)	4% (4/111)	
○ Sífilis (N=270)	10% (6/63)	7% (14/200)		5% (7/131)	10% (14/139)	
• Enfermedades Crónicas No Transmisibles	30% (20/66)	27% (60/224)	0,57	25% (33/138)	32% (47/151)	
○ Diabetes Mellitus	14% (9/66)	6% (14/224)	0,0510*	9% (12/138)	7% (11/152)	0,18
○ Hipertensión Arterial	17% (11/66)	18% (41/224)	0,76	16% (22/138)	20% (30/152)	0,64
○ Enfermedades tiroideas	8% (5/66)	10% (23/224)	0,51	7% (10/138)	12% (18/152)	0,400
						0,18

*p<0,05, Test U Mann Whitney. RN: Recién Nacido.

Tabla 6. Hábitos de estilo de vida antes del embarazo y en el primer trimestre del mismo, clasificados por diagnóstico del RN y por lugar de residencia materno (%). Provincia de Santa Fe, Argentina, 2018-2019.

HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA	CASOS (N=66)		CONTROLES (N=224)		URBANO (N=138)		RURAL (N=152)	
	Antes del embarazo	1 ^{er} trimestre	Antes del embarazo	1 ^{er} trimestre	Antes del embarazo	1 ^{er} trimestre	Antes del embarazo	1 ^{er} trimestre
Consumo de frutas y verduras	91% (60/66)	94% (62/66)	88% (196/224)	93% (208/224)	88% (122/138)	93% (129/138)	88% (134/152)	93% (141/152)
Actividad física	41% (27/66)	21% (14/66)	41% (91/223)	24% (53/223)	37% (51/138)	25% (34/138)	44% (67/151)	22% (33/151)
Consumo de alcohol	61% (40/66)	53% (35/66)	56% (125/224)	49% (109/224)	51% (70/138)	43% (60/138)	63% (95/152)	55% (84/152)
Fumadora activa	30% (20/66)	27% (18/66)	37% (83/224)	37% (82/224)	35% (48/138)	35% (48/138)	36% (55/152)	34% (52/152)
Fumadora pasiva	47% (31/66)	47% (31/66)	51% (115/224)	51% (114/224)	52% (72/138)	51% (71/138)	49% (74/152)	49% (74/152)
Consumo de drogas ilícitas	5% (3/66)	5% (3/66)	5% (12/224)	5% (12/224)	5% (7/138)	5% (7/138)	5% (8/152)	5% (8/152)
Utilización de pesticidas en el domicilio (N=289)	59,09% (39/66)		59,19% (132/223)		57,24% (79/138)		60,92% (92/151)	
Medicación								
• Ácido Fólico	8% (5/66)	55% (36/66)	5% (11/224)	55% (124/224)	6% (8/138)	54% (74/138)	5% (8/152)	57% (86/152)
• Hierro	8% (5/66)	58% (38/66)	5% (12/224)	50% (113/224)	6% (8/138)	49% (67/138)	6% (9/152)	55% (84/152)
• Antibióticos	6% (4/66)	15% (10/66)	5% (11/224)	16% (36/224)	1% (1/138)	17% (23/138)	9% (14/152)	15% (23/152)

10.2 Descripción de la prevalencia de AC relacionadas con factores de exposición ambiental maternos en la provincia de Santa Fe.

Los distintos tipos de AC fueron clasificadas por sistemas afectados y según la clasificación de la RENAC, como se muestra en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 13, las patologías registradas con mayor prevalencia fueron las polimalformaciones, seguidas por las del SNC, y luego en la misma frecuencia, los defectos de la pared abdominal, las anomalías de miembros y craneofaciales.

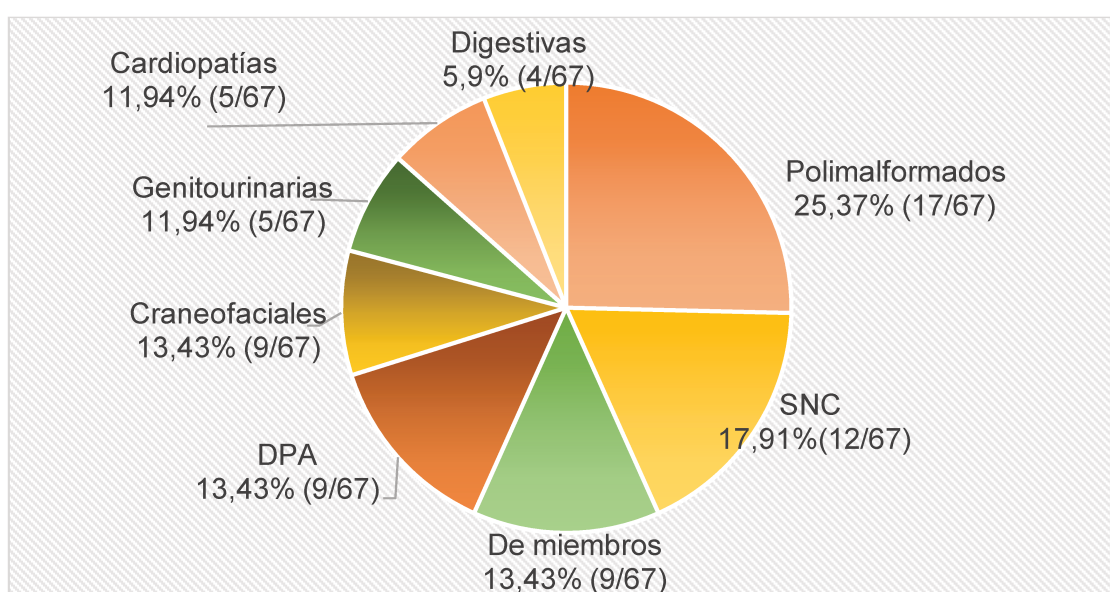


Figura 13. Proporción de AC detectadas en el estudio para la provincia de Santa Fe, 2018-2021. DPA: Defectos de la Pared Abdominal, SNC: Sistema Nervioso Central.

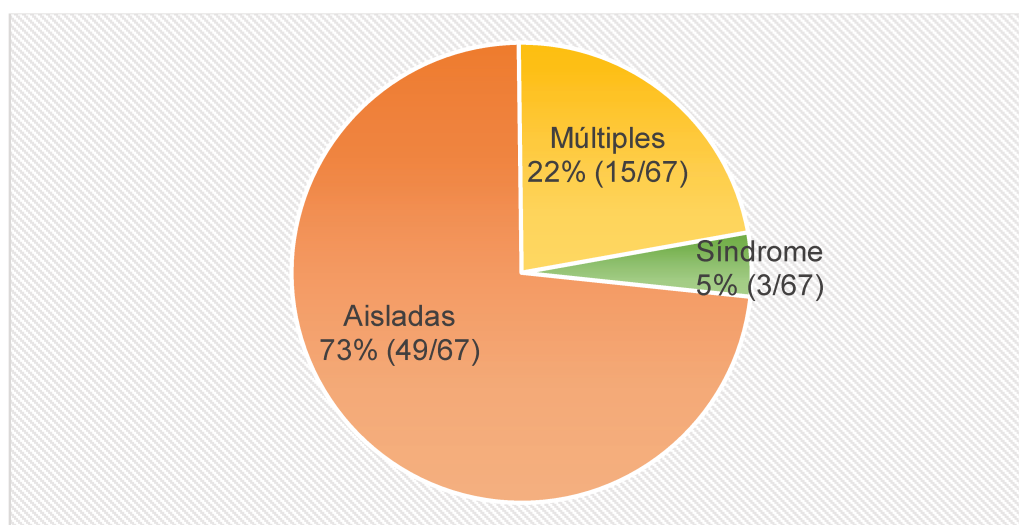


Figura 14. Frecuencia de las AC registradas en el presente trabajo según clasificación de la RENAC.

A su vez, en la Figura 15 se puede observar la distribución de las AC registradas por departamento provincial. En este caso se tuvieron en cuenta sólo aquellos departamentos que presentaron como mínimo 5 casos.

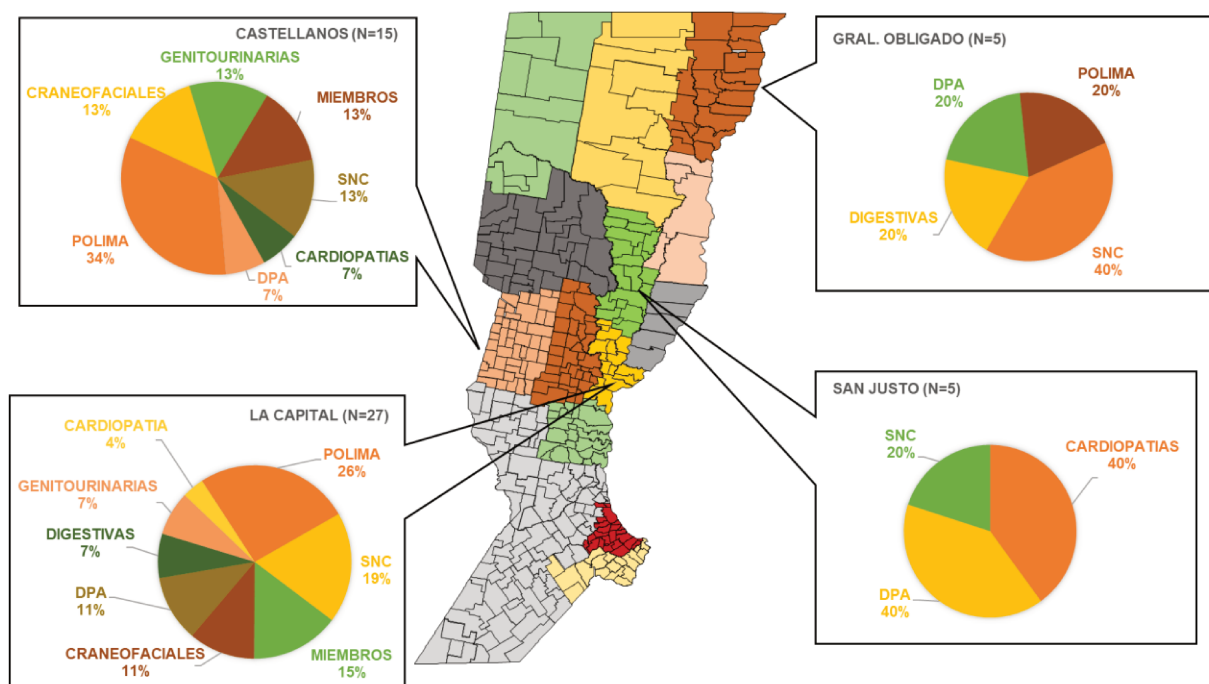


Figura 15. Distribución de las frecuencias de AC registradas a lo largo de la provincia de Santa Fe, por departamentos con mayor frecuencia de casos, 2018-2021. Fuente: elaboración propia.

10.3 Determinación de la presencia de analitos de sustancias xenobióticas en muestras maternas.

Se tomó una submuestra del total (N=72), teniendo en cuenta especialmente aquellos casos que también contaban con datos completos de los biomarcadores de efecto (ensayo cometa y citoma), y uno de sus controles (el que presentaba mayor similitud con las características maternas de su caso), y se les realizaron las determinaciones de analitos de xenobióticos.

De las 72 muestras maternas analizadas, se detectó algún xenobiótico en el 95,83% (69/72) excluyendo en estos resultados el analgésico acetaminofeno debido a su frecuente utilización durante el puerperio, y se logró cuantificar al menos un compuesto en el 93,05% (67/72) de las muestras. En la Figura 16, puede observarse las cantidades de xenobióticos (excluyendo acetaminofeno) detectados y cuantificados por cantidad de muestras. Se destaca; por un lado, la existencia de muestras en las que no se detectó ningún xenobiótico, hasta la detección de catorce distintos en una sola muestra. Por otro

lado, la cuantificación de los compuestos reveló que en la mayoría de las muestras existían entre una y siete sustancias distintas.

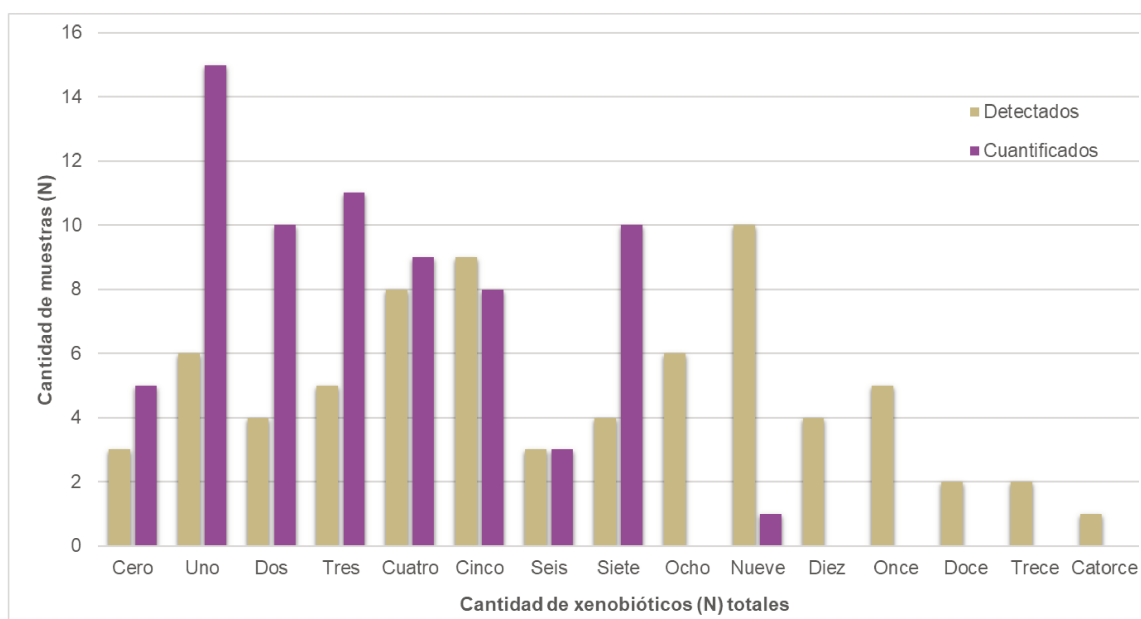


Figura 16. Cantidad de xenobióticos (N) totales detectados y cuantificados por cantidad de muestras maternas evaluadas (N).

10.3.1 Cantidades de xenobióticos detectados y cuantificados por casos y controles

Por otro lado, los datos anteriores se analizaron en función de los casos y controles, como se observa en la Figura 17. De este modo, en una muestra correspondiente a una madre de un caso con AC, se pudieron cuantificar hasta nueve sustancias distintas. No se halló diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, ni para las cantidades detectadas ($p=0,10$), ni para las cuantificadas ($p=0,44$, Test de Kruskal Wallis).

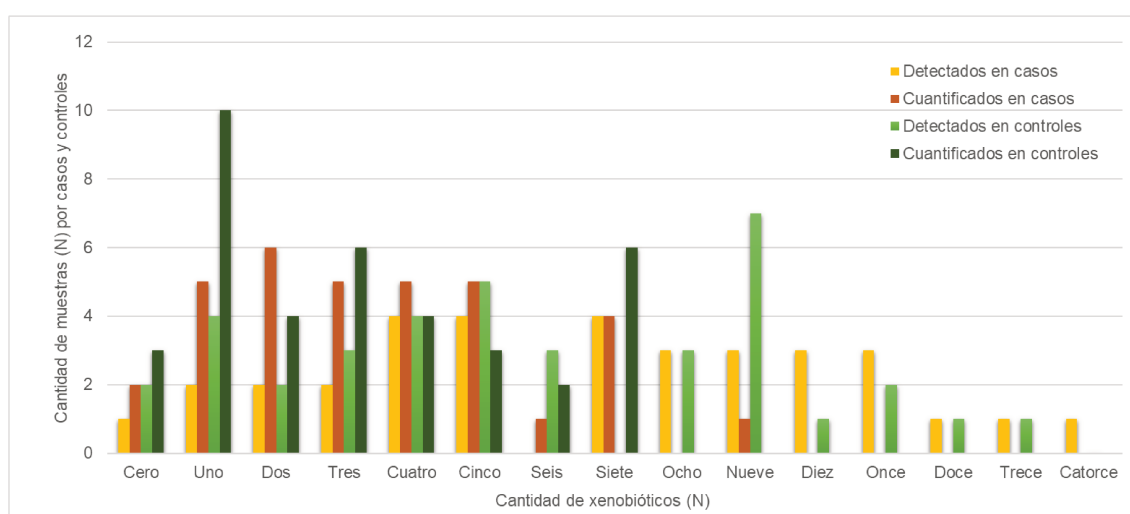


Figura 17. Cantidad de xenobióticos (N) totales detectados y cuantificados por cantidad de muestras maternas evaluadas (N) de casos y controles.

10.3.2 Cantidades de xenobióticos detectados y cuantificados por lugar de residencia materno.

Así mismo, se evaluó la cantidad de xenobióticos detectados y cuantificados por lugar de residencia materno, como se puede observar en la Figura 18. Se distingue una mayor cantidad de muestras cuantificadas en la población de mujeres rurales, que en las urbanas.

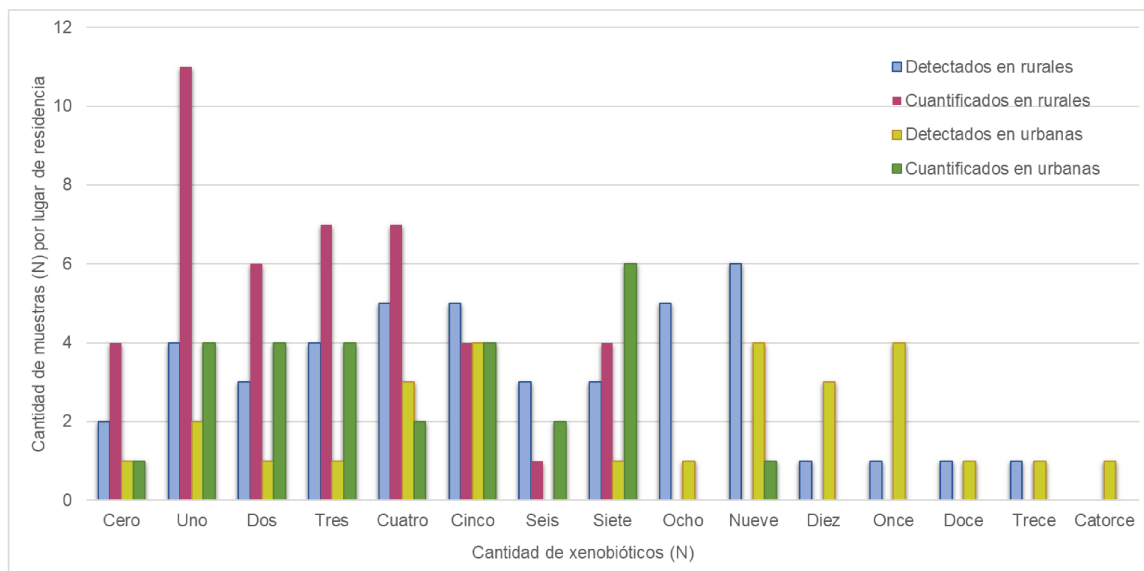


Figura 18. Cantidad de xenobióticos (N) totales detectados y cuantificados por lugar de residencia.

10.3.3 Clasificación y frecuencia de cuantificación de los xenobióticos evaluados.

Los cinco xenobióticos de mayor frecuencia de cuantificación (exceptuando el acetaminofeno) fueron: ATZ (57,14%), CBZ (46,42%), metil parabeno (46,42%), epóxido de exo-heptacloro (45,58%), y δ -HCH (39,70%). En la Tabla 7 se puede observarlos según su clasificación, rango y frecuencia de cuantificación en las muestras procesadas.

Tabla 7. Clasificación, rango y frecuencia de cuantificación en las muestras analizadas, de los xenobióticos evaluados.

Clasificación		Compuestos Analizados	Rango de concentraciones cuantificadas en las muestras (ppb)	Frecuencia de cuantificación en las muestras N (%)
Según organismo diana	Según composición química			
INSECTICIDAS	Carbamatos	Carbofuran	(0,02-0,01)	1,78% (1/56)
		Carbaril	NC	0% (0/56)
	Organoclorados	Aldrin	(0,05-0,17)	25% (17/68)
		Dieldrin	(0,06-0,44)	10,29% (7/68)
		Heptacloro	(0,11-0,12)	1,47% (1/68)
		α -Clordano	(0,06-0,10)	4,41% (3/68)
		γ -Clordano	NC	0% (0/68)
		α -Endosulfan	(0,08-0,11)	1,47% (1/68)
		β -Endosulfan	NC	0% (0/68)
		α -HCH	NC	0% (0/68)

FUNGICIDAS		β-HCH	(0,07-0,63)	36,76% (25/68)
		δ-HCH	(0,08-1,10)	39,70% (27/68)
		Endosulfan sulfato	NC	0% (0/68)
		o,p'-DDT	NC	0% (0/68)
		p,p'-DDT	(0,08-0,15)	5,88% (4/68)
		o,p'-DDD	NC	0% (0/68)
		p,p'-DDD	(0,14-0,51)	7,35% (5/68)
		o,p'-DDE	NC	0% (0/68)
		p,p'-DDE	(0,08-0,35)	14,70% (10/68)
		Mirex	(0,07-0,07)	1,47% (1/68)
		Metoxicloro	NC	0% (0/68)
		Epóxido de exo-heptacloro	(0,06-0,47)	45,58% (31/68)
		Epóxido de endo-heptacloro	NC	0% (0/68)
		Endrin	NC	0% (0/68)
	Organofosforados	Metil Clorpirifos	(0,12-0,91)	14,70% (10/68)
		Etil Clorpirifos	(0,14-0,68)	27,94% (19/68)
		Diazinon	NC	0% (0/46)
		Dimetoato	(0,02-0,01)	1,85% (1/54)
	Piretroides	λ- cihalotrina	NC	0% (0/68)
		Bifentrina	NC	0% (0/68)
		Cipermetrina	NC	0% (0/68)
		Deltametrina	NC	0% (0/68)
		Fenvalerato	NC	0% (0/68)
		Permetrina	NC	0% (0/68)
		Terflutina	(ND-0,15)	1,47% (1/68)
	Neonicotinoides	Imidacloprid	NC	0% (0/68)
	Halogenuro de alquilo	Lindano (γ-HCH)	(0,08-0,52)	5,88% (4/68)
	Organoclorados	Hexaclorobenceno (HCB)	(0,06-0,15)	19,11% (13/68)
	Bencimidazólico	Carbendazim	(0,02-0,28)	46,42% (26/56)
HERBICIDAS	Clorotriazina	ATZ	(0,77-1,78)	57,14% (32/56)
		Simazina	NC	0% (0/56)
	Diclorofenilurea	Diuron	NC	0% (0/56)
CONTAMINANTES EMERGENTES	Parabenos	Metil parabeno	(0,54-2,15)	46,42% (26/56)
		Dicloro ftalato	(0,11-0,20)	8,7% (4/46)
COADYUVANTE SINERGISTA		Piperonil butóxido	(0,03-0,13)	26,08% (12/46)
OTROS	Analgésico	Acetaminofeno	(0,465-93)	48,21% (27/56)
	Alcohol	1-α-Naftol	(0,11-11)	1,81% (1/55)

En rojo: sustancias prohibidas en Argentina (Ministerio de Salud de la Nación, 2017; SENASA, 2021). NC: no cuantificados.

10.3.4 Concentraciones de xenobióticos por grupos de casos y controles

En la Tabla 8 se describen las concentraciones de cada xenobiótico estudiado para las madres de los niños casos y controles. Las concentraciones máximas de los cinco xenobióticos más frecuentemente hallados (excluyendo acetaminofeno) fueron: ATZ: 1,78 ppb, CBZ: 0,28 ppb, metil parabeno: 2,15 ppb, epóxido de exo-heptacloro: 0,47 ppb, y δ-HCH: 1,10 ppb. No se hallaron diferencias significativas en las concentraciones comparando ambos grupos ($p > 0,05$, Test U Mann Whitney).

Tabla 8: Concentraciones (ppb) de xenobióticos en muestras maternas por casos y controles.

Xenobióticos	CONCENTRACIONES (ppb)					
	CASOS			CONTROLES		
	N	Media $\pm$ E.E.	Mín - Máx	N	Media $\pm$ E.E.	Mín- Máx
Acetaminofeno	28	116,56 $\pm$ 66,05	0 – 1563,93	28	131,77 $\pm$ 92,22	0 – 2459,96
Metil Parabeno	28	0,36 $\pm$ 0,11	0 – 2,15	28	0,19 $\pm$ 0,06	0 -1,02
ATZ	28	0,28 $\pm$ 0,06	0 – 0,96	28	0,39 $\pm$ 0,08	0 -1,78
δ -HCH	34	0,17 $\pm$ 0,05	0 – 0,97	34	0,19 $\pm$ 0,05	0 -1,1
β -HCH	34	0,09 $\pm$ 0,03	0 – 0,63	34	0,09 $\pm$ 0,02	0 - 0,47
Epóxido de exo-heptacloro	34	0,08 $\pm$ 0,02	0 – 0,47	34	0,07 $\pm$ 0,01	0 -0,32
Etil Clorpirifos	34	0,07 $\pm$ 0,02	0 – 0,46	34	0,09 $\pm$ 0,03	0 -0,68
Metil Clorpirifos	34	0,05 $\pm$ 0,02	0 – 0,62	34	0,08 $\pm$ 0,04	0 -0,91
HCB	34	0,03 $\pm$ 0,01	0 – 0,15	34	0,02 $\pm$ 0,01	0 -0,14
Dieldrin	34	0,03 $\pm$ 0,02	0 – 0,44	34	0,01 $\pm$ 0,01	0 -0,17
Aldrin	34	0,02 $\pm$ 0,01	0 – 0,17	34	0,03 $\pm$ 0,01	0 -0,16
p,p'-DDE	34	0,02 $\pm$ 0,01	0 – 0,21	34	0,03 $\pm$ 0,01	0 -0,35
p,p'-DDT	34	0,01 $\pm$ 0,01	0 – 0,15	34	0,01 $\pm$ 0,0041	0 -0,1
p,p'-DDD	34	0,01 $\pm$ 0,01	0 – 0,22	34	0,03 $\pm$ 0,02	0 -0,51
Dicloroetil-ftalato	23	0,01 $\pm$ 0,01	0 – 0,2	23	0,01 $\pm$ 0,0033	0 -0,05
Carbendazim	28	0,01 $\pm$ 0,0018	0 – 0,03	28	0,03 $\pm$ 0,01	0 -0,28
Butóxido de piperonilo	23	0,01 $\pm$ 0,0037	0 – 0,05	23	0,01 $\pm$ 0,01	0 -0,13
Terflutina	34	0,0044 $\pm$ 0,0044	0 – 0,15	34	NC	-
Heptacloro	34	0,0035 $\pm$ 0,0035	0 – 0,12	34	NC	-
α Endosulfan	34	0,0032 $\pm$ 0,0032	0 – 0,11	34	NC	-
Mirex	34	0,0021 $\pm$ 0,0021	0 – 0,07	34	NC	-
Carbofuran	28	0,00046 $\pm$ 0,00046	0 – 0,01	28	NC	-
Dimetoato	28	0,00036 $\pm$ 0,00036	0 – 0,01	28	0,00064 $\pm$ 0,00045	0 -0,01
α -HCH	34	NC	-	34	NC	-
Lindano	34	NC	-	34	0,03 $\pm$ 0,02	0 -0,52
Epóxido de endo-heptacloro	34	NC	-	34	0,0038 $\pm$ 0,0038	0 -0,13
Endrin	34	NC	-	34	NC	-
α Clordano	34	NC	-	34	0,01 $\pm$ 0,0049	0 -0,1
γ Clordano	34	NC	-	34	NC	-
β Endosulfan	34	NC	-	34	NC	-

Endosulfan sulfato	34	NC	-	34	NC	-
o,p'-DDT	34	NC	-	34	NC	-
o,p'-DDD	34	NC	-	34	NC	-
o,p'-DDE	34	NC	-	34	NC	-
Metoxicloro	34	NC	-	34	NC	-
λ Cihalotrina	34	NC	-	34	NC	-
Bifentrina	34	NC	-	34	NC	-
Cipermetrina	34	NC	-	34	NC	-
Deltametrina	34	NC	-	34	NC	-
Fenvalerato	34	NC	-	34	NC	-
Permetrina	34	NC	-	34	NC	-
1-naftol	28	NC	-	28	0,0014 ± 0,0014	0 - 0,04
Carbaryl	28	NC	-	28	NC	-
Diazinon	23	NC	-	23	NC	-
Diuron	28	NC	-	28	NC	-
Imidacloprid	28	NC	-	28	NC	-
Simazina	28	NC	-	28	NC	-

10.3.5 Concentraciones de xenobióticos por lugar de residencia

En la Tabla 9 se muestran las concentraciones de xenobióticos hallados por lugar de residencia materno.

Tabla 9. Concentraciones de xenobióticos hallados por lugar de residencia materno.

Xenobiótico	CONCENTRACIONES (ppb)					
	RURAL			URBANO		
	N	Media ± EE	Mín-Máx	N	Media ± EE	Mín-Máx
Acetaminofeno	34	86,01 ± 54,79	0 - 1563,93	22	183,14 ± 116,19	0 - 2459,96
ATZ	34	0,32 ± 0,07	0 - 1,78	22	0,35 ± 0,07	0 - 0,96
Metil Parabeno	34	0,21 ± 0,08	0 - 2,15	22	0,37 ± 0,1	0 - 1,52
β-HCH	41	0,11 ± 0,03	0 - 0,63	27	0,06 ± 0,02	0 - 0,24
δ-HCH	41	0,10 ± 0,04	0 - 1,1	27	0,29 ± 0,06	0 - 0,97
Etil Clorpirifos	41	0,08 ± 0,03	0 - 0,68	27	0,08 ± 0,02	0 - 0,35
Epóxido de exo-heptacloro	41	0,07 ± 0,02	0 - 0,43	27	0,09 ± 0,02	0 - 0,47
Metil Clorpirifos	41	0,04 ± 0,02	0 - 0,41	27	0,10 ± 0,05	0 - 0,91
Dieldrin	41	0,03 ± 0,01	0 - 0,44	27	0,01 ± 0,0047	0 - 0,1

p,p'-DDD	41	0,03 ± 0,02	0 - 0,51	27	0,01 ± 0,01	0 - 0,18
HCB	41	0,02 ± 0,01	0 - 0,13	27	0,03 ± 0,01	0 - 0,15
Lindano	41	0,02 ± 0,01	0 - 0,52	27	0,0033 ± 0,0033	0 - 0,09
p,p'-DDE	41	0,02 ± 0,01	0 - 0,21	27	0,03 ± 0,01	0 - 0,35
Carbendazim	34	0,02 ± 0,01	0 - 0,28	22	0,02 ± 0,01	0 - 0,12
Butóxido de piperonilo	27	0,02 ± 0,01	0 - 0,13	19	0,01 ± 0,0035	0 - 0,06
Aldrin	41	0,01 ± 0,0047	0 - 0,12	27	0,05 ± 0,01	0 - 0,17
Dicloroetil ftalato	27	0,01 ± 0,01	0 - 0,2	19	NC	-
α Clordano	41	0,0049 ± 0,0034	0 - 0,1	27	0,0037 ± 0,0037	0 - 0,1
Terflutina	41	0,0037 ± 0,0037	0 - 0,15	27	NC	-
Epóxido de endo-heptacloro	41	0,0032 ± 0,0032	0 - 0,13	27	NC	-
p,p'-DDT	41	0,0024 ± 0,0024	0 - 0,1	27	0,01 ± 0,01	0 - 0,15
1-naftol	34	0,0011 ± 0,0011	0 - 0,04	22	NC	-
Dimetoato	34	0,00082 ± 0,00046	0 - 0,01	22	NC	-
α-HCH	41	NC	-	27	NC	-
Heptacloro	41	NC	-	27	0,0044 ± 0,0044	0 - 0,12
Endrin	41	NC	-	27	NC	-
γ Clordano	41	NC	-	27	NC	-
α Endosulfan	41	NC	-	27	0,0041 ± 0,0041	0 - 0,11
β Endosulfan	41	NC	-	27	NC	-
Endosulfan sulfato	41	NC	-	27	NC	-
o,p'-DDT	41	NC	-	27	NC	-
o,p'-DDD	41	NC	-	27	NC	-
o,p'-DDE	41	NC	-	27	NC	-
Mirex	41	NC	-	27	0,0026 ± 0,0026	0 - 0,07
Metoxicloro	41	NC	-	27	NC	-
λ cihalotrina	41	NC	-	27	NC	-
Bifentrina	41	NC	-	27	NC	-
Cipermetrina	41	NC	-	27	NC	-
Deltametrina	41	NC	-	27	NC	-
Fenvalerato	41	NC	-	27	NC	-
Permetrina	41	NC	-	27	NC	-
Carbaryl	34	NC	-	22	NC	-
Carbofuran	34	NC	-	22	0,00059 ± 0,00059	0 - 0,01

Diazinon	27	NC	-	19	NC	-
Diuron	34	NC	-	22	NC	-
Imidacloprid	34	NC	-	22	NC	-
Simazina	34	NC	-	22	NC	-

NC: No Cuantificado.

Analizando los diez compuestos xenobióticos con mayor frecuencia de cuantificación, las concentraciones de δ -HCH y Aldrin mostraron diferencias significativamente mayores en la población materna urbana respecto a la rural ($p=0,004$ y $p=0,0018$, Test U Mann Whitney, respectivamente), como se puede observar en la Figura 19.

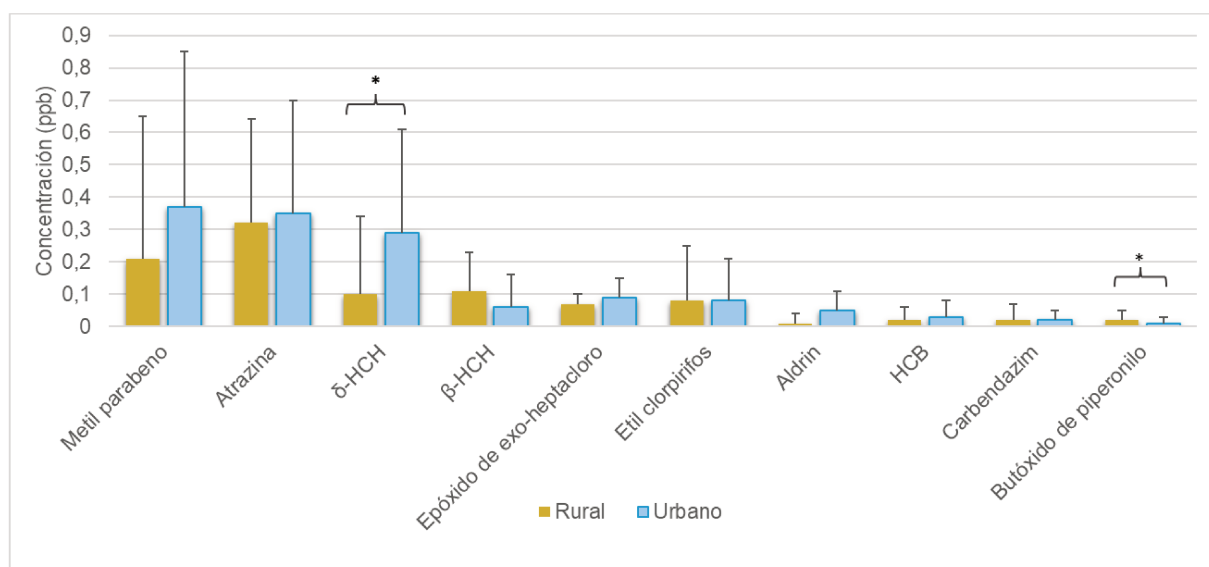


Figura 19. Concentraciones de los principales xenobióticos cuantificados por zona rural y urbana. (media $\pm$ DS) Test U Mann Whitney.

10.3.6 Concentraciones de xenobióticos más frecuentemente cuantificados por clasificación de AC

Respecto a las concentraciones de los xenobióticos por clasificación de las AC, se tomaron los seis primeros xenobióticos que mostraban mayores concentraciones en las muestras, como se puede observar en la Figura 20. Las madres de los niños con anomalías genitourinarias, presentaron las concentraciones de analitos de xenobióticos más altas, seguidas por aquellas madres de niños con cardiopatías y por las de niños con polimalformaciones. También es interesante destacar no sólo las concentraciones totales, sino también la diversidad de xenobióticos presentes.

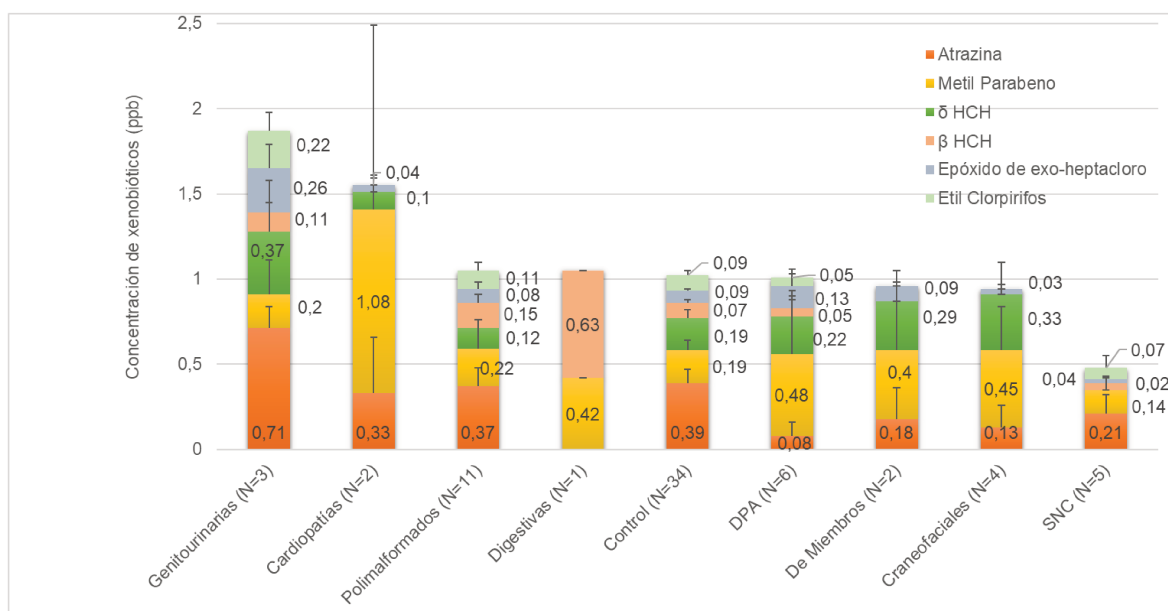


Figura 20. Concentraciones de los seis principales xenobióticos cuantificados, por tipo de AC.

No se halló diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de los distintos xenobióticos evaluados, por clasificación de AC ($p > 0,05$, Test de Kruskal Wallis).

10.3.7 Identificación y cuantificación de xenobióticos hallados por casos y controles.

Como se puede observar en la Figura 21, los compuestos con mayor porcentaje de cuantificación en el subgrupo de las muestras analizadas fueron: ATZ, epóxido de exo-heptacloro, δ -HCH, metil parabeno, CBZ, β -HCH, etil clorpirifos y aldrin.

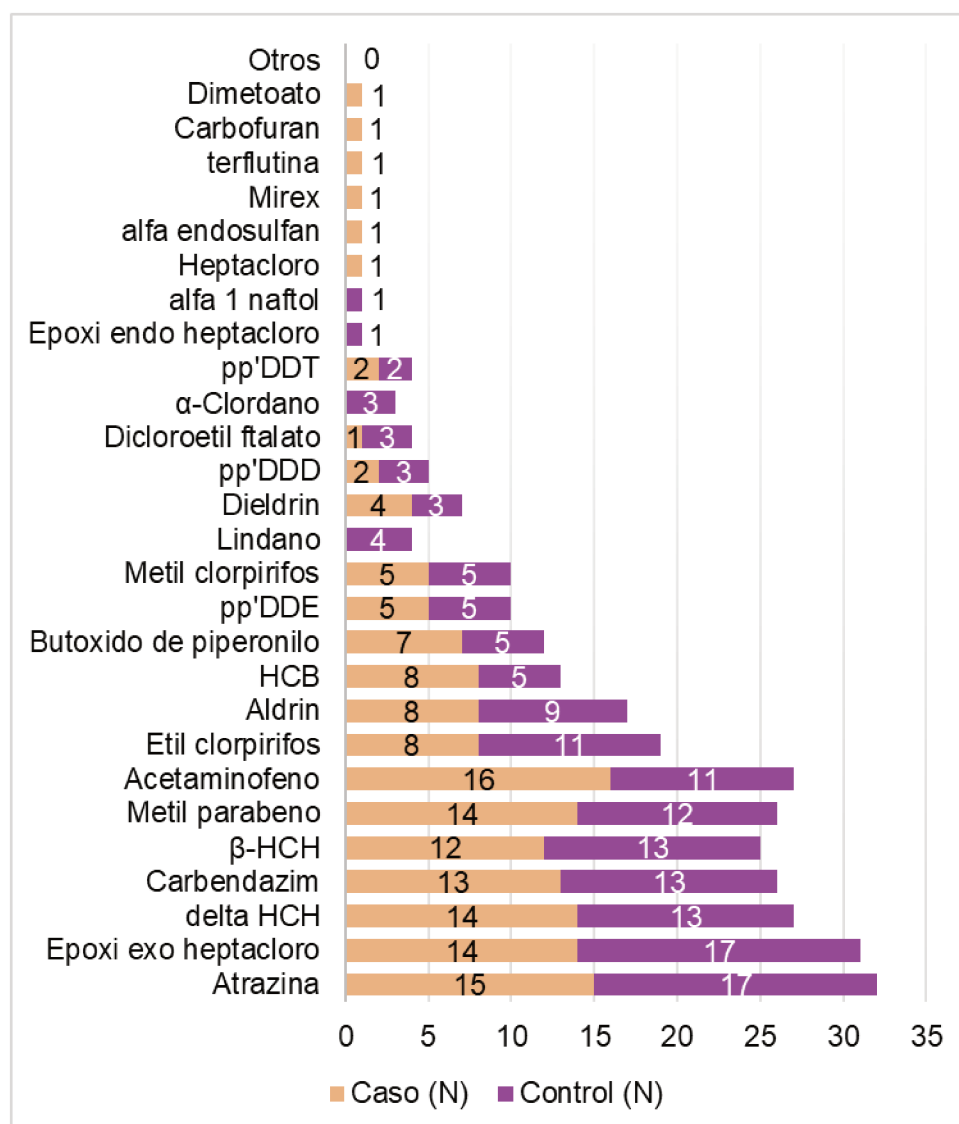


Figura 21. Frecuencia de compuestos xenobióticos cuantificados, por casos y controles.

Teniendo en cuenta lo anterior, en la Figura 22 se observan los % de cuantificación entre los grupos casos y controles. En cuanto a las concentraciones de estos principales xenobióticos cuantificados, no se registraron diferencias significativas entre dichos grupos ($p > 0,05$, Test U Mann Whitney).

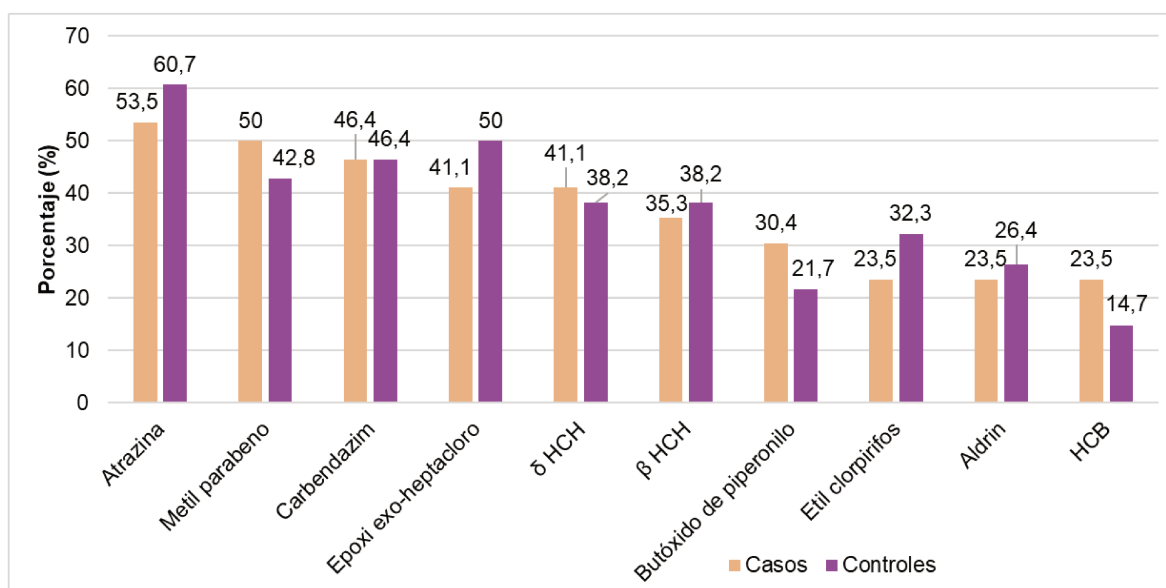


Figura 22. Frecuencia de los diez compuestos xenobióticos más cuantificados en muestras maternas, por grupo de casos y controles.

10.3.8 Identificación y cuantificación de xenobióticos hallados por lugar de residencia.

Como se puede observar en las Figuras 23 y 24, los principales xenobióticos cuantificados, en la submuestra evaluada, fueron: ATZ, epóxido de exo-heptacloro, δ-HCH, CBZ, metil parabeno, β-HCH, aldrin y etil clorpirifos.

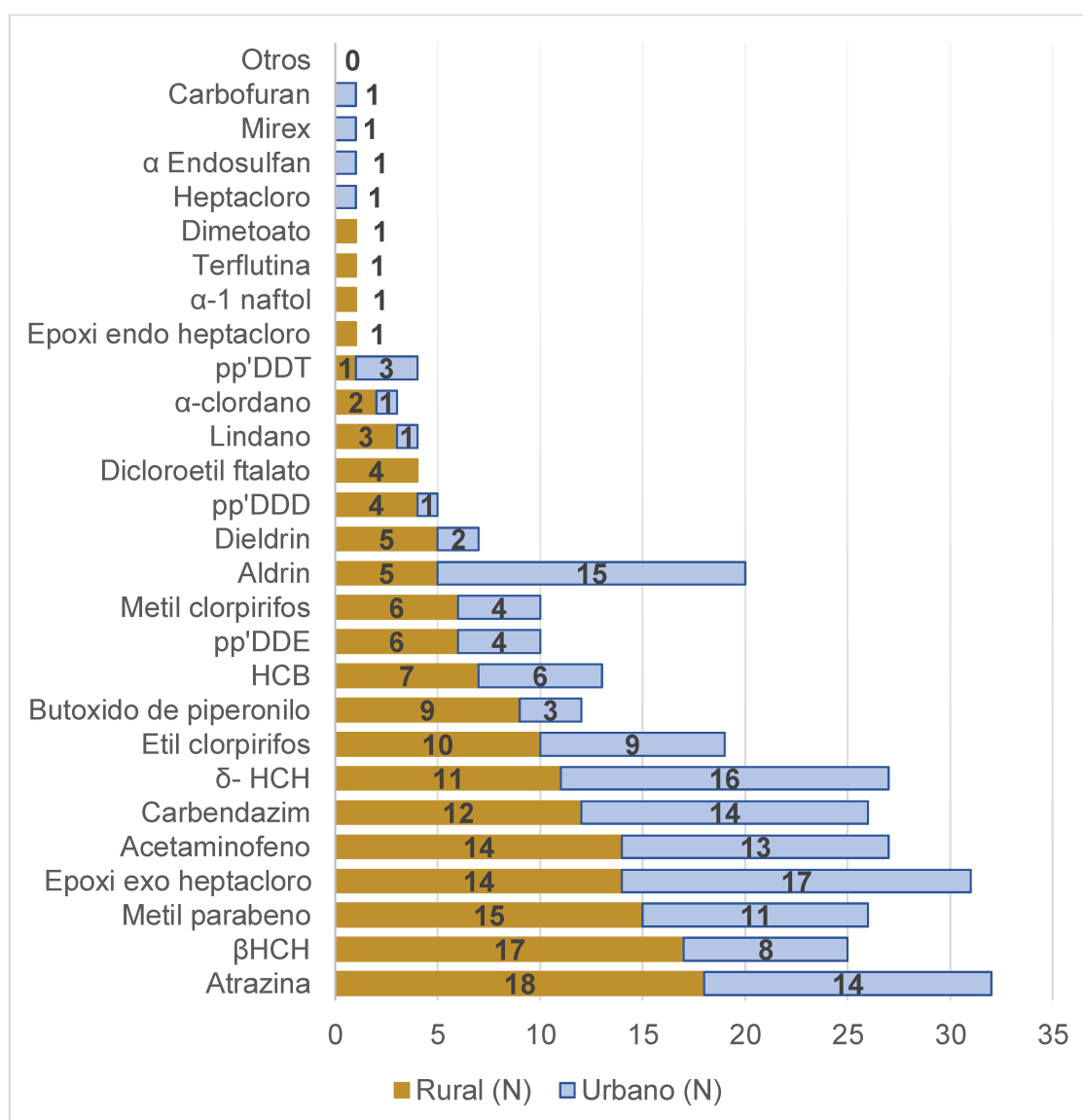


Figura 23. Cantidad de muestras (N) que presentaron cada uno de los compuestos analizados, por lugar de residencia materna.

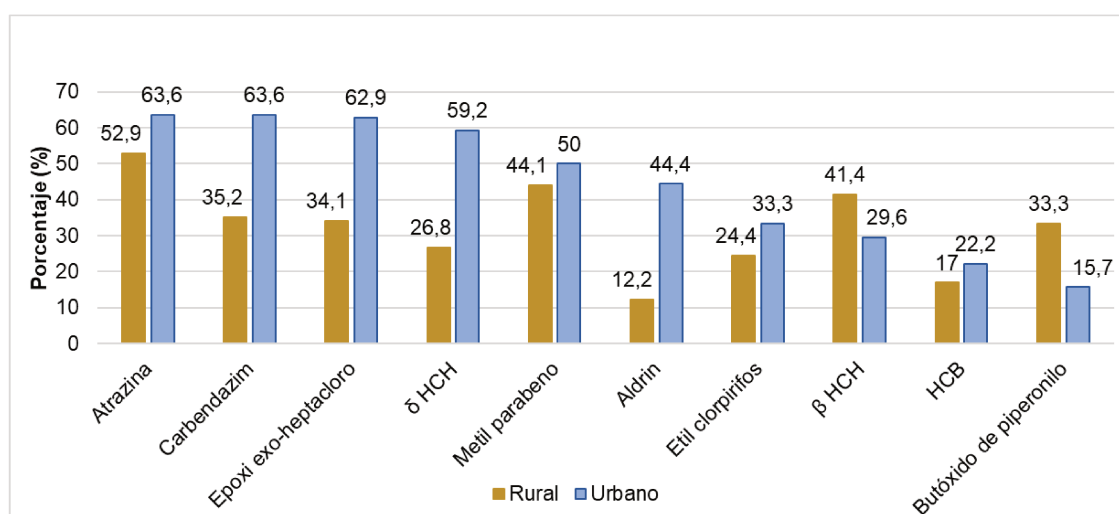


Figura 24. Frecuencia (en %) de cuantificación de los principales xenobióticos por lugar de residencia materna.

10.3.9 Frecuencia de cuantificación de xenobióticos por departamento

En la Figura 25 se observa la distribución de los principales xenobióticos cuantificados en las muestras maternas por departamentos de la provincia. En esta descripción se tuvieron en cuenta sólo aquellos departamentos con al menos tres muestras analizadas. En este caso, tampoco se hallaron diferencias significativas entre los departamentos ($p > 0,05$, Test Kruskal Wallis).

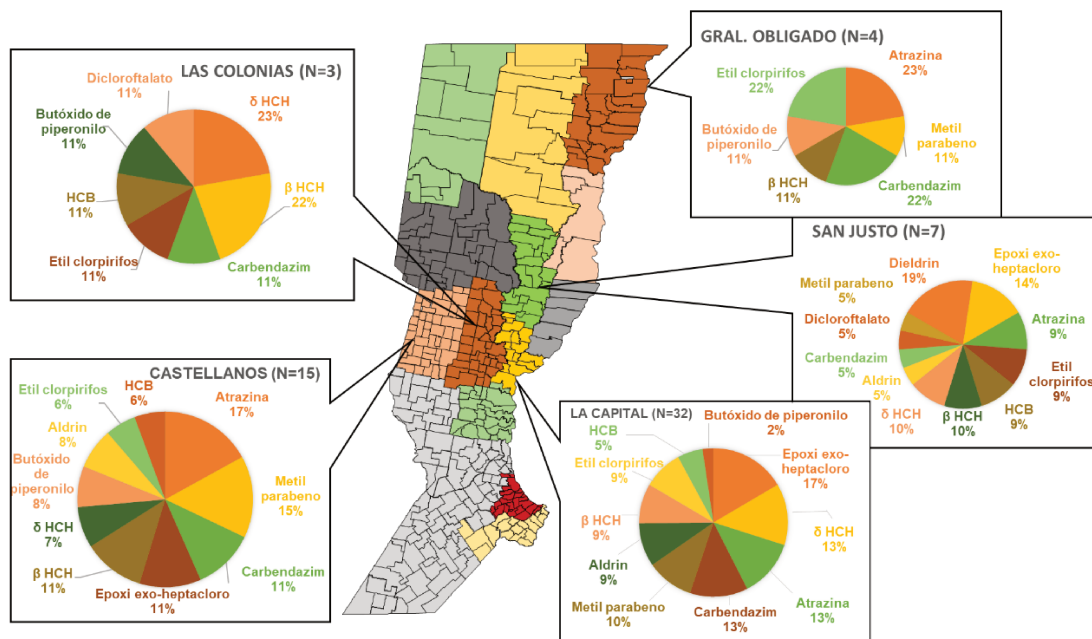


Figura 25. Distribución de los compuestos cuantificados en muestras maternas a lo largo de la provincia de Santa Fe, por departamentos. Fuente: elaboración propia.

10.4 Evaluación del daño genotóxico por biomarcadores de efecto

10.4.1 Ensayo cometa alcalino y modificado con Endonucleasa III.

Se analizaron 277 muestras para el ensayo cometa, en el cual, los valores medios de sus variables fueron: cometa alcalino: $134 \pm 23,24$; cometa con Endo III: $150,87 \pm 23,16$, y Sitios Endo: $16,14 \pm 11,47$.

Al compararse entre los distintos grupos de participantes, las mujeres provenientes de las zonas urbanas mostraron valores de Sitios Endo significativamente superiores a las de la zona rural ($p = 0,03$, Test U Mann Whitney), mientras que, entre los casos y controles, no se observaron diferencias significativas (Tabla 10).

Teniendo en cuenta los hábitos higiénico dietarios, no se halló diferencia significativa entre aquellas que declararon haber consumido frutas y verduras, y ácido fólico en el primer trimestre del embarazo, fumado o ingerido alcohol y las que no lo hacían ($p > 0,05$, Test U Mann Whitney, y $p > 0,05$ Test t de Student).

Respecto a las variables de salud materna, tampoco se observó diferencia significativa entre aquellas que presentaban alguna ECNT (como HTA o DM) y las que no ($p>0,05$, Test U Mann Whitney, y $p>0,05$ Test t de Student).

No se observó correlación entre la edad materna y las variables del EC ($p>0,05$, Test de Spearman), y al evaluar el comportamiento de este biomarcador con las concentraciones de ácido fólico y Hcy detectadas en las muestras evaluadas, sólo los Sitios Endo mostraron una correlación negativa con la concentración de Hcy ($\rho: -0,337^*$, $p=0,21$, Test de Spearman).

10.4.2 Ensayo Citoma

En cuanto al ensayo citoma, se analizaron 177 muestras, en las cuales los valores encontrados para cada variable fueron: MNMO/1000MO= $5,81 \pm 6,08$; MNBN/1000BN= $8,16 \pm 11,11$; NBUD/1000BN= $1,85 \pm 4,11$; NPB/1000 BN= $0,99 \pm 4,30$; NDI= $1,58 \pm 0,20$.

El grupo control mostró valores de MNBN/1000BN estadísticamente superiores a los casos ($p=0,04$, Test U Mann Whitney). Para las demás variables del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, como se puede observar en la Tabla 10.

Se evaluaron además teniendo en cuenta la clasificación de las AC, y no mostraron diferencias entre ellas (MNMO/1000MO $p=0,66$; MNBN/1000BN $p=0,13$; NBUD/1000BN $p=0,55$; NPB/1000BN $p=0,72$; NDI $p=0,20$; Test de Kruskal Wallis).

Por otro lado, los valores de las variables tampoco fueron significativamente diferentes cuando se compararon entre los departamentos provinciales (MNMO/1000MO $p=0,18$; MNBN/1000BN $p=0,24$; NBUD/1000BN $p=0,25$; NPB/1000BN $p=0,32$; NDI $p=0,15$; Test de Kruskal Wallis).

Teniendo en cuenta las variables de los hábitos higiénico-dietarios, no se halló diferencia significativa entre las madres que consumieron frutas y verduras, alcohol y fumaron en el primer trimestre de embarazo, y las que no ($p>0,05$, Test U Mann Whitney). Tampoco se observó diferencia en las variables entre aquellas que presentaban HTA y DM y las que no ($p>0,05$, Test U Mann Whitney).

La edad se correlacionó positivamente con la variable de NDI ($\rho=0,459^*$, $p=0,42$, Test de Spearman), mientras que las concentraciones halladas de ácido fólico y Hcy no mostraron correlación con las demás variables del ensayo citoma ($p>0,05$, Test de Spearman). Finalmente, tampoco se encontró correlación alguna entre las variables del EC y las de MNBC ($p>0,05$, Test de Spearman).

Tabla 10. Valores de las variables del ensayo cometa y citoma, por casos y controles, y por lugar de residencia materno. Valores expresados como media $\pm$ E.E. ($p < 0,05$, Test U Mann Whitney).

Biomarcadores de genotoxicidad	POR DIAGNÓSTICO			POR LUGAR DE RESIDENCIA		
	CASO	CONTROL	p	RURAL	URBANO	p
Ensayo Cometa (N=277)						
Alcalino	137,73 $\pm$ 3,33	133,86 $\pm$ 1,52	0,44	135,95 $\pm$ 1,76	132,8 $\pm$ 2,29	0,15
Con Endonucleasa III	154,27 $\pm$ 3,23	149,88 $\pm$ 1,53	0,19	151,03 $\pm$ 1,66	150,61 $\pm$ 2,45	0,46
Sitios Endo	16,55 $\pm$ 1,47	16,03 $\pm$ 0,78	0,77	15,08 $\pm$ 0,85	17,81 $\pm$ 1,15	0,03*
Ensayo Citoma (N=177)						
MNMO/ 1000MO	5,04 $\pm$ 0,96	6,01 $\pm$ 0,52	0,37	5,51 $\pm$ 0,59	6,3 $\pm$ 0,71	0,24
MNBN/1000BN	6,49 $\pm$ 2,11	8,6 $\pm$ 0,9	0,04*	8,57 $\pm$ 1,23	7,46 $\pm$ 0,87	0,28
NBUD/ 1000BN	1,98 $\pm$ 1,09	1,81 $\pm$ 0,27	0,21	2,17 $\pm$ 0,46	1,3 $\pm$ 0,28	0,43
NPB/ 1000BN	0,96 $\pm$ 0,45	1 $\pm$ 0,39	0,86	1 $\pm$ 0,47	0,99 $\pm$ 0,35	0,19
NDI	1,58 $\pm$ 0,03	1,58 $\pm$ 0,02	0,87	1,59 $\pm$ 0,02	1,56 $\pm$ 0,03	0,39

10.5 Determinación de marcadores bioquímicos

Se analizaron 50 muestras, 24 de madres de casos y 26 de controles. El 90% de ellas había reconocido, al momento de ser entrevistadas, el consumo de frutas y verduras antes del embarazo, y el 96% durante el primer trimestre.

La concentración media de ácido fólico fue de 7,17 $\pm$ 2,66 ng/mL, y la de Hcy fue 7,74 $\pm$ 2,36 μ mol/L. Solo 2 de las pacientes evaluadas presentaron valores de ácido fólico inferiores a los de referencia, y ambas eran madres de niños casos. Ninguna de ellas presentó valores de Hcy mayores al rango de referencia. En la Tabla 11 se describen las concentraciones por grupo poblacional. No se observó diferencia significativa en las concentraciones medias entre los grupos evaluados (t de Student).

Tabla 11. Concentraciones de ácido fólico y homocisteína por grupo poblacional ($\bar{x} \pm DS$).

Analito	Casos	Controles	p	Urbanas	Rurales	p
Ácido fólico (ng/L)	6,94 $\pm$ 2,68	7,39 $\pm$ 2,68	0,55	6,57 $\pm$ 2,64	7,65 $\pm$ 2,64	0,15
Homocisteína (μ mol/L)	7,18 $\pm$ 2,23	8,26 $\pm$ 2,40	0,10	8,18 $\pm$ 2,70	7,40 $\pm$ 2,04	0,24

Se realizó un análisis de correlaciones entre las variables de las concentraciones de ácido fólico y Hcy, tanto con las variables del EC, como con las del ensayo citoma y no se observaron correlaciones entre ellas ($p > 0,05$, Test de Spearman y Test de Pearson, según correspondiera).

10.6 Determinación de correlación entre la presencia de analitos ambientales y daño genotóxico.

Por un lado, se analizó la correlación entre las variables de los biomarcadores de exposición (cantidad de xenobióticos cuantificados por muestra), y los de efecto (variables del EC y Citoma), y se halló una correlación positiva entre la cantidad de xenobióticos, y las variables del ensayo citoma: MNMO/1000MO, MNBN/1000BN y NPB/1000BN; y una correlación negativa con el NDI, como se muestra en la Figura 26. El ensayo cometa solo mostró correlación negativa entre la variable cometa alcalino y la cantidad de xenobióticos cuantificados ($\rho = -0,311$, $p = 0,008$, Test de Spearman).

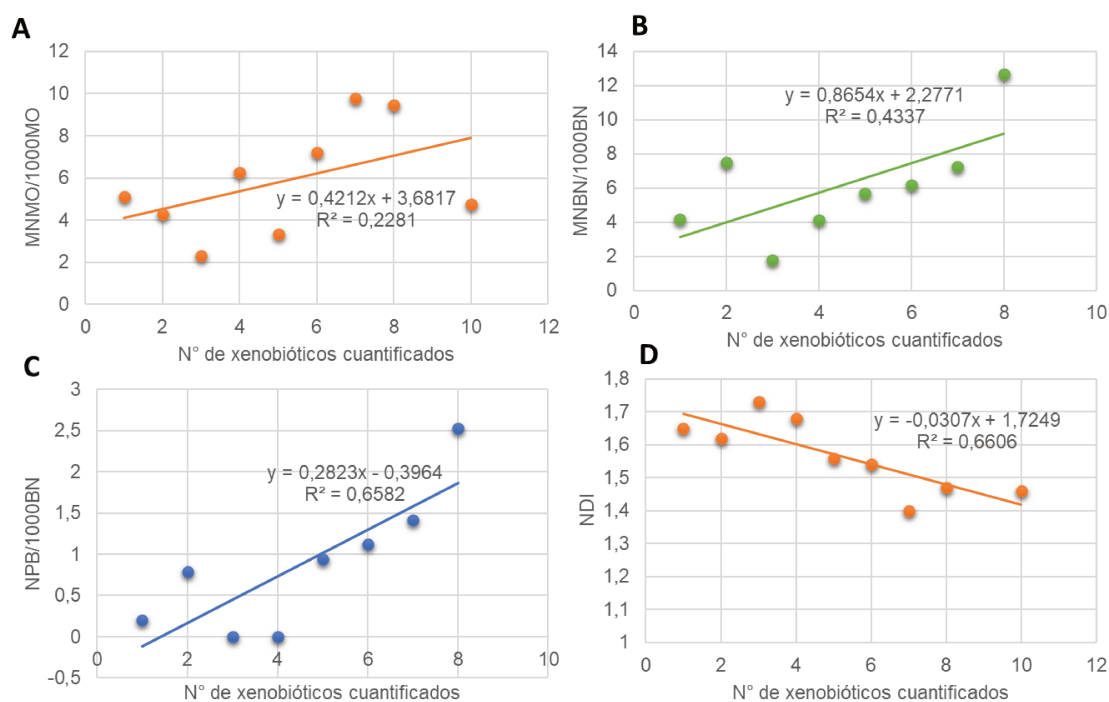


Figura 26. Correlaciones entre la cantidad de xenobióticos cuantificados por muestra y las variables del ensayo citoma. A) C. de Spearman ($\rho = 0,301^*$, $p = 0,010$); B) $\rho = 0,292^*$, $p = 0,013$; C) $\rho = 0,232^*$, $p = 0,049$; D) $\rho = -0,369^{**}$, $p = 0,001$.

Por otro lado, se analizaron las correlaciones entre las variables de cometa y citoma con las concentraciones de los xenobióticos cuantificados. En las Tablas 12 y 13, respectivamente, se pueden observar aquellos compuestos con los que se observó correlación, entre los que se destacan especialmente los plaguicidas OC.

Tabla 12. Correlación entre las variables del ensayo cometa y las concentraciones de los xenobióticos cuantificados en las muestras maternas.

Concentración de Xenobióticos	Cometa alcalino			Cometa Endo III			Sitios Endo		
	Rho	p	N	Rho	p	N	Rho	p	N
HCB	-0,215	0,079	68	-0,29	0,02	68	-0,171	0,163	68
β-HCH	0,354**	0,003	68	0,326*	0,01	68	-0,164	0,180	68
δ-HCH	-0,283	0,02	68	-0,086	0,488	68	0,194	0,112	68
Lindano	-0,077	0,533	68	-0,005	0,968	68	0,141	0,251	68
Heptacloro	-0,128	0,299	68	-0,178	0,148	68	-0,146	0,233	68
Epóxido de exo-heptacloro	0,015	0,905	68	0,086	0,487	68	-0,061	0,620	68
Epóxido de endo-heptacloro	0,19	0,121	68	0,149	0,224	68	-0,190	0,121	68
Aldrin	-0,216	0,77	68	-0,26*	0,03	68	-0,002	0,986	68
Dieldrin	-0,208	0,088	68	-0,25*	0,04	68	0,013	0,916	68
α Clordano	-0,142	0,247	68	-0,215	0,078	68	-0,022	0,859	68
α Endosulfan	-0,078	0,528	68	-0,100	0,419	68	0,053	0,668	68
p,p'-DDT	-0,102	0,409	68	-0,106	0,389	68	0,133	0,280	68
p,p'-DDD	0,109	0,374	68	0,081	0,513	68	-0,188	0,124	68
p,p'-DDE	0,059	0,635	68	0,113	0,360	68	-0,021	0,865	68
Carbendazim	-0,194	0,152	56	-0,042	0,759	56	0,297*	0,03	56
Dimetoato	-0,134	0,325	56	0,047	0,731	56	0,283*	0,03	56

En el caso de las variables del MNBC se observa que las concentraciones de metil clorpirifos se correlacionaron positivamente con MNMO/1000MO, MNBN/1000BN y NPB/1000BN, pero negativamente (al igual que todos los demás pesticidas), con el NDI.

Tabla 13. Correlación entre las variables del MNBC y las concentraciones de los xenobióticos cuantificados en las muestras maternas.

Concentración de Xenobioticos	MNMO/1000MO			MNBN/1000BN			NPB/1000BN			NDI		
	Rho	p	N	Rho	p	N	Rho	p	N	Rho	p	N
HCB	0,350**	0,003	68	0,341**	0,004	68	0,193	0,115	68	-0,227	0,062	68
β-HCH	-0,29	0,02	68	-0,397**	0,001	68	-0,176	0,151	68	0,013	0,915	68
δ-HCH	0,25	0,04	68	0,250*	0,040	68	0,190	0,122	68	-0,314**	0,009	68
Lindano	0,167	0,173	68	0,245*	0,044	68	0,209	0,086	68	-0,165	0,180	68
Epóxido de exo-heptacloro	0,205	0,093	68	0,193	0,115	68	0,269*	0,027	68	-0,278*	0,022	68
Metil clorpirifos	0,254	0,04	68	0,489**	0,000	68	0,651**	0,000	68	-0,553**	0,000	68
Butóxido de piperonilo	-0,288	0,053	46	-0,396**	0,006	46	-0,127	0,399	46	0,211	0,160	46

A partir de la colinealidad mostrada por las variables del ensayo citoma, se realizó una regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS), estandarizando las variables, teniendo en cuenta como variables predictoras las concentraciones de los xenobióticos con mayor frecuencia de cuantificación en las muestras; como variables de respuesta, las representativas de los ensayos cometa (Sitios Endo), citoma (MNBN/1000BN y MNMO/1000MO), y factores sociodemográficos (% de NBI); y como variables de clasificación, por un lado los distintos tipos de AC, y por otro los departamentos provinciales de origen de las participantes, como se puede ver en las Figuras 27 y 28, respectivamente.

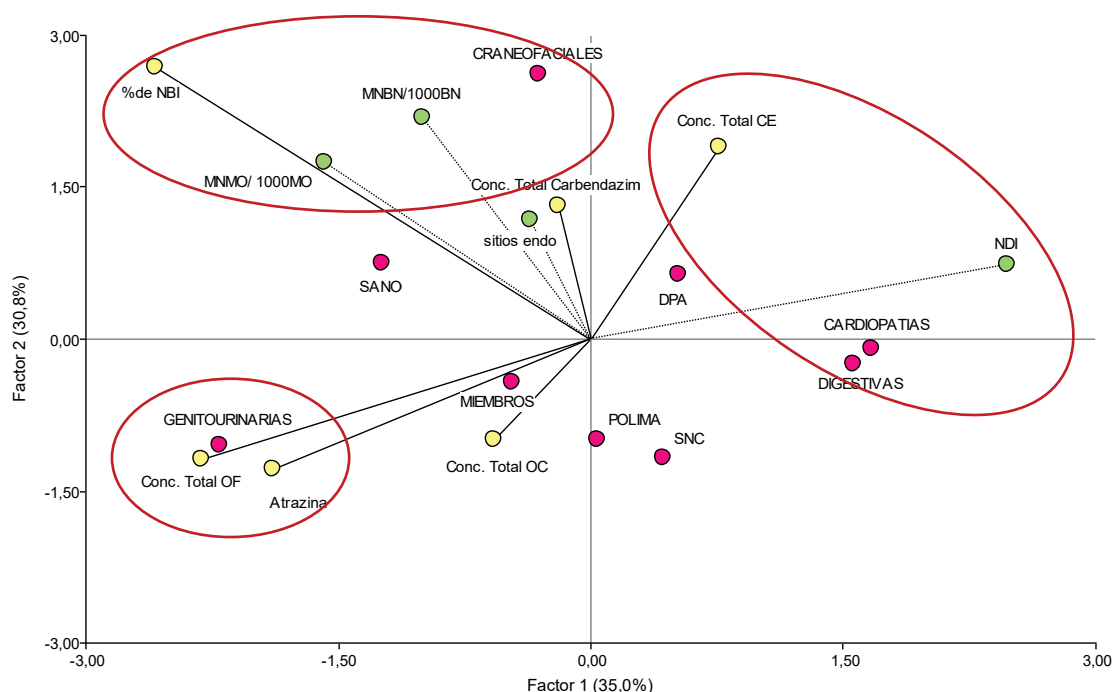


Figura 27. Triplot de la correlación entre una matriz de interacción entre cuatro variables de biomarcadores de genotoxicidad (MNMO/1000MO, MNBN/1000BN, NDI y Sitios Endo), y nueve tipos de AC vs. una matriz de cinco variables de biomarcadores de exposición (Concentración total de ATZ, OC, OF, CE y CBZ), y una sociodemográfica (% NBI).

En el cuadrante superior derecho se observa una asociación entre la concentración total de CE, y la variable NDI del ensayo citoma, para las cardiopatías y las AC digestivas, donde ambos biomarcadores mostraron niveles superiores respecto a los demás tipos de AC.

En los cuadrantes inferiores se muestran las altas concentraciones totales halladas de OF y ATZ en las madres de niños con anomalías genitourinarias, pero sin una aparente asociación con ninguna de las variables dependientes (biomarcadores de genotoxicidad). Finalmente, en el cuadrante superior izquierdo, se podría notar una

asociación entre las variables del ensayo citoma (MNMO/1000 MO y MNBN/1000BN), y el % de NBI, en el caso de las anomalías craneofaciales, y una correlación positiva entre los Sitios Endo y los MNBN/1000BN ($\rho=0,184^*$, $p=0,015$, Test de Spearman).

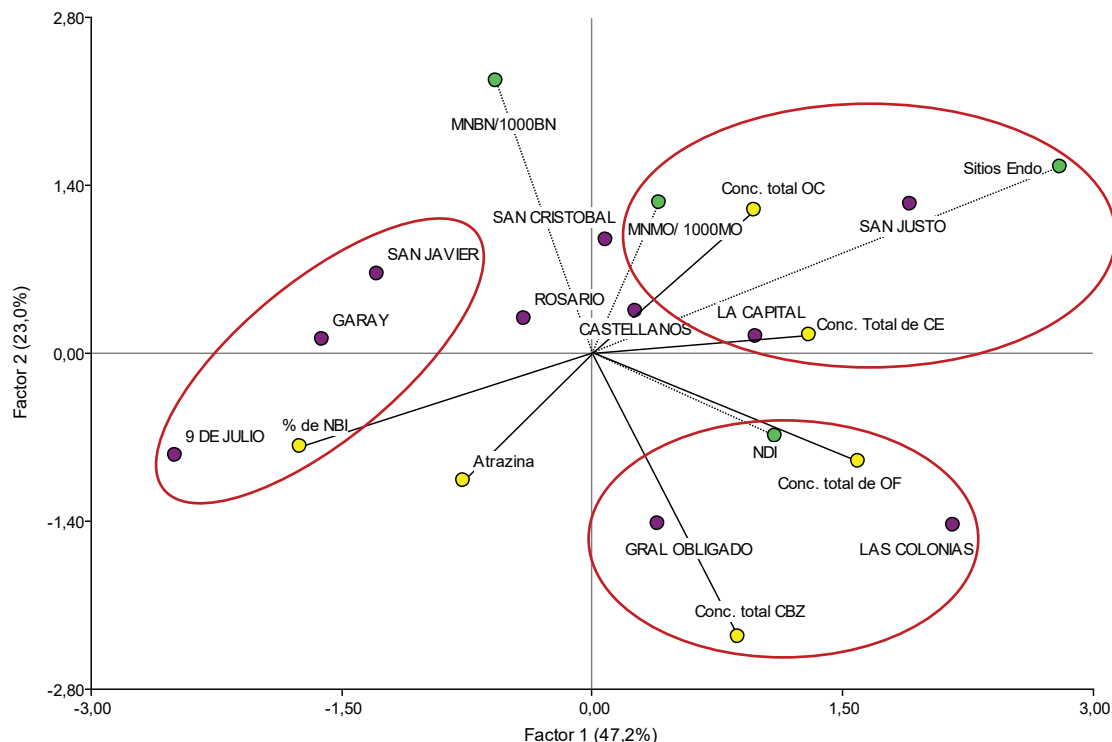


Figura 28. Triplot de la asociación entre una matriz de interacción entre cuatro variables de los biomarcadores de genotoxicidad (MNMO/1000MO, MNBN/1000BN, NDI y Sitios Endo) y diez departamentos, vs una matriz de cinco variables de biomarcadores de exposición (Concentración total de ATZ, OC, OF, CE y CBZ), y una sociodemográfica (% de NBI).

En este análisis de PLS se puede observar, en los cuadrantes de la izquierda, una asociación entre la variable predictora % de NBI y los Dptos. Garay, San Javier, y 9 de Julio. En el cuadrante superior derecho, se observa asociación entre las variables de los biomarcadores de exposición (concentración total de OC y CE) y los de genotoxicidad (Sitios Endo, y MNMO/1000MO), para los departamentos La Capital, y San Justo. En los cuadrantes inferiores se observa asociación entre las concentraciones totales de CBZ y OF, con la variable NDI del ensayo citoma, para los departamentos Gral. Obligado y Las Colonias, donde las concentraciones de dichos pesticidas fueron altas.

11. Discusión

11.1 Descripción de la prevalencia de AC relacionadas con factores de exposición ambiental maternos en la provincia de Santa Fe.

Teniendo en cuenta los reportes de la RENAC para los años 2018, 2019 y 2021 (Barbero et al., 2019, 2020, 2022), los casos reportados con mayor frecuencia fueron las cromosomopatías (todos los años), seguido por las fisuras orales en 2018 y 2019, y las cardiopatías en 2021, y en tercer lugar las cardiopatías en 2018, y las del SNC en 2019 y 2021. En este trabajo, durante los tres años registrados, los casos más prevalentes fueron polimalformados, seguidos de los SNC, y en las mismas proporciones anomalías de miembros, craneofaciales y defectos de la pared abdominal. Si bien las cardiopatías son una de las AC más frecuentes en Argentina, con unos 7000 nacimientos al año (Ministerio de Salud de la Nación, 2022), los datos hallados revelaron una prevalencia mucho menor, probablemente debido a que estos casos suelen ser muy graves, y son derivados a hospitales de mayor complejidad para intervenir al recién nacido inmediatamente, por lo que las madres no estaban disponibles para la entrevista. Alrededor del 50% de estos niños requieren cirugía en el primer año de vida, y dos terceras partes son solucionables con diagnóstico y tratamiento oportuno (Ministerio de Salud de la Nación, 2022). De hecho, un estudio realizado en colaboración con el servicio de neonatología del Hospital de Niños “Dr. O. Alassia” de la ciudad de Santa Fe, mostró que en el período febrero 2021 a enero 2022, el 12,68% de los ingresos en el servicio presentaron alguna AC, y de ellas, el 27% (su mayoría) eran cardiopatías (Colussi & López, 2022).

En cuanto a la distribución de las AC relevadas en esta tesis, en los distintos departamentos de la provincia, es interesante destacar que las anomalías genitourinarias, correspondieron a más del 10% de las registradas en el departamento Castellanos. Los recién nacidos con polimalformaciones fueron los de mayor prevalencia en los departamentos La Capital y Castellanos, pero también se registraron casos en Gral. Obligado, San Javier, 9 de Julio y Las Colonias. El estudio realizado con el Hospital de Niños, mostró que en los Dptos. Las Colonias y Castellanos, el 33% de las malformaciones fueron del tracto urogenital, coincidentemente con las halladas en esta tesis para esos departamentos (Colussi & López, 2022).

Un estudio de casos y controles en EEUU, a partir del Registro de Defectos Congénitos de Texas (con más de 16000 pacientes), demostró que varios defectos de nacimiento eran menos frecuentes en los condados rurales, lo que sugiere que las

características de los entornos urbanos pueden ser relevantes para sus etiologías, diagnóstico o vigilancia (Benavides et al., 2022).

11.2 Evaluación de factores de riesgos maternos y ambientales

En cuanto a los factores sociodemográficos maternos, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos de las madres de niños con y sin AC (casos y controles), no solo al considerar la edad materna, sino también el lugar de residencia, demostrando la homogeneidad de la población participante, en relación a dichos factores.

Los eventos ginecológicos revelaron diferentes asociaciones entre las AC y el parto prematuro, así como con la cirugía cesárea, como también ya fue descrito en un estudio realizado en Brasil (Freitas et al., 2021). En Argentina, en 2019, sobre un total de 625.441 nacidos vivos, 55.709 nacieron antes de las 37 semanas, lo que representa una tasa de prematuridad del 8,9%. A lo largo de la última década, se ha observado un incremento en dicha tasa de más del 10%. Los factores que podrían explicar este aumento de frecuencia a nivel global son múltiples. Algunos están relacionados con vulnerabilidad social, violencia, estrés laboral, físico y psíquico, tabaquismo, alcoholismo o consumo problemático de sustancias. Otros, con los extremos de la edad fértil (adolescencia y edad materna avanzada), y la morbilidad que conllevan (hipertensión, diabetes y preeclampsia), o con un aumento del número de tratamientos de fertilidad asistida (con el consecuente incremento de los embarazos múltiples). En algunas ocasiones, ciertas conductas obstétricas –como partos inducidos y cesáreas electivas antes del término del embarazo– también contribuyen al aumento de la prematuridad (Goldstein & Gorenstein, 2021). En este punto, es importante resaltar que esta alta prevalencia de nacimientos prematuros podría dar lugar a una generación de adultos que poseen un amplio espectro de riesgos para la salud a largo plazo, asociados con su prematuridad, incluido el síndrome metabólico, la hipertensión (Markopoulou et al., 2019), la DM (Crump et al., 2020), la función pulmonar reducida y problemas psiquiátricos (Raju et al., 2017).

Por otro lado, cuando se consideró el tipo de parto, hubo una asociación no solo entre las AC y las cesáreas, sino también entre éstas, y el lugar de residencia materno. En el primer caso, podría indicar atención prenatal y un diagnóstico previo, lo que llevó a programar el parto, especialmente en los casos con AC, para disminuir cualquier factor de riesgo tanto para la madre como para el bebé, según el criterio médico. En este sentido, en un estudio multicéntrico en países de América Latina, incluida Argentina, se encontró una asociación entre la cesárea y las zonas rurales, y la alta prevalencia general de este tipo de partos (Valladares & Zavaleta, 2006), en el que se describieron tasas crecientes de cesárea, tanto por conveniencia médica como por solicitud materna

(Ceriani Cernadas, 2019; Harrison et al., 2021). Este procedimiento, sin estricta recomendación médica, no está recomendado por la Organización Mundial de la Salud, dado que las tasas de cesárea superiores al 10%, no se asocian con reducción de las tasas de mortalidad materna y neonatal (Betran et al., 2015). El Sistema Informático Perinatal registró 34,7% de cesáreas en Argentina y 36% en Santa Fe en 2017 (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2018). Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis son superiores (51%), a los registros anteriormente citados, y ello puede deberse por un lado al tipo de muestreo (relación 1:4 caso:control), y por otro lado a los altos porcentajes de prematurez. En el primer caso, porque más del 70% de las madres de niños con AC y más del 50% de aquellas de niños sanos, recurrieron a la cesárea; y por otro lado, porque más del 70% de los niños prematuros nacieron por cesárea.

Las estadísticas argentinas sobre el bajo peso al nacer de los recién nacidos han descripto que el 7,3% de los nacimientos fueron menores de 2500 g y dos tercios de ellos fueron prematuros (Beltrame et al., 2017). Los registros de las historias clínicas analizadas documentan que más del 30% de los recién nacidos tuvieron bajo peso al nacer. Esto puede estar relacionado con las AC incluidas, como fue reportado en otro estudio realizado en Brasil (Vanassi et al., 2022). Por otra parte, más de la mitad de los datos registrados en este trabajo provienen de zonas rurales, mostrando que aún existen diferencias en cuanto a la atención de la salud y la accesibilidad al sistema sanitario entre las grandes ciudades como Santa Fe y Rosario, y otras ciudades y localidades más pequeñas de la provincia (Gobierno de Santa Fe, 2011).

En cuanto al estado de salud, es bien sabido que la diabetes pregestacional aumenta el riesgo de AC no cromosómicas específicas y múltiples (Schraw et al., 2021). En este trabajo, más de un tercio de la población participante tiene alguna ECNT. La asociación entre madres diabéticas y casos de AC es sutil, pero asociaciones similares ya fueron descriptas en estudios previos en Cuba (Santos et al., 2016), Argentina (Lapertosa et al., 2020), y EE. UU. (Tinker et al., 2021). En Argentina, casi el 10% de los embarazos se ven afectados por aumento de la glucosa en ayunas, lo que conlleva a un incremento de la prevalencia de DM gestacional (DMG) (Lapertosa et al., 2020).

Es importante señalar que poco más de la mitad de las madres tuvieron su primer control de embarazo durante el primer trimestre, proporción superior a la registrada en Argentina y en la provincia de Santa Fe por el Ministerio de Salud (Guevel et al., 2019). Esta consulta es muy importante para asesorar a las mujeres, y detectar posibles hábitos de riesgo a evitar durante este período susceptible. Por eso, un retraso en la primera consulta podría demorar el asesoramiento médico y el acompañamiento a las madres en su nueva etapa de vida. La encuesta mostró cómo esos hábitos presentan diferentes patrones de comportamiento a medida que transcurre la gestación. En este

sentido, la diferencia en la frecuencia de ingesta de ácido fólico entre antes del período de gestación y el primer trimestre, podría evidenciar no solo un diagnóstico tardío de embarazo o embarazos no planificados, sino también la ausencia de consejería preconcepcional para conocer la importancia del ácido fólico para un óptimo embarazo. Según datos del Ministerio de Salud, los embarazos no planeados llegan al 59,3% en Argentina y al 52,6% en la provincia de Santa Fe a pesar de la alta frecuencia (94,7%) de consejería en salud sexual y reproductiva declarada por el Ministerio de Salud (Guevel et al., 2020).

Por otro lado, según los datos recabados en las encuestas, mientras la ingesta de alcohol, el tabaquismo activo y el consumo de drogas disminuyeron desde el período previo al embarazo hasta el último trimestre del mismo, el tabaquismo pasivo se mantuvo constante en la mitad de las pacientes, quizás por una falta de percepción del riesgo de los efectos nocivos para la salud materno-fetal. Por otro lado, considerando el consumo de tabaco, no existe un nivel o trimestre seguro para el tabaquismo materno durante el embarazo (Id et al., 2020). Fauci et al., (2020) encontró que el 14% de las mujeres embarazadas continuaban fumando a pesar de su embarazo, coincidente con los datos registrados en esta tesis.

Las encuestas revelaron que, aun cuando la frecuencia de consumo de alcohol disminuyó a medida que se desarrollaba el embarazo, más del 15% de las pacientes mantuvieron el hábito hasta el final de la gestación. En este sentido, otros estudios encontraron asociación entre el consumo periconcepcional de alcohol y defectos de la pared abdominal como son las hernias diafragmáticas (Schulz et al., 2021), como así también con anomalías craneofaciales (Everson et al., 2020).

El uso combinado de alcohol y tabaco no solo expone a los fetos a un riesgo de adversidades perinatales, sino también puede retrasar el desarrollo motor y cognitivo (Negrão et al., 2020).

El bajísimo porcentaje de consumo de drogas ilícitas declarado en las encuestas, podría deberse al temor que genera revelar su uso debido a su prohibición en el país. En este sentido, estudios describen cómo los cannabinoides pueden exacerbar el efecto teratogénico del alcohol y producir anomalías craneofaciales y del SNC (Fish et al., 2019; Everson et al., 2020).

A diferencia de otros factores de riesgo, se observó que el uso de medicamentos aumentó a medida que avanzaba la gestación. Previamente, ya se ha descripto que, mujeres que tuvieron tres o más problemas de salud durante el embarazo, habían manifestado un uso más frecuente de medicamentos (Lutz et al., 2020).

Por todo esto, las campañas de educación en salud enfocadas en incentivar y apoyar a las mujeres para que abandonen hábitos nocivos, representan un desafío actual de

salud pública en Argentina, y son necesarias para mejorar la conciencia de los factores de riesgo a los que pueden estar expuestas las mujeres, especialmente aquellas en edad reproductiva.

Respecto a las infecciones durante el embarazo, una amplia revisión sobre la prevalencia mundial de toxoplasmosis crónica en embarazadas, mostró que en América del Sur dicha frecuencia es del 56,2% (Rostami et al., 2020). La prevalencia de dicha infección, recabada a partir de los datos de las historias clínicas, alcanzó el 45%, inferior a lo reportado para Sudamérica. Parte de la información sobre enfermedades infecciosas durante el embarazo, no pudo ser incluida en el estudio debido a historias clínicas incompletas o a gestaciones no controladas. Rivera et al. (2019), mostraron que la seroprevalencia de toxoplasmosis en mujeres gestantes era significativamente diferente entre las zonas urbanas (26,8%) y rurales (36,4%) en Chascomús (Argentina).

En las últimas dos décadas, la creciente evidencia epidemiológica sugiere que la exposición ambiental a material particulado y plaguicidas durante el embarazo, se asocia con nacimientos pretérmino y bajo peso al nacer (Kalliora et al., 2018; Liu et al., 2019). Además de éstos, las AC también contribuyen en gran medida a la mortalidad infantil, así como a la morbilidad infantil y adulta (Liu et al., 2019).

11.3 Determinación de la presencia de analitos de sustancias xenobióticas en las muestras maternas.

Tal como se observó en los resultados, el xenobiótico con mayor frecuencia de cuantificación y concentración hallada, fue el acetaminofeno, un antiinflamatorio no esteroideo. Esto no es un hecho casual, ya que muchas de las participantes del estudio estaban aún internadas, cursando el período de puerperio temprano, en el cual es muy común la administración de analgésicos para disminuir los dolores propios del postparto (Thiele et al., 2013).

Respecto a los demás compuestos encontrados, es interesante destacar la mezcla de plaguicidas detectados y cuantificados, como carbofuran, aldrin, dieldrin, heptacloro, α clordano, α endosulfan, β -HCH, δ -HCH, metil y etil clorpirifos, lindano, HCB, dicloro ftalato, en más del 90% del subgrupo de muestras que se analizó, lo que hace que la evaluación de los factores de riesgo y posibles fuentes de ingreso al organismo, sea mucho más complejo de determinar.

Varios de los compuestos encontrados son plaguicidas OC, ya prohibidos en el país, y otros OF, como metil y etil clorpirifos, cuya eliminación gradual de sus formulaciones fue establecida por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en 2021 (SENASA, 2021), y carbamatos de uso actual (Ministerio de Salud de la Nación, 2017).

En este sentido, la falta de diferencia significativa en la variedad de xenobióticos presentes entre casos y controles, ni entre aquellos de procedencia urbana y rural, mostró no solo la homogeneidad del muestreo, sino también la exposición indiscriminada a mezclas complejas de contaminantes ambientales (como bisfenol A, ftalatos, pesticidas y compuestos persistentes), cuyos efectos en la salud poblacional son impredecibles e incluyen efectos multigeneracionales (Rebuzzini et al., 2022).

Estos resultados obtenidos, permiten enfatizar la situación de riesgo sanitario en el que se encuentra la población santafesina y, particularmente las mujeres en edad fértil. Por un lado, debe tenerse en cuenta la salud materno-infantil y la posibilidad de transmisión placentaria de ciertos contaminantes, especialmente OC a la descendencia en cada embarazo (Barr et al., 2007), y por otro, la exposición postnatal de cada niño a través de la leche materna, como ya lo advierten numerosos estudios en Argentina (Parsehian, 2008; Ridolfi et al., 2014), China (Lu et al., 2015; Qi et al., 2022), y Europa (Jamnik et al., 2022).

Los factores que pueden influir en el nivel de contaminación con OC en humanos, depende principalmente de la exposición individual y la acumulación; y está afectado por el suelo y la polución del aire, la dieta, la duración de la exposición, la edad, y la habilidad de eliminación metabólica (Qi et al., 2022).

Si bien el objetivo del presente trabajo de tesis no fue la evaluación de la transmisión intergeneracional de los xenobióticos detectados y/o cuantificados, es importante resaltar que la alimentación es un factor importante, si se considera la lactancia materna (Lu et al., 2015). A pesar de la prohibición de los plaguicidas OC en nuestro país, y de que sería poco probable su incorporación reciente a través de los alimentos, no hay que perder de vista su capacidad de bioacumularse y persistir en el tejido adiposo de las madres durante un largo período de tiempo (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Los cambios hormonales y fisiológicos producidos durante el embarazo, puerperio y lactancia, podrían movilizar estos compuestos, generando potenciales riesgos en los lactantes (Qi et al., 2022). Por ello, la lactancia es, por un lado fuente de exposición a contaminantes medioambientales y, al mismo tiempo, contrarresta muchos de los efectos de estas exposiciones, ya que es el alimento más sano, seguro y menos contaminado del planeta en términos de seguridad alimentaria para la infancia (Ortega-García et al., 2021).

Por otra parte, se demostró la asociación entre la criptorquidia congénita y algunos OC persistentes (p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDT, HCH α , β y δ , HCB, α endosulfán) presente en la leche materna, que puede afectar negativamente el descenso testicular en los niños (Damgaard et al., 2006; Krysiak-Baltyn et al., 2012). Así mismo, se observó asociación positiva entre la mala calidad ambiental y DTN como

anencefalia y espina bífida, fisuras alveolo-palatinas y gastrosquisis (Krajewski et al., 2021). La exposición ocupacional materna a insecticidas, herbicidas y fungicidas fue asociada con ciertos tipos de cardiopatías como la comunicación interauricular, estenosis pulmonar y tetralogía de Fallot (Rocheleau et al., 2015).

En 1971, un estudio argentino ya detectaba niveles de plaguicidas OC como β -HCH, Lindano, dieldrin, p,p'-DDE y p,p'-DDT, tanto en personas no expuestas ocupacionalmente, como en madres puérperas y sus recién nacidos, en las provincias de Salta, Catamarca y Buenos Aires (Radomski et al., 1971). En distintos trabajos realizados en el CENATOXA-UBA, tanto en población adulta no expuesta, como en pediátrica de Argentina, los plaguicidas más frecuentemente detectados fueron los OC, del grupo del DDT, HCB, el grupo HCH y heptacloro y sus epóxidos, con valores de concentración máximos para p,p'-DDD y o,p'-DDE de 9,87 y 8,05 ppb (Álvarez et al., 2006; Ridolfi et al., 2014). Los plaguicidas OC se usaron ampliamente antes que los contemporáneos, no persistentes, que incluyen los OF, los carbamatos, los PIR y las triazinas (Freire et al., 2017)

Argentina ratificó la Convención de Estocolmo que prohibió el uso de DDT, HCB y HCH en la agricultura desde finales de 1990, tanto como instauró restricciones en los PCBs en 2001 (Barra et al., 2002), sin embargo los residuos de dichos pesticidas, continúan siendo hallados en numerosos estudios de biomonitorio humano en el país (Álvarez et al., 2006; Muñoz-de-Toro et al., 2006; Ridolfi et al., 2014; Hansen et al., 2017).

Debido a su uso intensivo, las madres estuvieron expuestas a OC, y ello puede ser confirmado por su detección en sangre, incluyendo algunos de sus metabolitos, como también ocurrió en la provincia de Córdoba, donde se demostró la presencia de p,p'-DDE, β -HCH, HCB, OF y PIR en habitantes de zonas circundantes a ex depósitos de agroquímicos y zonas productivas (Lucero et al., 2008; Filippi et al., 2021).

La concentración media de p,p'-DDE hallada en Córdoba (Lucero et al., 2008) fue casi el doble a la concentración máxima encontrada en el presente trabajo, mientras que la concentración media de β -HCH en Córdoba fue similar a la concentración máxima hallada en Santa Fe.

En otros trabajos realizados en Ushuaia y Salta, en mujeres puérperas, donde determinaron metabolitos de pesticidas OC, las concentraciones halladas de p,p'-DDE, p,p'-DDT, β -HCH fueron mayores en aquellas pacientes de Salta, que en las de Ushuaia (Bravo et al., 2017; Hansen et al., 2017), y en ambos casos fueron mayores a los detectados en esta tesis. Otro punto a tener en cuenta, es el hecho de que tanto las mujeres provenientes de zona rural, como urbana, presentaban niveles cuantificables de pesticidas, y que sorprendentemente, las concentraciones de aldrin y δ -HCH fueron

significativamente superiores para aquellas de zona urbana, respecto a las de zona rural, como también se describió en un estudio en España (Pérez-Carrascosa et al., 2022).

Comparado con estudios previos realizados en nuestro país, las concentraciones de los OC en las muestras sanguíneas de la población participante en el presente trabajo son menores y además se observa la aparición de nuevos plaguicidas actualmente en uso -como ATZ, CBZ y clorpirifos-, y también de otros compuestos clasificados como CE, como metil parabenos y dicloroftalatos.

En Argentina, se han encontrado residuos de ATZ en leche de vaca y agua subterránea (Urseler et al., 2022), así como clorpirifos, epoxiconazol, endosulfan (recientemente prohibido), cipermetrina y λ -cihalotrina, entre otros, en frutas y verduras de mercados locales de Buenos Aires (Mac Loughlin et al., 2018), y de Santa Fe (Maggioni et al., 2017). Un estudio escandinavo reveló la presencia de metil-azinfos, λ -cihalotrina, metil-tiofanato, imazalil, CBZ, y dicofol, en frutas argentinas importadas a los países nórdicos (Hjorth et al., 2011). Residuos de varios plaguicidas OF fueron encontrados en yerba mate (Pareja et al., 2015), y en miel de abejas, de diferentes provincias, incluida Santa Fe se hallaron residuos de OC (sulfato de endosulfan, metoxiclor), OF (metil clorpirifos, diazinon, dimetoato, disulfoton), carbamatos (cloprofan), y varios PIR y fungicidas (Medici et al., 2020). De hecho, un trabajo reciente realizado en varias granjas lecheras de la Región Pampeana (entre ellas, algunas santafesinas), cuantificó la presencia de ATZ en el 50% de las muestras de agua subterránea, en valores que rondaban los 0,07 a 1,40 $\mu\text{g/L}$, y en el 89% de las muestras de leche bovina. Más aun, los niveles de ATZ en el 44,4% de las muestras de agua y en el 11,1% de las muestras de leche, excedían los límites establecidos internacionalmente como seguros para el consumo humano (Urseler et al., 2022).

Un reciente estudio desarrollado en la vecina provincia de Córdoba, encontró concentraciones de ATZ en un rango de 0,14 a 1,26 ppb en aguas subterráneas (Urseler et al., 2022). Este herbicida también ha sido hallado, por otros autores, en otras matrices ambientales como agua de lluvia (Odetti et al., 2017), aguas superficiales (Regaldo et al., 2018) y suelos (Alonso et al., 2018), y fuentes alimentarias como leche de vaca (Urseler et al., 2022), frutas y verduras (Mac Loughlin et al., 2018). Un estudio con casos de malformaciones genitales masculinas aisladas y controles, con más de 16000 pacientes en EEUU, mostró asociación entre niveles medios y medios-bajos de exposición residencial materna a ATZ, y cada categoría de malformación genital masculina evaluada (Agopian et al., 2013).

Aunque múltiples estudios en todo el mundo, incluidos los realizados en América Latina y el Caribe, han demostrado que los plaguicidas tienen un impacto negativo en

la salud humana (Harari et al., 2010; Fortenberry et al., 2014; Handal et al., 2016; van Wendel de Joode et al., 2016; Kim et al., 2017), los sistemas de vigilancia y seguimiento en salud pública sobre el uso de plaguicidas, y las enfermedades asociadas, son extremadamente limitados en esta región (Wesseling et al., 2005).

Una amplia gama de productos de higiene de uso diario para el cuerpo y protectores solares, contienen niveles significativos de parabenos (Harley et al., 2016). El contacto diario de las embarazadas con estos compuestos, puede provocar exposiciones significativas y efectos adversos para la salud transgeneracional. Los efectos estrogénicos de los parabenos incluyen disminución en la duración de la gestación, efectos sobre el peso del recién nacido, y alteraciones en el sistema endocrino reproductivo en modelos animales relevantes, así como el inicio temprano de la pubertad (Wallace et al., 2016; Golestanzadeh et al., 2022).

El piperonil butóxido es utilizado como coadyuvante, por su conocido efecto sinérgico con PIR y carbamatos (Keane, 1999). Si bien prácticamente no se hallaron PIR en las muestras maternas, es interesante destacar la detección y cuantificación de su coadyuvante, en más del 26% de las muestras, lo que estaría indicando la potencial exposición de las mujeres a tales compuestos que, por su toxicocinética, pueden haber sido metabolizados y eliminados del torrente sanguíneo. Otros trabajos también han reportado su detección en sangre en trabajadores rurales de Egipto (Ammar et al., 2022), y en niños de 6 años en Canadá (Hardy et al., 2023).

En cuanto a la relación entre las AC y la exposición prenatal a contaminantes ambientales, entre ellos los pesticidas, estudios en otras partes del mundo sobre el clorpirifos y su efecto en el desarrollo embrionario, demostraron que la exposición continua durante el embarazo favorece la vía de la apoptosis, lo cual puede contribuir al aborto o a la concepción de embriones con trastornos teratogénicos (Vahabi Barzi et al., 2022).

En comparación con las áreas agrícolas, las áreas urbanas muestran una mayor detección de insecticidas y herbicidas en cuerpos de agua, tanto por el uso actual como por el pasado. Su utilización en el mantenimiento de bordes de caminos, espacios abiertos como plazas y parques y control de plagas, genera una exposición inadvertida a pesticidas (Meftaul et al., 2020). En esta tesis doctoral se obtuvieron resultados similares, donde mujeres oriundas de las áreas urbanas presentaron similares frecuencias de cuantificación de pesticidas respecto a las de zona rural. Benavides et al., (2022) encontraron una prevalencia más baja de defectos urogenitales en varones, como por ejemplo hipospadias, en condados rurales comparados con los urbanos.

En este sentido, a partir de una investigación que analizó el riesgo en la salud de la población rural, producto de la incorporación de agroquímicos en los cultivos de soja de la provincia de Santa Fe, para las campañas 2001/02 y 2010/11, se observó que el CBZ fue uno de los fungicidas más utilizados y el que mayor Coeficiente de Impacto Ambiental (EIQ, por sus siglas en inglés) posee (Nogar & Larsen, 2014), lo cual puede relacionarse con los resultados hallados en ésta tesis, donde casi la mitad de las muestras evaluadas presentaron niveles cuantificables de dicho compuesto. Por otro lado, en dicho estudio, al integrarse las variables para la evaluación de riesgo, se observó que los Dptos. 9 de Julio, San Javier y Garay fueron los que presentaron valores más bajos de riesgo, mientras que Gral. Obligado, Las Colonias, Castellanos y San Jerónimo, entre otros, fueron los que presentaron nivel de riesgo medio-alto, y en los que se habían registrado reclamos y denuncias importantes respecto a problemas de salud (Nogar & Larsen, 2014). Los resultados de dicha investigación concuerdan con los de la presente, donde se observa que los departamentos Garay, 9 de Julio y San Javier solo se asociaron a la variable % de NBI, y no a la presencia de altas concentraciones de plaguicidas en ellos, como sí ocurrió con Gral. Obligado y Las Colonias, por citar algunos. A su vez, en otro informe elaborado por la Cámara de Cereales de la provincia de Buenos Aires (Brihet, 2015), en la zona Santa Fe Norte (Dptos. Gral. Obligado, Vera, 9 de Julio, San Cristóbal y San Javier), para la campaña de soja 2012-13, se utilizaron 0,40 a 0,50 l/Ha de CBZ. En la zona Santa Fe Centro (Dptos. Castellanos, Las Colonias, La Capital, San Justo y Garay), el control de plagas se realizó con PIR, principalmente λ -cihalotrina, y con aplicaciones puntuales de fosforados, en general con clorpirifós. Las aplicaciones variaron en un rango de una a cinco, algunas de ellas en combinación con las de herbicidas (Brihet, 2015). Si bien estos datos son de varios años atrás, debido a que no se dispone de información más actualizada sobre las cantidades de plaguicidas utilizados en las distintas regiones de la provincia, se puede observar una relación con los tipos y cantidades de plaguicidas detectados y cuantificados en las muestras maternas, lo que confirma la continuidad del uso de estos pesticidas, en esos mismos departamentos.

El actual modelo agrícola argentino, con la continua y creciente utilización de plaguicidas, debería permitir un abordaje no solo desde una perspectiva socioeconómica, sino fundamentalmente desde una mirada sanitaria, ya que indefectiblemente plantea un problema relevante para la salud pública en términos actuales y a futuro. Estas exposiciones crónicas se consideran causas relevantes de morbilidad y mortalidad (WHO, 2022), siendo así determinantes importantes de los costos de atención médica para los sistemas de salud (Pérez-Carrascosa et al., 2022).

En este sentido, para proteger la salud de las poblaciones expuestas a plaguicidas, se han sugerido algunos medios como la promoción de estudios epidemiológicos de alta calidad con métodos estandarizados de evaluación de la exposición directa, el establecimiento de programas de biomonitoreo y vigilancia ambiental, y el desarrollo de políticas e intervenciones de prevención basadas en evidencia. Aun así, existe escasa información sobre el estado actual de la investigación de los efectos de los plaguicidas en la salud en la región de Latinoamérica (Zúñiga-Venegas et al., 2022).

Los estudios de biomonitoreo humano se han convertido en una herramienta relevante para evaluar dicha exposición (Yusa et al., 2015). Sin embargo, el análisis de contaminantes en matrices biológicas no es suficiente para evaluar los riesgos para la salud. Estos estudios, para que sean adecuados, necesitan seleccionar los biomarcadores más apropiados, que permitan la detección temprana tanto de los efectos adversos como del daño subclínico (Lionetto et al., 2019).

11.4 Evaluación del daño genotóxico por biomarcadores de efecto

El EC es uno de los métodos más utilizados en toxicología ambiental para evaluar el daño del ADN. Su modificación con la utilización de enzimas que permiten observar daño oxidativo al ADN en una amplia gama de tipos celulares, incluidos linfocitos, se utilizan ampliamente para monitorear la exposición humana a agentes genotóxicos como resultado de la ocupación, tratamiento de drogas, enfermedades o contaminación ambiental (Azqueta et al., 2009).

Los resultados hallados indican que solo la variable Sitios Endo, que permite la detección de roturas del ADN en bases pirimidínicas oxidadas (Staruchova et al., 2008), mostró valores significativamente superiores para las mujeres de procedencia urbana, respecto a las rurales. Considerando los grupos de casos y controles, ninguna de las variables de dicho ensayo mostró diferencia significativa. Se ha descrito que, algunos biomarcadores de estrés oxidativo fueron significativamente más altos en mujeres con embarazos afectados por defectos cardíacos congénitos, que en aquellas sin tales antecedentes (Hobbs et al., 2005).

La asociación del estrés oxidativo en el desarrollo de malformaciones congénitas del SNC también es cada vez más conocida. Pertenecen a los defectos de nacimiento comunes y uno de los más graves en los fetos. Numerosos estudios confirman la relación entre el desequilibrio oxidante-antioxidante y el desarrollo anormal del SNC. Así mismo, se ha demostrado el efecto negativo del estrés oxidativo sobre la diferenciación celular y el desarrollo de tal sistema (Sakai & Trainor, 2016; Cim et al., 2018), y en cardiopatías (Mukhopadhyay et al., 2015). Por un lado, según el grado de daño del ADN, se produjo la muerte fetal o el desarrollo anormal craneofacial, y el agente causal de las

malformaciones craneofaciales fueron los altos niveles de ROS (Sakai & Trainor, 2016). Por el otro, luego de investigar en recién nacidos con y sin cardiopatías congénitas, en éstos primeros se encontraron niveles elevados de los biomarcadores de estrés oxidativo, y reducidos niveles de antioxidantes (Mukhopadhyay et al., 2015).

Las ROS desempeñan un papel importante en la regulación de la señalización celular y la expresión genética. Por lo que el estrés oxidativo está indiscutiblemente relacionado con anomalías, tanto en la madre embarazada como en el desarrollo fetal. Sin embargo, aún no es posible establecer y confirmar con claridad que sea el factor causal, debido a la falta de conocimiento de un mecanismo de acción específico (Toboła-Wróbel et al., 2020).

En cuanto al MNBC, el grupo control mostró valores estadísticamente superiores a los casos, para la variable MNBN/1000 BN, sin evidencia de otra diferencia significativa entre grupos para las demás variables.

Si bien en el proyecto micronúcleo humano (HUMN, por sus siglas en inglés), con la inclusión de información de más de 7000 individuos describió una evaluación robusta sobre el aumento de MN relacionado con la edad, los resultados obtenidos en Santa Fe, no mostraron tal correlación (Bonassi et al., 2001), pero sí se halló una correlación positiva entre la edad y el NDI.

Se sabe además que factores como el consumo de alcohol, tabaco, micronutrientes, y el ejercicio físico, también pueden alterar los valores basales de las variables del ensayo citoma (Battershill et al., 2008). En este trabajo de tesis, al igual que en el desarrollado por Dass Singh et al., (2017) no se encontró correlación entre dichos factores y las variables analizadas.

Un estudio materno-infantil realizado en Australia, mostró que ninguno de los biomarcadores del MNBC determinados al momento del nacimiento estuvo asociado con el tabaquismo materno, el consumo de alcohol y de ácido fólico durante el embarazo (Singh et al., 2017).

Otro trabajo realizado en una cohorte griega de madres y recién nacidos, encontró que la frecuencia de los MNBN y el NDI era significativamente mayor en las mujeres que en sus bebés (Fucic et al., 2013). Considerando dicho estudio, los valores medios de MNMO y MNBN son muy inferiores a los que se registraron en el presente ($1,45 \pm 1,77$ vs. $5,81 \pm 6,08$), y ($5,32 \pm 3,64$ vs $8,16 \pm 11,11$), respectivamente. Sin embargo, los valores de NDI entre ambos trabajos son similares, $1,73 \pm 0,23$ en el caso de la cohorte griega y $1,58 \pm 0,20$ para el presente trabajo.

11.5 Determinación de asociación entre la presencia de analitos ambientales y daño genotóxico

En el análisis de resultados obtenidos de los biomarcadores de exposición y de efecto se encontró, por un lado, una correlación positiva entre la variable de cometa alcalino y la concentración de β -HCH, y por otro, correlaciones positivas y negativas entre el número de xenobióticos cuantificados y algunas de las variables del MNBC.

En referencia a la correlación entre el EC alcalino y la concentración de β -HCH, Dwivedi et al. (2022) realizó un estudio en la India en mujeres puérperas y sus recién nacidos, determinando asociación entre aquellas que presentaron mayores niveles de pesticidas OC en sangre, con partos pretérmino, y con un incremento significativo en el daño oxidativo al ADN.

En el presente trabajo, de los diez xenobióticos con mayor frecuencia de cuantificación, ocho fueron más frecuentes en las participantes de la zona urbana que en las de zona rural, y para β -HCH y aldrin mayor también su concentración lo cual podría explicar los valores significativamente más altos de daño oxidativo en el ADN en ese subgrupo de la población.

Resultados similares a los obtenidos fueron descritos por Ali et al. (2018), entre mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas, donde detectaron que aquellas con mayores concentraciones de cihalotrina, endosulfan y deltametrina, también presentaban mayor daño oxidativo en el ADN medido por el EC. Sin embargo, otro estudio realizado en sangre materna y de cordón umbilical, no encontró asociación entre los niveles de pesticidas encontrados y las variables de los biomarcadores de genotoxicidad (EC y citoma) (Alvarado-Hernandez et al., 2013).

En este sentido, el MNBC parece haber sido más sensible, ya que varias de sus variables se correlacionaron con las concentraciones de algunos plaguicidas OC, OF y CE. Además, estos resultados son similares a los hallados en estudios poblacionales en mujeres de México, donde los biomarcadores de genotoxicidad se correlacionaron con los de exposición (Zúñiga Violante E, 2012; Montaña-Soto et al., 2014).

La medición de MNMO representa el daño cromosómico expresado durante las divisiones *in vivo*, es decir el daño con el cual las participantes ingresaron al estudio. En cambio, los MNBN representan MN expresados *ex vivo*, que pueden incluir aquellos MN ya presentes en una célula previo al cultivo del tejido y que la célula no logró reparar durante el nuevo ciclo celular desarrollado *ex vivo* (Fenech et al., 1997). Por ende, la correlación positiva hallada de las variables MNMO/1000MO, MNBN/1000BN y NPB/1000BN y la cantidad de xenobióticos cuantificados por muestra, podría estar señalando un daño cromosómico tal, que aumenta y/o que no se alcanza a reparar a medida que aumenta la mezcla de plaguicidas presente en el organismo.

Resultados obtenidos en pacientes con cáncer después de la quimioterapia sugieren que la exposición a mutágenos *in vivo* conduce principalmente a la formación de MN durante la proliferación *ex vivo* de linfocitos, como consecuencia de la mala reparación del daño persistente. Si estos resultados también se aplican a otros tipos de exposición ambiental a mutágenos (como en los hallados en esta tesis), un aumento de las frecuencias de MN en el MNBC solo se podría esperar para exposiciones que conducen a una cantidad suficiente de daño que persista *ex vivo* durante el cultivo de linfocitos (Speit et al., 2011). Así mismo, se ha demostrado que la formación de NPB aumenta con una amplia gama de exposiciones, como oxidantes endógenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, el humo del cigarrillo, así como deficiencias en folato y selenio, entre otros (Fenech & Crott, 2002; Fenech et al., 2011). Por ende, las correlaciones positivas halladas podrían estar implicando una exposición materna previa a compuestos simples o mezclas desconocidas de sustancias.

Por otro lado, el NDI provee una medida del estatus proliferativo de la fracción de células viables, y una idea de la competencia inmunológica de un organismo, ya que el inicio de la mitosis de los linfocitos depende de varios factores intrínsecos, como por ejemplo, los niveles de interleucina (Beadling & Smith, 2002). Por ello, es un indicador de efecto citostático, y en el caso de los linfocitos, es también una medida de la respuesta mitogénica, la cual es útil como biomarcador de la función inmunológica (Fenech, 2007). En consecuencia, la correlación negativa entre la cantidad de xenobióticos y el NDI, podría estar indicando que una mayor mezcla de compuestos presentes en sangre, produciría una disminución de la competencia inmunológica, y/o alteraciones en la evolución del ciclo celular, medida por el NDI.

La presencia de numerosos xenobióticos ambientales, muchos de ellos ya identificados en estudios previos por alterar la función reproductiva en diversas especies, incluido el ser humano (Fucic et al., 2021), y la respuesta obtenida por los biomarcadores de genotoxicidad, podrían indicar una asociación entre todas estas variables.

Finalmente, las asociaciones descriptas por la regresión por cuadrados mínimos parciales, indicaron porcentajes de NBI relativamente altos en aquellas madres de niños con AC craneofaciales, para las cuales las variables del ensayo citoma (MNMO/1000 MO y MNBN/1000BN) parecerían haber tenido mejor desempeño, respecto a las otras variables de genotoxicidad. Por otra parte, en el análisis multivariado se pudo observar una posible asociación entre las AC genitourinarias con las altas concentraciones de OF y CBZ, cuantificados en las mujeres provenientes de los departamentos Las Colonias y General Obligado.

La variable NDI del ensayo citoma, mostró valores superiores en las madres de los casos con cardiopatías y AC digestivas, en las cuales se vieron las mayores concentraciones de CE, respecto a las otras dos variables de dicho ensayo, y como ya se dijo anteriormente, el NDI es un indicador de efecto citostático, y biomarcador de la función inmunológica (Fenech, 2007).

La asociación entre las variables de exposición (concentración total de OC y CE) con MNMO/1000MO y Sitios Endo estaría indicando mayor sensibilidad de éstos frente a la presencia de tales pesticidas, especialmente en los Dptos. La Capital, y San Justo.

En cuanto a las asociaciones entre los distintos tipos de biomarcadores analizados en esta tesis, se ha reportado genotoxicidad en ratones machos, a concentraciones ambientalmente relevantes de CBZ, evaluada a través del EC (Rai & Mercurio, 2020). Otros insecticidas como α cipermetrina, clorpirifos e imidacloprid mostraron efectos cito y genotóxicos a través del EC y citoma, en linfocitos humanos y cultivos celulares (HepG2), reflejando que los efectos dañinos sobre el ADN estarían causados por la interacción directa entre los compuestos testeados y/o sus metabolitos, que desestabilizaron la estructura del ADN (Želježić et al., 2016).

11.6 Evaluación de los factores de riesgo maternos y construcción de una herramienta sanitaria

De todos los factores de riesgo maternos posiblemente implicados, tanto los hábitos higiénico dietarios, como los de salud materna y exposición ambiental, se podría referir que la población estudiada, presenta prevalencias altas de consumos activos de tabaco y alcohol, falta de planificación familiar y consulta preconcepcional donde se puedan detectar y corregir estos hábitos, como también recomendar el consumo de frutas y verduras, y suplementos de hierro y ácido fólico.

En 1991, un estudio proporcionó pruebas sólidas de que el riesgo de DTN podría reducirse en aproximadamente un 83% entre las mujeres que tomaban un suplemento diario de 4 mg de ácido fólico. Sin embargo, confiar en el consumo de suplementos para reducir tales AC no es eficaz porque solo un pequeño porcentaje de mujeres los toman en el período preconcepcional. Por el contrario, existe evidencia sustancial que respalda la eficacia y seguridad de aumentar la ingesta de ácido fólico a través de la fortificación de los alimentos, por ello, cerca de 80 países en el mundo han introducido la fortificación con ácido fólico (Ghotme, 2023). En este sentido, los DTN conllevan graves consecuencias, como abortos espontáneos, muerte fetal, muerte neonatal e interrupción del embarazo después de la detección (Morris & Wald, 2022; Ghotme, 2023).

Si bien uno de los efectos de la suplementación de las harinas con ácido fólico y otros micronutrientes, se podría estar corroborando a través de las concentraciones halladas

de folato en las muestras evaluadas, no hay que menospreciar el valor de la educación y concientización tanto en las mujeres en edad fértil, como en los actores con capacidad de toma de decisiones.

En este sentido, por ejemplo, aunque los biomarcadores de exposición y genotoxicidad no sean fácilmente implementables en los controles de rutina hospitalarios, sí se puede contar con información sociodemográfica y con marcadores bioquímicos que pueden dar una idea del estado nutricional materno al momento de los controles de embarazo, y no solamente con la determinación de hemoglobina. Las concentraciones de ácido fólico y Hcy pueden ser de mucha utilidad para evaluar el estado en el cual llega la paciente al primer control de embarazo.

En relación a la exposición de las mujeres a los xenobióticos ambientales, se sabe que los plaguicidas configuran un aspecto central de las prácticas agrícolas en nuestro país. Por ello, ya se ha descripto la distribución espacial de la exposición a plaguicidas en Argentina y su asociación con indicadores de carga de cáncer, contruidos a través de biomarcadores de efecto en sujetos laboralmente expuestos (Butinof et al., 2017). Por lo que, tanto los resultados de dicho estudio de Córdoba como del presente, brindan valiosos elementos para vigilar la exposición a plaguicidas en Argentina, y formular políticas de prevención de las exposiciones inadvertidas, a través de la educación sanitaria, la responsabilidad social, y conjuntos de mayores regulaciones y controles en la utilización de los plaguicidas.

Sin embargo, ¿Por qué es tan difícil que las evidencias se transformen en políticas públicas a largo plazo?

En principio, porque las investigaciones llevan tiempo, y además la ciencia no viene empaquetada como una verdad absoluta (Cheung & Brown, 2022). Cuando finalmente se logra un consenso científico, como parece ser el caso de la fortificación con ácido fólico, el paso a la implementación de políticas se convierte en un arte en lugar de una ciencia. Influir en los formuladores de políticas requiere la capacidad y la voluntad de comunicar los resultados claramente, persuadiendo a los responsables de las decisiones, y a la población en general, ante la cual los funcionarios son responsables. Los factores morales e ideológicos también influyen tanto en la formulación de políticas como en la interpretación científica. La actitud de una sociedad ante el riesgo, así como la libertad personal se refleja en sus políticos, y en la comunidad científica que vive y trabaja como parte de esa misma sociedad (Cheung & Brown, 2022).

12. Conclusión

El presente estudio es el primer trabajo descriptivo sobre biomarcadores de exposición y efecto realizado en una población de madres puérperas de recién nacidos con y sin AC, de la provincia de Santa Fe, Argentina.

Si bien se lograron identificar y describir factores de riesgo maternos para el desarrollo de AC -como hábitos higiénico dietarios y de salud materna, entre otros-, ninguno de ellos demostró una asociación clara con el desarrollo de las mismas.

Se reveló que las mayores diferencias entre los grupos, tanto entre casos y controles, como entre las urbanas y rurales, se encontraron en cuanto a la edad gestacional de los recién nacidos, el tipo de parto y el peso al nacer de los niños, todas variables prevenibles. Estos indicadores no solo muestran una diferencia en la atención salud materno-infantil y planificación familiar, sino que también tendría un gran impacto en los futuros adultos nacidos prematuros, lo que afectaría negativamente su salud y calidad de vida.

El mejoramiento de los hábitos y estilos de vida, y la educación en salud materno-infantil son tan importantes, como la concientización de un ambiente adecuado y saludable para vivir, que favorezca la salud de la madre y el niño, un desafío permanente del sistema de salud pública argentino actual y del futuro.

En cuanto a la descripción de los casos de AC hallados en el período de tiempo evaluado, el mayor porcentaje fueron casos de polimalformaciones, seguidas por las del SNC. Si bien se sabe que la mayor prevalencia en el país son las cardiopatías, no se las pudo relevar adecuadamente por la gravedad de los cuadros que obligaban muchas veces a programar el parto en hospitales de mayor complejidad en Buenos Aires.

En cuanto a los biomarcadores de exposición, se demostró la presencia de xenobióticos ambientales, como plaguicidas (de uso actual y prohibidos), ftalatos y parabenos, en las muestras de sangre materna, lo que está indicando una exposición prenatal a los mismos por parte de los neonatos. Si bien no se halló una asociación directa entre sus concentraciones, y los casos participantes del estudio, resulta relevante la frecuencia de cuantificación y el número de plaguicidas (mezcla) en algunas de las participantes. En este sentido, algunas de las variables del MNBC se correlacionaron con las cantidades de pesticidas encontrados, demostrando ser un biomarcador prometedor para la evaluación de efecto por exposición a mezclas de compuestos.

La aplicación de los EC y citoma en una población tan específica como la de madres en puerperio, permitió obtener información sobre el estado de daño general y oxidativo al ADN, y de inestabilidad genética para las mujeres de toda la provincia de Santa Fe.

Algunas de las variables del EC fueron más sensibles a las concentraciones de ciertos pesticidas, con los cuales se correlacionaron positivamente, al igual que algunas del ensayo citoma, como ya se ha descrito antes, para las mezclas de plaguicidas. Así mismo, se destacan distintas asociaciones encontradas entre los biomarcadores de exposición y genotoxicidad, con el desarrollo de AC, a través del análisis de PLS; como el hallazgo de que las madres de los casos con anomalías genitourinarias tenían las mayores concentraciones de ATZ y OF, como la variable NDI sería más sensible las concentraciones totales de OF y carbendazim en los Dptos. Las Colonias y Gral. Obligado, o los Sitios Endo y MNMO serían más sensibles a las altas concentraciones de OC y contaminantes emergentes en los Dptos. San Justo y La Capital.

Estos datos obtenidos abren la posibilidad a una nueva línea de investigación sobre la exposición prenatal y los efectos en la salud reproductiva de dicha exposición, crónica e inadvertida a xenobióticos ambientales, y para lo cual, algunos biomarcadores de genotoxicidad podrían resultar especialmente sensibles y útiles en su evaluación.

Finalmente, la determinación de marcadores bioquímicos como ácido fólico y Hcy, más asequibles a ser determinaciones rutinarias durante el embarazo, permitirían, junto a una anamnesis completa y evaluación de riesgos maternos, llevar a cabo un análisis de situación de salud de cada mujer, y así proporcionar orientación y consejería más específica, que redunde en educación sanitaria para la mujer durante toda la etapa fértil de su vida.

El desafío actual a partir del presente trabajo, es continuar con la evaluación de los biomarcadores de exposición y genotoxicidad en los eventos ginecológicos, como los abortos espontáneos, la edad gestacional, el tipo de parto y el peso del RN al nacer.

13. Bibliografía

- Abbott Laboratories. (2010). *Folate*. En: https://www.illexmedical.com/files/PDF/Folate_ARC.pdf. Acceso: enero 2023.
- Agencia Europea de Medicamentos. (2020). Ficha técnica o resumen de las características del producto. In *Agencia Europea de Medicamentos*. En: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kyntheum-epar-product-information_es.pdf. Acceso: diciembre 2022.
- Agopian, A. J., Lupo, P. J., Canfield, M. A., & Langlois, P. H. (2013). Case-Control Study of Maternal Residential Atrazine Exposure and Male Genital Malformations. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 161(5), 977–982.
- Agus, S., Akkaya, H., Daglioglu, N., Eyuboglu, S., Atasayan, O., Mete, F., Colak, C., Sandal, S., & Yilmaz, B. (2022). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in breast milk samples and their correlation with dietary and reproductive factors in lactating mothers in Istanbul. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(3), 3463–3473.
- Ali, T., Ismail, M., Asad, F., Ashraf, A., Waheed, U., & Khan, Q. M. (2018). Pesticide genotoxicity in cotton picking women in Pakistan evaluated using comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 213–220.
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., & Marino, D. J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*, 645, 89–96.
- Alvarado-Hernandez, D., Montero-Montoya, R., Serrano-García, L., Arellano-Aguilar, O., Jasso-Pineda, Y., & Yáñez-Estrada, L. (2013). Assessment of Exposure to Organochlorine Pesticides and Levels of DNA Damage in Mother-Infant Pairs of an Agrarian Community. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 405, 391–405.
- Álvarez, G., Rodríguez Girault, M., Bardoni, N., Vignati, K., El Kassisse, Y., Ridolfi, A., Sosa, G., & Villaamil Lepori, E. (2006). Valores guía de plaguicidas organoclorados en población general del área metropolitana de Buenos Aires. In *Acta Toxicológica Argentina*. 14(2):37-76.
- Ammar, H., Tahon, M., & El-Safty, S. (2022). Monitoring of Pesticide Residue Levels in Blood Samples Collected from the Agricultural Spray-workers in Menoufia-Governorate, Egypt. *Egyptian Journals*.(11),18; 1-17.
- Ammouri, W., Tazi, Z. M., Harmouche, H., Maamar, M., & Adnaoui, M. (2017). Venous thromboembolism and hyperhomocysteinemia as first manifestation of pernicious anemia: A case series. *Journal of Medical Case Reports*, 11(1), 1–6.
- Angerer, J., Ewers, U., & Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3–4), 201–228.
- Arzamendia, V., & Giraudo, A. R. (2004). Usando patrones de biodiversidad para la evaluación y diseño de áreas protegidas: Las serpientes de la provincia de Santa Fe (Argentina) como ejemplo. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77(2), 335–348.
- Asprea, I., García, O., & Nigri, C. (2013). Control preconcepcional, prenatal y puerperal. Ministerio de Salud de la Nación. En: <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000158cnt-g02.control-prenatal.pdf>. Acceso: noviembre 2022.
- Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., & Ünal, F. (2016). Genotoxicity of

- monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 8–18.
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2014). The Comet Assay: High Throughput Use of FPG. In M. and G. I. Sierra (Ed.), *Genotoxicity and DNA Repair: A practical approach, methods in Pharmacology and Toxicology*. (Springer S, pp. 199–217).
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S., & Collins, A. R. (2009). DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 101–108.
- Bak, A., & Roszkowski, K. (2013). Oxidative stress in pregnant women. *Archives of Perinatal Medicine*, 19(3), 150–155.
- Barbero, P., Bidondo, M. P., Brun, P., Duarte, S., Groisman, B., Liascovich, R., & Trotta, M. (2022). Reporte anual RENAC 2022. Ministerio de Salud de la Nación. En: <https://www.ine.gov.ar/images/docs/Rep2022.pdf>. Acceso: octubre 2022.
- Barbero, P., Bidondo, M. P., Brun, P., Duarte, S., Groisman, B., Liascovich, R., & Trotta, M. (2021). Reporte Anual RENAC 2021. Ministerio de Salud de la Nación. En: <https://www.ine.gov.ar/renac/Rep2021.pdf>. Acceso: octubre 2022.
- Barbero, P., Bidondo, M. P., Duarte, S., Groisman, B., Liascovich, R., & Piola, A. (2019). Reporte Anual RENAC 2019. Ministerio de Salud de la Nación. En: <https://www.ine.gov.ar/renac/Rep2019.pdf>. Acceso: octubre 2022.
- Barbero, P., Bidondo, M. P., Duarte, S., Groisman, B., Liascovich, R., & Piola, A. (2020). Reporte Anual RENAC 2020. En: <https://www.ine.gov.ar/renac/Rep2020.pdf>. Acceso: octubre 2022.
- Barra, R., Colombo, J., Gamboa, N., Eguren, G., & Jardim, W. (2002). *Regionally based assessment of persistent toxic substances: Eastern and Western South America Regional Report*. United Nations Environmental Programme Chemicals.
- Battershill, J. M., Burnett, K., & Bull, S. (2008). Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: Impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 23(6), 423–437.
- Beadling, C., & Smith, K. A. (2002). DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Medical Immunology*, 14, 1–14.
- Beltrame, S., García, G., Grünwaldt, M. E., Hernández, H. G., Loíacono, K. V., Martínez, M. L., Pantano, A. F., Peyton, M. S., Pivchuk, O. M., Costa, J. C. R., & Santoro, A. G. (2017). Estadísticas Vitales. Información Básica 2017. Dirección de Estadísticas e Información en Salud, Ministerio de Salud de la Nación.
- Benavides, E., Lupo, P. J., Sosa, M., Whitworth, K. W., Canfield, M. A., Langlois, P. H., & Schraw, J. M. (2022). Urban–rural residence and birth defects prevalence in Texas: a phenome-wide association study. *Pediatric Research*, 91(6), 1587–1594.
- Betran, A., Torloni, M., Zhang, J., & Gülmezoglu, A. (2015). WHO Statement on Caesarean Section Rates. In *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 123(5):667-70
- Bidondo, M. P., Groisman, B., Flores, R., Ormazabal, M., & Barbero, P. (2015). *Atlas RENAC. Guía para la detección y descripción de las anomalías congénitas*. 1–53.
- Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C., & Freeman, L. B. (2015). Pesticides and human health. *Occupational and Environmental Medicine*, 72(2), 81–82.
- Bonassi, S., & Fenech, M. (2019). Micronuclei and their association with infertility, pregnancy complications, developmental defects, anaemias, inflammation,

- diabetes, chronic kidney disease, obesity, cardiovascular disease, neurodegenerative diseases and cancer. In S. K. and F. Michael (Ed.), *The Micronucleus Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. ping, Ceppi, M., Peter Chang, W., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Zijno, A. (2001). Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37(1), 31–45.
- Boyd Barr, D., Bishop, A., & Needham, L. L. (2007). Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology*, 23(3), 260–266.
- Boyd Barr, D., & Buckley, B. (2011). In Vivo Biomarkers and Biomonitoring in Reproductive and Developmental Toxicity. In R. Gupta (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 253–265). Elsevier Inc.
- Bravo, N., Hansen, S., Økland, I., Garí, M., Álvarez, M. V., Matioceovich, S., Odland, J. Ø., & Grimalt, J. O. (2017). Influence of maternal and sociodemographic characteristics on the accumulation of organohalogen compounds in Argentinian women. The EMASAR study. *Environmental Research*, 158, 759–767.
- Brevik, A., Vollset, S. E., Tell, G. S., Refsum, H., Ueland, P. M., Loeken, E. B., Drevon, C. A., & Andersen, L. F. (2005). Plasma concentration of folate as a biomarker for the intake of fruit and vegetables: The Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2), 434–439.
- Brihet, J. M. (2015). Relevamiento de Tecnología Agrícola Aplicada. Campaña 2012-2013. In *Bolsa de Cereales de Buenos Aires* (4),1. En: <http://bibliotecadigital.bolsadecereales.com.ar/greenstone/collect/bolcer/index/assoc/HASH15bf.dir/Relevamiento%20tecnologia%20agricola%20aplicada%202012-13.pdf>. Acceso: diciembre de 2022
- Butinof, M., Fernández, R., Muñoz, S., Lerda, D., Blanco, M., Lantieri, M., Antolini, L., Gieco, M., Ortiz, P., Filippi, I., Franchini, G., Eandi, M., Montedoro, F., & Díaz, M. del P. (2017). Valoración de la exposición a plaguicidas en cultivos extensivos de Argentina y su potencial impacto sobre la salud. *Rev Argent Salud Pública*, 8(33):8-15.
- Cano-Sancho, G., Alexandre-Gouabau, M. C., Moyon, T., Royer, A. L., Guitton, Y., Billard, H., Darmaun, D., Rozé, J. C., Boquien, C. Y., Le Bizec, B., & Antignac, J. P. (2020). Simultaneous exploration of nutrients and pollutants in human milk and their impact on preterm infant growth: An integrative cross-platform approach. *Environmental Research*, 182, 109018.
- Cao, L. L., Yan, C. H., Yu, X. D., Tian, Y., Zou, X. Y., Lu, D. S., & Shen, X. M. (2012). Determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum by gas chromatography with micro-electron capture detector. *Journal of Chromatographic Science*, 50(2), 145–150.
- Casarett, & Doull. (2001). *Manual de Toxicología*. McGraw-Hill, 5ª Ed.
- Cassoulet, R., Haroune, L., Abdelouahab, N., Gillet, V., Baccarelli, A. A., Cabana, H., Takser, L., & Bellenger, J. P. (2019). Monitoring of prenatal exposure to organic and inorganic contaminants using meconium from an Eastern Canada cohort. *Environmental Research*, 171, 44–51.

- Castignani, H. (2011). Zonas Agroeconómicas Homogéneas Santa Fe. En: *Estudios Socioeconómicos de La Sustentabilidad de Los Sistemas de Producción y Recursos Naturales*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 1439 (1033), 61.
- Caton, A. R., Bell, E. M., Druschel, C. M., Werler, M. M., Lin, A. E., Browne, M. L., McNutt, L. A., Romitti, P. A., Mitchell, A. A., Olney, R. S., & Correa, A. (2009). Antihypertensive medication use during pregnancy and the risk of cardiovascular malformations. *Hypertension*, 54(1), 63–70.
- Cavallo, D., Ursini, C., Rondione, B., & Iavicoli, S. (2009). Evaluation of a Suitable DNA Damage Biomarker for Human Biomonitoring of Exposed Workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(5), 391–405.
- Ceriani Cernadas, J. M. (2019). La epidemia de cesáreas no justificadas, ¿podremos revertirla? *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117(2), 66–67.
- Cheung, C. R., & Brown, N. (2022). There's science.. and then there might be policy change.. *Archives of Disease in Childhood*, 108(1), 1–2.
- Choi, J., Aarøe Mørck, T., Joas, A., & E. Knudsen, L. (2015). Major national human biomonitoring programs in chemical exposure assessment. *AIMS Environmental Science*, 2(3), 782–802.
- Christianson, A., Howson, C. P., & Modell, B. (2008). March of Dimes releases premature birth report card: Kentucky receives “F”--KMA joins healthy babies coalition.” *The Journal of the Kentucky Medical Association*, 106(12), 557–558.
- Cim, N., Tolunay, H. E., Karaman, E., Boza, B., Bilici, M., Çetin, O., Yıldızhan, R., & Sahin, H. G. (2018). Amniotic fluid oxidant–antioxidant status in foetal congenital nervous system anomalies. *Journal of International Medical Research*, 46(3), 1146–1152.
- Collins, A. (2015). The comet assay: A heavenly method! *Mutagenesis*, 30(1), 1–4.
- Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Rašlová, K., & Vaughan, N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30(2), 139–146.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., & Bonassi, S. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 759(1), 27–39.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261.
- Colussi, C. L., Contini, L., Poletta, G. L., & Simoniello, M. F. (2018, 27 y 28 de marzo). Development of an instrument for the evaluation of maternal risk to environmental xenobiotics: Preliminary study. [Póster]. IV International Congress in translational Medicine. Buenos Aires, Argentina.
- Colussi, C., & López, M.C. (2022, 16 a 20 de mayo). Anomalías congénitas en neonatos del Hospital de Niños “Dr. Orlando Alassia”: frecuencia de ingresos a partir del registro sistemático durante 2021. [Presentación oral]. VIII Encuentro Nacional de Epidemiología Pediátrica. Buenos Aires, Argentina.
- Crump, C., Sundquist, J., & Sundquist, K. (2020). Preterm birth and risk of type 1 and

- type 2 diabetes : a national cohort study. *Diabetologia*, 508–518.
- Damgaard, I. N., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., Virtanen, H. E., Shen, H., Schramm, K. W., Petersen, J. H., Jensen, T. K., Main, K. M., Boisen, K., Chellakooty, M., Schmidt, I., Kaleva, M., & Soumi, A. (2006). Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives*, 114(7), 1133–1138.
- Dass Singh, M., Thomas, P., Hor, M., Almond, T., Owens, J., Hague, W., Fenech, M. (2017). Infant birth outcomes are associated with DNA damage biomarkers as measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay: the DADHI study. *Mutagenesis*. 32,355-370.
- Gobierno de Santa Fe (2022). *Instituto Provincial de Estadísticas y Censos*. En: <http://www.estadisticasantafe.gob.ar/>. Acceso: diciembre de 2022.
- De Siqueira, M. T., Braga, C., Cabral-Filho, J. E., Augusto, L. G. D. S., Figueiroa, J. N., & Souza, A. I. (2010). Correlation between pesticide use in agriculture and adverse birth outcomes in Brazil: An ecological study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(6), 647–651.
- Dechiara, M. P., Marino, D., & Simoniello, M. F. (2020). Evaluación ambiental de biocidas y su relación con el daño genético en tres localidades rurales de la Provincia de Santa Fe. In: Centro de Estudios Interdisciplinarios (Ed.), *Desequilibrios ambientales: acerca de problemáticas diversas que amenazan calidad de vida y salud humana* (p. 377).
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
- Dolk, H., & Vrijheid, M. (2003). The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *British Medical Bulletin*, 68, 25–45.
- Dusinska, M., & Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191–205.
- Dwivedi, N., Mahdi, A. A., Deo, S., Ahmad, M. K., & Kumar, D. (2022). Assessment of genotoxicity and oxidative stress in pregnant women contaminated to organochlorine pesticides and its correlation with pregnancy outcome. *Environmental Research*, 204(PB), 112010.
- Eastmond, D. A., & Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1), 34–43.
- Engel, S. M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D. B., Canfield, R. L., & Wolff, M. S. (2011). Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1182–1188.
- Ersson, C. (2011). International validation of the Comet Assay and a human intervention study. [Tesis, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia].
- EUROCAT. (2022). Prevalence rates by year. En: https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en. Acceso : noviembre 2022.
- Eurocat Central. (2004). A Review of Environmental Risk Factors for Congenital Anomalies. *Human Genetics*, 44. En: <https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/sites/default/files/eurocat-pub-docs/Special-Report-Env-Risk-I-and-II.pdf>. Acceso: noviembre de 2022.

- Everson, J. L., Batchu, R., & Eberhart, J. K. (2020). Multifactorial Genetic and Environmental Hedgehog Pathway Disruption Sensitizes Embryos to Alcohol-Induced Craniofacial Defects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44(10), 1988–1996.
- Fauci, V. La, Squeri, R., Genovese, C., & Alessi, V. (2020). The ‘ Dangerous Cocktail ’: an epidemiological survey on the attitude of a population of pregnant women towards some pregnancy risk factors. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(3), 330–335.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(SUPPL. 3), 101–107.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1–2), 58–66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- Fenech, M., & Crott, J. W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes - Evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1–2), 131–136.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T., & Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 770, 12–25.
- Fenech, M., Perepetskaya, G., & Mikhalevich, L. (1997). A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30(2), 112–118.
- Fernández, N., Alvarez, G., Rodríguez, M. E., Quiroga, P., & Ridolfi, A. (2022). Chapter 7. Residue analysis of organochlorine, organophosphate, and pyrethroid pesticides in human biological specimens by Gas Chromatography-Microelectron Capture Detector (GC-uECD). In E. Gallardo & B. Mário (Eds.), *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Pesticides Toxicology.
- Ferrer, R. L., Lugo, N. T., Sánchez, Y. T., & Portilla, C. V. (2005). Fundamentos del ácido fólico en la prevención primaria farmacológica de defectos congénitos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(1–2).
- Filippi, I., Lucero, P., Bonansea, R. I., Lerda, D., Butinof, M., Fernandez, R. A., Wunderlin, D. A., Ame, M. V., & Munoz, S. E. (2021). Validation of exposure indexes to pesticides through the analysis of exposure and effect biomarkers in ground pesticide applicators from Argentina. *Heliyon*, 7(9), e07921.
- Fish, E. W., Murdaugh, L. B., Zhang, C., Boschen, K. E., Boa-Amponsem, O., Mendoza-Romero, H. N., Tarpley, M., Chdid, L., Mukhopadhyay, S., Cole, G. J., Williams, K.

- P., & Parnell, S. E. (2019). Cannabinoids Exacerbate Alcohol Teratogenesis by a CB1-Hedgehog Interaction. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16.
- Fortenberry, G. Z., Meeker, J. D., Sánchez, B. N., Barr, D. B., Panuwet, P., Bellinger, D., Schnaas, L., Solano-González, M., Ettinger, A. S., Hernandez-Avila, M., Hu, H., & Tellez-Rojo, M. M. (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.
- Freire, C., Koifman, R. J., & Koifman, S. (2017). Serum levels of organochlorine pesticides in blood donors: A biomonitoring survey in the North of Brazil, 2010–2011. *Science of the Total Environment*, 598, 722–732.
- Freitas, L. C. de S., Nunes, A. A., Meneguci, J., Neto, G., & Castro, S. de S. (2021). Association of congenital anomalies in live births with their obstetric-neonatal and sociodemographic profiles. *Texto e Contexto Enfermagem*, 30, 1–15.
- Fucic, A., Katic, J., Fthenou, E., Kogevinas, M., Plavec, D., Koppe, J., Batinic, D., Chalkiadaki, G., Chatzi, L., Lasan, R., Kleinjans, J., & Kirsch-Volders, M. (2013). Increased frequency of micronuclei in mononucleated lymphocytes and cytome analysis in healthy newborns as an early warning biomarkers of possible future health risks. *Reproductive Toxicology*, 42, 110–115.
- Fucic, A., Duca, R., Galea, K. S., Maric, T., Garcia, K., Bloom, M., Andersen, H. R., & Vena, J. (2021). Reproductive health risks associated with occupational and environmental exposure to pesticides. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(12).
- Ghotme, K. (2022). The NeuroAdvocacy Toolkit: A Knowledge Translation Strategy to Strengthen Food Fortification Policies to Prevent Neural Tube Defects in Latin American Countries. A Mixed-Method Study. [Doctoral Dissertation at George Washington University].
- Gilden, R. C., Huffling, K., & Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing*, 39(1), 103–110.
- Giulioni, C., Maurizi, V., Castellani, D., Scarcella, S., Skrami, E., Balercia, G., & Galosi, A. B. (2022). The environmental and occupational influence of pesticides on male fertility: A systematic review of human studies. *Andrology*, 10(7), 1250–1271.
- Gobierno de Santa Fe, Ministerio de Salud. Sala de situación de Salud. (2011). Análisis de situación de salud de la población de la provincia de Santa Fe Primer informe. En: <https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/128722/636232/file/02%20Primer%20Informe%20sala%20de%20situacion%20para%20web.pdf>. Acceso: noviembre de 2022.
- Gobierno de Santa Fe, Ministerio de Salud. (2012). Estrategia de Intensificación Vigilancia Intoxicación Plaguicidas. Instructivo para notificar casos intoxicación/exposición aguda a plaguicidas en SaSiPro. En: <https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/152210/744318/file/estrategia>. Acceso: noviembre de 2022.
- Goldstein, B., Gibson, J., Henderson, R., Hobbie, J., Landrigan, P., Mattison, D., Perera, F., Pfitzer, E., Silbergeld, E., & Wogan, G. (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74(1), 3–9.
- Goldstein, M. F., & Gorenstein, A. (2021). Política Integral para la Prematurez. Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de acceso a la Salud. En:

- <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/politica-integral-para-la-prematurez>. Acceso: noviembre de 2022
- Golestanzadeh, M., Ebrahimpour, K., Daniali, S. S., Zarean, E., Yazdi, M., Basirat, Z., Goodarzi-Khoigani, M., & Kelishadi, R. (2022). Association between parabens concentrations in human amniotic fluid and the offspring birth size: A Sub-study of the PERSIAN birth cohort. *Environmental Research*, 212(PD), 113502.
- Guevel, C., Pantano, A. F., De Arriba, A., Mistorni, C., Cardozo, E., Loíacono, K. V., Gallardo, L., Peyton, M. S., Cadile, M., Grünwaldt, M. E., Wolberg, M., Pivchuk, O. M., Günther, R., & Riso, V. (2020). Estadísticas vitales. Información Básica. 2020. Ministerio de Salud de la Nación.
- Guevel, C., Santoro, A., Pantano, A., De Arriba, A., Mistorni, C., Cardozo, E., Loíacono, K., Peyton, M., Grünwaldt, M. E., Pivchuk, O. M., Günther, R., & Riso, V. (2019). Estadísticas vitales. Información Básica. 2019. Ministerio de Salud de la Nación.
- Gundogan, K., Donmez-Altuntas, H., Hamurcu, Z., Akbudak, I. H., Sungur, M., Bitgen, N., Baskol, G., & Bayram, F. (2018). Evaluation of chromosomal DNA damage, cytotoxicity, cytostasis, oxidative DNA damage and their relationship with endocrine hormones in patients with acute organophosphate poisoning. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 825, 1–7.
- Handal, A. J., Hund, L., Páez, M., Bear, S., Greenberg, C., Fenske, R. A., & Barr, D. B. (2016). Characterization of Pesticide Exposure in a Sample of Pregnant Women in Ecuador. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(4), 627–639.
- Hansen, S., Nieboer, E., Bravo, N., Økland, I., Matioceovich, S., Alvarez, M. V., Nilsen, S. T., Grimalt, J. O., & Odland, J. Ø. (2017). Variations in serum concentrations of selected organochlorines among delivering women in Argentina. The EMASAR study. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 19(12), 1542–1553.
- Harari, R., Julvez, J., Murata, K., Barr, D., Bellinger, D. C., Debes, F., & Grandjean, P. (2010). Neurobehavioral deficits and increased blood pressure in school-age children prenatally exposed to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 890–896.
- Hardy, F., Takser, L., Gillet, V., Baccarelli, A., & Bellenger, J. P. (2023). Characterization of childhood exposure to environmental contaminants using stool in a semi-kurban middle-class cohort from eastern Canada. *Environmental Research*, 141267.
- Harley, K. G., Kogut, K., Madrigal, D. S., Cardenas, M., Vera, I. A., Meza-Alfaro, G., She, J., Gavin, Q., Zahedi, R., Bradman, A., Eskenazi, B., & Parra, K. L. (2016). Reducing phthalate, paraben, and phenol exposure from personal care products in adolescent girls: Findings from the hermosa intervention study. *Environmental Health Perspectives*, 124(10), 1600–1607.
- Harrison, M., Garces, A., Figueroa, L., Esamai, F., Bucher, S., Bose, C., Goudar, S., Derman, R., Patel, A., Hibberd, P., Chomba, E., Mwenechanya, M., Hambidge, M., & Krebs, N. (2021). Caesarean birth by maternal request: a poorly understood phenomenon in low- and middle-income countries. *International Health*. 13, 63–69.
- He, M., Wu, Y., Xie, Z., Li, Z., Hao, L., Liu, G., He, Q., Liao, Y., Ghappar, R., Peng, H., Xie, J., Wei, X., Zhang, Y., Huang, Q., Chen, Y., & Liang, X. (2022). Epidemiology of hospitalizations due to pesticide intoxication-associated acute kidney injury in China. *International Urology and Nephrology*, 54(2), 377–383.
- Henríquez-Hernández, L. A., Macías-Montes, A., Acosta-Dacal, A., Rial-Berriel, C.,

- Duarte-Lopes, E., Lopes-Ribeiro, A. L., Alfama, P. M., Livramento, M., Zumbado, M., Díaz-Díaz, R., Bernal-Suárez, M. del M., Serra-Majem, L., & Luzardo, O. P. (2022). Human biomonitoring of persistent and non-persistent pollutants in a representative sample of the general population from Cape Verde: Results from the PERVEMAC-II study. *Environmental Pollution*, 306.
- Hjorth, K., Johansen, K., Holen, B., Andersson, A., Christensen, H. B., Siivinen, K., & Toome, M. (2011). Pesticide residues in fruits and vegetables from South America - A Nordic project. *Food Control*, 22(11), 1701–1706.
- Hobbs, C. A., Cleves, M. A., Zhao, W., Melnyk, S., & James, J. (2005). Congenital heart defects and maternal biomarkers of oxidative stress 1-4. *Am J Clin Nutr*. 81:147-53.
- Honorable Congreso de la Nación Argentina. (2002). Ley 25630. *Boletín Oficial*. En: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-25630-77088/texto>. Acceso: enero de 2023.
- Ibrahim, H. K., Al-awkally, N. M., Makhoul, A., & Farag, A. (2022). Drugs that cause fetal abnormalities. *Journal of Biological Pharmaceutical And Chemical Research*. 9(1): 59-68.
- Id, B. L., Xu, G., Sun, Y., Id, X. Q., Id, K., Id, Y. Y., Snetselaar, L. G., & Id, W. B. (2020). *Maternal cigarette smoking before and during pregnancy and the risk of preterm birth : A dose – response analysis of 25 million mother – infant pairs*. 486, 1–17.
- Iturburu, F. G., Calderon, G., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2019). Ecological Risk Assessment (ERA) of pesticides from freshwater ecosystems in the Pampas region of Argentina: Legacy and current use chemicals contribution. *Science of the Total Environment*, 691, 476–482.
- Jamnik, T., Flasch, M., Braun, D., Fareed, Y., Wasinger, D., Seki, D., Berry, D., Berger, A., Wisgrill, L., & Warth, B. (2022). Next-generation biomonitoring of the early-life chemical exposome in neonatal and infant development. *Nature Communications*, 13(1), 1–14.
- Kahl, V. F. S., Simon, D., de Souza, M. R., da Rosa, V. H., Nicolau, C., Da Silva, F. R., Kvitko, K., Peres, A., Dorneles, G. P., de Souza, C. T., Dias, J. F., & Da Silva, J. (2018). Base excision repair (OGG1 and XRCC1) and metabolism (PON1) gene polymorphisms act on modulation of DNA damage and immune parameters in tobacco farmers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 83, 9–18.
- Kalliora, C., Mamoulakis, C., Vasilopoulos, E., Stamatiades, G. A., Kalafati, L., Barouni, R., Karakousi, T., Abdollahi, M., & Tsatsakis, A. (2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 346, 58–75.
- Kapeleka, J. A., Sauli, E., & Ndakidemi, P. A. (2019). Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. In *Int J Environ Health Res*. 31(7):805-822.
- Keane, P. (1999). The Use of Piperonyl Butoxide in Formulations for the Control of Pests of Humans, Domestic Pets and Food Animals. *Piperonyl Butoxide*, 289–300.
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525–535.
- Knudsen, L. E., & Hansen, Å. M. (2007). Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3–4), 461–470.

- Knudsen, L. E., & Kirsch-Volders, M. (2021). Micronuclei, reproduction and child health. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 787, 108345.
- Kokhanov, A. (2022). Congenital Abnormalities in the Infant of a Diabetic Mother. *NeoReviews*, 23(5), e319–e327.
- Krajewski, A. K., Rappazzo, K. M., Langlois, P. H., Messer, L. C., & Lobdell, D. T. (2021). Associations between cumulative environmental quality and ten selected birth defects in Texas. *Birth Defects Research*, 113(2), 161–172.
- Krysiak-Baltyn, K., Toppari, J., Skakkebaek, N. E., Jensen, T. S., Virtanen, H. E., Schramm, K. W., Shen, H., Vartiainen, T., Kiviranta, H., Taboureau, O., Audouze, K., Brunak, S., & Main, K. M. (2012). Association between chemical pattern in breast milk and congenital cryptorchidism: Modelling of complex human exposures. *International Journal of Andrology*, 35(3), 294–302.
- Kunisue, T., Someya, M., Kayama, F., Jin, Y., & Tanabe, S. (2004). Persistent organochlorines in human breast milk collected from primiparae in Dalian and Shenyang, China. *Environmental Pollution*, 131(3), 381–392.
- Ladeira, C., & Smajdova, L. (2017). The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genetics*, 4(3), 166–191.
- Ladeira, C., & Viegas, S. (2016). Human Biomonitoring – An overview on biomarkers and their application in Occupational and Environmental Health. *Biomonitoring*, 3(1).
- Lapertosa, S. G. De, Sucani, S., Salzberg, S., Faingold, C., Jawerbaum, A., & Rovira, G. (2020). Prevalence of gestational diabetes mellitus in Argentina according to the Latin American Diabetes Association (ALAD) and Internatinal Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria and the associated maternal-neonatal complications. *Health Care Women Int.* 42(4-6):636-656.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., & Giordano, M. E. (2019). *Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring*. 1–9.
- Liu, C., Li, Q., Yan, L., Wang, H., Yu, J., Tang, J., Yao, H., Li, S., Zhang, Y., & Guo, Y. (2019). The association between maternal exposure to ambient particulate matter of 2.5 Mm or less during pregnancy and fetal congenital anomalies in Yinchuan, China: A population-based cohort study. *Environment International*, 122, 316–321.
- López, M. B., Filippetti, V. A., & Cremonte, M. (2015). Revista panamericana de salud publica. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 37, 211–217.
- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., & Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28(4), 427–432.
- Lu, D., Wang, D., Ni, R., Lin, Y., Feng, C., Xu, Q., Jia, X., Wang, G., & Zhou, Z. (2015). Organochlorine pesticides and their metabolites in human breast milk from Shanghai, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 9293–9306.
- Lucero, P., Nassetta, M., & Romedi, A. De. (2008). Evaluación de la exposición ambiental a plaguicidas orgánicos persistentes en dos barrios de la provincia de Córdoba. *Acta Toxicológica Argentina*, 16, 41–46.
- Lutz, B. H., Miranda, V. I. A., Silveira, M. P. T., Dal Pizzol, T. da S., Mengue, S. S., da

- Silveira, M. F., Domingues, M. R., & Bertoldi, A. D. (2020). Medication use among pregnant women from the 2015 pelotas (Brazil) birth cohort study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1–14.
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, M. L., Etchegoyen, M. A., Alonso, L. L., de Castro, M. C., Percudani, M. C., & Marino, D. J. G. (2018). Pesticide residues in fruits and vegetables of the argentine domestic market: Occurrence and quality. *Food Control*, 93(March), 129–138.
- Maggioni, D., Signorini, M., Michlig, N., Repetti, M., Sigrist, M., & Beldoménico, H. (2017). Comprehensive estimate of the theoretical maximum daily intake of pesticide residues for chronic dietary risk assessment in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 1532-4109.
- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., & Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192(1), 3–16.
- Markopoulou, P., Papanikolaou, E., Analytis, A., Zoumakis, E., & Siahianidou, T. (2019). Preterm Birth as a Risk Factor for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease in Adult Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Pediatrics*, 210, 69-80.e5.
- McKenna, D. J., McKeown, S. R., & McKelvey-Martin, V. J. (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*, 23(3), 183–190.
- Medici, S. K., Blando, M., Sarlo, E., Maggi, M., Espinosa, J. P., Ruffinengo, S., Bianchi, B., Eguaras, M., & Recavarren, M. (2020). Pesticide residues used for pest control in honeybee colonies located in agroindustrial areas of Argentina. *International Journal of Pest Management*, 66(2), 163–172.
- Meftaul, I., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Megharaj, M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of the Total Environment* 711. 134612.
- Mezcua, M., Agüera, A., Lliberia, J. L., Cortés, M. A., Bagó, B., & Fernández-Alba, A. R. (2006). Application of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. *Journal of Chromatography A*, 1109(2), 222–227.
- Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado. (2011). *Santa Fe en Cifras*. En: http://www.santafe.gov.ar/archivos/estadisticas/Santa_Fe_en_Cifras.pdf. Acceso: noviembre de 2022.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2017). *Químicos prohibidos y restringidos en Argentina (Chemicals prohibited and restricted in Argentina)*. 1–31.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2022). *Programa Nacional de Cardiopatías Congénitas (PNCC)*. En: <https://www.argentina.gob.ar/salud/cardiopatiasongenitas>. Acceso: enero de 2022.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. (2018). *Sistema Informático Perinatal para la Gestión (SIP-G) Indicadores básicos 2017 República Argentina*. 56.
- Montaño-Soto, T., Arellano-García, E., Camarena-Ojinaga, L., von Glascoe, C., & Ruiz Ruiz, B. (2014). Genotoxic Biomonitoring and Exposure To Pesticides in Women Laborers At Maneadero Valley in Baja California, Mexico. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3(2), 89–96.

- Moore, K., Persaud, T., & Torchia, M. (2016). *Before we are Born: Essentials of Embriology and Birth Defects* (9th ed.). Saunders, Elsevier.
- Morgan-Ortiz, F., Quevedo-Castro, E., Báez-Barraza, J., López-Manjarrez, G., Gutiérrez-Jiménez, G., & Morgan-Ruiz, F. V. (2016). Teratología y farmacoterapia durante el embarazo y lactancia. *Revista Médica de La UAS (Universidad Autónoma de Sinaloa)*, 6(1), 22–41.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Liu, G., Balaram, V., Ribeiro, A. R. L., Lu, Z., Stock, F., Carmona, E., Teixeira, M. R., Picos-Corrales, L. A., Moreno-Piraján, J. C., Giraldo, L., Li, C., Pandey, A., Hocquet, D., Torri, G., & Crini, G. (2022). Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, May.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177.
- Mukhopadhyay, B., Gongopadhyay, A. N., Rani, A., Gavel, R., & Mishra, S. P. (2015). Free radicals and antioxidants status in neonates with congenital malformation. *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons*, 20(4), 179–183.
- Muñoz-de-Toro, M., Beldoménico, H. R., García, S. R., Stoker, C., De Jesús, J. J., Beldoménico, P. M., Ramos, J. G., & Luque, E. H. (2006). Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environmental Research*, 102(1), 107–112.
- Muñoz-Quezada, M. T., Lucero, B. A., Barr, D. B., Steenland, K., Levy, K., Ryan, P. B., Iglesias, V., Alvarado, S., Concha, C., Rojas, E., & Vega, C. (2013). Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: A systematic review. *NeuroToxicology*, 39, 158–168.
- Nagiah, S., Phulukdaree, A., Naidoo, D., Ramcharan, K., Naidoo, R. N., Moodley, D., & Chuturgoon, A. (2015). Oxidative stress and air pollution exposure during pregnancy. *Human and Experimental Toxicology*, 34(8), 838–847.
- Nayak, S., Panigrahi, K., Pathi, B., & Poddar, N. (2022). Association of TORCH infections and foetal outcome in women with bad obstetric history in a tertiary care hospital of Eastern India. 20(10), 54–63.
- Nazer, J., López-Camelo, J., & Castilla, E. E. (2001). ECLAMC: Estudio de 30 años de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural en Chile y en Latinoamérica. *Revista Medica de Chile*, 129(5), 531–539.
- Negrão, M. E. A., Rocha, P. R. H., Saraiva, M. C. P., Barbieri, M. A., Simões, V. M. F., Batista, R. F. L., Ferraro, A. A., & Bettiol, H. (2020). Association between tobacco and/or alcohol consumption during pregnancy and infant development: Brisa cohort. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(1), 1–9.
- Neira, M., & Prüss-Ustün, A. (2016). Preventing disease through healthy environments: A global assessment of the environmental burden of disease. *Toxicology Letters*, 259, S1.
- Nersesyan, A., Kundi, M., Fenech, M., Stopper, H., da Silva, J., Bolognesi, C., Mišik, M., & Knasmueller, S. (2022). Recommendations and quality criteria for micronucleus studies with humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 789.
- Nogar, A., & Larsen, B. (2014). Análisis de riesgos en la salud de la población rural de la Pampa Argentina por uso de agroquímicos en cultivo de soja. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(2), 71–84.

- Odetti, L., Dechiara, M. P., Marino, D., & Simoniello, M. F. (2017). Marcadores Tempranos De Daño Oxidativo Y Su Relación Con Factores De Riesgo En Una Localidad Ambientalmente Expuesta a Agroquímicos. *Fabricib*, 20, 11–23.
- Ogilvy-Stuart, A., & James, M. (2022). *Clinical Guideline : Management of Babies Born to Mothers with Thyroid Disease*. United Kingdom National Health Services.
- Økland, I., Odland, J. Ø., Matioceovich, S., Alvarez, M. V., Aarsland, T., Nieboer, E., & Hansen, S. (2017). The argentinian mother-and-child contaminant study: A cross-sectional study among delivering women in the cities of Ushuaia and Salta. *International Journal of Circumpolar Health*, 76(1).
- Olden, K., & Guthrie, J. (2001). Genomics: Implications for toxicology. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 473(1), 3–10.
- Oliveira, C. I. F., & Fett-Conte, A. C. (2013). Birth defects: Risk factors and consequences. *Journal of Pediatric Genetics*, 2(2), 85–90.
- Ortega-García, J. A., Aguilar-Ros, E., Ares-Segura, S., Agüera-Arenas, J. J., Pernas-Barahona, A., Sáenz de Pipaón, M., Campillo i López, F., & Ferrís i Tortajada, J. (2021). Occupational exposures, diet and storing: Recommendations to reduce environmental pollutants in breastfeeding. *Anales de Pediatría*, 94(4), 261.e1-261.e9.
- Pachajoa, H., Ariza, Y., Isaza, C., & Méndez, F. (2011). Defectos congénitos mayores en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia 2004-2008. *Revista de Salud Publica*, 13(1), 152–162.
- Papaseit, E., García-Algar, O., & Farré, M. (2013). Talidomida: una historia inacabada. *Anales de Pediatría*, 78(5), 283–287.
- Pareja, L., Niell, S., Vryzas, Z., González, J., Verónica Cesio, M., Mourkidou, E. P., & Heinzen, H. (2015). Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 98–104.
- Parsehian, S. Der. (2008). Plaguicidas organoclorados en leche materna. *Revista Del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 27(2), 70–78.
- Pawluk, M. S., Campanã, H., Gili, J. A., Comas, B., Giménez, L. G., Villalba, M. J., Scala, S. C., Poletta, F. A., & López Camelo, J. S. (2014). Determinantes sociales adversos y riesgo para anomalías congénitas seleccionadas. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 12(3), 215–223.
- Peng, F. J., Hardy, E. M., Béranger, R., Mezzache, S., Bourokba, N., Bastien, P., Li, J., Zaros, C., Chevrier, C., Palazzi, P., Soeur, J., & Appenzeller, B. M. R. (2020). Human exposure to PCBs, PBDEs and bisphenols revealed by hair analysis: A comparison between two adult female populations in China and France. *Environmental Pollution*, 267.
- Pérez-Carrascosa, F. M., Barrios-Rodríguez, R., Gómez-Peña, C., Salcedo-Bellido, I., Velasco-García, M. E., Jiménez-Moleón, J. J., García-Ruiz, A., Navarro-Espigares, J. L., Requena, P., Muñoz-Sánchez, C., & Arrebola, J. P. (2022). Public healthcare costs associated with long-term exposure to mixtures of persistent organic pollutants in two areas of Southern Spain: A longitudinal analysis. *Environmental Research*, 213.
- Pietryga, M., Dydowicz, P., Toboła, K., Napierała, M., Miechowicz, I., Gąsiorowska, A., Brązer, M., & Florek, E. (2017). Selected oxidative stress biomarkers in antenatal

- diagnosis as 11–14 gestational weeks. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 517–523.
- Qi, S. Y., Xu, X. L., Ma, W. Z., Deng, S. L., Lian, Z. X., & Yu, K. (2022). Effects of Organochlorine Pesticide Residues in Maternal Body on Infants. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
- Radomski, J. L., Astolfi, E., Deichmann, W. B., & Rey, A. A. (1971). Blood levels of organochlorine pesticides in Argentina: Occupationally and nonoccupationally exposed adults, children and newborn infants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 20(2), 186–193.
- Rai, B., & Mercurio, S. D. (2020). Environmentally relevant exposures of male mice to carbendazim and thiram cause persistent genotoxicity in male mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10629–10641.
- Raju, T. N. K., Buist, A. S., Blaisdell, C. J., Moxey-mims, M., & Saigal, S. (2017). *Adults born preterm: a review of general health and system-specific outcomes*. 1409–1437.
- Ramakrishnan, A., Lee, L. J., Mitchell, L. E., & Agopian, A. J. (2015). Maternal Hypertension During Pregnancy and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatric Cardiology*, 36(7), 1442–1451.
- Rebuzzini, P., Fabozzi, G., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., Zuccotti, M., & Garagna, S. (2022). Multi- and Transgenerational Effects of Environmental Toxicants on Mammalian Reproduction. *Cells*, 11(19), 1–24.
- Refsum, H. (2001). Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *British Journal of Nutrition*, 85(S2), S109.
- Regaldo, L., Gutierrez, M. F., Reno, U., Fernández, V., Gervasio, S., Repetti, M. R., & Gagneten, A. M. (2018). Water and sediment quality assessment in the Colastiné-Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6951–6968.
- Ridolfi, A., Alvarez, G., & Rodríguez Girault, M. E. (2014). Chapter 2. Organochlorinated Contaminants in General Population of Argentina and Other Latin American Countries. *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, 1–308.
- Rivera, E. M., Lavayén, S. N., Sánchez, P., Martins, C. M. A., Gómez, E., Rodríguez, J. P., Arias, M. E., Silva, A. P., & Angel, S. O. (2019). *Toxoplasma gondii* seropositivity associated to peri-urban living places in pregnant women in a rural area of Buenos Aires province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00121>
- Roberts, J., August, P., Bakris, G., Barton, J., & Bernstein, I. (2013). Hypertension, Pregnancy-Induced—Practice Guideline. American College of Obstetricians and Gynecologists (ed.).
- Roche Diagnostics. (2019). *Homocisteyne Enzimatic Assay*. En: https://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/hcys_2019-11_v4.pdf. Acceso: enero de 2023
- Rocheleau, C. M., Bertke, S. J., Lawson, C. C., Romitti, P. A., Sanderson, W. T., Malik, S., Lupo, P. J., Desrosiers, T. A., Bell, E., Druschel, C., Correa, A., & Reefhuis, J. (2015). Maternal occupational pesticide exposure and risk of congenital heart

- defects in the national birth defects prevention study. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 103(10), 823–833.
- Rodríguez, M. (2021). Así seguimos la pista de los contaminantes emergentes. *The Conversation*. Academic Journalism Society. En: <https://theconversation.com/asi-seguimos-la-pista-a-los-contaminantes-emergentes-156672>. Acceso: enero de 2023
- Rojas, A., Ojeda, M. E., & Barraza, X. (2000). Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. *Revista Médica de Chile*, 128(4), 399–404.
- Rostami, A., Riahi, S. M., Gamble, H. R., Fakhri, Y., Nouroollahpour Shiadeh, M., Danesh, M., Behniafar, H., Paktinat, S., Foroutan, M., Mokdad, A. H., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2020). Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, xxxx.
- Rudzi, S. K., Ho, Y. Bin, Tan, E. S. S., Jalaludin, J., & Ismail, P. (2022). Pesticides Exposure and Biomarkers of DNA damage: A Review. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 18, 106–119.
- Ruiz-Suárez, L. E., Castro-Chan, R. A., Rivero-Pérez, N. E., Trejo-Acevedo, A., Guillén-Navarro, G. K., Geissen, V., & Bello-Mendoza, R. (2014). Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(10), 10444–10460.
- Sakai, D., & Trainor, P. A. (2016). Face off against ROS: Tcof1/Treacle safeguards neuroepithelial cells and progenitor neural crest cells from oxidative stress during craniofacial development. *Development Growth and Differentiation*, 58(7), 577–585.
- Sambu, S., Hemaram, U., Murugan, R., & Alsofi, A. A. (2022). Toxicological and Teratogenic Effect of Various Food Additives: An Updated Review. *BioMed Research International*, 2022.
- Santos, M., Vivian, S., Vázquez, R., Cristobal, M., Torres, J., Grisel, G., & Vázquez, T. (2016). Factores de riesgo relevantes asociados a las malformaciones congénitas en la provincia de Cienfuegos 2008–2013. *Revista de Ciencias Médicas de Cienfuegos*.(4)6:737-747.
- Schraw, J. M., Langlois, P. H., & Lupo, P. J. (2021). Annals of Epidemiology Original article Comprehensive assessment of the associations between maternal diabetes and structural birth defects in offspring : a phenome-wide association study. *Annals of Epidemiology*, 53, 14-20.e8.
- Schulz, F., Jenetzky, E., Zwink, N., Bendixen, C., Kipfmüller, F., Rafat, N., Heydweiller, A., Wessel, L., Reutter, H., Mueller, A., & Schaible, T. (2021). Parental risk factors for congenital diaphragmatic hernia – a large German case-control study. *BMC Pediatrics*, 21(1), 1–8.
- Selevan, S. G., Kimmel, C. A., & Mendola, P. (2000). Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environmental Health Perspectives*, 108(3), 451–455.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (2021). *Res. 414/2021*. En: <https://www.boletinoficial.gob.ar/#!DetalleNorma/247780/20210806>. Acceso: enero de 2023.
- Simoniello, M. F., Contini, L., Benavente, E., Mastandrea, C., Roverano, S., & Paira, S. (2017). Different end-points to assess effects in systemic lupus erythematosus

- patients exposed to pesticide mixtures. *Toxicology*, 376, 23–29.
- Simoniello, M. Fernanda. (2011). Exposición ocupacional a los agroquímicos. Evaluación del daño genético y su relación con procesos de estrés oxidativo. [Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral].
- Singh, M., Thomas, P., Hor, M., Almond, T., Owens, J., Hague, W., & Fenech, M. (2017). Infant birth outcomes are associated with DNA damage biomarkers as measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay: The DADHI study. *Mutagenesis*, 32(3), 355–370.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Speit, G., Zeller, J., & Neuss, S. (2011). The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 26(1), 107–110.
- Staruchova, M., Collins, A. R., Volkovova, K., Mislanová, C., Kovacikova, Z., Tulinska, J., Kocan, A., Staruch, L., Wsolova, L., & Dusinska, M. (2008). Occupational exposure to mineral fibres. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defence and associations with DNA damage and repair. *Mutagenesis*, 23(4), 249–260.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2(3), 33–59.
- Steegers-Theunissen, R. P. M., Twigt, J., Pestinger, V., & Sinclair, K. D. (2013). The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: The importance of one-carbon metabolism. *Human Reproduction Update*, 19(6), 640–655.
- Stillerman, K. P., Mattison, D. R., Giudice, L. C., & Woodruff, T. J. (2008). Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: A review of the science. *Reproductive Sciences*, 15(7), 631–650.
- Suratman, S., Edwards, J. W., & Babina, K. (2015). Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: Pathways and risk of adverse health effects. *Reviews on Environmental Health*, 30(1), 65–79.
- Tellerias, L., & Paris E. (2008). Impact of toxics on neurodevelopment. *Rev Chil Pediatr*, 79(1), 55–63.
- Thiele, K., Kessler, T., Arck, P., Erhardt, A., & Tiegs, G. (2013). Acetaminophen and pregnancy: Short- and long-term consequences for mother and child. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 128–139.
- Thomas, P., Wu, J., Dhillon, V., & Fenech, M. (2011). Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 26(1), 69–76.
- Tinker, S. C., Gilboa, S. M., Moore, C. A., Waller, D. K., Simeone, R. M., Kim, S. Y., Jamieson, D. J., & Lorenzo, D. (2021). *National Birth Defects Prevention Study, 1997 – 2011*. 222(2), 1–21.
- Toboła-Wróbel, K., Pietryga, M., Dydowicz, P., Napierała, M., Brązert, J., & Florek, E. (2020). Association of Oxidative Stress on Pregnancy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

- Torres, M. L. (2017). *Atlas De Mortalidad Por Cáncer. Provincia De Santa Fe Años 2013-2015*. Dirección Provincial de Información para la Gestión.
- Urseler, N., Bachetti, R., Biolé, F., Morgante, V., & Morgante, C. (2022). Atrazine pollution in groundwater and raw bovine milk: Water quality, bioaccumulation and human risk assessment. *Science of the Total Environment*, 852.
- Vahabi Barzi, N., Eftekhari, Z., Doroud, D., & Eidi, A. (2022). Maternal exposure during organogenesis to chlorpyrifos insecticide induce apoptosis process. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 35(20), 3845–3852.
- Valladares, E., & Zavaleta, N. (2006). Caesarean Delivery Rates and Pregnancy Outcomes : *The 2005 WHO Global Survey on Maternal and Perinatal Health in Latin America Caesarean delivery rates and pregnancy outcomes*.
- Valverde, M., & Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681(1), 93–109.
- van den Dries, M. A., Lamballais, S., El Marroun, H., Pronk, A., Spaan, S., Ferguson, K. K., Longnecker, M. P., Tiemeier, H., & Guxens, M. (2020). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and brain morphology and white matter microstructure in preadolescents. *Environmental Research*, 191.
- van Wendel de Joode, B., Mora, A. M., Lindh, C. H., Hernández-Bonilla, D., Córdoba, L., Wesseling, C., Hoppin, J. A., & Mergler, D. (2016). Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. *Cortex*, 85, 137–150.
- Vanassi, B. M., Parma, G. C., Magalhaes, V. S., dos Santos, A. C. C., & Iser, B. P. M. (2022). Congenital anomalies in Santa Catarina: case distribution and trends in 2010–2018. *Revista Paulista de Pediatria*, 40.
- Vashishtha, E. (2022). Effects of Maternal Smoking on Fetus and Child Development : a literature review. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*. (6)1.
- Vivien, H., Hashim, Z., Ismail, P., Md Said, S., Omar, D., & Bahri Mohd Tamrin, S. (2013). Biological monitoring of genotoxicity to organophosphate pesticide exposure among rice farmers: Exposure-effect continuum study. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 2(1), 27–36.
- Wahaibi, F. Al, Zutshi, A., Panchatcharam, S. M., & Gowri, V. (2022). Obstetric and Neonatal Outcomes in Pregnant Women With Hypothyroidism: A Case–Control Study. *Perinatology*, 22(4), 252–257.
- Wallace, M. A. G., Kormos, T. M., & Pleil, J. D. (2016). Blood-borne biomarkers and bioindicators for linking exposure to health effects in environmental health science. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 19(8), 380–409.
- Weselak, M., Arbuckle, T. E., & Foster, W. (2006). Pesticide exposures and developmental outcomes: The epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 10(1–2), 41–80.
- Wesseling, C., Corriols, M., & Bravo, V. (2005). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 SUPPL.), 697–705.
- World Health Organization. (2000). Primary Health care approaches for prevention and

- control of congenital and genetic disorders. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66571/1/WHO_HGN_WG_00.1.pdf. Acceso: enero de 2023
- World Health Organization. (2022). Noncommunicable diseases. En: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Acceso: diciembre de 2022
- Yadav, U., Kumar, P., & Rai, V. (2021). Maternal biomarkers for early prediction of the neural tube defects pregnancies. *Birth Defects Research*, 113(7), 589–600.
- Yang, W., Zeng, L., Cheng, Y., Chen, Z., Wang, X., Li, X., & Yan, H. (2012). The Effects of Periconceptional Risk Factor Exposure and Micronutrient Supplementation on Birth Defects in Shaanxi Province in Western China. *PLoS ONE*, 7(12), 1–7.
- Yusa, V., Millet, M., Coscolla, C., & Roca, M. (2015). Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Analytica Chimica Acta*, 891, 15–31.
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227–236.
- Želježić, D., Mladinić, M., Žunec, S., Lucić Vrdoljak, A., Kašuba, V., Tariba, B., Živković, T., Marjanović, A. M., Pavičić, I., Milić, M., Rozgaj, R., & Kopjar, N. (2016). Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 90–106.
- Zhang, T. N., Huang, X. M., Zhao, X. Y., Wang, W., Wen, R., & Gao, S. Y. (2022). Risks of specific congenital anomalies in offspring of women with diabetes: A systematic review and meta-analysis of population-based studies including over 80 million births. *PLoS Medicine*, 19(2), 1–25.
- Zhao, W., Mosley, B. S., Cleves, M. A., Melnyk, S., James, S. J., & Hobbs, C. A. (2006). Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 76(4), 230–236.
- Zietz, B. P., Hoopmann, M., Funcke, M., Huppmann, R., Suchenwirth, R., & Gierden, E. (2008). Long-term biomonitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk from mothers living in northern Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(5–6), 624–638.
- Zumbado, M., Dominguez-Boada, L., Luzardo, O., Álvarez, E., Goethals, M., Serra, L., & Cabrera, F. (2004). Exposición inadvertida a plaguicidas organoclorados (DDT y DDE) en la población de las Islas Canarias. *Ecosistemas: Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 13(3), 7.
- Zúñiga-Venegas, L. A., Hyland, C., Muñoz-Quezada, M. T., Quirós-Alcalá, L., Butinof, M., Buralli, R., Cardenas, A., Fernandez, R. A., Foerster, C., Gouveia, N., Gutiérrez Jara, J. P., Lucero, B. A., Muñoz, M. P., Ramírez-Santana, M., Smith, A. R., Tirado, N., van Wendel de Joode, B., Calaf, G. M., Handal, A. J., Mora, A. M. (2022). Health Effects of Pesticide Exposure in Latin American and the Caribbean Populations: A Scoping Review. *Environmental Health Perspectives*, 130(9).
- Zúñiga Violante, E., Arellano García, E., Camarena Ojinaga, L., Daesslé Heusser, W., Von-Glascoe, C., Leyva Aguilera, J., & B., R. R. (2012). Daño genético y exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas del Valle de San Quintín, Baja California, México. *Rev. Salud Ambient.*, 12(2), 93–101.

14. Anexos

14.1 Instrumentos de recolección de datos sociodemográficos y de factores de riesgo

Fecha:.....Código.....

El objetivo de esta encuesta es obtener mayor información sobre cuáles podrían ser las causas de las malformaciones en chiquitos, ya que mucha de esta información se desconoce. Sus respuestas serán confidenciales.

Durante la entrevista, se le realizarán algunas preguntas acerca de sus actividades entre su embarazo y los 3 meses anteriores, sobre enfermedades que haya tenido, y de remedios que haya tomado. Por favor, incluya toda la medicación que haya tomado, tanto la recetada por un médico, como también aquellas sin receta, adquiridas en tiendas, farmacias, amistades, o parientes, hierbas o remedios caseros.

1. Datos personales:

- a) DNI: FN:.....
 Correo/teléfono:.....
- b) Alfabetizada: SI..... NO.... A.... Pl.... PC.... SI.... SC.... TI.... TC.... UI.... UC....

2. Datos habitacionales:

a) Lugar de residencia:

- b. Actual.....
- c. Domicilio:.....
- d. Durante el embarazo.....
- e. Se mudó durante este embarazo? SI..... NO.....

3. Datos de exposición

- a. Utilización de productos químicos en el domicilio (Raid, Fuyí, Gamexane, etc.) SI.... NO....
Cuáles?.....(Frecuencia).....
- b. Lo realiza Ud. misma? SI.... NO..... (si: ir a la tabla de exposición directa, no: ir a la de exposición indirecta).
- c. A qué se dedica? (actividad laboral):..... Desde cuándo? (años):.....
- d. Cambió la actividad laboral durante el embarazo? SI.... NO.....
- e. Actividad laboral anterior:.....
- f.Cuál es la actividad laboral del conviviente (pareja, cónyuge, hijos, padre, madre, etc.):.....

Formas de contacto (marcar con una cruz):

Exposición directa:	Exposición indirecta
Por contacto directo accidental?	Convivencia con trabajadores (n)
Por ausencia de equipo de protección durante la jornada	Lavar ropa contaminada
Por almacenamiento en la casa o habitación	Vivir cerca del lugar del trabajo
Trabaja en el campo?	
Por comer en lugar de trabajo	
Por utilizar envases vacíos de contenedores de agua para consumo	

4. Hábitos conductuales:

Hábitos conductuales	Antes del embarazo		1º trimestre		2º trimestre		3º trimestre	
	si	no	si	no	si	no	si	no
Consumo de frutas y verduras								
Consumo de bebidas no alcohólicas								
Actividad física								
Fumadora activa								
Fumadora pasiva								
Consumo de alcohol								
Consumo de drogas activa								
Consumo de drogas pasiva								

5. Hábitos higiénico-dietarios

- a. Qué tipo de agua toma? (marcar con círculo)
- a. De pozo/bomba? (ir a pregunta d) →
- b. Potable?
- b. Hace cuánto tiempo que la consume? (años):.....
- c. ¿Cuál consumía antes?.....

d) Usos (subrayar): Riego de huerta, bañarse, cocción/hervido, beber, preparación de infusiones (te/café/mate), lavado de frutas y verduras, preparación de

6. Estado de salud:

OBSTETRICOS		gestas previas	abortos	vaginales	nacidos vivos	viven
ULTIMO PREVIO n/c ☐ <2500g ☐ normal ☐ >4000g ☐ Antecedente de gemelares ☐ no ☐ si		☐ ☐ emb. ectópico	☐ ☐ 3 espont. consecutivos	☐ ☐ cesáreas	☐ ☐ nacidos muertos	☐ ☐ muertos 1 ^{ra} sem. ☐ después 1 ^{ra} sem.

EMBARAZO PLANEADO ☒ no ☐ si

FRACASO METODO ANTICONCEP.
☐ no usaba ☒ barrera ☒ DIU ☒ hormo nal ☒ emer gencia ☒ natural

- De cuántas semanas estaba embarazada cuando lo supo?.....
- Se realizó los controles de embarazo? SI..... NO.....
- En qué semana estaba de embarazo cuando se realizó el primer control?.....
- Se realizó algún estudio radiológico durante el embarazo? (si/no).....
- De cuántas semanas nació el bebé?..... Fecha de parto:.....

PADRE	FAMILIARES	PERSONALES	no	si	no	si
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	TBC	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	Neurológicas	☐ no ☒ si
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	diabetes	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	Tiroides ↑↓ H	☐ no ☒ si
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	hipertensión	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	Tumor/Cáncer	☐ no ☒ si
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	preeclampsia	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	Infecciosas	☐ no ☒ si
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	eclampsia	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si		
☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	Probl de nac	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si		

	Hierro	Folatos	ATB	Analgésic	Anticonv	P/fiebre	Pg	P/contracc	Hierbas	Otros
Anterior embarazo	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si
1º trimestre	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si	☐ no ☒ si

- Tiene algún parentesco sanguíneo (algún abuelo, tío o familiar en común) con el padre del bebé? SI... NO.... cuál?.....
- ¿Hay algún factor que usted cree que podría causar defectos de nacimiento? Cuál?.....

Muchas gracias por su participación!!

DATOS A PARTIR DE FUENTES SECUNDARIAS*

- Diagnóstico del RN:.....IQ:.....
- TORCH (si/no/trimestre).....
- Sífilis (si/no/trimestre).....
- Localidad materna:.....Nº habitantes:.....Sup. departamental:.....

e. Superficie departamental sembrada:.....

Tipos de industrias	Distancia al domicilio	En el departamento	
		N	%
Alimenticias			
Curtiembres			
Metalúrgicas			
Papeleras			
Químicas			
textil			

* Historia clínica, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), Instituto Provincial de Estadísticas y Censos (IPEC).

14.2 Protocolo Ensayo Cometa

✓ Reactivos y soluciones

Agarosa de punto fusión normal (APFN) al 1 %

Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 1%

Solución de lisis stock: 2,5 M NaCl +100 mM Na₂EDTA +10 mM Tris. Ajustar pH 10 con NaOH

Solución de lisis final: 40 ml de solución stock + 5 ml Dimetil sulfóxido (DMSO) + 400 µl Tritón. Preparar inmediatamente antes de su uso. Refrigerar a 4-10 °C, 30-60 min antes de usar.

Soluciones stock de electroforesis: A) 10 N NaOH; B) 200 mM Na₂EDTA, pH 10

Buffer de electroforesis final: 30 ml solución A + 5 ml solución B + H₂O csp 1 litro de buffer de electroforesis, pH>13.

Buffer de neutralización: 0,4M Tris. Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado.

Solución de Tinción: Naranja de acridina.

✓ Preparación de las muestras

Dilución de la sangre: 50 µl de sangre entera heparinizada + 200 µl de ABPF.

✓ Técnica operatoria

Por un lado, para la preparación de los portaobjetos, se fundió la APFN en microondas (2 minutos a baja potencia), para luego recubrir los portaobjetos con la misma, y posteriormente deshidratarlos en estufa 5 minutos, a 40°C, para lograr una capa de mordiente. Se agregó 200 µl de APFN y se cubrió inmediatamente con cubreobjetos, se llevó a heladera durante 10 minutos para que gelifique. Se retiró el cubreobjetos y se dejó secar en estufa 20 minutos a 50 °C. Esta preparación permite el guardado de los portaobjetos en un desecador, para su posterior utilización.

Por otro lado, se preparó la solución de lisis final en un vaso coplin, y se llevó a heladera para refrigerar hasta el momento de utilizarlo.

Finalmente, a dos portaobjetos con la primera capa deshidratada se le agregaron partes iguales de la mezcla: 200 μ l de ABPF (37°C) y sangre, colocando cubreobjetos sobre ambos portaobjetos para ser llevados a heladera por 10 min. Así, cada muestra se realizó por duplicado.

Se deslizó el cubreobjetos en forma lateral y se agregó una tercera capa de ABPF fundida a 37 °C. Se colocó el cubreobjetos y se dejó solidificar, se quitó el cubre y se sumergió los portaobjetos en solución de lisis fría. Se dejó a 4°C por 1 hora como mínimo y 4 semanas como máximo.

Todos los pasos posteriores se realizaron en ausencia de luz para evitar el daño extra que puede sufrir el ADN desnudo expuesto a la luz directa.

Cumplido el tiempo mínimo de lisis, se retiraron los preparados de dicha solución, se realizaron tres lavados, y posteriormente se agregó Endonucleasa (ENDO III), a uno de los portaobjetos y al otro solo buffer de la enzima. Luego se llevaron a estufa a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se sometieron a electroforesis en buffer alcalino, colocándose en una cuba horizontal en baño de hielo -que contenía el Buffer de electroforesis a 4°C-, por 20 min, para que se lleve a cabo el desenrollamiento (Unwinding) del ADN. Luego se realizó la electroforesis a 0,90 V/cm. durante 20 minutos. Se retiraron cuidadosamente los portaobjetos de la cuba y se realizaron 3 lavados con buffer de neutralización a intervalos de 5 minutos. Se escurrieron los preparados y se deshidrataron durante 5 minutos en alcohol etílico. Se conservaron en lugar seco.

Los preparados se tiñeron con 25 μ l de la solución de naranja de acridina, en el momento de la lectura, que se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus CX 40 equipado con un filtro de excitación U-RFLT 50) a 400 X.

14.3 Protocolo Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de citocinesis

- ✓ Reactivos y soluciones
 - Medio de cultivo RPMI 1640
 - Suero Fetal Bovino (SFB) 10%
 - Fitoheмоaglutinina (FHA)
 - Citocalasina-B
 - KCl 0,075 M
 - Solución de Carnoy (alcohol metílico:ácido acético 3:1)
 - Colorante Giemsa 10%
 - Preparación de medio de cultivo

RPMI+SFB: Se siguió el protocolo de (Fenech, 2007), para el cultivo de linfocitos en sangre periférica a partir de sangre entera.

CITOCALASINA B: El liofilizado de 1mg/L fue diluido en 1,66 ml de DMSO en el mismo frasco, para obtener una concentración de 600µl/L. Se fraccionó en 16 Eppendorfs de 100µl que fueron freezados a -20°C para su conservación. Posteriormente, para su uso, se descongelaba una alícuota y se agregaban 900µl de RPMI, para llegar a una concentración final de 60 µl/L, y se colocaron 82 µl en cada tubo falcon de cultivo.

SOLUCION SALINA HIPOTÓNICA KCl: Se preparó una Solución Madre de KCl 10X 0,75 M: Para ello, se pesaron 5,60 g de KCl y se mezclaron con 100 ml de agua destilada. Se mantuvo freezada (stock). Para la cosecha, se realizó una dilución 1/10 de la SM, y se mantuvo en heladera hasta su consumo total.

CARNOY: Prepararlo previo a la cosecha.

✓ Preparación de las muestras

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de las participantes del estudio, por punción venosa, y luego separadas en tubos; uno estéril con heparina y otro sin anticoagulante, para obtener suero.

✓ Técnica operatoria

- SIEMBRA (Se realizó al lado del mechero encendido, y bajo campana).
 - a. Se colocaron en un tubo Falcon estéril con tapa a rosca: 675 µl de RPMI, 150µl de SFB (o si ya están mezclados los dos 825 µl), 11,25 µL de PHA y 150 µl de sangre entera (heparinizada).
 - b. Se incubó el tubo a 37°C, durante 44 h, colocándolo en una gradilla inclinado unos 45°.
 - c. Cada muestra se realizó por duplicado.
- AGREGADO DE CITOCALASINA B (Se realiza al lado del mechero encendido y bajo campana).
 - d. A las 44 h, se retiraron del tubo 82 µl del sobrenadante, y se agregó el mismo volumen de Citocalasina B, agitando suavemente para homogeneizar.
 - e. Se incubó por 28 h más.
- COSECHA
 - f. A las 72 hs desde el inicio del cultivo, se agregaron 1,5 ml de solución salina hipotónica de KCl 1X¹ a cada tubo, se mezcló suavemente con pipeta Pasteur, y se refrigeró en heladera por 3 minutos.
 - g. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos lavados de 5 min cada uno, con Carnoy, el primero con 0,75ml y el segundo con 1,5ml.
 - h. Se descartó el sobrenadante, y del pellet restante se tomaron 100 µl para centrifugar, utilizando citocentrífuga, 5 min a 600rpm.

- i. Se rotularon los vidrios para cada muestra, previamente desengrasados con alcohol.
 - j. Una vez realizados los extendidos, se los dejó secar al aire.
 - TINCIÓN
 - k. Se colocaron los extendidos 10 min en metanol, y se dejó secar al aire.
 - l. Se tiñó con Giemsa al 10%.
- ¹solución salina de KCl 0,075M (hacer una dilución 1/10 para su utilización).