



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“RELACIÓN FENOTIPO/GENOTIPO DEL GEN *AS3MT* (-477) EN UNA POBLACIÓN
EXPUESTA A ARSÉNICO INORGÁNICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ERIKA HERNÁNDEZ CASTELLANOS



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PROFESORES

Presidente	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
Secretario	Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez
1°. Suplente	Prof. Maria Benita Leonor Fernandez Salgado
2°. Suplente	Prof. Maria Elena Bravo Gómez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Centro De Investigación y De Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sección Externa de Toxicología, Laboratorio 28.

Dirección: Av. IPN. No. 2508, México D.F., C.P. 07000

Asesor del Tema

Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez

Supervisor Técnico

M. en C. Luz Del Carmen Sánchez Peña

Sustentante

Erika Hernández Castellanos

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Sección Externa de Toxicología, laboratorio 28, bajo la tutoría de la Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez con apoyo de CONACYT a través del proyecto 50097-M.

Gracias Dios

Por la oportunidad que día a día me brindas de vivir en tu amor.

Agradezco y dedico este trabajo a mis padres

Filomena Castellanos Castellanos y Primitivo Hernández Castellanos

Por todo su amor, esfuerzo, sacrificio y confianza que han depositado en mí, por que sin ellos no seria la persona que soy.

A mí hermano *Uriel Hernández Castellanos* por compartir momentos tan especiales y demostrarme que la vida va más allá de libros y tareas.

A mis tíos *Teresa, Monico y Antonio* a mis abuelos *Aurelios* y mi abuelita *Esperanza* que en donde quiera que estén me cuidan y me guían en este andar por la vida.

A mis padrinos *Aurio y Juanita* por apoyarme siempre que los he necesitados desde el momento que nací.

A *Matilde, Remedios, Oscar* y El *Tío Paulino* por adoptarme todo este tiempo y hacerme sentir parte de su familia

A *Rafael Ramírez* por estar siempre a mí lado en los momentos más difíciles, por darme ánimos y fortaleza para continuar.

A mis *Familiares y Amigos* por su apoyo

“Aunque tuviera el don de profecía y descubriera todos los misterios –el saber más elevado-, aunque tuviera tanta fe como para trasladar montes, si me faltara amor nada soy” 1 Co13;2

Agradecimientos

*Con cariño y admiración a la **Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez** por darme la oportunidad de ser parte de este laboratorio y hacerme sentir que puedo lograr cualquier meta que me proponga.*

*A **M. en C. Luz del Carmen Sánchez Peña y Ángel Barrera Hernández** por su apoyo técnico en la realización de la fase experimental de este proyecto.*

*A **Carmen** por brindarme su amistad, cariño, amor y paciencia en este tiempo.*

*A **Verónica** por todo su apoyo, cariño y paciencia.*

*A **Abigail, Erika Edith, Yaneth C., Jeanett I. y Hugo** por haber compartido parte de su vida conmigo.*

A mis Profesores de toda mi carrera ya que gracias a sus enseñanzas soy la profesionalista que mi país necesita.

*A la **Dra. Elizabeth Langley** y la **M en C Yamileth Noriega** por haberme apoyado en los momentos más difíciles.*

*A mis Tíos **Catalina** y **Antonio** por su amor y su cariño.*

*A mis Primos **Elias, Toño, Ernesto, Leonardo y Beto** por ser mis amigos*

*A mis Primas **Viky, Margarita, Miriam, Paty y Yaneth** por que para mi son muy especiales.*

*A mi abuela **Antelma** por haberme dado a la mamá más maravillosa del mundo.*

*A **Rosy** y **Miguel** por apoyarme todo este tiempo y ser un modelo importante en mi vida.*

*A mi prima y modelo a seguir **Francisca Hernández** por que es un ejemplo de vida ya que todo lo que soñamos lo podemos lograr a pesar de algunas limitaciones.*

*A todos mis **amigos** y **hermanos** de comunidad por que con sus oraciones me ayudaron a superar mis adversidades.*

*A todos **mis familiares** por estar conmigo y compartirme su sabiduría día con día.*

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Propiedades físicas y químicas del arsénico	1
1.2 Fuentes de exposición a arsénico	1
1.2.1 Arsénico en el aire	2
1.2.2 Arsénico en el suelo	2
1.2.3 Arsénico en los alimentos	3
1.2.4 Arsénico como contaminante en el agua	3
1.3 Toxicocinética del arsénico	4
1.3.1 Absorción	4
1.3.2 Distribución y acumulación	4
1.3.3 Biotransformación	5
1.3.3.1 Metiltransferasa del arsénico	7
1.3.3.2 Polimorfismo del gen <i>AS3MT</i>	8
1.3.4 Excreción	10
1.4 Toxicidad del arsénico	11
1.4.1 Compuestos arsenicales de importancia toxicológica	12
1.4.2 Toxicidad de las especies metiladas	13
1.4.3 Mecanismo de acción	14
1.4.4 Estabilidad de especies arsenicales trivalentes en sistemas biológicos	15
1.5 Efectos tóxicos por la exposición crónica a arsénico inorgánico	15
1.5.1 Efectos no carcinogénicos	15
1.5.2 Efectos carcinogénicos	18
1.6 Características del área de estudio	18
1.6.1 Localización	18
1.6.2 Antecedentes mineros en el área de Zimapan	19

1.6.3	Abastecimiento y contaminación del agua por arsénico inorgánico en el municipio de Zimápan.	20
2.	JUSTIFICACIÓN	22
3.	HIPOTESIS	22
4.	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo general	22
4.2	Objetivo particular	22
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1	Material y equipo	23
5.2	Reactivos	23
5.3	Diseño del estudio	25
5.3.1	Criterios de inclusión	25
5.3.2	Criterios de exclusión	25
5.3.3	Variables del estudio	26
5.3.4	Etapas del estudio	26
5.3.4.1	Recopilación de la información y muestreo de agua para consumo humano	26
5.3.4.2	Exploración dermatológica	27
5.3.4.3	Obtención de células bucales	27
5.3.4.4	Obtención de la muestra de orina	28
5.4	Métodos analíticos	29
5.4.1	Determinación de arsénico total en agua	29
5.4.2	Determinación de especies arsenicales en orina	30
5.4.2.1	Proporción relativa de especies arsenicales (fenotipo)	32
5.4.2.2	Cálculo de la tasa indicadora de biotransformación	32
5.4.3	Determinación de creatinina en orina	33
5.4.4	Obtención de ADN en células bucales	34
5.4.4.1	Concentración y pureza del ADN	34
5.4.4.2	Integridad del ADN	35

5.4.5	Determinación del genotipo mediante PCR en tiempo real	35
5.4.5.1	PCR en tiempo real	36
5.4.5.2	Genotipificación del Polimorfismo	36
6.	RESULTADOS	38
6.1	Características de la Población de Estudio	38
6.2	Exposición ambiental a arsénico inorgánico	39
6.3	Concentración de las especies arsenicales en orina	40
6.4	Tasas indicadoras de la biotransformación del As_i	41
6.5	Patrón de metilación de arsenicales	42
6.6	Determinación del genotipo del SNP A-477G del gen <i>AS3MT</i>	43
6.7	Relación entre las especies arsenicales y el genotipo de <i>AS3MT</i>	44
6.7	Asociación de las covariables y variables confusoras con la presencia de lesiones en piel	46
6.8	Correlación entre las covariables y variables confusoras.	47
6.9	Relación entre el genotipo <i>AS3MT</i> con la presencia de lesiones en piel	48
7.	DISCUSIÓN	50
7.1	Características de los participantes	50
7.2	Exposición ambiental a As_i	50
7.3	Fenotipo del metabolismo del As_i	51
7.4	Determinación del genotipo de <i>AS3MT</i>	52
7.5	Relación entre las especies arsenicales y el genotipo de <i>AS3MT</i>	53
7.6	Relación entre el genotipo de <i>AS3MT</i> con la presencia de lesiones en piel	54
8.	CONCLUSIONES	55
9.	PERSPECTIVAS	56
10.	BIBLOGRAFÍA	57
11.	ANEXOS	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Fuentes de exposición a arsénico (ATSDR, 2005).	2
Tabla 2 Polimorfismos del gen <i>AS3MT</i> y su asociación con alteraciones en el metabolismo del As_i .	10
Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos y sondas utilizados para el análisis del SNP A-477G mediante PCR en Tiempo Real.	36
Tabla 4 Tipos de fluorescencias y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR-Tiempo Real.	37
Tabla 5 Características generales de la población de estudio (n=119).	38
Tabla 6 Tipos de lesiones cutáneas presentes en la población de estudio.	39
Tabla 7 Concentración de AsT en el agua de bebida en la población de estudio.	40
Tabla 8 Concentraciones urinarias de los metabolitos de As trivalentes y pentavalentes.	41
Tabla 9 Razones metabólicas indicadoras de la biotransformación del As_i .	41
Tabla 10 Genotipos y frecuencias alélicas del SNP (-477) del gen <i>AS3MT</i> en la población de estudio.	44
Tabla 11 Comparación de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas del SNP A-477G del gen <i>AS3MT</i> mediante la ecuación de Hardy-Weinberg, en la población de Zimapán.	44
Tabla 12 Comparación de las concentraciones, proporciones y tasas metabólicas totales en la biotransformación de As entre los genotipos.	45
Tabla 13 Comparación de las concentraciones, proporciones y tasas metabólicas según su estado de oxidación de los arsenicales entre los genotipos.	46
Tabla 14 Análisis de regresión logística bivariado de la presencia de lesiones en piel (n=119).	47
Tabla 15 Correlación entre las posibles variables confusoras.	48

Tabla 16 Comparación de frecuencias alélicas entre los individuos con y sin lesiones en piel (n=119). 49

Tabla 17 Análisis de regresión logística bivariado de las frecuencias alélicas entre los individuos con y sin lesiones en piel (n=119). 49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Biotransformación del Arsénico Inorgánico (Adaptado de Waters y col., 2004; Thomas y col., 2007).	6
Figura 2 Estructura del gen <i>AS3MT</i> (Word y col., 2006).	7
Figura 3 Estructuras de algunos compuestos arsenicales trivalentes y pentavalentes de importancia toxicológica (ATSDR, 2005).	13
Figura 4 Ubicación del área de estudio (Valenzuela, 2003).	20
Figura 5 Sistema utilizado para medir las especies arsenicales.	32
Figura 6 Tipos de fluorescencias y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en Tiempo Real.	37
Figura 7 Patrón de metilación del arsénico en la población de estudio.	42
Figura 8 Representación de los genotipos del SNP A-477G de 46 muestras.	43

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
As	Arsénico
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
AsH ₃	Arsinas
As _i	Arsénico inorgánico
As _i ^{III}	Arsenito
As _i ^V	Arsenato
AsT	Arsénico total
AS3MT	Metiltransferasa de arsénico
AS3MTr	Metiltransferasa de arsénico recombinante
ATP	Trifosfato de adenosina
ATSDR, U.S.	Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. (Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de los Estados Unidos)
C	Citosina
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DMA	Ácido dimetilarsinico
DMA ^{III}	Ácido dimetilarsenioso
DMA ^V	Ácido dimetilarsénico
EA	Exposición acumulada en función del tiempo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FIAS	Sistema por inyección de Flujo
G	Guanina
GR	Enzima reductasa de glutatión
Grx	Proteína glutaredoxina
GSH	Glutatión Reducido
GSSG	Glutatión Disulfuro
GST	Glutatión S-transferasa
IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IVU	Infección de vías urinarias
K _m	Constante de Michaelis-Mentel
LMP	Límite máximo permisible
MMA	Ácido monometil arsónico
MMA ^{III}	Ácido monometil arsenioso
MMA ^V	Ácido monometil arsénico
MQ	Agua mili Q
NIST, U.S.	National Institute of Standards y Technology, U.S. (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los Estados Unidos)
NRC	The National Research Council (Consejo Nacional de Investigación)
OR	Razón de momios

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppb	Partes por billón ($\mu\text{g/L}$, ng/L)
ppm	Partes por millón (mg/L)
SAH	Homocisteína
SAM	Sulfo- Adenosilmetionina
SH	Sulfhidrilo
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SRM	Materiales estándar de referencia
T	Timina
TMAO	Óxido trimetilarsénico
TR	Enzima tioredoxina reductasa
TRx	Proteína tioredoxina
UJED	Universidad Juárez del Estado de Durango
U.S., EPA	Environmental Protection Agency, U.S. (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos)
Vmax	Velocidad Máxima

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades Físicas y Químicas del Arsénico

El arsénico (As) es un elemento que se encuentra en el grupo VA de la tabla periódica, está clasificado como un elemento de transición o metaloide ya que posee propiedades físicas y químicas de los metales y no metales; su número atómico es 33 y su peso atómico es 74.9. Los estados de oxidación son -3, +3 y +5. En su estado elemental (0) el As se encuentra en forma sólida de color amarillo, es muy inestable y en su estado metálico (+3,+5) forma cristales grisáceos. Reacciona violentamente con cloro (ATSDR, 2005).

Al calentarse se combina con azufre y con la mayoría de los metales para formar su arseniuro (estado gaseoso) correspondiente. A presión atmosférica sublima a 613°C, a 400°C genera una llama blanca formando un sesquióxido As_4O_6 y cuando se calienta en presencia de aire se oxida, formándose el trióxido de arsénico bajo la forma de un humo blanco con un olor característico a ajo (ATSDR, 2005).

En fase acuosa el As se encuentra principalmente en forma de arsénico inorgánico (As_i), forma precipitados insolubles con varios elementos como el calcio, azufre, bario, aluminio y flúor, lo que disminuye la biodisponibilidad de los compuestos de As en el agua. En los microorganismos, las plantas y los animales, existe metilación y reducción de los compuestos arsenicales orgánicos (As_o) e inorgánicos, que son estables físicoquímica y biológicamente (Regmi y col., 2007)

1.2 Fuentes de Exposición a Arsénico

El As se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, sus fuentes de exposición pueden ser de origen natural y/o antropogénica (Tabla 1). Los seres humanos podemos estar en contacto con el As a través del aire, suelo, agua y alimentos; siendo el agua de bebida la principal fuente de exposición (ATSDR, 2005).

El As_i no es eliminado del ambiente, solamente cambia de forma al reaccionar con oxígeno o con otras moléculas; también puede ser biotransformado por acción de bacterias. Cuando el As se une a partículas ambientales muy pequeñas, puede permanecer en el aire por varios días, por acción del viento y la lluvia es arrastrado grandes distancias y se depositarse en agua de lagos y ríos. Los peces y alimentos

marinos son capaces de almacenar en sus tejidos compuestos de As en forma trimetilada orgánica, frecuentemente llamada “As marino” (ATSDR, 2005).

Tabla 1. Fuentes de exposición a arsénico (ATSDR, 2005).

Naturales
Erupciones volcánicas
Presencia de minerales del subsuelo

Antropogénicas
Minería y metalurgia (refinación de cobre y el plomo)
Plantas eléctricas (proceso de combustión de carbón y uso de insecticidas)
Aserraderos (conservador de la madera)
Agricultura (plaguicidas y herbicidas, especialmente en el cultivo del algodón)
Industria automotriz (en aleaciones para baterías ácidas de plomo)
Electrónica (semiconductores y diodos emisores de luz)
Raticida (productos químicos caseros)
Medicina (agente terapéutico para combatir leucemia)

Se ha estimado que la ingesta promedio de As orgánico e inorgánico a partir de las fuentes naturales, es de alrededor de 50µg/día, por lo que se ha propuesto como dosis tolerable de ingestión diaria el valor de 2.0 µg/Kg (WHO, 1996)

1.2.1 Arsénico en el aire

Las concentraciones de As_i en el aire en sitios alejados de actividades antropogénicas son de 1 a 3 ng/m³, mientras que en áreas industriales emisoras de As se pueden encontrar concentraciones entre 100-300 ng/m³ (ATSDR, 2005).

1.2.2 Arsénico en el suelo

La concentración del As_i en el suelo varía ampliamente, los intervalos van de 1 a 40 mg/kg, con un nivel promedio de 5 ppm; sin embargo, los suelos cercanos a depósitos geológicos ricos en As_i, como fundidoras, zonas mineras o áreas agrícolas, los niveles pueden ser hasta de 10,000 mg/kg (ATSDR, 2005).

Algunas formas orgánicas e inorgánicas de As son todavía utilizadas en la agricultura y silvicultura como insecticidas, herbicidas y fungicidas, aunque su uso está siendo paulatinamente reducido. Actualmente, se utilizan algunos compuestos arsenicales tales como la roxarsona y el ácido fenilarsónico como aditivo en alimentos de aves y cerdos; se ha demostrado que las heces de las aves contienen bacterias de los géneros *Clostridium* y *Lactobacillus*, las cuales son capaces de biotransformar la

roxarsona en sales de arseniato, contribuyendo a la exposición de As_i en suelos (Stolz y col., 2007).

1.2.3 Arsénico en los alimentos

Los alimentos de origen marino (peces y crustáceos) contienen concentraciones altas de As ($> 20 \mu gAs/g$) (De Gieter y col., 2002; Ninh y col., 2006). Generalmente, del 96 al 99% del As_i ingerido por los organismos marinos es biotransformado a compuestos orgánicos más complejos como la arsenobetaina (AsB), la arsenocolina (AsC) y arsenoazúcares (NRC, 2001); que al ser ingeridos por los humanos se absorben en un 70% sin biotransformarse en el tracto gastrointestinal y son excretados rápidamente en la orina (Pellizzari y col., 2006). Estos tipos de arsenicales orgánicos son considerados de baja toxicidad (Borak y Hosgood, 2007)

1.2.4 Arsénico como contaminante en agua

La concentración del As_i en agua es muy variable y, probablemente, depende de las formas de As_i presentes en el subsuelo (WHO, 2001).

Se ha observado que el estado de oxidación del As se ve afectado por la temperatura, el pH, la salinidad y la presencia de luz. Las principales especies de As presentes en el agua son el arsenito (As_i^{III}) y el arseniato (As_i^V), siendo esta última la forma predominante (WHO, 2001).

La contaminación de las aguas subterráneas por sales de As_i origina lo que se conoce en Latinoamérica como hidroarsenicismo regional endémico. Se ha estimado que más de 100 millones de individuos en el mundo están expuestos a concentraciones elevadas de As_i a través del agua de bebida proveniente de los pozos profundos, siendo el As_i^V la especie principal presente (Mukherjee y col., 2008).

En México desde la década de los 30, el límite máximo permisible (LMP) era de $50 \mu g/L$ de As_i en el agua de bebida. Con base a los estudios realizados en Taiwán, que determinaron el efecto carcinogénico del As , la Agencia de Protección Ambiental de EUA (US, EPA, 2000), propuso una reducción drástica de 50 a $10 \mu g/L$ en el LMP. En México el LMP ha disminuido gradualmente de 50 a $25 \mu g/L$ desde el 2000 hasta el 2007, de acuerdo a lo estipulado en la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 2000).

1.3 Toxicocinética del Arsénico

La velocidad con la que se distribuyen las especies arsenicales en los organismos depende de varios factores como:

A) La **vía de exposición**, siendo la vía oral la que presenta mayor biodisponibilidad (Kenyon y col., 2005).

B) Las **características fisicoquímicas** (estructura y estado de oxidación), se ha descrito que la exposición a especies arsenicales trivalentes presentan mayor capacidad de absorción y acumulación en órganos y tejidos (Kenyon y col., 2005).

C) La **dosis**, se ha observado que la capacidad de acumulación de As_i y sus metabolitos en roedores depende de la dosis, se presenta mayor excreción de As_i y menor excreción de especies metiladas conforme incrementa la dosis (Csanaky y col., 2003; Kenyon y col., 2005).

D) El **tipo de exposición**, estudios realizados en animales muestran que la capacidad de biotransformación, la retención celular y la excreción de los arsenicales es diferente entre exposiciones agudas y/o crónicas (Hughes y col., 2005; Kenyon y col., 2005)

1.3.1 Absorción

En los humanos y en la mayoría de especies animales, la absorción de As_i se realiza principalmente a través del tracto gastrointestinal (95%) cuando se administra en solución acuosa, también se puede absorber a través de tracto respiratorio (30%) la cual depende del tamaño de las partículas inhaladas y de la solubilidad del compuesto arsenical, siendo el As_i la partícula más pequeña ($<10 \mu m$) que se encuentra suspendida en el aire debido a las actividades antropogénicas (ATSDR, 2005). Otra vía que contribuye en menor proporción (2-6 %) es la absorción a través de la piel la cual se lleva por contacto directo con el suelo y el agua (Lowney y col., 2005).

1.3.2 Distribución y Acumulación

Estudios en animales muestran que a dosis bajas de arsénico ($0.75 mg As_i^V/kg$) las especies As_i y DMA se encuentran principalmente en hígado y riñón mientras que a dosis altas de arsénico ($7.5 mg As_i^V/kg$) las especies MMA y DMA se encuentran en riñón y pulmón (Kenyon y col., 2005). En caso de ratones expuestos a dosis única de

arsénico, las especies As_i y MMA se acumulan preferentemente en sangre, hígado y riñón, estando en menor proporción el DMA en tejidos (Kenyon y col., 2005).

En general las especies arsenicales se acumulan principalmente en órganos bien irrigados con distribución sistémica como son el hígado, riñón, pulmón y vejiga, estando presentes en menor proporción en tejidos liposolubles como son el tejido adiposo (Paul y col., 2007) y el cerebro (Hughes y col., 2000; Rodriguez y col., 2005). Las especies trivalentes comparadas con las pentavalentes, tienen mayor capacidad de acumulación en los tejidos, debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Hirano, 2003; Zhang y col., 2007) como la queratina contenida en cabello, piel y uñas (ATSDR, 2005).

Por su semejanza química con el fósforo, también puede depositarse en huesos y dientes, quedándose retenido por largo tiempo (ATSDR, 2005).

1.3.3 Biotransformación

En humanos, así como en muchos mamíferos la biotransformación del As_i se realiza principalmente en el hígado. Se ha propuesto que en el organismo la biotransformación del As_i se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de reducción y de metilación oxidativa. (Waters y col., 2004), sugieren que la enzima metiltransferasa del arsénico (AS3MT) es determinante en el metabolismo del As_i . La AS3MT cataliza los procesos de metilación con sulfo adenosil metionina (SAM), donadora de grupos metilos, así como los procesos de reducción en presencia de reductores endógenos como el GSH, el sistema tiorredoxina y el ácido lipóico, formándose las especies trivalentes y pentavalentes, que son metabolitos intermediarios o finales en esta vía. El mecanismo propuesto se muestra en la Figura 1 la metilación de As_i involucra una reducción de As_i^V a As_i^{III} , seguida de incorporación de un grupo metilo en la molécula de As_i^{III} para obtener el ácido monometil arsénico (MMA^V), después se postula una reducción MMA^V a MMA^{III} previa a la segunda metilación, produciéndose el ácido dimetil arsénico (DMA^V) el cual sufre una tercera reducción DMA^V a DMA^{III} , seguida de una tercera metilación formándose el óxido trimetil arsénico ($TMAO^V$) recientemente identificado en muestras de orina de individuos expuestos ambientalmente, éste compuesto trimetilado ha sido considerado de menor toxicidad (Thomas y col., 2001; 2007). Una vez que los arsenicales son metilados, éstos no son desalquilados (Zakharyan y col., 2001).

Se ha postulado que el perfil normal de excreción urinario de las especies arsenicales en humanos es aquél que presenta de un 10-30% As_i^{III+V} , 10-15% MMA^{III+V} y 60-80% DMA^{III+V} (Concha y col., 2002; Vahter y Concha, 2001).

En poblaciones humanas ambientalmente expuestas a As_i las proporciones de As_i , MMA, y DMA en la orina son muy variadas, estos resultados muestran que existe una variación intraespecie e interindividual en los procesos de reducción y de metilación del As, que puede estar relacionados con la actividad catalítica de la AS3MT, así como de los cofactores que esta enzima necesita (Valenzuela y col., 2005).

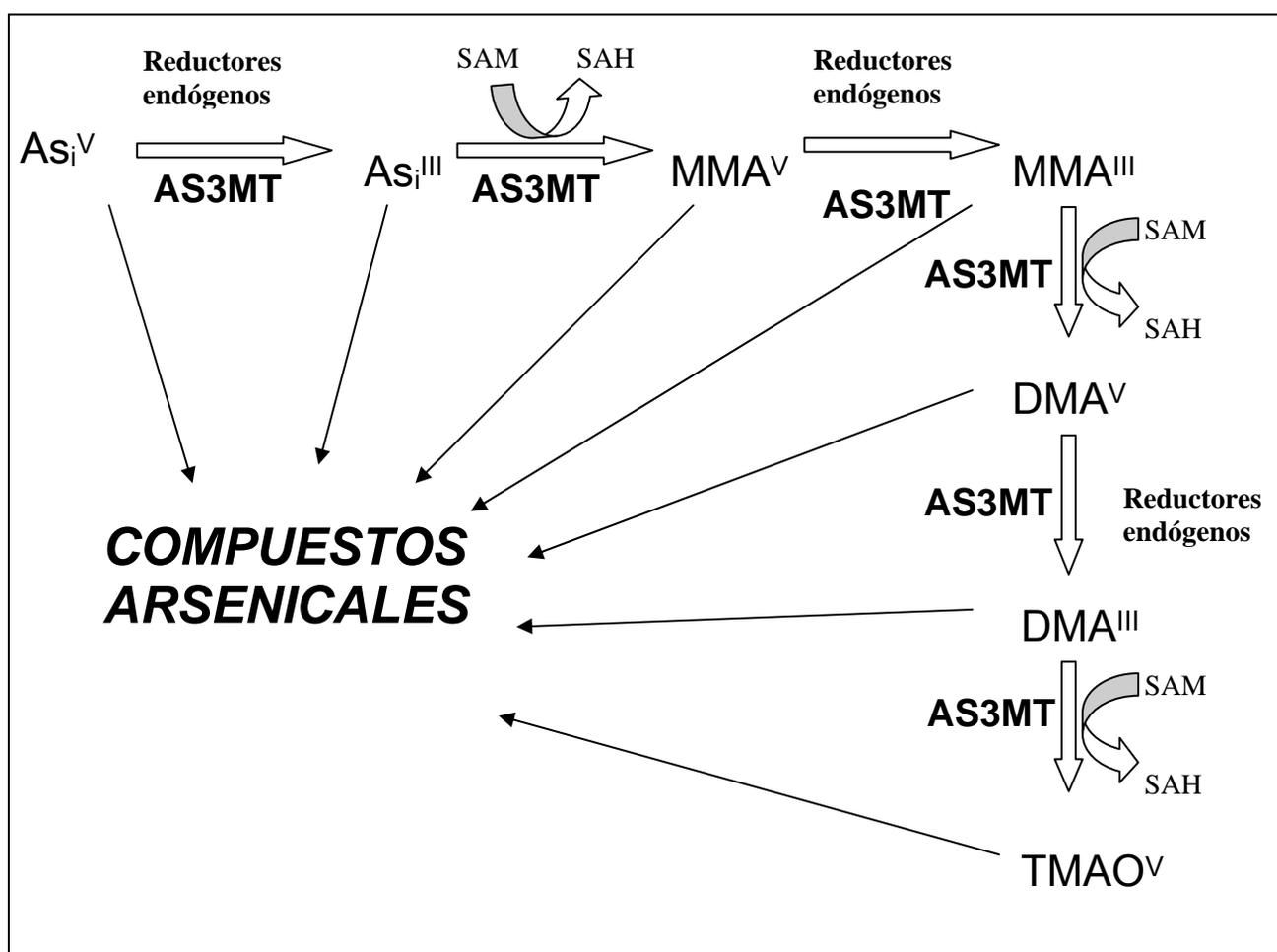


Figura 1. Biotransformación del Arsénico Inorgánico
(Adaptado de Waters y col., 2004; Thomas y col., 2007).

1.3.3.1 Metiltransferasa del arsénico

La enzima arsénico 3 metiltransferasa (AS3MT) recién purificada del hígado de rata, es una proteína constituida de 375 aminoácidos que tiene un peso molecular aproximado de 41 kDa y contiene 2 dominios metiltransferasa (Lin y col., 2002). El gen *AS3MT* en el humano, se localiza en el cromosoma 10q24, tiene una longitud de 32 kb y consta de 11 exones (Figura 2) (Wood y col., 2006).

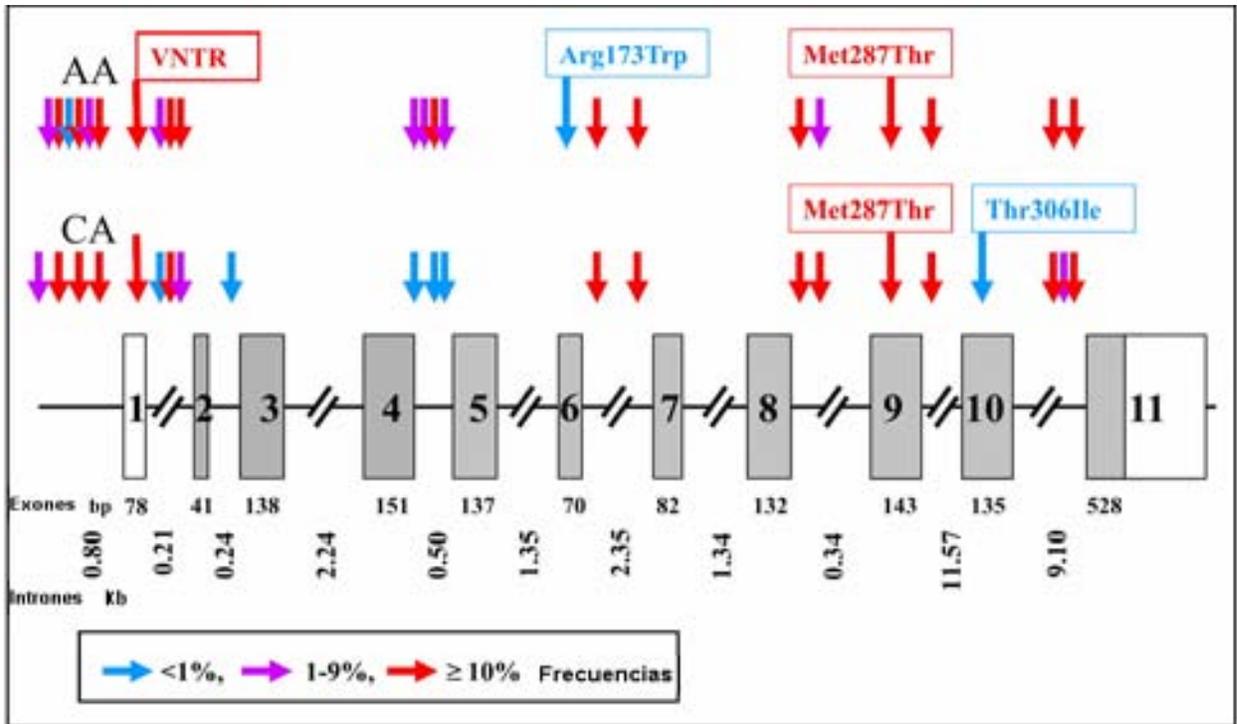


Figura 2. Estructura del gen *AS3MT*. Los rectángulos sombreados representan la región codificante, las flechas indican la ubicación de los polimorfismos y su frecuencia (Modificada de Wood y col., 2006).

La enzima AS3MT tiene regiones que están presentes en otras metiltransferasas como el dominio UbiE, el cual contiene motivos, tal como el motivo I que tiene residuos de glicina (G) conservados (ILDLGSGSG) que se han relacionado con la unión a SAM, dicha región se encuentra en el exón 3; el motivo II (LMFDANFT) incluye un aminoácido aromático fenilalanina (F) seguido de un residuo de aspartato (D), el cual se sugiere como otro sitio de unión a SAM, dicha región se encuentra en el exón 8 (Lin y col., 2002). Se ha descrito que la enzima AS3MT, purificada del hígado de rata, presenta 13 residuos de cisteínas que se encuentran conservados en la enzima AS3MT de

humanos, los cuales se sugieren como posibles sitios de unión a As_i^{III} , es decir que estas cisteínas podrían tener un papel crucial en la capacidad metabólica de esta enzima (Thomas y col., 2004).

El valor de la constante de metilación de As_i obtenida de la AS3MT de rata tiene una $K_m = 250nM$, $V_{max} = 0.04 \mu M/mg$ de proteína/min (Lin y col., 2002).

Waters y col., evaluaron la capacidad de la enzima AS3MT recombinante (AS3MTr) para catalizar la formación de MMA y DMA a partir de As_i , observando que ésta enzima cataliza no sólo la metilación oxidativa de As , sino también interviene en la reducción de MMA^V a MMA^{III} , usando sistemas de reductores endógenos tales como: a) tiorredoxina (Trx) / tiorredoxina reductasa (TR) / NADPH, b) glutarredoxina (Grx) / glutatión reductasa (GR) / NADPH y c) ácido dihidrolipoico (DHLA) / TR / NADPH (Waters y col., 2004).

La enzima AS3MT es expresada de manera constitutiva principalmente en el hígado, pero también se ha observado su expresión en el corazón, cerebro, bazo, pulmón, músculo esquelético, glándula renal, vejiga urinaria, testículos, ovarios, riñones y glándulas tiroideas (Kobayashi y col., 2007; Lin y col., 2002; Meza y col., 2007). Sin embargo, hasta el momento se desconoce que ésta sea una enzima inducible y que participe en algún proceso fisiológico en el organismo, además no se le conoce un sustrato endógeno, solo su participación en la biotransformación del As_i .

La capacidad de los humanos para biotransformar al As_i , depende de varios factores como son la dosis, el tiempo de exposición (Del Razo y col., 1997; Valenzuela y col., 2005), el estado nutricional (Vahter y Marafante, 1987), problemas hepáticos (Buchet y Lauwerys, 1987), el embarazo (Hopenhayn y col., 2003; Vahter y col., 2006), el ayuno (Brima y col., 2007) y la edad (Meza y col., 2007)

Recientemente se ha observado que la presencia de los polimorfismos en el gen *AS3MT* es determinante en el metabolismo del As_i (Engström y col., 2007; Hernández y col., 2008; Lindberg y col., 2007; Meza y col., 2005, 2007; Wood y col., 2006).

1.3.3.1.1 Polimorfismo del gen *AS3MT*

Los primeros estudios acerca de la variación interindividual del gen *AS3MT* se realizaron en cultivos primarios de hepatocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de As_i , en donde se observó un cambio del aminoácido metionina por treonina en el codón 287 que se encuentra en el motivo II de unión a SAM, proponiendo

que dicho cambio podría ser responsable de un aumento en la capacidad de formación de MMA^{III} a niveles altos de exposición a As_i (Drobna y col., 2004).

Además, en ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de metilación de esta enzima, en las cuales se expresó la enzima AS3MT recombinante de humano (AS3MTr) en células de rata, en presencia de los cofactores SAM y tris carboxietil fosfina (TCEP), que es un reductor no endógeno, se observó que después de realizar mutaciones puntuales en el gen *AS3MTr*, que consisten en el cambio de algunos residuos de cisteínas conservados por serina, y usando As_i^{III} como sustrato se observó una disminución en la capacidad de formación de metabolitos metilados en el caso de la cisteína 61 y una ausencia de la metilación en el caso de la cisteína 156. Por lo tanto, los residuos de cisteínas conservados, podrían tener un papel crítico en la actividad metabólica de la AS3MT (Thomas, 2004).

El análisis del perfil de excreción urinario de las especies arsenicales en humanos, permite evaluar la capacidad de metilación de cada individuo, se ha postulado que un patrón de metilación normal es aquél que presenta de un 10-30% As_i^{III+V}, 10-15% MMA^{III+V} y 60-80% DMA^{III+V} en la orina (Concha y col., 2002; Vahter y Concha, 2001). Sin embargo, se ha observado que individuos que presentan una menor capacidad de metilación, dada por un incremento en MMA^{III+V} y con una disminución DMA^{III+V} en la orina, presentan mayor riesgo de desarrollar efectos adversos a la salud tales como enfermedades vasculares periféricas, lesiones en piel, cáncer en piel y vejiga (Tseng 2007). Otros estudios (Valenzuela y col., 2005) muestran que el incremento en la proporción de MMA^{III+V} en los individuos con lesiones en piel en comparación con los que no tienen lesiones; es principalmente como MMA^{III}, confirmando lo encontrado en varios estudios en los cuales el MMA^{III} es el metabolito que presenta una mayor toxicidad en varios órganos y tejidos (Cohen y col., 2006; Hirano y col., 2003; Sakurai y col., 2006; Styblo y col., 2000). Por esta razón, es de gran interés evaluar las diferencias en la capacidad metabólica que pueden contribuir en la susceptibilidad de presentar efectos adversos a la salud por exposición crónica a As_i. En la tabla 2 se presentan algunos polimorfismos del gen *AS3MT* estudiados y la relación que tienen en la biotransformación del As_i.

Tabla 2. Polimorfismos del gen *AS3MT* y su asociación con alteraciones en el metabolismo del As_i .

Estudios	Variante Región	Cambio de nucleótido	Población/frecuencia alélica	Efectos/fenotipo	Referencia
In vitro	M287T (Exón 9)	T → C	Células COS-1	↑ actividad enzimática (350%) y ↑ formación de MMA ^{III}	Drobna y col., 2004; Wood y col., 2006
	A173W (Exón 6)	C → T	Células COS-1	↓ actividad enzimática (31%)	Wood y col., 2006
	T306I (Exón 10)	C → T	Células COS-1	↓ actividad enzimática (4.8%)	Wood y col., 2006
In vivo	2393 (Intrón 3)	G → A	Hombres, mujeres y niños de Sonora G:0.61 A:0.39	↓ % MMA en la orina	Meza y col., 2005,2007
	7388 (Intrón 6)	G → C	Hombres, mujeres y niños de Sonora G:0.58 C:0.42	↓ % MMA en la orina	Meza y col., 2005,2007; Engström y col., 2007
	30585 (Intrón 9)	T → C	Hombres, mujeres y niños de Sonora T:0.63 C:0.37	↓ % MMA en la orina	Meza y col., 2005,2007
	14215 (Intrón 8)	C → T	Mujeres indígenas de Argentina C:0.28 T:0.72	↓ % MMA en la orina	Engström y col., 2007
	35991 (Intrón 9)	G → A	Mujeres indígenas de Argentina G:0.24 A:0.76	↓ % MMA en la orina	Engström y col., 2007
	M287T (Exón 9)	T → C	Hombres y mujeres de Hungría, Rumania y Eslovaquia T=0.89 C=0.11	↑ % MMA y ↓ % DMA en la orina	Lindberg y col., 2007
	M287T (Exon 9)	T → C	Hombres Chilenos T:0.91 C:0.09	↑ % MMA en la orina	Hernández y col., 2008
	-114 Promotor	G → C	Hombres Chilenos G:0.91 T:0.09	↑ % MMA en la orina	Hernández y col., 2008

1.3.4 Excreción

Estudios *in vivo* en animales de experimentación muestran que la excreción de las especies de As se lleva a cabo principalmente a través de la orina, dependiendo del tipo de exposición y la concentración del arsenical al que se está expuesto. En ratones expuestos a dosis única de As_i^V (0.7mg/Kg) se presenta una mayor excreción urinaria del metabolito DMA (60-80% de la dosis), seguida por el As_i (20-40%) y <4% como

MMA en comparación con exposiciones repetidas (95% DMA, 5% As_i y <1% MMA), como se puede observar, a mayor tiempo de exposición se incrementa la excreción DMA en la orina mientras que disminuye la proporción de As_i y MMA (Hughes y col., 2003; Kenyon y col., 2005). Esta disminución en la proporción As_i y MMA en orina se ha observado en ratas expuestas con dosis de 100ppm de As_i^V en agua, en comparación con la exposición de agua con 10ppm de As_i^V . (Cui y col., 2004). La presencia de las especies arsenicales en heces representa un 4% de dosis, debido a la alta absorción que sufren las especies arsenicales en el intestino (Menzel y col., 1994). Se ha descrito que en animales expuestos a As_i^{III} , presentan una mayor excreción de As_i^{III} y MMA^{III} en las heces bajo la forma de conjugados de GSH mediante excreción biliar por la circulación enterohepática (Csanaky y Gregus, 2002; Kobayashi y col., 2005; Suzuki y col., 2004).

La excreción de los arsenicales en poblaciones humanas crónicamente expuestas a As_i es generalmente de un 10-30% como As_i , 10-20% en forma de MMA y del 60-80 % en forma de DMA (Concha y col., 2002; Vahter y Concha, 2001). También se ha identificado presencia de As en muestras de cabello y uñas, debido a que el As tiene afinidad por los grupos tioles de las proteínas, como una menor fuente de excreción (Lin y col., 1998) sin embargo la concentración de arsenicales en orina ha sido tradicionalmente aceptada como el mejor indicador de la exposición a As, debido a que el riñón es la principal vía de eliminación de la mayoría de las especies arsenicales (NRC, 2001). La metilación del As_i es evaluada generalmente en orina con la medición de $As_i^{(III+V)}$, $MMA^{(III+V)}$ y $DMA^{(III+V)}$ (NRC, 2001).

1.4 Toxicidad del Arsénico

La toxicidad de los compuestos de As depende principalmente de su estado de oxidación y de su forma química. Estudios realizados en diferentes protocolos de experimentación han señalado a la especie As_i^{III} como el principal elemento involucrado en las diversas alteraciones sistémicas observadas tras la exposición a este elemento. Como los arsenicales metilados pentavalentes (MMA^V y DMA^V) son significativamente menos tóxicos y menos mutagénicos que el As_i^{III} (Yamauchi y col., 1994) la biotransformación de As_i había sido generalmente aceptada como un proceso de desintoxicación. Esto no quiere decir que las especies metiladas pentavalentes de As no sean tóxicas, solo que su toxicidad es uno ó hasta dos órdenes de magnitud menor

en comparación con las especies arsenicales trivalentes (Kenyon y col., 2001). De hecho existen varias evidencias en estudios en ratas que muestran que el DMA^V es un promotor de la carcinogénesis en piel (Yamanaka y col., 2000), pulmón (Yamanaka y col., 1996), vejiga (Wanibuchi y col., 1996), hígado (Wanibuchi y col., 1997), riñón y tiroides (Yamamoto y col., 1995).

1.4.1 Compuestos arsenicales de importancia toxicológica

La toxicidad de los compuestos del arsénico varía considerablemente dependiendo de su forma y estructura química. Por lo tanto, los compuestos de As con mayor importancia toxicológica son los compuestos formados a partir de As inorgánico (As_i) trivalentes y pentavalentes, productos de su biotransformación. En la Figura 3 se muestran las estructuras de los arsenicales con mayor relevancia toxicológica.

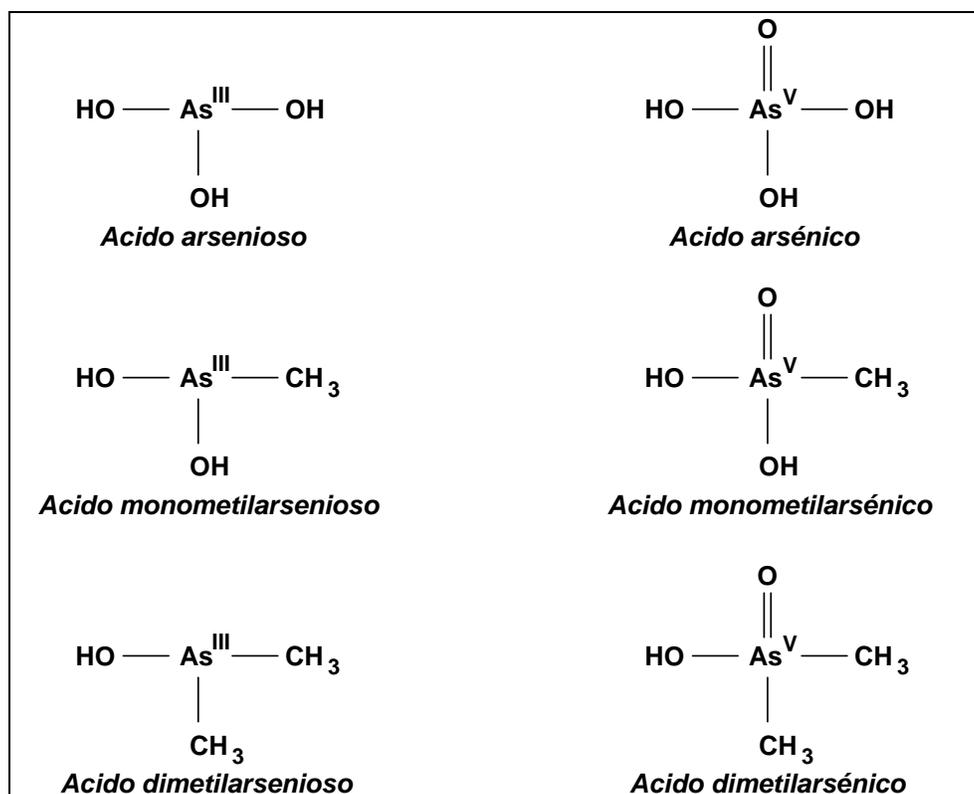


Figura 3. Estructuras de algunos compuestos arsenicales trivalentes y pentavalentes de importancia toxicológica (ATSDR, 2005).

Otros compuestos arsenicales de menor importancia toxicológica la constituyen los organoarsenicales trimetilados provenientes de ciertos hongos, algunas algas, y alimentos de origen marino, tales arsenicales son la arsenocolina

$[(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH-X}^-]$, arsenobetaína $[(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$, óxido de trimetilarsina $[(\text{CH}_3)_3\text{As=O}]$, o bien arsenicales de estructuras más complejas que pueden ser dimetilados o trimetilados como los arsenoazúcares y arsenolípidos presentes principalmente en crustáceos, algas y aceites de pescado (Andrewes y col., 2004; Hirata y col., 2005).

1.4.2 Toxicidad de las especies metiladas trivalentes

A finales de la década de los 90 apareció la primera información que muestra comparativamente, que las especies arsenicales metiladas trivalentes (metabolitos intermedios de la biotransformación de As_i) son más tóxicas que el As_i^{III} . La información sobre la toxicidad de estos intermediarios (MMA^{III} y DMA^{III}) en diferentes modelos experimentales ha ido en ascenso (ATSDR, 2005).

De acuerdo a lo descrito en la literatura, las especies metiladas trivalentes inhiben la actividad enzimática de flavoproteínas reductasas dependientes de NADPH tales como la reductasa de glutatión (GR) (Stybło y col., 1997) y reductasa de tiorredoxina (TR) los cuales mantienen el estado redox intracelular (Lin y col., 2001; Stybło y col., 1999); son más citotóxicos que el As_i^{III} en diferentes tipos de células animales y de humanos (Petrick y col., 2000; Stybło y col., 1999; 2000); tienen una mayor actividad genotóxica en linfocitos humanos, además de interactuar directamente con el ADN desnudo (Mass y col., 2001; Peng y col., 2002; Schwerdtle y col., 2003); inhiben a la enzima piruvato hidrogenasa (Petrick y col., 2001); son más potentes activadores de la fosforilación de factores de transcripción como el AP-1 que el As_i^{III} (Drobna y col., 2003), son clastogénicos, induciendo la formación de aberraciones cromosómicas (Kligerman y col., 2003), son mutagénicos, mediante la generación de deleciones transgénicas (Klein y col., 2007), generan peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas (Wang y col., 2007) y el MMA^{III} induce la transformación de células epiteliales de vejiga (Bredfeldt y col., 2006).

En resumen, las evidencias recientes demuestran que las especies metiladas trivalentes formadas durante el metabolismo de As_i presentan mayor toxicidad que las especies metiladas pentavalentes, sugieren fuertemente la reconsideración de la teoría aceptada desde la década de los 40 de que la metilación de As es una vía de desintoxicación. Actualmente la metilación de As_i es reconocida como una vía de

activación, contradiciendo la aseveración general de que únicamente las especies As_i^V son las formas tóxicas activas (Aposhian, 1997; Styblo y col., 2000).

1.4.3 Mecanismo de Acción

El As_i^V es un desacomplante de la fosforilación oxidativa; su mecanismo de acción se relaciona con la sustitución competitiva del As_i^V por un fosfato inorgánico en la formación del trifosfato de adenosina (ATP). Por otro lado el As_i^{III} inhibe varias enzimas ya que reacciona con ligandos biológicos que contienen grupos sulfhidrilo (SH) disponibles, por lo cual es más tóxico que el As_i^V (ATSDR, 2005).

El As_i^{III} tiene una alta afinidad por grupos tioles (SH) vecinos, por lo que al unirse a las proteínas que tienen residuos de grupos tioles que son críticos para su actividad, puede interferir con la función normal celular (Samikkannu y col., 2003).

Las células de los mamíferos poseen un sistema que regula la función del estado redox celular de los tioles, protegiendo a las proteínas que contengan grupos SH, del excesivo estado de oxidación. Entre éstos se incluyen enzimas de bajo peso molecular que donan grupos SH, para catalizar la reducción de grupos SH de proteínas y agentes pro-oxidantes por conjugación con GSH. El efecto protector de GSH contra los efectos tóxicos del As, sugiere que la toxicidad del As resulta de la formación de uniones reversibles con los grupos SH de las proteínas (Watson y col., 1996).

Estudios realizados *in vitro* (Le y col., 2002) han detectado que las especies metiladas trivalentes del As (MMA^{III} y DMA^{III}) tienen mayor afinidad que el As_i^{III} por los grupos tioles. La metaloproteína y metalotioneína, que tiene 20 grupos tioles forma complejos con As al unirse con 6 moléculas de As_i^{III} , 10 de MMA^{III} y 20 de DMA^{III} , esto demuestra la mayor afinidad que tienen las especies metiladas trivalentes por lo grupos SH que el As_i^{III} (Le y col., 2002).

La actividad oxidante del As ha sido demostrada principalmente con el As_i^{III} , esta actividad oxidante puede ser explicada por sus características de oxianión con un par de electrones 4s no compartidos, lo que favorece la interacción con las moléculas biológicas, incluyendo al ADN, mientras que las especies pentavalentes pierden esta reactividad química. Cuando el As_i^{III} es metilado, los grupos hidroxilo que son ionizables, son remplazados por grupos metilo sin carga que pueden aumentar la hidrofobicidad y disminuir la ionizabilidad del intermediario, por lo que, tanto MMA^{III} como DMA^{III} pueden ser capaces de interactuar directamente con el ADN más fácilmente que el propio As_i^{III} (Mass y col., 2001).

1.4.4 Estabilidad de las especies arsenicales metiladas en sistemas biológicos

Las especies metiladas trivalentes, debido a su estructura y alta reactividad, son muy inestables en el medio ambiente, en presencia de oxígeno tienden a oxidarse rápidamente. La especie DMA^{III} es más inestable que el MMA^{III} (Del Razo y col., 2001). La oxidación de las especies arsenicales trivalentes dependen de manera importante de la matriz biológica en la que se encuentren; por ejemplo, el MMA^{III} en cultivos celulares permanece sin oxidarse durante 2 semanas, mientras que en la orina un 25% es oxidado en 24 hrs (Del Razo y col., 2001).

La estabilidad de estas especies ha sido evaluada en orina humana. Se ha reportado que el 60% del MMA^{III} es oxidado a MMA^V después de almacenar la muestra de orina por dos semanas a 4°C (Le y col., 2000); que el 25% del MMA^{III} y el 41% del DMA^{III} se oxidó en muestras de orina almacenadas a 4°C durante 24hrs (Del Razo y col., 2001); muestras conservadas a -20°C fueron más estables que las almacenadas a 25 y 4°C, sugiriendo que la estabilidad de las especies trivalentes depende del tiempo y la temperatura a la cual se almacena la muestra de orina (Gong y col., 2001); el 30% del MMA^{III} y el 100% del DMA^{III} fueron oxidados a MMA^V y DMA^V, respectivamente, después de 24h de almacenar las muestras de orina a -20°C. Recientemente se reportó que al mantener las muestras a -70°C y evaluando dentro de las primeras 6 horas de obtener la orina, es posible detectar el 100% de MMA^{III} y un 75% del DMA^{III} (Valenzuela-Limón, 2003).

1.5 Efectos tóxicos por la exposición crónica a arsénico inorgánico

Los efectos causados por la exposición a As_i dependen de varios factores como son la vía de exposición, el tipo de arsenical al que se está expuesto y el tipo de exposición. Una exposición crónica es el resultado de exposiciones prolongadas o repetidas a varias dosis subtóxicas por periodos de tiempo largos (Valenzuela, 2003).

1.5.1. Efectos no Carcinogénicos

La exposición a As_i causa una amplia gama de efectos sistémicos adversos dentro de los que destacan:

a) **Efectos Cardiovasculares-** El As puede afectar la estructura y función del endotelio vascular desarrollando enfermedades vasculares periféricas (Tseng y col., 1995), trombosis arterial, hipertensión (Chen y col., 2007; Rahman y col., 1999), aterosclerosis (Wang y col., 2002; Simeonova y Luster, 2004), enfermedad cardíaca isquémica (Chen y col., 1996) y la enfermedad del pie negro que se caracteriza por una progresiva disminución de la circulación en las manos y pies, seguido por una necrosis y gangrena (Chen y col., 1992).

b) **Efectos Respiratorios-** Se han observado efectos pulmonares que se manifiestan con tos, sonidos en el pecho y respiración acelerada, principalmente en niños de 10-19 años (Guha y col., 2000); una alta prevalencia de bronquitis y tos crónica, que se incrementan con la magnitud de la exposición (Milton y col., 2002); así como también enfisema pulmonar y obstrucción de vías aéreas (Engel y Smith, 1994)

c) **Efectos Hepáticos-** Se han reportado aumentos en las concentraciones de alanina aminotransferasa y bilirrubina en suero (Hernández-Zavala y col., 1998); alteración en la concentración de gama glutamil transferasa y la transferasa pirúvica glutámica en suero de mujeres ocupacionalmente expuestas a As_i (Luo y col., 2002). También se ha encontrado hepatomegalia y fibrosis portal no cirrótica (Guha y col., 2001);

d) **Efectos Inmunológicos-** Se ha descrito una disminución en la proliferación de los linfocitos (Ostrosky-Wegman y col., 1991), retraso en la progresión del ciclo celular (Gonsebatt y col., 1997), observándose un arresto en la fase G1 (Hernández-Zavala y col., 2005), supresión de la respuesta inmune mediada por células (Savabieasfahani y col., 1998; Soto-Peña y col., 2006).

e) **Efectos neurológicos-** Se han descrito neuropatías a nivel de sistema nervioso central y sistema periférico (Rodríguez y col., 2003). Los primeros síntomas a exposiciones crónicas han sido identificados a concentraciones de ~0.02 mg As/kg/día, produciendo una polineuropatía sensorial con disminución de la sensibilidad del sentido del tacto, así como alteraciones audiovisuales, sensoriales y disminución de la libido (Rahman y col., 2001; Mukherjee y col., 2003). Además se ha observado la presencia de manifestaciones neurológicas no neuropáticas, en pobladores adultos de Bengala, India expuestos a 242-923 µg/L de As en el agua de bebida, en quienes se observaron cambios en el comportamiento como: irritabilidad, depresión, insomnio o somnolencia, dolor de cabeza, vértigo y falta de concentración (Rahman y col., 2001).

f) **Efectos sobre el sistema endocrino-** El As_i es considerado un disruptor endocrino, es decir, que altera la actividad normal de algunas hormonas (Davey y col.,2007). Se ha reportado que el As_i posee actividad estrogénica y androgénica (Benbrahim-Tallaa y col., 2005, 2007; Waalkes y col., 2000, 2004). Además, se ha descrito que la exposición a As_i contribuye a la presencia de diabetes mellitus (Coronado-González y col., 2007; Chen y col., 2007; Zierold y col., 2004), a este respecto se ha sugerido que el As_i^{III} y su metabolito MMA^{III} inhiben el ingreso celular de la glucosa que es estimulado por la insulina (Paul y col., 2007).

g) **Lesiones en piel-** La presencia de lesiones cutáneas clásicas asociadas a la exposición a As_i se conoce con el nombre de arsenicismo (NRC, 2001). La ingestión crónica de 0.01mg/kg/día ó mas vía oral en los seres humanos, produce arsenicismo, (ATSDR, 2005; NRC, 2001).

En el caso de la exposición crónica se han reconocido las siguientes lesiones cutáneas:

- La hipopigmentación se presenta principalmente sobre las partes no expuestas del cuerpo, tales como el tronco, la región glútea y el tercio superior de los muslos, aunque pueden estar presentes en cualquier parte del cuerpo. Se presentan como decoloraciones con apariencia de gotas de lluvia, su diámetro es muy variado (Kshitish, 2003).
- La hiperpigmentación está distribuída de manera similar a la hipopigmentación, se caracteriza por su pigmentación café oscuro con apariencia de gota de lluvia. Estos signos pueden estar presentes en ausencia de la hipopigmentación, aunque es común que se presenten en manera conjunta, a lo que se conoce como discromías o hipo e hiperpigmentación tipo confeti (Kshitish, 2003).
- La hiperqueratosis palmoplantar se presenta en los bordes laterales de las palmas y los dedos, así como en las plantas, arco del pie y cara anterior de los dedos del pie. Aunque también suelen estar presentes de manera difusa en las palmas y en los pies. Inclusive en algunas ocasiones sólo una de estas regiones (pies o manos) es la afectada. Están caracterizadas por elevaciones pequeñas corniformes, usualmente de 0.4 a 1 cm de diámetro, y son de aspecto nodular (Kshitish, 2003).
- La hiperqueratosis corporal se encuentra distribuida en cualquier parte del cuerpo con excepción de las palmas de la mano y planta de los pies. Se

caracterizan por placas escamo-queratinosas o como parches planos y eritematosos (Kshitish, 2003).

- Los cuernos cutáneos son un tipo de hiperqueratosis palmoplantar que se caracteriza por nódulos muy elevados de 10 a 30 mm de diámetro (Kshitish, 2003).

1.5.2. Efectos Carcinogénicos

El As_i no es un genotóxico que actúa de manera directa, pero puede incrementar el daño al ADN y generar mutaciones indirectamente, debido a que inhibe la reparación del ADN (Andrew y col., 2003; 2006) y puede también actuar como un co-carcinógeno o como un promotor tumoral y de progresión del cáncer (Rossman, 2003); causa incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y de intercambio de cromátidas hermanas (Gradecka y col., 2001), producción de entrecruzamientos entre el ADN y proteínas nucleares (Ramírez y col., 2000), incremento en el número de micronúcleos en linfocitos (Basu y col., 2002), en células epiteliales exfoliadas de vejiga y de la cavidad oral (Gonsebatt y col., 1997; Basu y col., 2002).

El As_i es reconocido como un agente carcinogénico, clasificado en el grupo A (con suficiente evidencia en humanos) por la Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer (IARC, 1990). Existen varios estudios epidemiológicos que muestran que las personas expuestas a As_i presentan una incidencia alta de cáncer de piel, riñón, hígado, vejiga y pulmón (Cantor y Lumbin, 2007; Casanovas-Taltavull y col., 2006; Walvekar y col., 2007; Yang y col., 2004).

1.6 Características del Área de Estudio

1.6.1 Localización

En México la exposición a As_i a través del agua de bebida es un problema grave presente en varias áreas geográficas como es el caso del área de Zimapán. Este es el municipio más grande del estado de Hidalgo, tiene una superficie total de 905.83 Km, colinda al sur con los municipios de Tecozautla y Tasquillo, al este con los municipios de Jacala, Nicolás Flores e Ixmiquilpan, y al oeste con el municipio de Tecozautla y Querétaro (Figura 4). Está conformado por 84 comunidades donde habitan sus casi 40 mil habitantes. Su clima es templado y seco, con una temperatura media de 19°C

presenta un déficit del 40% en el suministro de agua, ya que su precipitación es de 391mm/año, es decir que llueve aproximadamente 10 días al año. La cabecera municipal de Zimapán se localiza justo a 126 kilómetros al noroeste de Pachuca y a 240 kilómetros del Cinvestav-IPN, en el campus de Zacatenco de la Ciudad de México (INEGI, 2000).



Figura 4. Ubicación del área de estudio (Valenzuela, 2003).

1.6.2 Antecedentes Mineros en el Área de Zimapán

Durante el período de 1632 a 1810 operaron 40 fundidoras, pequeñas y medianas, en lo que ahora es el área urbana de Zimapán y zonas aledañas, que se dedicaban a la fundición de plata y plomo. La intensa explotación minera produjo grandes volúmenes de jales en los exteriores de las minas y en menor proporción en las inmediaciones de la zona urbana de Zimapán. Los residuos de las fundidoras,

aunque proporcionalmente de menor volumen que los jales, también se acumularon en los alrededores de los asentamientos de Zimapán. Se ha comprobado que la concentración de As_i (8,300 mg/Kg) en los residuos sólidos de las fundidoras contaminan por lixiviación las formaciones acuíferas (Méndez y Armienta, 2003). Actualmente el área de Zimapán es todavía explotada mineralmente por una planta llamada San Francisco, la cual se encarga de la extracción de oro, plata y zinc, así como de calcio, azufre, hierro, magnesio y manganeso (Ongley y col., 2007).

1.6.3 Abastecimiento y contaminación del agua, por arsénico inorgánico en el municipio de Zimapan.

El valle de Zimapán se encuentra localizado en la cuenca del Río Pánuco. La principal fuente de abastecimiento de agua potable la constituye el sistema acuífero local. Hasta la década de los 70 las necesidades de agua se satisfacían mediante la explotación de norias de 5 a 15 metros de profundidad. Cuando los volúmenes requeridos fueron mayores se realizaron excavaciones de pozos profundos, abasteciendo sus requerimientos con agua extraída 13 pozos profundos. Sin embargo, en 1992 durante una campaña para conocer el avance del cólera en la zona, se identificó que al menos 4 pozos presentaban concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/L}$ de As_i , además de que uno de ellos, el de mayor aporte de agua a la cabecera municipal (10 litros por segundo) y a 13 comunidades más, presentaba una concentración muy alta (~1,200 $\mu\text{g/L}$), por lo que este último fue clausurado en 1996. Los estudios realizados durante ese tiempo mostraron que el As_i presente en el agua subterránea de Zimapán procedía de los minerales presentes en las rocas calizas (principalmente arsenopirita), la lixiviación de los depósitos de jales (relativamente baja) y los procesos de fundición que se efectuaban (Armienta y col., 1993). Durante 2004, se perforó un nuevo pozo que actualmente sustituye el aporte de agua del pozo clausurado cuya concentración de As_i es de 4 $\mu\text{g/L}$. Las autoridades locales están planeando clausurar paulatinamente los otros tres pozos de agua contaminada y sustituirlos con acuíferos de buena calidad.

Diversos trabajos han evaluado la contaminación de As en esta área. En un estudio realizado en la cabecera del municipio de Zimapán (Armienta y col., 1997),

encontraron que los habitantes de Zimapán tenían una concentración promedio de AsT en el cabello de 8.55 ± 3.56 mg/kg, siendo este valor 6 veces mayor al valor de referencia, además de presentar lesiones en piel clásicas por la exposición crónica a As_i, tales como hipopigmentación (19.6%), hiperpigmentación (12.8%) e hiperqueratosis (26.5%). Se realizó un estudio en otras localidades de Zimapán (Aguacatito, Puerto Juárez, Barrón y Detzani), encontrando signos de arsenicismo tales como hipopigmentación, hiperpigmentación e hiperqueratosis palmo-plantar (Lechuga y col., 2001).

Se evaluaron las especies de As trivalentes y pentavalentes en la orina de individuos de las localidades del Aguacatito, Llano Norte, El Muhi y Calvario encontrando una asociación entre las concentraciones de MMA^{III} en la orina con la presencia de lesiones en piel en esta población. En este estudio las personas que presentaron mayor proporción de MMA^{III} en la orina mostraron un riesgo del 14% de desarrollar lesiones en piel (Valenzuela y col., 2003). Por lo anterior resulta importante evaluar si el polimorfismo genético de la *AS3MT* que es una enzima determinante en el metabolismo del As_i, podría ser utilizado como un marcador de susceptibilidad a la toxicidad causada por la exposición a este metaloide, ya que se ha observado que existen diferencias interindividuales en la capacidad de biotransformar al arsénico, por lo tanto individuos que presenten un genotipo con una mayor capacidad metabólica serán más susceptibles a desarrollar los efectos por la exposición a este metaloide, debido a una mayor formación de los metabolitos metilados trivalentes, considerados como de mayor toxicidad que son generados como intermediarios o producto final durante la biotransformación del As_i.

2. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento los efectos tóxicos observados por la exposición a As_i han sido relacionados con la dosis, el tiempo de exposición y alteraciones en el metabolismo del As_i ; sin embargo, es importante determinar el papel genético de la enzima *AS3MT* en el metabolismo del As_i y su asociación con daños a la salud (lesiones cutáneas como la melanosis e hiperqueratosis) para identificar a los individuos susceptibles a los efectos adversos causados por la exposición a este metaloide.

Se han descrito numerosos polimorfismos en diferentes regiones intrónicas y exónicas del gen *AS3MT*, algunos de estos polimorfismos ejercen un efecto en la excreción de especies arsenicales en humanos (fenotipo). En la actualidad sólo existe un reporte acerca del SNP G-515A localizado en la región promotora del gen *AS3MT*, en el cual se observa un aumento de la proporción de MMA en una población de mujeres argentinas (Schläwicke, 2007), por lo que es de nuestro interés determinar el efecto que pudiera tener el SNP A-477G que se localiza en la región promotora del gen *AS3MT* y determinar si existe alguna relación con el metabolismo al As_i en una población de Zimapán Hidalgo que a estado expuesta a este metaloide.

3. HIPÓTESIS

Los individuos que presente la variación alélica G del SNP A-477G que se localiza en la región promotor del gen *AS3MT* pueden presentar variaciones en la biotransformación del As_i .

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

La evaluación del SNP A-477G que se localiza en la región promotora del gen *AS3MT* como factor de susceptibilidad en la toxicidad causada por la exposición a As_i .

4.2 Objetivos Particulares

- 1) Determinar el fenotipo en la población de estudio evaluando el patrón de biotransformación del As_i en orina.
- 2) Identificar el genotipo por medio del SNP A-477G de la población de estudio.
- 3) Evaluar la relación entre el fenotipo y el genotipo en la población de estudio.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material y Equipo

- Centrifuga marca Jovan, modelo CR3i
- Lector de microplacas marca Spectra max plus, modelo 384
- Microcentrifuga marca Hsiangtai, modelo 2000
- Parrilla marca Lab-Line, modelo 2053
- Espectrofotómetro marca Termo Spectronic, modelo 302
- ABI PRISM Sequence Detection System de Applied Biosystems, modelo 7000
- Balanza analítica marca ADAM, modelo AAA250L
- Espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer, modelo 3100
- FIAS (Flow Injection Autosampler) marca Perkin Elmer, modelo 200
- Fuente de poder para lámpara de descarga sin electrodo System 2
- Integrador Nelson, modelo 1020
- Lámpara de descarga sin electrodo de As marca Perkin Elmer, modelo No. 10621
- Espectrofotómetro Vitalab ECLIPSE marca Merck
- Microbalanza MT-5 Mettler-Toledo
- Parrilla de calentamiento Thermolyne, modelo 2200
- Campana de trabajo para PCR/UV, marca Biocold Scientific, modelo COY
- Transiluminador UV marca UVP, modelo M-26
- Micropipetas de volumen variable de 0.1, 0.2, y 5 mL marca Eppendorf
- Micropipetas de volumen variable de 0.01, 0.02 y 1 mL marca Gilson
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL de polipropileno marca Falcon
- Tubos de 0.6 y 1.5 mL marca eppendorf
- Vasos de precipitados de 100 mL.

5.2 Reactivos

- Ensayo comercial de purificación para DNA (GFX genomic Blood DNA Amersham Biosciences, Inc., Uppsala, Sweden)
- oligonucleótidos y Sondas Taqman para el SNP A-477G (Taqman Universal PCR-Master Mix, Big Dye™ Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.)
- Ensayo comercial para creatinina (RANDOX, San diego, CA, USA)

- Proteínasa K (Fermentas)
- EDTA (Fermont)
- Tanque de Aire comprimido grado cero (INFRA)
- Tanque de Argón alta pureza (INFRA)
- Tanque de Helio grado cromatográfico (INFRA)
- Tanque de Hidrogeno grado cromatográfico (INFRA)
- Nitrógeno líquido (INFRA)
- Azarosa grado analítico (Invitrogen)
- Buffer Fosfatos (PBS) (Invitrogen)
- agua DEPC (Invitrogen)
- ácido clorhídrico (HCl) al 37% grado analítico (Merck)
- ácido nítrico (HNO₃) al 62% grado analítico (Merck)
- ácido perclórico (HClO₄) al 72% grado analítico (Merck)
- ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 97% grado analítico (Merck)
- cloruro de sodio (NaCl) grado reactivo (Merck)
- hidróxido de sodio (NaOH) suprapuro (Merck)
- yoduro de potasio (KI) grado analítico (Merck)
- Tris-HCl (Merck)
- persulfato de potasio (JT Baker)
- estándar de referencia (SRM) 1643e para AsT en el agua
- SRM 2670 para el AsT en orina (NIST)
- antiespumante B grado reactivo (Sigma)
- arsenato de sodio grado analítico (AsNaSO₃)
- arsenito de sodio grado analítico (AsNaSO₂)
- azul de bromofenol grado analítico
- borohidruro de sodio (NaBH₄) suprapuro
- bromuro de etidio (Invitrogen)
- ácido monometil arsénico grado analítico (MMA^V)
- ácido dimetilarsénico grado analítico (DMA^V)
- ácido monometil arsenioso grado analítico (MMA^{III})
- ácido dimetilarsenioso grado analítico (DMA^{III})
- dodecil sulfato de sodio (SDS)
- glicerol grado analítico (SIGMA)

- PMSF (SIGMA)
- triton X-100 (SIGMA)

Nota: El ácido monometil arsénico (MMA^V) (Vineland Company), el ácido monometil arsenioso (MMA^{III}) y el ácido dimetilarsenioso (DMA^{III}) fueron sintetizados por el Dr. William Cullen (British Columbia) y donados por el Dr David J. Thomas de la USEPA.

5.3 Diseño del Estudio

La presente investigación fue un estudio epidemiológico de corte transversal aprobado por el comité de ética del Cinvestav (COBISH) en el que se invitó a participar a individuos residentes de tres localidades del municipio de Zimapán, Hidalgo los cuales están expuestos a concentraciones bajas y altas de As₃ a través del agua de bebida. Los participantes del estudio tuvieron condiciones socioeconómicas similares, los cuales fueron seleccionados en base a los criterios de inclusión y exclusión.

5.3.1 Criterios de Inclusión

- Residentes habituales de las localidades del Calvario, Llano Norte y El Aguacatito
- Firmar el consentimiento informado (aceptado por el Comité de ética del CINVESTAV) Anexo 1
- Personas de cualquier género de 18 a 60 años de edad
- Proporcionar una muestra de agua usada para consumo humano
- Haber contestado el cuestionario y haberse sometido a una evaluación clínica dermatológica
- Donar una muestra de orina de micción espontánea
- Haber donado una muestra del células bucales

5.3.2 Criterios de Exclusión

- Personas con tiempo de residencia menor a 1 año
- Mujeres que estuviesen embarazadas
- Individuos que no cumplieran con alguno de los criterios de inclusión

5.3.3 Variables del estudio

Variables Independientes

- La evaluación del SNP A-477G
- Concentraciones de AsT en el agua de bebida (como indicador de la exposición actual)

Variables Dependientes

- Concentraciones urinarias de los metabolitos de arsénico en orina (As_i^{V} , As_i^{III} , MMA^{V} , MMA^{III} , DMA^{V} , DMA^{III})
- Presencia de Lesiones en Piel

Variables Confusoras

- Edad
- Estado nutricional, mediante la evaluación del Índice de Masa Corporal (IMC)
- Hábito de Fumar
- Consumo de bebidas alcohólicas
- Infección de vías urinarias
- Exposición acumulada en función del tiempo (EA) (como indicador de la exposición histórica)

5.3.4 Etapas del Estudio

El presente estudio fue realizado en 3 etapas: 1) Aplicación de un cuestionario y recolección de muestras de agua, 2) Exploración dermatológica y 3) Recolección de muestras biológicas (orina y células bucales).

5.3.4.1. Recopilación de la información y muestreo de agua para consumo humano

En base a un muestreo aleatorio, se invitó a participar al 20% de cada una de las tres poblaciones de estudio (Calvario, Llano Norte y El Aguacatito). Cada participante fue informado verbalmente y por escrito, de los objetivos, protocolo y características del estudio. Los participantes del estudio otorgaron su consentimiento por escrito antes de iniciar el estudio, en total se aplicaron 160 encuestas.

Para evaluar factores asociados a la exposición al As_i, se aplicó un cuestionario precodificado que ya ha sido utilizado en otras investigaciones relacionadas con la exposición al As_i, a través del agua de consumo humano (Anexo 2) (Valenzuela, 2006). Este cuestionario fue diseñado para obtener información general como el nombre, edad, ocupación, hábitos personales, hábitos de dieta, consumos habituales de agua, tiempo de residencia en el poblado, exposición a medicamentos, exposición al sol, así como historia clínica para evaluar la presencia de algunas enfermedades como presencia de diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades hepáticas y renales, entre otras.

Las muestras de agua empleadas para consumo humano fueron recolectadas en recipientes de polipropileno de 100 mL previamente lavados con ácido nítrico al 10% en el laboratorio. Las muestras de agua se preservaron en hielo durante su transporte y posteriormente se guardaron en congelación hasta el momento de la cuantificación de AsT.

5.3.4.2 Exploración Dermatológica

Una semana después de la aplicación de los cuestionarios y de la recolección de muestras de agua, se realizó la exploración clínica registrando datos como su peso corporal, talla, tensión arterial y la detección de signos clínicos de alteraciones cutáneas, típicas de la exposición crónica a As (Anexo 3). La exploración dermatológica fue realizada por 3 médicos que previamente uniformaron sus criterios de evaluación. Los responsables de las evaluaciones clínicas fueron los Dres. Gonzalo García-Vargas (UJED), José Contreras Ruíz (Hospital General Dr. Manuel GEA González) y Daniela Gutiérrez (Hospital General Dr. Manuel GEA González)

5.3.4.3 Obtención de células bucales

Las células bucales se obtuvieron mediante un raspado bucal de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Antes de la toma de muestras, enjuagar una vez durante 30 segundos con 20 ml de enjuague bucal (Oral-B® diluido 1:1 con agua), para eliminar posible contaminación de la muestra con microorganismos.
- b) Con la boca del participante completamente abierta, se introdujo un cepillo para citología se raspó vigorosamente 5 veces de arriba hacia abajo cada una de las mejillas, primero del lado derecho, posteriormente, con la parte del cepillo que no se ha

utilizado se raspó la mejilla del lado izquierdo. De esta manera las células de la mucosa bucal quedan adheridas al cepillo.

c) Inmediatamente después de tomar la muestra de ambas mejillas, se colocó el cepillo en un tubo cónico de 15mL con tapa que contenía 3 mL de una solución EDTA-Tris-HCl estéril y se preservó a 4°C hasta su transferencia al laboratorio en donde se sometió durante 1 min a una agitación con vortex, para desprender las células del cepillo. Se retira el cepillo del tubo (desecharlo) y se preservaron las células bucales a -70°C hasta la extracción del ADN.

5.3.4.4 Obtención de las muestra de orina

Las muestras de orina se obtuvieron entre 15 a 30 días después de la aplicación de los cuestionarios, ya que la estrategia de recolección de las muestras de orinas fue diseñada para recolectar únicamente 10 muestras por día, por lo que apoyados por el personal del Centro de Salud de la Jurisdicción de Zimapán, Hidalgo, un día antes de la recolección de orina, se citaron a grupos de 10-12 personas que ya habían sido encuestadas y que ya habían proporcionado muestra(s) de agua. A los individuos participantes se les entregó el recipiente de polipropileno, previamente enjuagado con agua desionizada y se les pidió una muestra de orina de micción espontánea, las cuales una vez que fueron obtenidas directamente en los frascos de polipropileno, se les realizó un análisis general usando tiras reactivas de 10 elementos para análisis de orina (Uri-Quick[™]). Inmediatamente después se separó una alícuota de 10 mL de cada muestra de orina en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL para el análisis de las especies de arsénico y la concentración de creatinina y el resto se utilizó para la separación de las células exfoliadas de la vejiga.

Las alícuotas de 10 mL fueron mantenidas en hielo seco (~ -78.5 °C) durante su transportación al Cinvestav, en la ciudad de México (~4.5 horas) donde fueron inmediatamente cuantificados los arsenicales trivalentes (As_i^{III} , MMA^{III} y DMA^{III}). Una vez que se realizó la cuantificación urinaria de los arsenicales trivalentes, el resto de la alícuota fue conservada a -20°C para el posterior análisis de los arsenicales pentavalentes y de la concentración de creatinina.

5.4 Métodos Analíticos

5.4.1 Determinación de arsénico total en agua

Se utilizó la técnica descrita en los métodos estándar para análisis de agua (APHA, 1989).

Principio- Para eliminar las interferencias producidas por la presencia de materia orgánica, la muestra se digirió con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y persulfato de potasio ($K_2S_2O_6$), con este tratamiento los compuestos arsenicales presentes en la muestra se convirtieron a As_i . Después de la digestión, el As_i^V se redujo a As_i^{III} utilizando como reductor yoduro de potasio (KI), se adicionó borohidruro de sodio ($NaBH_4$) para formar el gas arsina, que es arrastrado por una corriente de argón hacia la celda de cuarzo calentada eléctricamente a $900^\circ C$, en la cual se realizó la atomización de la muestra, registrándose la absorción de energía a 193.7 nm. La energía absorbida fue proporcional a la concentración de As presente en la muestra.

Procedimiento- En un tubo de 15 ml se deposita por duplicado una muestra representativa (2-10 mL) de agua proveniente de pozo, de la red de distribución, ó de agua de garrafón, se le adicionaron 200 μL de ácido sulfúrico 2.5 N y 1 mL de persulfato de potasio al 5%, la mezcla resultante se colocó en una parrilla a temperatura de $\pm 90^\circ C$, hasta que el volumen de la muestra se redujo a 1 mL (~20 minutos). La muestra se resuspendió en 10 mL con HCl al 10%, se adicionó 1 mL de KI al 20% y se dejó reposar 30 minutos para permitir la reducción del As_i^V presente en la muestra. Después se determinó la concentración de arsénico utilizando un inyector de flujo FIAS-200 en donde se generó la arsina a pH <2 con $NaBH_4$ que fue detectada en un espectrofotómetro de absorción atómica.

Para evaluar la exactitud de la determinación se utilizó bajo el tratamiento anterior en cada serie de trabajo, un estándar de referencia para agua NIST (1643e), con concentración certificada de $60.45 \pm 0.72 \mu g/L$.

Los valores obtenidos fueron interpolados en una gráfica de calibración con las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 25, 50, y 100 $\mu g As_i/L$. Las soluciones de la gráfica de calibración fueron sometidas al mismo tratamiento de las muestras problema.

Control de calidad- Todas las muestras y estándares se determinaron por duplicado, las muestras en las cuales se obtuvo un coeficiente de variación mayor del 5% se analizaron nuevamente. En cada lote de muestras se incluyó un estándar de

agua NIST (1643e) con los valores obtenidos de esta muestra se evaluó la exactitud, la cual fue del 94 – 106%, mientras que la precisión obtenida fue < 5 % en muestras por duplicado, las cuales se calcularon con las formulas siguientes: Exactitud = $(C_p / C_t) \times 100$ donde C_p = concentración práctica y C_t = concentración teórica.

La precisión = $(C_1 - C_2 / C_1 + C_2) \times 100$; donde C_1 = concentración mayor entre dos valores y C_2 = concentración menor entre dos valores.

5.4.2 Determinación de especies arsenicales (As_i^{III} , MMA^{III} , DMA^{III} , As_i^V , MMA^V y DMA^V) en orina

Principio- El sistema de separación se basa en la capacidad que tienen los arsenicales en formar especies volátiles en función de la temperatura y el pH de la reacción (Del Razo y col., 2001).

En condiciones de $pH < 2$ se generan las arsinas totales (As_i^{III+V} , MMA^{III+V} , DMA^{III+V}), esta condición se alcanza depositando en el vaso de reacción, un volumen adecuado de muestra de orina (0.01 a 1 mL), mas 10 mL de agua desionizada y 1 mL de HCl 6M.

Las arsinas correspondientes a las especies arsenicales trivalentes (As_i^{III} , MMA^{III} , DMA^{III}), se forman a pH 6. Estas condiciones se obtienen colocando un volumen adecuado de muestra de orina (0.01 a 1 mL), más 10 mL de agua desionizada y 1 mL de solución amortiguadora de tris-HCl 2.5M, NaOH 0.06M.

Para llevar a cabo la formación de las correspondientes arsinas, se le aplica 1 mL de una solución de $NaBH_4$ al 4% (w/v) en NaOH 0.02M. Finalmente para conocer la cantidad de especies pentavalentes a las concentraciones de especies totales (evaluadas a $pH < 2$) se le restaron las concentraciones de las especies trivalentes (evaluadas a $pH = 6$).

El vaso donde se llevó a cabo la reacción fue conectado a un tubo de borosilicato, en forma de U, de aproximadamente 30 cm de longitud. El tubo en U fue previamente empaquetado con una fase estacionaria (1.2 g) de 45-60 mallas de OV-3 al 15% en Chromosorb WAW-dimetildiclorosilano. El tubo en U fue enrollado con alambre de 0.6 Ω /kg de resistencia que fue conectado a un transformador de potencia variable, donde se controló la temperatura de calentamiento. Durante el proceso de generación de hidruros el tubo en U fue enfriado con nitrógeno líquido con posterior aplicación de

temperatura a través del alambre. Las diferentes arsinas formadas quedaron atrapadas en el tubo y fueron liberadas durante el gradiente de temperatura de -293 a 50°C lograda al usar nitrógeno líquido y calentamiento a través del alambre enrollado en la columna, liberándose la arsinas formadas de As_i a -55°C , de MMA a 2°C y de DMA a 35.6°C .

Las arsinas formadas fueron arrastradas a una celda de cuarzo, utilizando helio (150 mL/min) como gas acarreador. La atomización de las arsinas fue realizada con una microflama de hidrogeno y aire, con flujo de 180 y 350 mL/min , respectivamente. Las arsinas fueron detectadas con un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con un integrador de áreas registrándose la absorción de energía que fue proporcional a la concentración de As en la muestra. Durante el proceso se utilizó una lámpara de As de descarga sin electrodos acoplada a una fuente de poder.

Las condiciones de operación del equipo de absorción atómica fueron los siguientes: se utilizó una potencia de la fuente de poder de 4 watts , a una longitud de onda de 193.7 nm con una amplitud de ventana: 0.7 nm . Ver figura 5.

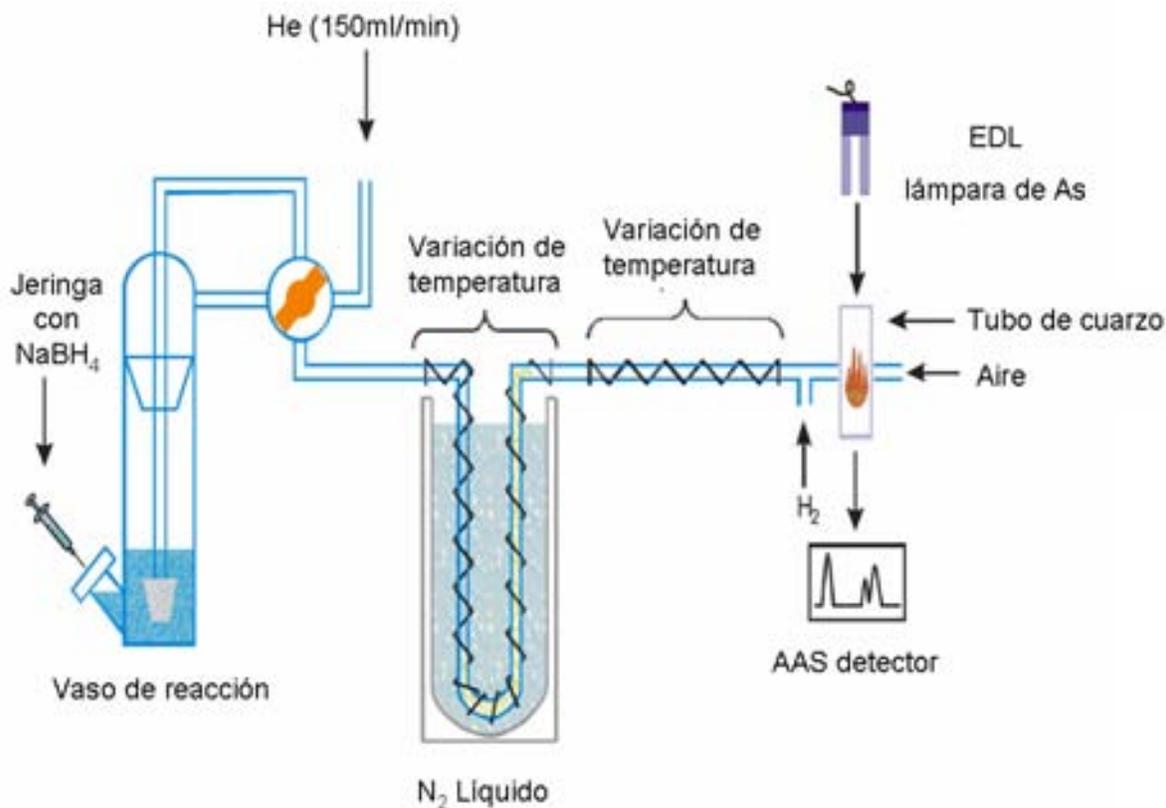


Figura 5. Sistema utilizado para medir las especies arsenicales.

Procedimiento: En un vaso de reacción a una muestra representativa (0.01-1ml) de orina se le adicionaron 10 ml de agua desionizada y dependiendo lo que se fuera a medir (arsenicales totales o trivalentes) 1 mL de HCl 6M o de solución amortiguadora. Se monta el vaso al sistema descrito anteriormente. Se inyectó 1 mL de una solución de NaBH₄ se dejó reaccionar 3 minutos con un flujo constante de Helio (150 mL/min), se cerró el sistema para que el flujo de helio arrastre las arsinas, pase por la variación de temperatura y estas sean detectadas por el equipo.

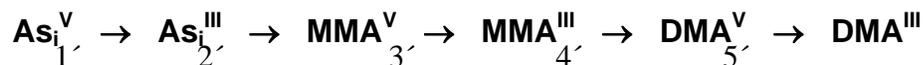
Las áreas obtenidas de las muestras son directamente proporcionales a la concentración de las especies arsenicales.

5.4.2.1 Proporción relativa de especies arsenicales (fenotipo)

Con el objeto de evaluar posibles alteraciones en el patrón de metilación del As_i se calcularon las proporciones relativas de cada una de las seis especies urinarias. El cálculo se realizó al considerar como 100% la sumatoria de las concentraciones de As_i^{III+V} + MMA^{III+V} + DMA^{III+V}. De tal manera que la proporción de cada especie es igual a la concentración de la especie de As entre la concentración de la sumatoria de las seis especies multiplicado por 100.

5.4.2.2 Cálculo de la tasa indicadora de la biotransformación

Tomando como base las propuestas de Cullen y col., 1984; Kitchin, 2001; Thomas y col., 2001 y Lin y col., 2002, para la hipótesis de la biotransformación del As se utilizaron las reacciones producto / sustrato como indicadores de la eficiencia de la reducción y de la metilación del As.



De esta manera, estas reacciones fueron evaluadas por las siguientes razones:

Reacción	Razón
1´ Primera Reducción	As_i^{III} / As_i^V
2´ Primera Metilación	MMA^V / As_i^{III}
3´ Segunda Reducción	MMA^{III} / MMA^V
4´ Segunda Metilación	DMA^V / MMA^{III}
5´ Tercera Reducción	DMA^{III} / DMA^V

La disminución de los valores de estas razones fueron interpretadas como disminución en la capacidad de reducción ó/y de metilación del As, según fuera el caso.

5.4.3 Determinación de creatinina en orina

Debido a que la orina fue recolectada por emisión espontánea y en estas condiciones puede estar sujeta a factores como la hidratación del individuo que puede alterar la concentración de solutos presentes en la orina, se ajustaron las concentraciones urinarias de las especies de As. Un método bien aceptado para controlar la posible dilución o concentración de la muestra de orina, es la del ajuste de solutos en función de la concentración de creatinina urinaria (Clarkson y col, 1988). Las concentraciones de creatinina, se cuantificaron en muestras de orina centrifugada utilizando un ensayo comercial obtenido de Randox.

Principio- la creatinina en solución alcalina (NaOH) reacciona con ácido pícrico formándose el ácido picramico el cual es un complejo color amarillo. La cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la orina.

Procedimiento- muestras duplicadas de 1 μ L de orina se diluyeron hasta 50 μ L con agua desionizada y se les adicionaron 250 μ L de NaOH y 250 μ L de ácido pícrico, se homogenizaron y se cuantificaron inmediatamente en un analizador automático para ensayos clínicos de laboratorio, Vitalab, Eclipse. Previa a la determinación de creatinina en las muestras de orina se determinó el factor de cálculo, utilizando un blanco de reactivo y un estándar comercial de creatinina (Randox) a una concentración de 2 mg/dL.

Las condiciones de operación para el analizador fueron las siguientes: se utilizó un filtro de 490 a 510 nm, a una temperatura de 37°C, el tiempo de medición es de 30

segundos, y la linealidad es de hasta 500 mg/dL con una sensibilidad hasta de 14 $\mu\text{mol/L}$.

Para evaluar la precisión se realizaron análisis de las muestras por duplicado, obteniendo coeficientes de variación menores al 5%; mientras que la exactitud fue evaluada utilizando la medición del estándar de referencia, con una concentración conocida de creatinina (2 mg/dL). Los resultados obtenidos se encontraron entre el rango de 95 a 102%.

5.4.4 Obtención de ADN de las células epiteliales bucales

La extracción de ADN se hizo utilizando un ensayo comercial de Amersham Biosciences (Kit de Purification, GFX genomic Blood DNA). Las células bucales se descongelaron a temperatura ambiente (TA), después se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min para separar el paquete celular. Al paquete celular se le adicionaron 12 μL de Proteinasa K (18 mg/mL) y se mantuvo 15 minutos a 55°C, posteriormente se le agregaron 500 μL de amortiguador de extracción (Amersham Biosciences) y se dejó incubar 5 minutos a TA. Esta solución de extracción fue transferida a una columna empaquetada con fibra de vidrio (Amersham Biosciences) a la cual se une el ADN, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Posteriormente se adicionaron 500 μL de solución de lavado (amortiguador de Tris-EDTA + etanol absoluto; el amortiguador es parte del ensayo de Amersham Biosciences). Finalmente, el DNA purificado se eluyó en 100 μL de agua libre de DNAsas y se preservó a -20°C hasta su análisis.

5.4.4.1 Concentración y pureza del ADN

Para determinar el grado de pureza de las muestras de ADN se obtuvo el cociente ADN/proteína. Se realizaron diluciones de 4 μL de ADN en 196 μL de agua MQ teniendo un factor de dilución de 50. Dichas muestras se evaluaron en un espectrofotómetro (Termo Spectronic) obteniéndose las concentraciones de ADN y proteína a una longitud de onda de 260 y 280 nm respectivamente.

PUREZA= $\text{ABS}_{260}/\text{ABS}_{280}$; este valor entre más cercano a 2 tiene una pureza óptima para usarlo en PCR.

CONCENTRACION = $(\text{ABS } 260/0.02)*50$ (ng/ μL)

5.4.4.2 Integridad del ADN

Para evaluar la posible degradación del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen) la cual se disolvió por calentamiento en amortiguador TBA 1X (Tris-acetato 2M, EDTA 0.05M, pH 8.3). Una vez que la agarosa se enfría (~45 °C) se le adicionaron 5µL de bromuro de etidio para tener una concentración final de 0.5µg/mL. Se colocaron 2µL de muestra en 5µL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30% en agua MQ); la electroforesis se realizó a 100 volts durante 20 minutos. El ADN se visualizó mediante el uso de luz UV en un transiluminador. La integridad del ADN fue valorada por electroforesis observando una banda no fragmentada de alto peso molecular.

5.4.5 Determinación del genotipo mediante PCR en Tiempo Real

El método PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en Tiempo Real, es usado para producir grandes cantidades de un fragmento específico de ADN *in vitro*, a partir de pequeñas cantidades de ADN molde mediante la amplificación enzimática de un fragmento de ADN que está flanqueado por dos oligonucleótidos que hibridan con las bandas opuestas de una secuencia blanco. Los oligonucleótidos deben estar orientados con sus extremos 3' dirigidos uno hacia el otro. El sistema Taqman se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa, que genera el rompimiento de sondas marcadas con diferente fluorescencia para cada uno de los alelos evaluados, en este sistema se mide la intensidad de la fluorescencia emitida y por discriminación alelica se determina el genotipo del individuo.

La amplificación y detección del SNP A-477G se llevo a cabo mediante el uso de sondas y oligonucleótidos específicos. Para la detección del alelo silvestre del SNP A-477G se utilizo la sonda Taqman marcada con el fluoroforo VIC, mientras que para el alelo mutante se utilizó la sonda Taqman marcada con el fluoroforo FAM. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el software Fast-PCR. Las sondas Taqman fueron diseñadas por Applied Biosystems. Las secuencias de los oligonucleótidos y de las sondas para el SNP se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos y sondas utilizados para el análisis del SNP A-477G mediante PCR en Tiempo Real.

Variante	Secuencia de los oligonucleótidos	Sonda Taqman
SNP A-477G	S 5' TTTGGTCTCCGTTTTGGTGATGTAT AS 5' CCGTGAAATCCATCTTTCTTCAGTGT	VIC 5' TTCTGTGAACTC <u>I</u> GGCAA FAM 5' TGTGAACTC <u>C</u> GGCAA

S: oligonucleótido sentido; AS: oligonucleótido antisentido; A y G localización de los nucleótidos silvestre y mutado dentro de las sondas Taqman.

5.4.5.1 PCR en Tiempo Real

Esta se realizó en el equipo ABI Prism 7700, utilizando el sistema Taqman Universal PCR Master Mix. Para llevar a cabo la amplificación por PCR se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 10µL la cual contenía: 3µL de ADN genómico (30 ng), 5µL de Taqman Universal PCR-Master Mix (que contiene a la enzima Taq ADN polimerasa, dNTPs con dUTP, una molécula fluorescente como referencia, AmpErase UNG), 0.25uL de la mezcla del oligonucleótidos (36µM) y sondas Taqman (8µM), 1.75uL de agua MQ estéril. Las condiciones empleadas en el termociclador para la amplificación fueron las siguientes: primero un ciclo a 50°C por 2 min, seguido de un ciclo a 95°C por 10 min (desnaturalización inicial) y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1min.

5.4.5.2 Genotipificación del Polimorfismo

Una vez concluida la amplificación, se analizaron los gráficos obtenidos de la amplificación lo cual nos permite agrupar a los individuos de acuerdo a su genotipo, en base a las fluorescencias obtenidas, donde se correlacionó la señal del fluoroforo con el genotipo correspondiente como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 4. Tipos de fluorescencias y genotipos correspondientes obtenidos del SNP A-477G mediante PCR en Tiempo Real.

Fluorescencia registrada	Genotipo
Solo fluorescencia de VIC	Homocigoto silvestre
Solo fluorescencia de FAM	Homocigoto mutado
Ambas fluorescencias	Heterocigoto

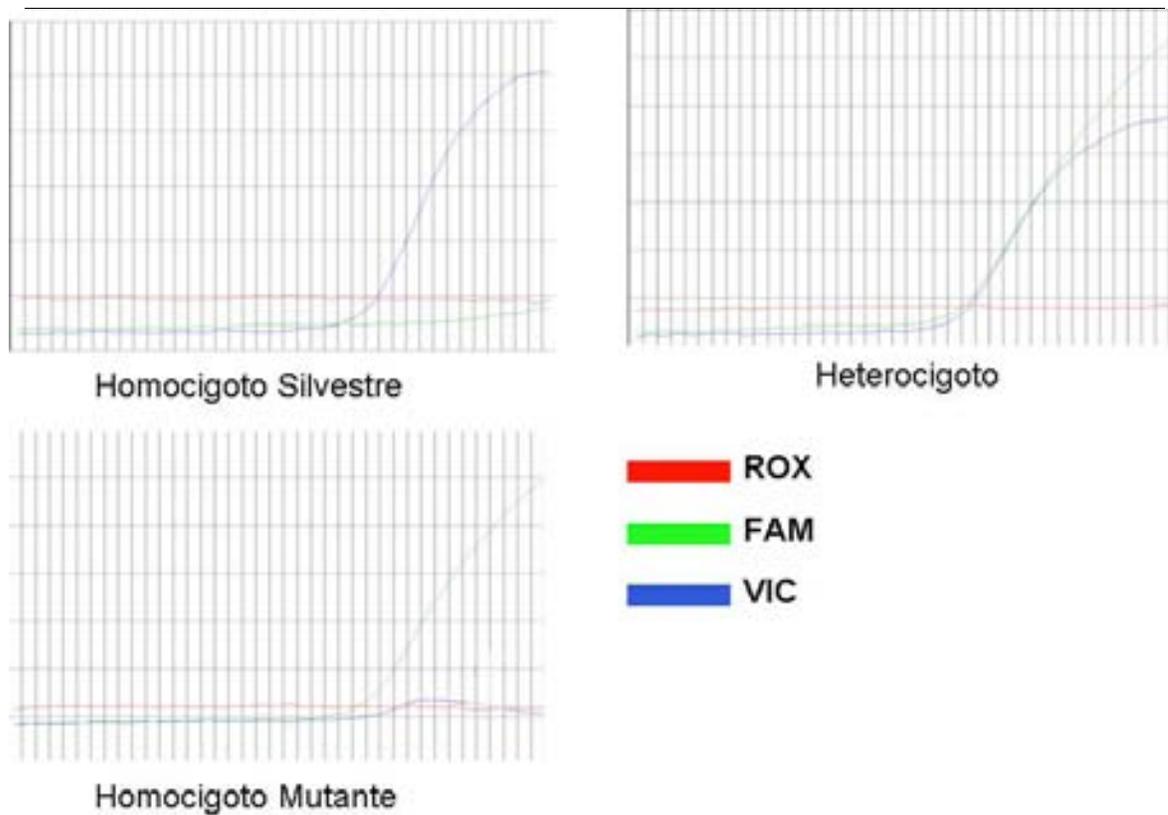


Figura 6. Tipos de fluorescencias y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en Tiempo Real.

6 RESULTADOS

6.1 Características de la Población de Estudio

La población de estudio comprendió un total de 119 individuos de origen Mestizo, fueron habitantes de las localidades del Llano Norte, Calvario y Aguacatito del Municipio de Zimapán, Hidalgo. Las características de la población estudiada se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características generales de la población de estudio (n=119).

Características		N	Media	SD
Género	Masculino	13	-	-
	Femenino	106	-	-
Edad (años)	18 - 29	41	23.8	4.2
	30 - 40	37	35.1	3.1
	40 - 51	41	45.9	3.6
IMC (kg/m ²) ^a	Hombres	13	23.8	4.3
	Mujeres	106	28.1	5.5
Habito	Consumo de alcohol (si/no)	29/90	-	-
	Fumar (si/no)	4/115	-	-
Infección de vías urinarias (si/no)		52/67	-	-
Lesiones cutáneas (si/no)		69/50	-	-

^acalculado como la relación entre el peso en Kg entre la estatura en m²

La población de estudio tuvo una media de edad de 36.5 años con un intervalo de 18-51 años; el 10.9% fueron hombres y el 89.1% fueron mujeres. Respecto al IMC su valor promedio fue de 27.7 kg/m²; el 77.9% de las mujeres tuvo valores superiores a los considerados como normales (18.7 – 23.8 kg/m²) presentando sobrepeso y el 1.8% de las mujeres presento desnutrición; mientras 30.7 % de los hombres tuvo el IMC considerado como normal (20-25 kg/m²), el 46% presento sobrepeso (>25 kg/m²) y el restante 23.3% presento desnutrición según los valores de referencia establecidos por la OMS (1995).

Los datos obtenidos del cuestionario mostraron que el 17% de la población tiene el hábito de ingerir bebidas alcohólicas con una frecuencia de ligera a moderada (1-3 cervezas o 2 vasos de pulque 1 a 4 veces al mes), y un 3.3% reportó tener hábito de fumar con una frecuencia de 1 a 10 cigarros por día durante 10 años. El cuestionario que contiene la historia clínica y de exposición se muestra en el anexo 2.

Con base a los resultados obtenidos en la exploración clínica dermatológica, el 44.44% de la población no presentó lesiones cutáneas, mientras que el restante 55.56% presentó al menos una o algunas de las lesiones en piel clásicas por la exposición crónica a As_i que se describen en la Tabla 6. Como se observa en esta tabla, las lesiones cutáneas que se presentaron con mayor frecuencia en esta población es la hipopigmentación (38%) y la presencia de hiperqueratosis palmar (33%.) El formato de la exploración clínica dermatológica se muestra en el anexo 3.

Tabla 6. Tipos de lesiones cutáneas presentes en la población de estudio.

Tipo de lesión	Frecuencia
Sin lesiones	44.44%
Hipopigmentación	38 %
Hiperpigmentación	27 %
Hipo e hiperpigmentación	10 %
Hiperqueratosis palmar	33 %
Hiperqueratosis plantar	30 %
Hiperqueratosis corporal	18 %
Cuernos cutáneos	3 %

6.2 Exposición ambiental a arsénico inorgánico

Las concentraciones de AsT en el agua de bebida a las cuales están expuestos los participantes de este estudio se muestran en la Tabla 7. Los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos de las tomas de agua (pozo ó garrafón) de cada domicilio, considerando a toda la población se obtuvo una media geométrica de 83.31 µg/L, con una amplia variación en las concentraciones de As en el

agua que van de 1 $\mu\text{g/L}$ hasta aquéllos expuestos a 658 $\mu\text{g/L}$. De acuerdo a la norma oficial el LMP de arsénico en el agua de bebida vigente en México que es de 25 ppb o $\mu\text{g/L}$. Comparando dicho límite con los valores observados en el presente estudio, encontramos que el 53.8% de la población estaba expuesta a niveles de arsénico superiores a los establecidos por la Norma Oficial Mexicana.

Tabla 7. Concentración de AsT en el agua de bebida en la población de estudio.

Intervalo	Media	SD	n	%
< 25 $\mu\text{g/L}$	7.2	8.4	55	46.2
25 – 100 $\mu\text{g/L}$	58.5	17.4	45	37.8
> 100 $\mu\text{g/L}$	360.2	201.2	19	16.0

6.3 Concentración de las especies arsenicales en orina.

En la Tabla 8 se muestran las concentraciones de cada una de las especies trivalentes y pentavalentes en la orina de los individuos del estudio, además de presentarse las proporciones relativas de cada uno de los metabolitos del As_i como indicadores del fenotipo de la población.

Comparando las proporciones de las especies trivalentes con las pentavalentes en el caso del As_i , se observó un ligero aumento de la proporción en su estado de oxidación +5 (As_i^{V}) en comparación con el As_i^{III} (9.1% vs 7.9%). Sin embargo, los metabolitos metilados trivalentes estuvieron presentes en mayor proporción en comparación con sus metabolitos pentavalentes, a pesar de su mayor inestabilidad en muestras biológicas. El metabolito más inestable es el DMA^{III} pero fue principalmente excretado en la orina por individuos ambientalmente expuestos representando el 48.3% del total del As presente en la orina.

Tabla 8. Concentraciones urinarias de los metabolitos de As trivalentes y pentavalentes.

Especies	Media ($\mu\text{g} / \text{g}$ creatinina)	Intervalo ($\mu\text{g} / \text{g}$ creatinina)	Media Proporción (%)
As_i^{V}	7.2	1 – 65.5	9.1
As_i^{III}	9.5	0.1 – 172.3	7.9
MMA^{V}	2.4	0.2 – 28.3	3.1
MMA^{III}	7.8	0.1 – 101.9	7.7
DMA^{V}	25.8	0.6 - 710	23.9
DMA^{III}	57.6	0.1 – 506.3	48.3

6.4 Tasas indicadoras de la biotransformación del As_i

A partir de las concentraciones de los metabolitos presentes en orina se realizó el cálculo de las razones indicadoras de la reducción y metilación del arsénico en los humanos (Tabla 9), como se describe en el apartado 5.4.2.2 de la metodología. Como era de esperarse los procesos de la segunda y tercera etapa de reducción y la segunda metilación participan mayoritariamente en el proceso de biotransformación favoreciendo la presencia de DMA^{III} en la orina.

Tabla 9. Razones metabólicas indicadoras de la biotransformación del As_i .

Razón	Etapas	Media	Mínimo	Máximo
$\text{As}_i^{\text{III}} / \text{As}_i^{\text{V}}$	1ra Reducción	1.49	0.013	36.4
$\text{MMA}^{\text{V}} / \text{As}_i^{\text{III}}$	1ra Metilación	1.22	0.015	36.5
$\text{MMA}^{\text{III}} / \text{MMA}^{\text{V}}$	2da Reducción	6.81	0.013	46.5
$\text{DMA}^{\text{V}} / \text{MMA}^{\text{III}}$	2da Metilación	10.43	0.042	392.5
$\text{DMA}^{\text{III}} / \text{DMA}^{\text{V}}$	3ra Reducción	5.42	0.014	49.9

6.5 Patrón de metilación de arsenicales

La Tabla 8 muestra las proporciones relativas para cada una de las especies arsenicales analizadas en orina. De manera general se ha considerado como un patrón de metilación típica a individuos que presentan en su orina del 10-30% en forma de As_i^{III+V} , del 10-15% de MMA^{III+V} y del 60-80% de DMA^{III+V} (Vather y col., 2000). En la Figura 7 se esquematiza el patrón de metilación del As_i en los participantes del estudio. Se puede apreciar que el 68% de la población presenta proporciones de As_i^{III+V} considerados como normales, el 18% por arriba y el 24% por debajo de lo normal, en el caso de la proporción de MMA^{III+V} el 30% de la población presento valores normales el 16% arriba y el 54% por debajo y en el caso de la proporción de DMA^{III+V} el 54% de la población fue considerado normal el 32% arriba y el 14% por debajo de lo normal.

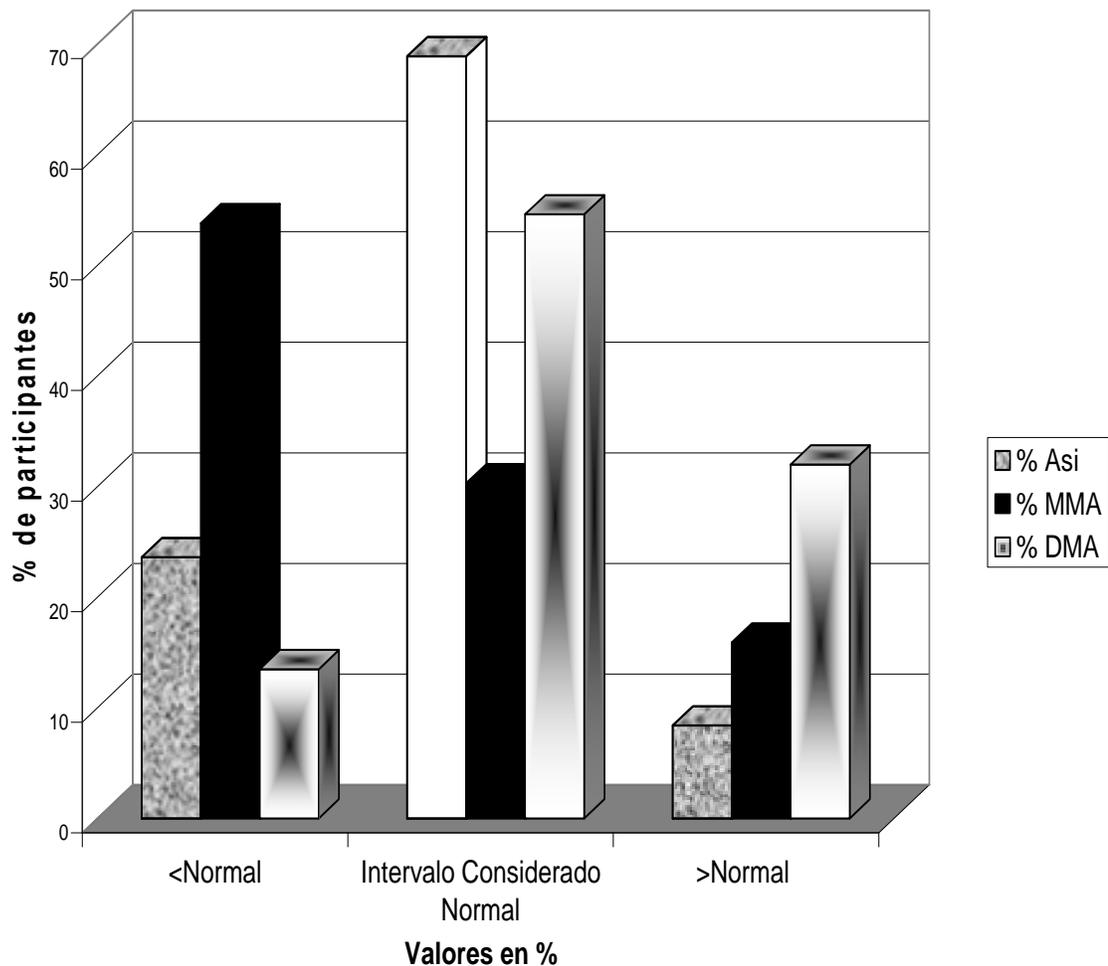


Figura 7. Patrón de metilación del arsénico en la población de estudio.

6.6 Determinación del genotipo del SNP A-477G del gen *AS3MT*

El análisis del genotipo de la *AS3MT* se realizó a partir de ADN genómico obtenido de 119 muestras bucales de los participantes del estudio.

En la Figura 8 se representa un gráfico de genotipificación del SNP A-477G obtenida por PCR en tiempo real. De un total de 119 individuos el 40.3% fueron homocigotos silvestres, el 44.6% fueron heterocigotos y 15.1% que fueron homocigotos mutados (Tabla10).

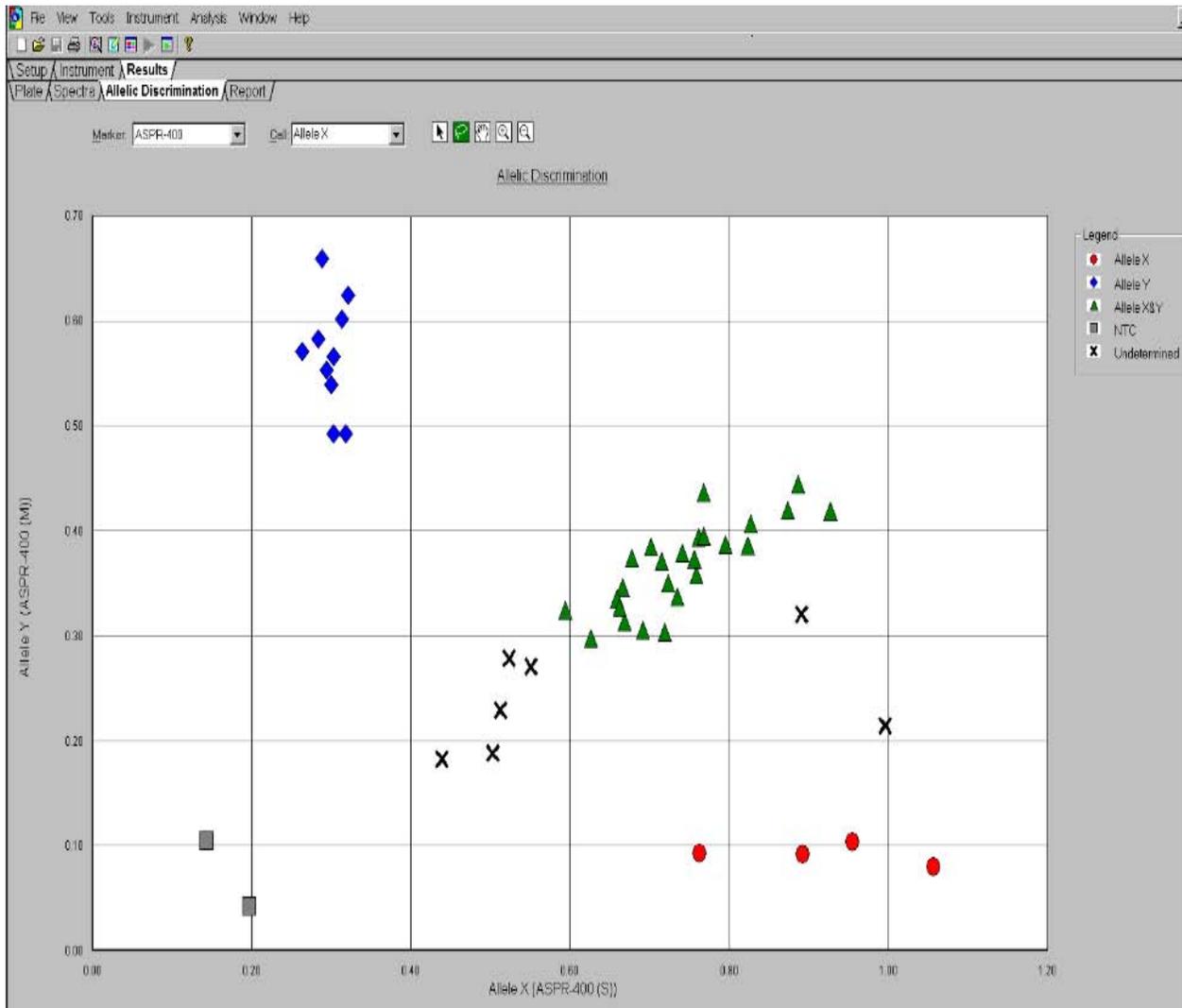


Figura 8. Representación de los genotipos del SNP A-477G de 46 muestras, Los cuadrados representan los controles negativos, los círculos representan los homocigotos silvestres, los triángulos representan a los heterocigotos, los rombos representan los homocigotos mutados y las cruces son muestras no determinadas.

Tabla 10 Genotipo y frecuencia alélica del SNP A-477G del gen *AS3MT* en la población de estudio.

Genotipo ^a (n = 119)			Frecuencia alélica ^b (n = 119)	
Homocigoto Silvestre	Heterocigoto	Homocigoto Mutante	A	G
40.4 (48)	44.5 (53)	15.1 (18)	0.63	0.37

^aEl genotipo se presenta como porcentaje y el número de individuos se muestra entre paréntesis; ^b Para el caso de la frecuencia alélica ésta se calculo utilizando la ecuación de Hardy-Weinberg. En la frecuencia alélica A representa el alelo silvestre y G representa el alelo mutado.

Las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos evaluados se muestran en la Tabla 11. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias esperadas y las observadas en la población de estudio, por lo tanto se considera que la población se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

Tabla 11. Comparación de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas del SNP A-477G del gen *AS3MT* mediante la ecuación de Hardy-Weinberg, en la población de Zimapán

Frecuencia	Genotipo			χ^2
Prom(-477)	Homocigoto Silvestre (AA)	Heterocigoto (AG)	Homocigoto Mutante (GG)	p
Observada (%)	40.4	44.5	15.1	0.88
Esperada (%)	39.7	46.6	13.7	

6.7 Relación entre las especies arsenicales y el genotipo de *AS3MT*

En la Tabla 12 se representan las concentraciones de especies totales (As_i^{III+V} , MMA^{III+V} y DMA^{III+V}), sus proporciones relativas de estos metabolitos ($\%As_i^{III+V}$, $\%MMA^{III+V}$ y $\%DMA^{III+V}$) y las tasas indicadoras de la primera (MMA/As_i) y segunda (DMA/MMA) etapa de la metilación del arsénico. En la población total (n=119) se puede

apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los metabolitos de As en orina entre los genotipos.

Sin embargo al realizar las comparaciones de las proporciones relativas se puede apreciar que los individuos que son homocigoto mutado presentan una menor %MMA^{III+V} y una mayor %DMA^{III+V} en la orina en comparación con los homocigotos silvestres y heterocigotos consecuentemente se observa un aumento en la tasa DMA/MMA en el grupo de Homocigotos mutados (Tabla 12).

Al realizar las comparaciones del genotipo con las especies arsenicales en sus diferentes estados de oxidación (pentavalentes y trivalentes) se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa Tabla 13.

Tabla 12. Comparación de las concentraciones, proporciones y tasas metabólicas totales en la biotransformación de As entre los genotipos.

Especies arsenicales Genotipos	Concentración (µg/g creat)				Proporciones (%)			Tasas metabólicas	
	AsT	As _i	MMA	DMA	As _i	MMA	DMA	MMA/As _i	DMA/MMA
Homocigoto Silvestre(AA) (n=48)	128.9	19.6	12.9	96.5	16.8	11.8	71.4	0.8	7.65
Heterocigoto (AG) (n=53)	101.4	16.5	8.9	76.0	18.3	10.7	70.9	0.74	9.75
Homocigoto Mutante(GG) (n=18)	87.29	9.8	7.1	70.4	12.9	8.6*	78.4**	0.71	10.8***

Aquí se muestran la media de las concentraciones, proporciones y tasas de metilación del As_i en los diferentes grupos. Se realizó la comparación de medias entre los grupos mediante la prueba Kruskal-Wallis *p=0.02, **p=0.05, ***p=0.03

Tabla 13. Comparación de las concentraciones, proporciones y tasas metabólicas según su estado de oxidación de los arsenicales entre los genotipos.

	Genotipos	Homocigoto	Heterocigoto	Homocigoto
	Especies arsenicales	Silvestre (n=48)	(n=53)	Mutado (n=53)
Concentración (µg/g creat)	As _i ^V	8.2	6.7	6.0
	As _i ^{III}	11.4	9.8	3.8
	MMA ^V	3.2	2.1	1.3
	MMA ^{III}	9.7	6.7	5.8
	DMA ^V	33.3	23.1	13.8
	DMA ^{III}	63.2	52.9	56.6
Proporciones (%)	As _i ^V	9.3	9.1	7.9
	As _i ^{III}	7.5	9.2	5.0
	MMA ^V	4.9	2.5	2.1
	MMA ^{III}	7.6	8.2	6.5
	DMA ^V	25.0	22.9	23.8
	DMA ^{III}	46.4	48.0	54.5
Tasas metabólicas	As _i ^{III} / As _i ^V	1.2	1.9	0.9
	MMA ^V / As _i ^{III}	1.7	0.9	0.9
	MMA ^{III} / MMA ^V	7.9	5.6	7.7
	DMA ^V / MMA ^{III}	17.1	6.7	4.1
	DMA ^{III} / DMA ^V	5.2	4.8	7.9

Se realizó la comparación estadística mediante la prueba Kruskal-Wallis obteniendo un resultado no significativo para los arsenicales evaluados.

6.8 Asociación de las covariables y variables confusoras con la presencia de lesiones en piel

El objetivo de este análisis fue determinar cuáles de nuestras covariables del estudio, podrían ser consideradas como factores confusores en la presencia de lesiones en piel. De esta manera, en la Tabla 14 se presentan los análisis de regresión logística bivariados entre la presencia de lesiones en piel con las covariables del estudio, en el

cual se puede apreciar que la exposición acumulada, y el nivel de exposición están asociadas con la presencia de lesiones en piel. Todas las variables presentes en la Tabla 14 que presenten una $p \leq 0.05$ serán considerados como posibles variables confusoras para el desarrollo de lesiones en piel en esta población de estudio.

Tabla 14. Análisis de regresión logística bivariado de la presencia de lesiones en piel (n=119).

Variables Independientes	OR	I.C. (95%)	p
Edad (años)	0.99	0.92 – 1.07	0.93
Género	1.73	0.49 – 5.95	0.39
IMC (kg/m ²)	1.00	0.94 – 1.07	0.97
Exposición acumulada (mg)	1.32	1.01 – 1.60	0.004
Consumo de alcohol	1.54	0.57 – 4.15	0.38
Exposición ^a	3.71	1.94 – 7.9	0.000
Prom (-477)	1.03	0.61 – 1.73	0.92

^a Exposición de AsT en orina, se evaluó como variable dicotómica, con punto de corte de 50 $\mu\text{g/g}$ de creatinina. Se presentan los valores de razón de momios (OR), intervalo de confianza (IC 95%) y el valor p.

6.9 Correlación entre las covariables y variables confusoras.

En la Tabla 15 se presenta la relación existente entre las posibles variables confusoras que se consideraron en el presente estudio (la edad, el género, el estado nutricional evaluado con el IMC, el consumo de bebidas alcohólicas, la exposición acumulada). Estas variables se escogieron como confusoras, debido a que son consideradas variables que por sí mismas pueden incrementar el riesgo de presentar lesiones en piel en poblaciones de áreas endémicas con arsénico.

Tabla 15. Correlación entre las posibles variables confusoras

Relación de las variables	p
Edad/género	0.42 ^a
Edad/IMC	0.001^a
Edad/exposición acumulada	0.95 ^a
Edad/consumo de alcohol	0.088^a
Género/IMC	0.008^a
Género/exposición acumulada	0.45 ^a
Género/consumo de alcohol	0.031^b
IMC/exposición acumulada	0.45 ^a
IMC/consumo de alcohol	0.90 ^a
Exposición acumulada/consumo de alcohol	0.072^a

En esta tabla se presenta (valor p) de las correlaciones de las covariables ^aDe acuerdo a la prueba de regresión lineal. ^bDe acuerdo a la prueba de χ^2 .

Los resultados obtenidos de los análisis bivariados de regresión lineal y la prueba de chi cuadrada entre las posibles variables confusoras mostraron que se encuentra una correlación significativa entre el índice de masa corporal con la edad y el género, así como entre el consumo de alcohol y el género, en este punto hay que remarcar que solo se tienen 13 hombres.

Además también se observó una relación marginalmente significativa entre el consumo de alcohol con la edad, la exposición acumulada, También se observó una correlación marginalmente significativa entre el IMC y la edad (Tabla 15).

6.10 Relación entre el genotipo *AS3MT* con la presencia de lesiones en piel

Primeramente se realizó una comparación entre las frecuencias alélicas entre los individuos con y sin lesiones en piel. Como se muestra en las Tablas 16 y 17, los individuos con lesiones y sin lesión en piel no presentan diferencias estadísticamente

significativas entre los genotipos homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado.

Tabla 16. Comparación del genotipo de los individuos con lesiones en piel (n=119).

Grupo	Homocigoto Silvestre	Heterocigoto	Homocigoto Mutado
Sin lesiones (n = 50)	43.75	39.62	44.44
Con lesiones (n = 69)	56.25	60.38	55.56

Valor de p=0.893 mediante la prueba de χ^2

Tabla 17. Análisis de regresión logística bivariado de la frecuencias alélicas entre los individuos con y sin lesiones en piel (n=119).

Variables Independientes	OR	I.C. (95%)	p
A-477G	1.03	0.61 – 1.73	0.917

Valor de p=0.917

7. DISCUSIÓN

Existe gran interés por identificar el papel que juegan los factores genéticos sobre la biotransformación del As_i .

El presente estudio fue enfocado a el papel que puede tener el SNP A-477G localizado en la región promotor del gen *AS3MT* con el fenotipo del As_i , así como su asociación a marcadores de daño como son las lesiones en piel, por la exposición al contaminante.

7.1 Características de los participantes

En este estudio no fue posible tener una distribución similar entre ambos géneros (Tabla 5) debido a que los hombres en edad económicamente productiva que habitan los poblados de estudio migran a otras ciudades para trabajar. Sin embargo, se encontró una distribución de edad similar en los dos géneros, con un rango de 18-51 años y una media de 36.5 años. La mayor parte de la población que participó en el presente estudio se dedica al hogar.

Respecto al IMC, el 77.9% presentaron sobrepeso y el 1.8% de las mujeres presentó desnutrición; mientras que en los hombres, el 46% presentó sobrepeso y 23.3% presentó desnutrición según los valores de referencia establecidos por la OMS (1995).

La incidencia de tabaquismo fue baja, del 3%, por lo que no se tomó en cuenta como una variable confusora, al realizar el análisis estadístico.

Con base a los resultados obtenidos en la exploración clínica dermatológica (Tabla 6), se observó la presencia de hipopigmentación, hiperpigmentación e hiperqueratosis palmo-plantar, al igual que en estudios previos en Zimapán (Armienta y col., 1997; Lechuga y col., 2001). Además en el presente estudio también se observó la presencia de hiperqueratosis corporal otro signo clásico del arsenicismo.

7.2 Exposición ambiental a As_i

En el presente estudio, la concentración de AsT en el agua de bebida (Tabla 7), presentó una amplia variación en las concentraciones de As que van de 1 ppb hasta 658 ppb. De acuerdo a la norma oficial el LMP de arsénico en el agua de bebida, vigente en México desde el 2007, es de 25 ppb o $\mu g/L$. Comparando dicho límite con los valores observados en el presente estudio, encontramos que el 53.8% de la población estaba expuesta a niveles de AsT superiores a los establecidos por la Norma Oficial Mexicana.

Al realizar la correlación entre la concentración de AsT presente en agua de bebida y la concentración de AsT en la orina no se observó una correlación lineal positiva, a diferencia de otros estudios (Calderon y col., 1999) en donde se recomienda el uso de la concentración de As en el agua como el mejor indicador de exposición a As, siempre y cuando la exposición a través de la ingestión de agua sea crónica y constante. Por lo que en el presente estudio, la concentración de As en el agua no resultó un buen indicador de exposición, debido a la modificación de los hábitos del consumo de agua de esta población, por esta razón se utilizó la concentración de As en las orinas como indicador de exposición.

7.3 Fenotipo del metabolismo del As_i.

Es generalmente aceptado que el fenotipo del metabolismo del As_i se evalúa a partir del cálculo de las proporciones relativas de las especies arsenicales. Por lo tanto, las proporciones relativas y las razones metabólicas indicadoras de la metilación del As han ganado aplicación como marcadores importantes que permitan evaluar el fenotipo de cada individuo. Sin embargo, estos marcadores han resultado poco útiles en situaciones donde las concentraciones urinarias son relativamente bajas (menores a 10 ppb), debido a la incertidumbre en la exactitud y precisión en la cuantificación de las especies arsenicales (Chowdhury y col., 2003; Sun y col., 2007).

El fenotipo del As_i ha sido evaluado considerando básicamente la presencia de tres especies urinarias (As_i^{III+V}, MMA^{III+V}, DMA^{III+V}). Este se ha evaluado en múltiples estudios en base a la exposición ambiental y ocupacional de este metaloide en diversos grupos ubicados en áreas geográficas diversas, con diferentes grupos de edad, género, nivel de exposición y nivel socioeconómico (ATSDR, 2005).

En el presente estudio se evaluó la capacidad metabólica de una población de adultos principalmente mujeres, ambientalmente expuestas a As_i a través del agua de bebida, cuantificando en la orina la presencia de 6 arsenicales urinarios (As_i^V, As_i^{III}, MMA^V, MMA^{III}, DMA^V, DMA^{III}).

En el presente estudio la sumatoria de las especies trivalentes (As_i^{III}, MMA^{III}, DMA^{III}) representó el 63.9% del total de arsenicales en orina. En otros estudios las concentraciones obtenidas de especies trivalentes han sido probablemente subestimadas. Manda y col. (2001) mostraron que la sumatoria de las especies trivalentes fue del 38% en el grupo expuesto a 33 ppb de As en el agua, 28% en el

grupo expuesto a 148 ppb, 39% en el grupo expuesto a menos de 3 ppb (este grupo modificó su exposición a As 1.5 años previos a la realización del estudio, ya que tienen antecedentes que muestran una exposición a 210 ppb de As durante 5 a 20 años), mientras que los individuos que tienen una media de exposición a As de 248 ppb presentaron un 14% de especies trivalentes en la orina.

Comparando las proporciones de las especies trivalentes con las pentavalentes en el caso del As_i , se observó un ligero aumento de la proporción en su estado de oxidación +5 (As_i^V) en comparación con el estado +3 (As_i^{III}) (9.1% vs 7.9%). Sin embargo, el MMA y DMA trivalentes estuvieron presentes en mayor proporción en comparación con sus metabolitos pentavalentes (Tabla 8), a pesar de su mayor inestabilidad en muestras biológicas; este resultado es similar al reportado por Aposhian y col., (2000) quienes encontraron que una población de Rumania expuesta a As del total de arsenicales en la orina del 7-11% fue de MMA^{III}.

A partir de las concentraciones de los metabolitos presentes en orina se realizó el cálculo de las razones indicadoras de la reducción y metilación del As_i (Tabla 9). Como era de esperarse los procesos de la segunda y tercera etapa de reducción y la segunda metilación participan mayoritariamente en el proceso de biotransformación favoreciendo la presencia de DMA^{III} en la orina.

De manera general se ha considerado como un patrón de metilación típica a individuos que presentan en su orina del 10-30% en forma de As_i^{III+V} , del 10-15% de MMA^{III+V} y del 60-80% de DMA^{III+V} (Concha y col., 2002; Vahter y Concha, 2001). En este estudio se encontró que el 51% de la población tiene valores dentro del rango considerado normal y el 49% fuera de éste, las proporciones relativas en el caso del As_i^{III+V} y el MMA^{III+V} se encuentran por debajo de lo esperado y del DMA^{III+V} se encuentra arriba de lo esperado.

7.4 Determinación del genotipo de AS3MT

Dentro de los primeros estudios en los que se evaluó el posible papel del AS3MT en el metabolismo del As en humanos están los estudios *in vitro* realizados por Drobna y col. (2004) utilizando cultivos primarios de hepatocitos expuestos a As_i^{III} , observando una mutación puntual en el ARNm de la AS3MT que fue asociada con una mayor actividad de la enzima generando una mayor proporción de MMA^{III}. Posteriormente, en un estudio epidemiológico realizado por Meza y col. (2005) se detectó por primera vez

que este gen es polimórfico, encontrándose cerca de 58 sitios polimórficos. A partir de entonces, se han descrito algunas asociaciones de sitios polimórficos del gen *AS3MT* y alteraciones en el patrón de metilación de arsenicales, principalmente en la proporción de MMA, en diferentes poblaciones. En la mayoría de estos estudios los polimorfismos se han evaluado en los intrónes del gen *AS3MT*.

En el presente estudio se evaluó el SNP A-477G ubicado en la región promotora del gen *AS3MT*.

De un total de 119 individuos el 40.3% fueron homocigotos silvestres, el 44.6% fueron heterocigotos y 15.1% que fueron homocigotos mutados (Tabla 10). La frecuencia alélica obtenida de este polimorfismo fue de A=0.63 y G=0.37, esta frecuencia fue parecida a la obtenida por Wood y col. (2006) en una población Caucásico-Americana G= 0.383 y una población Afro-Americanos G=0.317. En un estudio epidemiológico realizado por Meza y col. (2005) reportaron una frecuencia alélica en niños de G=0.39 en Europeos y de G=0.46 en Americanos.

La frecuencia de los polimorfismos evaluados estuvieron en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg (Tabla 11), lo cual indica que las frecuencias genotípicas no se han modificado por la migración e inmigración en la población de estudio, que permanecen constantes de generación en generación, lo que sugiere un apareamiento al azar, sin generación de mutaciones que originen la conversión de un alelo en otro.

7.5 Relación entre las especies arsenicales y el genotipo de *AS3MT*

Se ha propuesto que en el organismo, la biotransformación del As_i se lleva a cabo mediante una serie de reacciones de reducción y de metilación oxidativa. Waters y col., (2004), sugieren que la enzima *AS3MT* es determinante en el metabolismo del As_i , por lo que el genotipo que afecte la biotransformación del arsénico podría ser un importante factor determinante de la variabilidad interindividual del metabolismo de arsénico y la susceptibilidad a éste.

En la población de estudio (n=119) se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los metabolitos de As en orina entre los individuos homocigotos silvestres en comparación con los homocigotos mutados del SNP A-477G. Sin embargo, al realizar las comparaciones de las proporciones relativas se puede apreciar que los individuos que son homocigoto

mutante presentan una menor proporción de MMA^{III+V} y una mayor proporción de DMA^{III+V} en la orina, en comparación con los individuos con el genotipo homocigoto silvestre y heterocigoto, consecuentemente se observa un aumento en la tasa DMA/MMA en el grupo homocigoto mutante de este polimorfismo (Tabla 12).

Como se puede observar la región de estudio aparentemente tiene un impacto en el metabolismo del arsénico, ya que este SNP está en la región promotora del gen de estudio, se puede pensar que hay un efecto a nivel transcripcional del gen, se tendría que realizar una serie de experimentos en los cuales pudiéramos ver si está afectada la transcripción del gen y el que pudiera generar el cambio observado.

Se ha sugerido que para una mejor evaluación del análisis genético se determinen los haplotipos, los cuales representan el ligamento de múltiples SNPs, lo cual provee significativamente más poder en el análisis en comparación con la evaluación de los SNPs por separado (Cambien, 2001).

7.6 Relación entre el genotipo *AS3MT* con la presencia de lesiones en piel

El motivo de buscar asociaciones entre el polimorfismo del gen *AS3MT* con un marcador de daño por la exposición de As_i (lesión de piel), fue para ver si este polimorfismo pudiera ser un marcador de susceptibilidad en poblaciones expuestas a As_i.

Ciertos estudios sugieren que en individuos expuestos crónicamente a As y que presentan lesiones en piel existe un aumento de la proporción de MMA^{III+V} total. (Yu y col., 2000; Del Razo y col., 1997) por lo que podría estar contribuyendo importantemente a efectos tóxicos.

En el presente estudio se observó que la presencia del genotipo mutado (GG) de este polimorfismo favorece la disminución de la proporción de MMA y un aumento en el DMA urinario, esto nos sugiere, que estos individuos son mejores metiladores que los que presentan el genotipo silvestre (AA), por lo tanto podrían ser menos susceptibles al daño por la exposición a As_i, por lo cual se esperaría una disminución en la presencia de lesiones en piel, se encontró que la presencia de lesiones de piel no estuvo asociada con el SNP A-477G del gen *AS3MT* como se muestra en la tabla 16.

8. CONCLUSIONES

- Las especies trivalentes de As están presentes en mayor proporción (63.9%) en las muestras de orina, siendo el DMA^{III} el metabolito predominante en la orina, no obstante su baja estabilidad.
- En la población de estudio se observó una frecuencia alélica de A=0.63 y G=0.37, las cuales fueron similares a la frecuencias observadas en una población Caucásico-Americana que fue de A=0.617 y G=0.383 (Meza y col., 2005).
- Se observó una relación significativa entre el SNP A-477G localizado en la región promotora del gen *AS3MT* y el fenotipo del As_i. Los individuos homocigotos mutados presenta una menor proporción relativa MMA^{III+V} y una mayor proporción de DMA^{III+V} en la orina en comparación con los individuos homocigotos silvestres y heterocigoto; consecuentemente se observa un aumento en la tasa DMA/MMA en el grupo homocigoto mutante.
- Se encontró que la presencia de lesiones de piel no estuvo asociada al SNP A-477G.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios para la determinar si el SNP A-477G localizado en la región promotora del gen *AS3MT* afecta la transcripción de éste.
- Evaluar otros polimorfismos presentes en el gen *AS3MT* para determinar si el SNP A-477G se encuentra relacionado con ellos.
- Determinar la asociación de este polimorfismo con otros marcadores de daño para determinar la aportación del polimorfismo de la *AS3MT* como marcador de susceptibilidad genética en poblaciones expuestas a As_i .

10. BIBLIOGRAFÍA

- Andrew AS, Burgess JL, Meza MM, Demidenko E, Waugh MG, Hamilton JW, Karagas MR. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair *in vitro* and in individuals exposed to drinking water arsenic. *Environ. Health Perspect.* 114: 1193-1198, (2006).
- Andrew AS, Karagas MR, Hamilton JW. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *Int. J. Cancer* 104: 263-268, (2003).
- Andrewes P, Demarini DM, Funasaka K, Wallace K, Lai VW, Sun H, Cullen WR, Kitchin KT. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4140-4148, (2004).
- Aposhian HV, Arroyo A, Cebrian ME, del Razo LM, Hurlbut KM, Dart RC, Gonzalez-Ramirez D, Kreppel H, Speisky H, Smith A, Gonsebatt ME, Ostrosky-Wegman P, Aposhian MM. DMPS-arsenic challenge test. I: Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropane sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 192-200, (1997).
- Armienta M., Rodríguez R. and Cruz O. Arsenic content in hair of people exposed to natural arsenic polluted groundwater at Zimapán, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 583-589, (1997).
- Armienta MA, Rodríguez R, Villaseñor G, Aguayo A, Cenicerros N, Juárez F, Méndez T. Estudio de reconocimiento de la contaminación por arsénico en la zona de Zimapán, Hidalgo, informe técnico, informe del igf al municipio de Zimapán, Hgo. 60 pp. (1993).
- ATSDR. Toxicological profile for arsenic – Draft for Public Comment. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia. (2005).
- Basu A, Mahata J, Roy AK, Sarkar JN, Poddar G, Nandy AK, Sarkar PK, Dutta PK, Banerjee A, Das M, Ray K, Roychaudhury S, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.* 516: 29-40, (2002).
- Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Styblo M, Achanzar WE, Webber MM, Waalkes MP. Molecular events associated with arsenic-induced malignant transformation of

- human prostatic epithelial cells: aberrant genomic DNA methylation and K-ras oncogene activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206: 288-298, (2005).
- Borak J, Hosgood HD. Seafood arsenic: implications for human risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47:204-212, (2007).
- Bredfeldt TG, Jagadish B, Eblin KE, Mash EA, Gandolfi AJ. Monomethylarsonous acid induces transformation of human bladder cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216:69-79, (2006).
- Buchet JP, Lauwerys R. Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 65-74, (1987).
- Calderon RL, Hudgens E, Le XC, Schreinemachers D, Thomas DJ. Excretion of arsenic in urine as a function of exposure to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect.* 107: 663-667, (1999).
- Cambien F. Genes in population, In Malcolm S, Goodship J. (Eds.), *Genotype to Phenotype*. Academic Press, Guildford, UK, pp: 31-53, (2001).
- Cantor KP, Lubin JH. Arsenic, internal cancers, and issues in inference from studies of low level exposures in human populations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:252-257, (2007).
- Casanovas-Taltavull T, Ribes J, Berrozpe A, Jordan S, Casanova A, Sancho C, Valls C, Bosch FX. Patient with hepatocellular carcinoma related to prior acute arsenic intoxication and occult HBV: epidemiological, clinical and therapeutic results after 14 years of follow-up. *World J Gastroenterol.* 12:1972-1974, (2006).
- Chen CJ, Chen CW, Wu MM, Kuo TL. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer* 66: 888-892, (1992).
- Chen, C.J., Chiou, H.Y., Chiang, M.H., Lin, L.J., Tai, Y.T. Dose– response relationship between ischemic heart disease mortality and longterm arsenic exposure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 504–510, (1996).
- Chen CJ, Wang SL, Chiou JM, Tseng CH, Chiou HY, Hsueh YM, Chen SY, Wu MM, Lai MS. Arsenic and diabetes and hypertension in human populations: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:298-304, (2007).
- Chen Z, Zhao WL, Shen ZX, Li JM, Chen SJ, Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, Zhou J, Guillemin MC, Vitoux D, de Thé H. Arsenic trioxide and acute promyelocytic

- leukemia: clinical and biological. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 313:129-144, Review, (2007).
- Chowdhury U, Biswas B, Chowdhury R, Samanta G, Mandal B, Basu G, Chanda C, Lodh D, Saha K, Mukherjee S, Roy S, Kabir S, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ. Health Perspect.* 108: 393-397, (2000).
- Chowdhury UK, Rahman MM, Sengupta MK, Lodh D, Chanda CR, Roy S, Quamruzzaman Q, Tokunaga H, Ando M, Chakraborti D. Pattern of excretion of arsenic compounds [arsenite, arsenate, MMA(V), DMA(V)] in urine of children compared to adults from an arsenic exposed area in Bangladesh. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 38:87-113, (2003).
- Clarkson TW, Friberg L, Norberg G, Sager P. *Biological Monitoring of Toxic Metals.* NIOSH (ed.) Plenum Press New York pp 303-321, (1988).
- Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit Rev Toxicol.* 36:99-133, Review, (2006).
- Concha G, Vogler G, Nermell B, Vahter M. Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *Int Arch Occup Environ Health.* 75:576-580, (2002).
- Coronado-González JA, Del Razo LM, García-Vargas G, Sanmiguel-Salazar F, Escobedo-de la Peña J. Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environ Res.* 104:383-389, (2007).
- Csanaky I, Gregus Z. Species variations in the biliary and urinary excretion of arsenate, arsenite and their metabolites. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 131:355-65, (2002).
- Cui X, Kobayashi Y, Hayakawa T, Hirano S. Arsenic speciation in bile and urine following oral and intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats. *Toxicol. Sci.* 82: 478-487, (2004).
- Cui X, Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Hatakeyama K, Hirano S. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells. *Hum. Pathol.* 37: 298-311, (2006).
- Cullen W, McBride B, Reglinski J. The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *J. Inorg. Biochem.* 21:179-194, (1984).

- Cullen WR, McBride BC, Pickett AW, Reglinski J. The wood preservative chromated copper arsenate is a substrate for trimethylarsine biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:443-444, (1984).
- De Gieter M, Leermakers M, Van Ryssen R, Noyen J, Goeyens L, Baeyens W. Total and toxic arsenic levels in north sea fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 406-417, (2002).
- Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol Sci.* 98:75-86, (2007).
- Del Razo L, Garcia-Vargas G, Vargas H, Albores A, Gonsebatt M, Montero R, Ostrosky-Wegman P, Kelsh M, Cebrian M. Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch. Toxicol.* 71: 211-217, (1997).
- Del Razo LM, Styblo M, Cullen WR, Thomas DJ. Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174: 282-293, (2001).
- Diario Oficial de la Federación. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (2000).
- Drobna Z, Jaspers I, Thomas DJ, Styblo M. Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals. *FASEB J.* 17: 67-69, (2003).
- Drobna Z, Waters SB, Walton FS, LeCluyse EL, Thomas DJ, Styblo M. Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201: 166-177, (2004).
- Engel RR, Smith AH: Arsenic in drinking water and mortality from vascular disease: an ecologic analysis in 30 counties in the United States. *Arch Environ Health*, 49:418-427, (1994).
- Engström SK, Broberg K, Concha G, Nermell B, Warholm M, Vahter M. Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidence from Argentina. *Environ Health Perspect* 115:599-605, (2007).
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). National primary drinking water regulations; Arsenic and clarifications to compliance and new source contaminants

- monitoring; Proposed rule. U.S. Environmental Protection Agency. 65 FR38888, (2000).
- Gong Z, Lu X, Cullen WR, Le C. Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *J. Anal. At. Spectrom.* 6: 1409-1413, (2001).
- Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzman P, Blas J, Del Razo LM, Garcia-Vargas G, Albores A, Cebrian ME, Kelsh M, Ostrosky-Wegman P. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* 386: 219-228, (1997).
- Gradecka D, Palus J, Wasowicz W. Selected mechanisms of genotoxic effects of inorganic arsenic compounds. *J. Occup. Med. Environ. Health* 14: 317-328, (2001).
- Guha Mazumder DN, Haque R, Ghosh N, De BK, Santra A, Chakraborti D, Smith AH. Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *Inter. J. of Epidem.* 29: 1047-1052, (2000).
- Guha Mazumder DN. Arsenic and liver disease. *J. Indian Med. Assoc.* 99: 311, 314-315, 318-320, (2001).
- Hernández A, Xamena N, Sekaran C, Tokunaga H, Sampayo-Reyes A, Quinteros D, Creus A, Marcos R. High arsenic metabolic efficiency in AS3MT287Thr allele carriers. *Pharmacogenet Genomics.* 18:349-55, (2008).
- Hernández A, Xamena N, Sekaran C, Tokunaga H, Sampayo-Reyes A, Quinteros D, Creus A, Marcos R. High arsenic metabolic efficiency in AS3MT287Thr allele carriers. *Pharmacogenet Genomics.* 18:349-55 (2008)
- Hernández A, Marcos R. Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics.* 9:1113-32 (2008).
- Hernandez-Zavala A, Cordova E, Del Razo LM, Cebrian ME, Garrido E. Effects of arsenite on cell cycle progression in a human bladder cancer cell line. *Toxicology.* 207: 49-57, (2005).
- Hernández-Zavala A, Del Razo LM, Aguilar C, García-Vargas GG, Borja VH, Cebrian ME. Alterations in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Toxicol. Letters* 99: 79-84, (1998).
- Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, Shraim A. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Arch. Toxicol.* 77: 305-312 (2003).

Hirata S, Toshimitsu H. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 383:454-460, (2005).

Hughes MF, Del Razo LM, Kenyon EM. Dose-dependent effects on tissue distribution and metabolism of dimethylarsinic acid in the mouse after intravenous administration. *Toxicology* 143: 155-166, (2000).

Hughes MF, Devesa V, Adair BM, Styblo M, Kenyon EM, Thomas DJ. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 208:186-197, (2005).

Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Razo LM, Thomas DJ. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 191:202-210, (2003).

IARC. (International Agency for Research on Cancer. In : IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans- overall evaluation of carcinogenicity. An update of IARC Monographs 1 to 42, (Suppl. 7), Lyon, pp 100 (1990).

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), Marco Geo estadístico, (2000)

Kenyon EM, Del Razo LM, Hughes MF, Kitchin KT. An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of arsenite action 2. Heme oxygenase induction in mice. *Toxicology.* 206: 389-401, (2005).

Kenyon EM, Hughes MF. A concise review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsinic acid. *Toxicology.* 160: 227-236, Review, (2001).

Kitchin KT. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Applied. Pharmacol.* 172: 249-261, (2001).

Klein CB, Leszczynska J, Hickey C, Rossman TG. Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:289-97, (2007).

Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ. Mol. Mutagen.* 42:192-205, (2003).

- Kobayashi Y, Cui X, Hirano S. Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [As(GS)₃] and methylarsenic diglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile. *Toxicology* 211: 115-123 (2005).
- Kobayashi Y, Hayakawa T, Hirano S. Expression and activity of arsenic methyltransferase Cyt 19 in rat tissues. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23:115-120, (2007).
- Le XC, Gong Z, Jiang G, Lu X, Cullen WR Trivalent arsenic compounds: speciation, preservation and interaction with proteins. 5th International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects, San Diego, California pp 24, (2002).
- Lechuga D, Cebrian M, Del Razo L, Gilda R, Cruz Gonzalez M, Soto I. Exposición Humana a Arsénico en agua de consumo en Zimapán Hidalgo. IX Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública. Cuernavaca Morelos, Marzo (2001).
- Li J, Waters SB, Drobna Z, Devesa V, Styblo M, Thomas DJ. Arsenic (+3oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204:164-169, (2005).
- Lin S, Del Razo LM, Styblo M, Wang C, Cullen W, Thomas DJ. Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 305-311, (2001).
- Lin S, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, Hall LL, Simeonsson JB, Thomas DJ. A novel S-adenosyl-L-methionine: arsenic (III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 277: 10795-10803, (2002).
- Lin TH, Huang YL, Wang MY. Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot disease. *J. Toxicol. Environ Health A.* 53: 85-93, (1998).
- Lindberg AL, Kumar R, Goessler W, Thirumaran R, Gurzau E, Koppova K, Rudnai P, Leonardi G, Fletcher T, Vahter M. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ Health Perspect.* 115:1081-1086, (2007).
- Loffredo CA, Aposhian HV, Cebrian ME, Yamauchi H, Silbergeld EK. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ Res.* 92:85-91, (2003).
- Lowney YW, Ruby MV, Wester RC, Schoof RA, Holm SE, Hui XY, Barbadillo S, Maibach HI. Percutaneous absorption of arsenic from environmental media. *Toxicol Ind Health.* 21:1-14, (2005).

- Luo JC, Hsieh LL, Chang MJ, Hsu KH. Decreased white blood cell counts in semiconductor manufacturing workers in Taiwan. *Occup. Environ. Med.* 59: 44-48, (2002).
- Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chem Res Toxicol.* 14:371-378, (2001).
- Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, Kligerman AD. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 355-361, (2001).
- Mendez M, Armienta MA. Arsenic phase distribution in Zimapán mine tailings, Mexico. *Geofísica Internacional*, 42: 131-140, (2003).
- Meza M, Gandolfi AJ, Klimecki WT. Developmental and genetic modulation of arsenic biotransformation: a gene by environment interaction?. *Toxicol Appl Pharmacol.* 222:381-387, (2007).
- Meza MM, Yu L, Rodriguez YY, Guild M, Thompson D, Gandolfi AJ, Klimecki WT. Developmentally restricted genetic determinants of human arsenic metabolism: association between urinary methylated arsenic and CYT19 polymorphisms in children. *Environ. Health Perspect.* 113: 775-781 (2005).
- Milton AH, Rahman M. Respiratory effects and arsenic contaminated well water in Bangladesh. *Int. J. Environ. Health Res.* 12: 175-179, (2002).
- National Research Council, 2001. *Arsenic in Drinking Water: 2001 Update*. National Academy Press, Washington, DC.
- Ninh TD, Nagashima Y, Shiomi K. Quantification of seven arsenic compounds in seafood products by liquid chromatography/electrospray ionization-single quadrupole mass spectrometry (LC/ESI-MS). *Food Addit Contam.* 23:1299-1307 (2006).
- Ongley LK, Sherman L, Armienta A, Concilio A, Salinas CF. Arsenic in the soils of Zimapán, Mexico. 145:793-799, (2007).
- Ostrosky-Wegman P, Gonshebbatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, Garcia-Vargas G, Del Razo LM, et al. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* 250: 477-482, (1991).

- Paul DS, Harmon AW, Devesa V, Thomas DJ, Stýblo M. Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. *Environ Health Perspect.* 115:734-743, (2007).
- Pellizzari ED, Clayton CA. Assessing the measurement precision of various arsenic forms and arsenic exposure in the National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS). *Environ Health Perspect.* 114:220-227, (2006).
- Petrack J, Ayala-Fierro F, Cullen W, Carter D, Aposhian H. Monomethylarsonous acid (MMAsIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 163: 203-207, (2000).
- Petrack J, Jagadish B, Mash E, Aposhian H. Monomethylarsonous acid (MMAsIII) and arsenite: LD50 in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 651-656, (2001).
- Rahman MM, Chowdhury UK, Mukherjee SC, Mondal BK, Paul K, Lodh D, Biswas BK, Chanda CR, Basu GK, Saha KC, Roy S, Das R, Palit SK, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India--a review and commentary. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39:683-700, Review, (2001).
- Rahman M, Tondel M, Ahmad SA, Chowdhury IA, Faruquee MH, Axelson O. Hypertension and arsenic exposure in Bangladesh. *Hypertension* 33: 74-78, (1999).
- Ramirez P, Del Razo LM, Gutierrez-Ruiz MC, Gonshebbatt ME. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis.* 21: 701-706, (2000).
- Regmi R, Milne BF, Feldmann J. Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Anal Bioanal Chem.* 388:775-782.
- Rodríguez VM, Del Razo LM, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Sánchez-Peña LC, Uribe-Querol E, Gutiérrez-Ospina G, Gonshebbatt ME. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol Sci.* 84:157-166, (2005).
- Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett.* ;145:1-18, Review, (2003).
- Rossmann TG. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res.* 533:37-65, Review, (2003).

- Sakurai T, Kojima C, Kobayashi Y, Hirano S, Sakurai MH, Waalkes MP, Himeno S. Toxicity of a trivalent organic arsenic compound, dimethylarsinous glutathione in a rat liver cell line (TRL 1215). *Br. J. Pharmacol.* 149: 888-897, (2006).
- Samikkannu T, Chen CH, Yih LH, Wang AS, Lin SY, Chen TC, Jan KY. Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 409-414, (2003).
- Savabieasfahani M, Lochmiller RL, Rafferty DP, Sinclair JA. Sensitivity of wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) to the immunotoxic effects of low-level arsenic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 289-296, (1998).
- Simeonova PP, Luster MI: Arsenic and atherosclerosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198:444-449, Review, (2004).
- Soto-Peña GA, Luna AL, Acosta-Saavedra L, Conde P, López-Carrillo L, Cebrián ME, Bastida M, Calderón-Aranda ES, Vega L. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB J.* 20:779-781, (2006).
- Stolz JF, Perera E, Kilonzo B, Kail B, Crable B, Fisher E, Ranganathan M, Wormer L, Basu P. Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environ Sci Technol.* 41:818-823, (2007).
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.* 74: 289-299, (2000).
- Styblo M, Thomas DJ. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147: 1-8, (1997).
- Styblo M, Vega L, Germolec D, Luster M, Del Razo L, Wang C, Cullen W, Thomas D. Metabolism and toxicity of arsenicals in cultured cells. In: *Arsenic Exposure and Health Effects* Chappell, W.R., Abernathy, C.O., and Calderon, R.L., eds.. Elsevier, Amsterdam. 311-323, (1999).
- Sun G, Xu Y, Li X, Jin Y, Li B, Sun X. Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *Environ Health Perspect.* 115:648-52, (2007).

- Suzuki KT, Katagiri A, Sakuma Y, Ogra Y, Ohmichi M. Distributions and chemical forms of arsenic after intravenous administration of dimethylarsinic and monomethylarsonic acids to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198:336-344, (2004).
- Thomas DJ, Del Razo LM, Scheinemachers DM, Hudgens EE, Le XC, Calderon RL. In *Arsenic Exposure and Health Effects* (Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, eds.). Elsevier, Amsterdam. 353-366 pp, (2001).
- Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, Devesa V, Styblo M. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.* 232(1): 3-13, Review, (2007).
- Thomas DJ, Waters SB, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198: 319-326, (2004).
- Tseng, C.H., Chong, C.C., Chen, C.J., Tai, T.Y. Dose-response relationship between peripheral vascular disease and ingested inorganic arsenic among residents in blackfoot disease endemic villages in Taiwan. *Atherosclerosis* 120:125-133, (1995).
- Vahter M, Marafante E. Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicol. Lett.* 37: 41-46, (1987).
- Vahter M, Concha G. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol Toxicol.* 9:1-5 Review (2001).
- Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology.* 27;181-182:211-217. Review (2002).
- Valenzuela Limón OL. Evaluación de las especies metiladas trivalentes de arsénico y su relación con la toxicidad en piel de individuos expuestos crónicamente a este metaloide. Tesis CINVESTAV IPN, 150pp. (2003).
- Valenzuela OL, Borja-Aburto VH, Garcia-Vargas GG, Cruz-Gonzalez MB, Garcia-Montalvo EA, Calderon-Aranda ES, Del Razo LM. Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ. Health. Perspect.* 113: 250-254 (2005).
- Waalkes MP, Liu J, Ward JM, Diwan BA. Animal models for arsenic carcinogenesis: inorganic arsenic is a transplacental carcinogen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198:377-84, (2004).

- Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol.* 166:24-35, (2000).
- Wang TC, Jan KY, Wang AS, Gurr JR. Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. *Mutat. Res.* 615:75-86, (2007).
- Wang, C.H., Jeng, J.S., Yip, P.K., Chen, C.L., Hsu, L.I., Hsueh, Y.M., Chiou, H.Y., Wu, M.M., Chen, C.J. Biological gradient between long term arsenic exposure and carotid atherosclerosis. *Circulation* 105: 1804–1809, (2002).
- Wanibuchi H, Hori T, Meenakshi V, Ichihara T, Yamamoto S, Yano Y, Otani S, Nakae D, Konishi Y, Fukushima S. Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid: association with elevated ornithine decarboxylase activity and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 1149-1154, (1997).
- Wanibuchi H, Yamamoto S, Chen H, Yoshida K, Endo G, Hori T, Fukushima S. Promoting effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 17: 2435-2439, (1996).
- Waters SB, Devesa V, Del Razo LM, Styblo M, Thomas DJ. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 404-409, (2004).
- Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Dackiw AP, Marshall JC. Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis. *Surgery* 120: 150-157, (1996).
- WHO (World Health organization). Arsenic and arsenic compounds. 2nd ed. *Environmental Health Criteria* 224. Geneva (2001).
- Wood TC, Salavagionne OE, Mukherjee B, Wang L, Klumpp AF, Thomae BA, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies. *J. Biol. Chem.* 281: 7364-7373, (2006).
- Yamamoto S, Konishi Y, Matsuda T, Murai T, Shibata MA, Matsui-Yuasa I, Otani S, Kuroda K, Endo G, Fukushima S. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.* 55: 1271-1276, (1995).

- Yamanaka K, Katsumata K, Ikuma K, Hasegawa A, Nakano M, Okada S. The role of orally administered dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in the promotion and progression of UVB-induced skin tumorigenesis in hairless mice. *Cancer Lett.* 152: 79-85, (2000).
- Yamanaka K, Ohtsubo K, Hasegawa A, Hayashi H, Ohji H, Kanisawa M, Okada S. Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis* 17: 767-770, (1996).
- Yang CY, Chiu HF, Wu TN, Chuang HY, Ho SC. Reduction in kidney cancer mortality following installation of a tap water supply system in an arsenic-endemic area of Taiwan. *Arch Environ Health.* 59:484-488, (2004).
- Yang C, Frenkel K. Arsenic-mediated cellular signal transduction, transcription factor activation and aberrant gene expression: implications in carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21: 331-342, (2002).
- Yeh S. Skin cancer in chronic arsenicism. *Human. Pathol.* 4: 469-485, (1973).
- Yu RC, Hsu KH, Chen CJ, Froines JR. Arsenic methylation capacity and skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:1259-62, (2000).
- Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. Human monomethylarsonic acid (MMAV) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* 14:1051-1057, (2001).
- Zhang X, Yang F, Shim JY, Kirk KL, Anderson DE, Chen X. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 255:95-106, (2007).
- Zierold, K.M., Knobeloch, L., Anderson, H. Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic contaminated drinking water. *Am. J. Public Health* 94:1936–1937 (2004).

ANEXOS

Anexo 1

Carta de consentimiento

Universidad de Carolina del Norte-Chapel Hill (USA)
Consentimiento para almacenar muestras biológicas con identificación

Estudio IRB #05-1057

Fecha de la Versión de la Forma de Consentimiento: Junio 5, 2006

Título del Estudio: Biomarcadores de Riesgos para la Salud Humana Asociados con la Exposición Ambiental al Arsénico

Investigador Principal:	Dr. Miroslav Styblo, (UNC, Chapel Hill)
Departamento de UNC-Chapel Hill:	Nutrición
UNC-Chapel Hill Número telefónico:	001 (919) 966-5721
Dirección electrónica:	styblo@med.unc.edu
Co-Investigadores:	Dra. Luz Maria Del Razo Jiménez (Cinvestav-IPN) Dr. Gonzalo G. García-Vargas, (Universidad Juárez del Estado de Durango)

Fuente de Financiamiento: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América.

Teléfono para contacto del estudio: (55) 5061-3306 (Dr. Del Razo, Cinvestav-IPN)

Dirección electrónica para contacto del estudio: ldelrazo@cinvestav.mx

¿Cuáles son algunas cosas generales que usted debe de saber acerca de éste estudio de investigación?

Los estudios de investigación están diseñados para obtener nuevos conocimientos que pueden ayudar a otras personas en el futuro. Usted puede no recibir un beneficio directo en esta investigación. También puede haber riesgos en los estudios de investigación.

Estudios en sangre, tejidos o fluidos biológicos pueden ayudar a los investigadores a entender como funciona el cuerpo humano. Las muestras biológicas utilizadas en la investigación permiten contestar varias preguntas. Existen diferentes tipos de estudios que usan muestras biológicas. Algunos investigadores pueden desarrollar nuevas pruebas para encontrar enfermedades. Otros pueden desarrollar nuevos métodos para el tratamiento de las enfermedades. En el futuro, algunas investigaciones permitirán ayudar al desarrollo de nuevos medicamentos.

Usted se puede negar a permitirnos guardar sus muestras biológicas. Si usted padece de alguna enfermedad, usted no tiene que estar en este estudio de investigación para recibir tratamiento.

Los detalles de esta investigación están descritos abajo. Es importante que entienda esta información para que pueda tomar una decisión con respecto a los estudios de investigación. Se le proporcionara una copia de esta solicitud de consentimiento. Usted puede en cualquier momento, preguntarles a los investigadores nombrados arriba o a los miembros del equipo que los asiste cualquier duda que tenga acerca de este estudio.

¿Cuál es el propósito de este estudio?

El propósito de este estudio es examinar como el arsénico presente en el agua para beber afecta la salud de las personas. Para lograr el propósito de éste estudio, necesitamos recolectar y analizar muestras de orina y sangre que usted nos proporcione.

Los investigadores determinarán la cantidad de arsénico en su orina y marcadores de enfermedades comunes en su sangre. También se realizarán análisis genéticos usando ADN y ARN de su muestra de sangre que permitirá identificar si usted es más sensible a la toxicidad del arsénico que los demás participantes del estudio. A usted se le solicitará permiso para que su sangre, orina, ADN y ARN (referidos colectivamente como “muestras biológicas”) las cuales serán recolectadas en éste estudio para ser almacenadas por 5 años después de haber concluido éste estudio. Estas muestras serán utilizadas en el futuro para el análisis de nuevos marcadores de enfermedades causadas por la exposición a arsénico y para el análisis de genes que puedan estar involucrados en el metabolismo de arsénico o en enfermedades causadas por la exposición a arsénico.

¿Cómo serán recolectadas las muestras?

Las muestras de orina y sangre serán recolectadas como se especifica en su consentimiento para participar en éste estudio: usted tendrá que entregar 2 muestras de orina (una al principio y una al final del estudio). Una muestra de sangre será colectada de su vena con jeringa. Usted puede ser requerido para dar otra muestra de sangre durante el transcurso de éste estudio.

Usted no puede estar en este estudio si se encuentra embarazada. Si se embaraza durante el periodo de 3 años que dura este proyecto, será excluida de estudios posteriores. También se le excluirá si se encuentra gravemente enfermo, si comienza a usar cierto tipo de medicamentos o suplementos alimenticios, si comienza a trabajar con materiales que contienen arsénico o si se vuelve adicto al alcohol o a las drogas durante el periodo de estudio. Tampoco puede ser incluido en este proyecto si su padre, abuelo o hijo ya está participando en este estudio.

¿Qué se hará con las muestras?

Las muestras serán almacenadas en la Universidad de Carolina del Norte (UNC) en Chapel Hill (USA) y en el Cinvestav-IPN (México D.F.). Toda la información de identificación incluyendo su nombre y su número de registro médico serán retirados de las muestras y reemplazados por un código. Únicamente el Dr. Styblo (UNC) y la Dra. Del Razo (Cinvestav-IPN) sabrán que estas muestras fueron tomadas de usted. Aunque los resultados del análisis de sus muestras sean publicados, su nombre no aparecerá en estas publicaciones. Algunas de sus muestras serán compartidas con otros investigadores fuera de la UNC o del Cinvestav. Sin embargo, únicamente se dará información que no permitirá la identificación del donante. 5 años después de haber completado éste estudio, todas las muestras serán destruidas.

¿Cuáles son los beneficios de estar en este estudio?

Los beneficios directos para usted son poco probables. Estos estudios (los recientes y los futuros) podrán proveer información adicional que pueda ser de utilidad para entender como la exposición al arsénico afecta la salud de las personas y que medidas se deberían de tomar para prevenir estos efectos adversos a la salud por esta exposición.

¿Cuáles son los posibles riesgos o incomodidades de estar en éste estudio de investigación?

Como se describe en su consentimiento de participación, un pequeño riesgo para usted está asociado con la colección de sangre. La sangre será colectada por enfermeras profesionales en el Centro de Salud local. Usted experimentará un pequeño dolor a la hora de sacar la sangre. Ocasionalmente se forma un moretón en el lugar del piquete. Se usarán técnicas especiales para prevenir infecciones. Usted o su padre ó tutor tendrán que contactar al Centro de Salud o a su médico si aparece alguna irritación o dolor en el área del piquete después de haber salido del

Centro de Salud. Si usted se enferma durante la colección de sangre, será llevado inmediatamente al hospital más cercano o a alguna clínica de emergencia.

¿Habrá un costo para usted por el almacenamiento de sus muestras?

No hay ningún costo para usted o para su compañía de seguro por el almacenamiento y uso de las muestras.

¿Qué recibirá usted a cambio por estar en este estudio?

Como se describe en su consentimiento, usted recibirá una compensación de \$250 pesos por su participación en este estudio, siempre y cuando resulte seleccionado y haya proporcionado las muestras de agua de bebida, sangre y orina; además de atender a la visita para la exploración de la piel. Al final del estudio usted recibirá otros \$250 pesos.

¿Quién es el propietario de sus muestras?

Las muestras de orina y sangre (incluyendo ADN y ARN aislado de la sangre) obtenidas para el propósito de éste estudio son propiedad exclusiva de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, USA. Los investigadores pueden retener, preservar o disponer de estas muestras y pueden usar estas muestras para investigación que puede resultar en aplicaciones comerciales. No hay planes para compensarlo por cualquier uso comercial futuro de estas muestras.

¿Cómo se protegerá su privacidad?

Toda su información personal se mantendrá guardada en un lugar seguro en la oficina de la Dra. Del Razo en el Cinvestav-IPN, Ciudad de México. Su nombre será sustituido por un número que será usado posteriormente para la identificación de sus muestras. Toda la información acerca de usted y su familia se mantendrá guardada bajo llave en un archivero en la oficina de la Dra. Del Razo en la Ciudad de México. Esta información no se dará a ningún otro miembro del equipo dentro o fuera de la Ciudad de México. Únicamente los Doctores Styblo, Del Razo y García-Vargas tendrán acceso a esta información. Esta información será almacenada en la oficina de la Dra. Del Razo por cinco años después de que haya terminado la investigación. Después de 5 años esta información será destruida. Si nosotros encontramos que usted tiene una enfermedad causada por el arsénico le pediremos permiso para transmitir esta información a su doctor.

En ninguna publicación acerca de este estudio aparecerá el nombre de los sujetos de estudio. A pesar de que se hará un gran esfuerzo para que esta investigación sea privada, puede existir la ocasión que por leyes federales o estatales se necesite desglosar el contenido de los archivos, incluyendo la información personal. Esto es muy poco probable, pero en caso de que se necesite que esta información sea revelada, las instituciones participantes en este estudio harán todo lo posible para proteger la privacidad de esta información personal. En algunos casos, para propósitos de control de calidad o seguridad, la información sobre éste estudio podría ser revisada por representantes de la Universidad, o por investigadores que están apoyando este estudio o por miembros de agencias gubernamentales. Si usted tiene alguna preocupación acerca de la privacidad, usted puede contactar a cualquier miembro del equipo de investigación quienes están identificados en su carta de consentimiento y en la primera página de este documento.

¿Buscarán los investigadores su aprobación para utilizar sus muestras en estudios futuros?

Al firmar este documento de consentimiento, usted está dando su autorización a los investigadores para que se utilicen sus muestras como se menciona arriba. La investigación actual y futuras están previstas por un Comité llamado Comité Institucional de Revisión (CIR) el papel del CIR es proteger

los derechos y el bienestar de los participantes de la investigación, en algunos casos el CIR puede solicitar que usted sea contactado de nuevo y solicitarle su consentimiento para utilizar sus muestras en un estudio de investigación específico. Usted tiene el derecho en ese tiempo futuro, de no participar en cualquier estudio de investigación para lo cual su consentimiento será buscado. Si usted decide no participar, no se afectará su atención médica o resultar en pérdida de los beneficios a los cuales usted tiene derecho.

¿Recibirá resultados de los estudios realizados en sus muestras en investigaciones futuras?

La mayoría de las investigaciones en sus muestras no se espera que produzcan nueva información que pueda ser importante para compartir con usted individualmente. En casos excepcionales, a usted se le puede ofrecer la oportunidad de recibir la información acerca de los resultados de la investigación en el cual sus muestras fueron usadas (por ejemplo, hallazgos que puedan afectar su cuidado médico).

¿Puede usted retirar sus muestras de éste estudio de investigación?

Si usted decide que sus muestras ya no sean almacenadas, usted debe contactar a los investigadores que aparecen en la primera página de este documento. Usted puede también contactar al CIR (o IRB por sus siglas en inglés), Office of Human Research Ethics, en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, USA. Telefono: 001 (919) 966-3113 o al correo electrónico IRB_subjects@unc.edu. Es mejor que haga su solicitud por escrito. Cualquier análisis en proceso al tiempo de recibir su solicitud o al haber terminado el procesamiento de la muestra previo a recibir su solicitud, el investigador continuará utilizando la muestra como parte del estudio de investigación. Una vez que los investigadores hayan sido notificados, sus muestras serán destruidas. Si usted no hace tal solicitud, las muestras podrán ser almacenadas por siempre. Los investigadores pueden elegir destruir las muestras en cualquier momento.

¿Que pasará si usted es lesionado durante esta investigación?

Todas las investigaciones involucran una posibilidad de lesionarse. Esto puede incluir el riesgo de una lesión personal. A pesar de todas las medidas de seguridad usted puede desarrollar una reacción o lesión al momento de recolectar su muestra. Si tales problemas se presentan, los investigadores le ayudaran a conseguir atención médica, pero cualquier costo por la atención médica lo tienen que pagar usted o su compañía seguro. La Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, no reservo fondos para pagarle por cualquier reacción o lesión que usted presente, o lo relacionado con la atención médica. Sin embargo, al firmar este documento usted no renuncia a ninguno de sus derechos legales.

¿Quién patrocina este estudio?

Esta investigación esta patrocinada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Esto significa que el equipo de investigación para hacer este estudio será pagado por esta agencia. Además, los investigadores no tienen un interés financiero con la agencia o con los resultados finales de este estudio.

¿Qué hacer si usted tiene preguntas acerca de este estudio?

Usted tiene el derecho de preguntar cualquier duda acerca de esta investigación y de que sus preguntas sean contestadas. Si usted tiene preguntas, las tiene que discutir con los investigadores nombrados en la primera página de este documento.

¿Qué hacer si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en esta investigación?

Todos los estudios realizados en personas voluntarias son revisados por un comité que trabaja para proteger sus derechos. Si usted tiene preguntas o preocupaciones que tengan que ver con sus derechos y la investigación puede contactar anónimamente a los siguientes Comités Institucionales de Revisión:

Dr. Edmundo Mesta Figueroa
Universidad Juárez Del Estado De Durango
Tel: +52 (871) 714-5122
E-mail: edmundo_mesta @compujed.zzn.com

Dr. Raúl Mena López
CINVESTAV, IPN,
Teléfono: +52 (555) 061 3800 (oficina 5130 Lab. 3362),
E-mail: rmena@fisio.cinvestav.mx

Institutional Review Board
Oficina de Revisión de Ética Humana
Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill
Teléfono: 001 1-919-966-3113
E-mail: IRB_subjects@unc.edu.

Acuerdo del Participante:

Número de folio de la encuesta: _____

He leído toda la información dada anteriormente. He preguntado todas las preguntas que tengo hasta este momento. Yo accedo voluntariamente a participar en este estudio de investigación.

Firma del participante.

Fecha

Nombre escrito del participante.

Firma de la persona que obtiene el permiso.

Fecha

Nombre escrito de la persona que obtiene el permiso.

Anexo 2

Formato del cuestionario utilizado para evaluar la exposición

ENCUESTA SOBRE EXPOSICION CRONICA AL ARSENICO.

1. FICHA DE IDENTIFICACION.

1.1 NOMBRE

1.2 SEXO 1) Masc. 2) Fem.

1.3 EDAD (años)

1.4 LOCALIDAD

1.5 NUM. VIVIENDA.

2. FACTORES DE EXPOSICION

2.1 ¿SIEMPRE HA VIVIDO EN ESTA LOCALIDAD?	1) Si (Pase a la preg. 2.5) 2) No	<input type="checkbox"/>
2.2 ¿CUANTO TIEMPO TIENE VIVIENDO EN ESTA LOCALIDAD?	Convertir a meses	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2.3 ¿DONDE HA VIVIDO ANTERIORMENTE? (Anotar 5 direcciones donde ha vivido anteriormente)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
2.4 ¿POR CUANTO TIEMPO VIVIO EN ESA (S) LOCALIDAD (ES)?	Convertir a meses	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2.5 ¿HA SALIDO DE LA LOCALIDAD POR PERIODOS MAYORES DE TRES MESES EN EL ULTIMO AÑO?	1) Si 2) No	<input type="checkbox"/>
2.6 ¿EN LOS ULTIMOS TREINTA DIAS HA ESTADO AUSENTE DE LA LOCALIDAD?	1) Si 2) No (pase a la preg. 2.8)	<input type="checkbox"/>
2.7 ¿CUANTOS DIAS?	Anotar Número de Días	<input type="text"/> <input type="text"/>
2.8 ¿EN QUE TRABAJA?	1) Hogar 2) Estudiante → (Pase a la preg. 2.10) 3) Cementera 4) Minería 5) Agricultura 6) Fundidoras 7) Hidroeléctrica 8) Otros <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>
2.9 ¿DESDE HACE CUANTO TIEMPO TRABAJA AHÍ?	Convertir a meses	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2.10 ¿QUE TIPO DE AGUA UTILIZA PARA BEBER? (Leer todas las opciones)	1) Entubada 2) Pozo 3) Manantial 4) Hidrante público 5) Garrafón o envasada (Pase a la preg. 2.10 bis) 6) OTRO <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2.10 bis. MENCIONE EL NOMBRE O LA MARCA DEL AGUA ENVASADA O DE GARRAFON	1) Floresta 2) Aguacatal 3) La Gotita 4) Arcoiris 5) Otros	<input type="checkbox"/>

2.24 ¿A QUE EDAD COMENZO A TOMAR ESTAS BEBIDAS?	Anotar en años	<input type="text"/>
2.25 ¿CADA CUANDO TOMA?	1) Diario 2) 1 vez a la semana 3) de 2 a 4 veces por semana 4) 1 vez cada 15 días 5) Ocasionalmente 6) Otros _____	<input type="text"/>
2.26 ¿CUANTOS VASOS SE TOMA AL DIA?	Anotar el número de vasos	<input type="text"/>

3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS		
3.1 ¿HA PADECIDO ALGUNA DE ESTAS ENFERMEDADES? (Leer todas las opciones)	1) Si 2) No 1) Cáncer o Tumor maligno (Si es No pasar a la 3.4) 2) SIDA 3) Diabetes 4) Cirrosis 5) Hepatitis 6) Insuficiencia Renal 7) Problemas de Circulación 8) Amputaciones 9) Hipertensión 10) Tos Crónica 11) Otros _____	<input type="text"/>
3.2 ¿EN DONDE TIENE EL CANCER?	1) Piel 2) Vías Urinarias 3) Pulmón 4) Mama 5) Cervicouterino 6) Estómago 7) Otros _____	<input type="text"/>
3.3 ¿ESTA RECIBIENDO RADIOTERAPIA O QUIMIOTERAPIA?	1) Si 2) No	<input type="text"/>
3.4 ¿ESTA TOMANDO ALGUN (OS) MEDICAMENTO (S)?	1) Si 2) No (pase a la preg. 4.1)	<input type="text"/>
3.5 ¿CUAL (ES) Y PARA QUE...? (Anotar los nombres)	_____ _____ _____ _____	<input type="text"/>
3.6 ¿CON QUE FRECUENCIA TOMA ESTOS MEDICAMENTOS? (Leer todas las opciones)	1) 1 vez al día 2) 2 veces al día 3) 3 veces al día 4) 1 vez cada 15 días 5) Ocasionalmente 6) Frecuentemente 7) Otros _____	<input type="text"/>

Anexo 3

Evaluación clínica dermatológica



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, IPN

SECCIÓN EXTERNA DE TOXICOLOGÍA

Zimapan, Hgo.

Consulta Médica

Nombre del Médico: _____ Fecha: _____

1. DATOS GENERALES DEL PACIENTE:

Nombre: _____ Folio: _____
Edad: ____ años Género: _____ Peso: ____ Kg Estatura: ____ m ____ cm

2. EXPLORACIÓN DERMATOLÓGICA

2.1 MANIFESTACIONES DERMICAS

2.1.1. CABELLO *SI (1) NO (2)*

2.1.1.1. FINO

2.1.1.2. RESECO

2.1.1.3. QUEBRADIZO

2.1.1.4. ALOPECIA

2.1.1.5. OTRO DE IMPORTANCIA _____

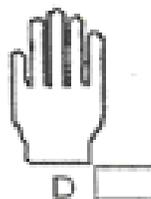
2.1.2. UÑAS *SI (1) NO (2)*

2.1.2.1. HIPERPIGMENTACIÓN

2.1.2.2. LINEAS DE MEES

2.1.2.3. OTRO DE IMPORTANCIA _____

3. UÑAS AFECTADAS (Marcar en el esquema)



4- PIEL *SI (1) NO (2)*

4.1 COLOR DE LA PIEL: Blanco Morena Negra Otro

4.2 ASPECTO: Normal Eczematosa Seca Tersa

4.3 LESIONES

SI (1) NO (2)

4.3.1. Eritrodermia _____	<input type="checkbox"/>
4.3.2. Exfoliación _____	<input type="checkbox"/>
4.3.3. Hiperhidrosis palmoplantar _____	<input type="checkbox"/>
4.3.4. Hipopigmentación _____	<input type="checkbox"/>
4.3.5. Hiperpigmentación _____	<input type="checkbox"/>
4.3.6. Hypo-hyperpigmentación (tipo confetti) _____	<input type="checkbox"/>
4.3.7. Hiperqueratosis palmar _____	<input type="checkbox"/>
4.3.8. Hiperqueratosis plantar _____	<input type="checkbox"/>
4.3.9. Hiperqueratosis corporal _____	<input type="checkbox"/>
4.3.10. Cuernos cutáneos _____	<input type="checkbox"/>
4.3.11. Bowen _____	<input type="checkbox"/>
4.3.12. Melanoma _____	<input type="checkbox"/>
4.3.13. Carcinoma basocelular _____	<input type="checkbox"/>
4.3.14. Carcinoma de células escamosas _____	<input type="checkbox"/>
4.3.15. Verrugas vulgaris _____	<input type="checkbox"/>
4.3.16 Otros de importancia _____	<input type="checkbox"/>

4.4 LOCALIZACIÓN (Anotar con la clave del tipo de lesión en el siguiente esquema)

