



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup de Mutagènesi

Tesis Doctoral

BIOMONITORIZACIÓN GENOTÓXICA DE  
POBLACIONES HUMANAS EXPUESTAS  
AMBIENTALMENTE AL ARSÉNICO

Valeria Martínez González

2005

BIOMONITORIZACIÓN GENOTÓXICA DE POBLACIONES HUMANAS  
EXPUESTAS AMBIENTALMENTE AL ARSÉNICO

*Memoria presentada para optar al  
grado de Doctor en Ciencias  
Ambientales por Valeria Martínez  
González*

*Bellaterra , 15 de abril de 2005*

Valeria Martínez González

Vº Bº

Los directores del trabajo

Dr. Amadeu Creus Capdevila  
Prof. Titular de Genética

Dr. Ricard Marcos Dauder  
Catedrático de Genética

## RESUMEN

El arsénico (As) es un elemento natural de amplia y heterogénea distribución en la naturaleza, siendo altamente tóxico para el organismo humano. El As se encuentra a concentraciones mucho más altas de lo que se considera seguro en el agua de consumo de millones de personas en distintos países. La exposición ambiental al As constituye un factor de riesgo para distintos tipos de cáncer; sin embargo, el mecanismo por el cual el As ejerce su acción toxicológica permanece incierto. El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el de evaluar el posible daño genotóxico de una población expuesta a altas concentraciones de As en el agua de consumo. Se ha utilizado la concentración de As en orina y en uñas como biomarcadores de exposición interna. Para determinar el nivel de daño citogenético, se ha utilizado el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y en células de descamación de la mucosa bucal. Teniendo en cuenta que el daño genético puede estar modulado por las características genéticas individuales, también se ha realizado un análisis de genotipos para los polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* en la población de estudio, lo que se ha utilizado como biomarcador de sensibilidad individual. La población expuesta ha sido seleccionada en el norte de Chile donde, por las características geológicas de la región, se presentan altas concentraciones de As en el agua de consumo, llegando a superar los 0,75 mg As/L. Esta población cuenta con 106 individuos de los cuales 50 son de etnia atacameña. La población indígena habita en la región bajo similares condiciones desde hace unos 11.000 años. Se ha propuesto que los atacameños presentan algún tipo de resistencia frente a la exposición al As debido a que no tienen los problemas de salud descritos en otras poblaciones expuestas bajo condiciones similares. La población control cuenta con 111 individuos y se ha seleccionado en la ciudad de Concepción, ubicada unos 2.000 km al sur del primer lugar de muestreo, presentando niveles de As en agua de 0,0002 mg As/L. En este trabajo se ha evidenciado que la exposición al As por medio del agua de consumo supone un riesgo genotóxico, induciendo un aumento significativo en la frecuencia de MN en linfocitos en la población expuesta. Sin embargo, no se ha detectado daño en las células de la mucosa bucal. En relación con la supuesta resistencia de la etnia atacameña a los altos niveles de As ambiental, no se han detectado diferencias significativas entre los atacameños y los no atacameños en cuanto al daño citogenético evaluado mediante el ensayo de MN, ni en linfocitos ni en células de la mucosa bucal, a pesar de que la población atacameña presenta una concentración mayor de As en las uñas. En cuanto a los polimorfismos genéticos, sólo se han encontrado diferencias significativas para el gen *GSTP1*, en que el genotipo *val/val* (homocigoto mutante) es más frecuente en la población que presenta un mayor nivel de daño citogenético, medido en ambos tipos celulares. También se ha encontrado con mayor frecuencia en la población atacameña.

## SUMMARY

The arsenic (As) is a ubiquitous element in the environment and its distribution is heterogeneous in nature. In some locations, the As occurs naturally in drinking water in higher concentrations to those considered as safe, and affects millions of people. Environmental exposure to As is considered as a cancer risk factor. Nowadays, no general agreement has been reached about its mechanism of action related to the genotoxic potential of arsenic. Taking this into account, the objective of this Doctoral Thesis has been the assessment of genotoxic damage of a population environmentally exposed to As in drinking water. Individual measures of As exposure were determined in fingernails and urine as internal biomarkers of exposure. The micronucleus assay has been used to determine the possible genotoxic damage, using peripheral blood lymphocytes and epithelial cells of buccal mucosa. Considering that cytogenetic damage can be modulated by individual genetic characteristics, the polymorphisms for the genes *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in the population studied have been analyzed and they have been used as biomarkers of individual susceptibility. The exposed population has been selected from different villages from northern Chile. In this region As occurs naturally in water in connection with geological characteristics. We have determined concentrations over 0.75 mg As/L. The exposed population consisted in 106 people; taking into account their ethnicity they were classified in 50 atacameño and 56 non-atacameño. The atacameño people inhabits this region under similar conditions for almost 11,000 years, and it has been proposed that this people have some kind of resistance to As effects because they don't present classical problems of arsenicism shown in populations under similar conditions of exposure. The control group consisted in 111 healthy people from Concepción city, located almost 2,000 km south, where As levels in drinking water were as low as 0.0002 mg As/L. The results obtained in this study indicated that exposition to As in drinking water involved a genotoxic risk, by the induction of a significant high frequency of micronucleus in peripheral blood lymphocytes. In this work there is no evidence of cytogenetic damage in oral mucosa cells. In relation with the supposed resistance to As exposure of atacameño people, we did not found significant differences in the frequency of genetic damage between the atacameño group and the non-atacameño exposed group in both cellular types. However, the atacameño group shows high concentrations of As in nails. With respect to the genotype analysis, we found significant differences in the frequency distribution polymorphisms of gene *GSTP1*. The homozygous genotype mutant (*val/val*) presents a higher frequency in the population with a high level of cytogenetic damage in both cellular types. The results show that it occurs frequently in atacameño people when compared to the non-atacameño group.

*A mi Familia*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, los Doctores Amadeu Creus y Ricard Marcos, por darme la oportunidad de hacer el Doctorado, por su dirección y su apoyo. Agradezco también a los profesores del departamento, Doctores Oriol Cabré, Jordi Surrallés, Antonia Velázquez y Noel Xamena por sus enseñanzas.

Al Doctor Waldo Venegas, de la Universidad de Concepción en Chile, por dedicar parte de su tiempo, disponibilidad de su laboratorio y grupo de trabajo al desarrollo de este estudio. Al Instituto Médico de Higiene General y Salud Ambiental de la Universidad de Goettingen en Alemania por su participación en el análisis de las muestras.

Al Doctor Álex Arroyo, de la Universidad de Antofagasta en Chile, Al Doctor Jorge Yutronic y a la enfermera Isabel Honorato, de la posta de San Pedro de Atacama. Al personal del Consultorio Calama y del Consultorio Alemania, en Calama. Porque con su ayuda fue posible y muy agradable todo el trabajo de muestreo en el Desierto de Atacama.

También quiero dar las gracias a cada uno de los donantes que dieron el consentimiento para participar en este estudio y hacer posible esta investigación.

A Glòria Umbert por sus enseñanzas, paciencia y amistad, por viajar a Chile y trabajar conmigo en esta Tesis, al igual que a Teresa Amador y Anna Corral, por sus horas en el microscopio. A Alba Hernández por ayudarme con los geles y a Susana Pastor por su apoyo estadístico.

Gracias a las “Chicas Buenas” y a todos los compañeros y compañeras con los que he compartido este tiempo, por todos los momentos que pasamos juntos, los recuerdos, las risas y por ser como son. A toooooodos mis amigos que me han tenido geográficamente lejos, pero que han estado cybercerca dándome su apoyo, que a pesar de la distancia me han mantenido al día haciéndome sentirlos aquí conmigo, los quiero mucho.

A las instituciones que han hecho posible llevar a cabo esta investigación: a la Unión Europea, que ha subvencionado el proyecto “The mechanistic basis for providing a realistic cancer risk assessment for exposure to inorganic arsenic within the European Community” EU, Proyecto QLKA-CT99-01142 (2000-2003), dentro del cual se ha desarrollado esta Tesis. Al igual que al Ministerio de Educación y Ciencia de España, por haberme otorgado una beca del programa nacional de Formación de Profesorado Universitario (2001-2005) que ha hecho posible mi dedicación exclusiva a este trabajo.

En especial quiero agradecer a mi familia, a Nelson, con quien he compartido esta experiencia, por cuidarme durante el tiempo que he sido absorbida por este trabajo, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas, por sus palabras de aliento, por hacerme sonreír aunque fuera con cansancio, gracias por confiar en nosotros y a nuestra hija Anahí que ha hecho que cada día sea más hermoso.

Gracias a todos.

## ABREVIATURAS

As	arsénico
As(i)	arsénico inorgánico
As <sup>+3</sup>	arsenito
As <sup>+5</sup>	arsenato
BNMN	células binucleadas con micronúcleo
C	control
C	Concepción (Control)
Ca	Calama
CBMN	células bucales con micronúcleo
CBPI	índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis
cyt-B	citocalasina-B
DMA	dimetilarsénico
DMA <sup>+3</sup>	ácido dimetilarsenioso
DMA <sup>+5</sup>	ácido dimetilarsínico
E	expuesto
EA	expuesto atacameño
ENA	expuesto no atacameño
ET	error típico
GSH	glutation
GST	glutation S-transferasa
HA	hombres atacameños
HC	hombres control
HE	hombres expuestos
HNA	hombres expuestos no atacameños
<i>ile/ile</i>	homocigosis del gen salvaje en <i>GSTP1</i>
<i>ile/val</i>	heterocigosis en <i>GSTP1</i>
<i>M, ile/ile</i>	<i>M1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje en <i>GSTP1</i>
<i>M, ile/val</i>	<i>M1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>M, val</i>	<i>M1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>

<i>M, val/val</i>	<i>M1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>M1-</i>	<i>M1</i> ausente
<i>M1+</i>	<i>M1</i> presente
MA	mujeres atacameñas
MC	mujeres control
ME	mujeres expuestas
MMA	monometilarsénico
MMA <sup>+3</sup>	ácido monometilarsenioso
MMA <sup>+5</sup>	ácido monometilarsónico
MN	micronúcleo
MNA	mujeres expuestas no atacameñas
MT	<i>M1</i> ausente y <i>T1</i> ausente
<i>MT, ile/ile</i>	<i>M1</i> ausente, <i>T1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje en <i>GSTP1</i>
<i>MT, ile/val</i>	<i>M1</i> ausente, <i>T1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>MT, val</i>	<i>M1</i> ausente, <i>T1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>MT, val/val</i>	<i>M1</i> ausente <i>T1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
OR	<i>odds ratio</i>
P	Peine
S	Socaire
SAM	S-adenosilmetionina
SP	San Pedro de Atacama
T	Toconao
<i>T, ile/ile</i>	<i>T1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje <i>GSTP1</i>
<i>T, ile/val</i>	<i>T1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>T, val</i>	<i>T1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>T, val/val</i>	<i>T1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>T1-</i>	<i>T1</i> ausente
<i>T1+</i>	<i>T1</i> presente
TMAO	óxido de trimetilarsina
<i>val/val</i>	homocigosis del gen mutado en <i>GSTP1</i>

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	El arsénico como problema ambiental.....	1
1.1.1	Características químicas del arsénico .....	3
1.1.2	Distribución ambiental del arsénico.....	4
1.1.3	Usos del arsénico .....	8
1.1.4	Efectos sobre la salud en poblaciones expuestas al arsénico .....	9
1.2	El arsénico en Chile .....	13
1.2.1	Distribución del arsénico en el norte de Chile .....	13
1.2.2	Breve reseña histórica del arsenicismo en Chile.....	17
1.2.3	Salud poblacional en la región de Antofagasta .....	18
1.3	Exposición al arsénico.....	20
1.3.1	Entrada del arsénico en el organismo.....	20
1.3.2	Metabolismo del arsénico.....	25
1.3.3	Biomarcadores de exposición.....	34
1.4	Efectos biológicos del arsénico .....	35
1.4.1	Genotoxicidad del arsénico .....	36
1.4.2	Biomarcadores de efecto .....	44
1.4.3	Los micronúcleos .....	45
1.5	Sensibilidad individual al arsénico.....	50
1.5.1	Biomarcadores de sensibilidad individual.....	51
1.5.2	Las glutathion S-transferasas.....	52
1.6	Estudios de riesgo genético en poblaciones humanas expuestas al arsénico .....	57
1.6.1	Estudios de biomonitorización .....	57
1.6.2	Poblaciones en estudio de riesgo genotóxico .....	58

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
3.1	Población estudiada .....	69
3.1.1	Grupo expuesto .....	69
3.1.2	Grupo control.....	69
3.2	Obtención y preparación de las muestras .....	70
3.2.1	Encuesta .....	70
3.2.2	Muestras de agua.....	71
3.2.3	Muestras de orina.....	72
3.2.4	Muestras de uñas.....	73
3.2.5	Ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.....	74
3.2.6	Ensayo de MN en células de mucosa bucal .....	76
3.2.7	Análisis de las glutatión S-transferasas .....	78
3.3	Análisis estadístico .....	83
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
4.1	Descripción de la población estudiada .....	87
4.1.1	Descripción poblacional .....	87
4.1.2	Descripción poblacional del grupo de hombres.....	93
4.1.3	Descripción poblacional del grupo de mujeres .....	96
4.1.4	Comparación entre los diferentes grupos de hombres y mujeres ..	99
4.1.5	Descripción de la población según el lugar de residencia .....	101
4.2	Indicadores de exposición ambiental .....	104
4.2.1	Arsénico en agua.....	104
4.3	Indicadores de exposición interna.....	106
4.3.1	Arsénico en orina.....	106
4.3.2	Arsénico en uñas.....	108

4.4	Biomarcadores de efecto biológico.....	112
4.4.1	MN en linfocitos.....	112
4.4.2	Índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI).....	118
4.4.3	MN en mucosa bucal.....	121
4.5	Biomarcador de susceptibilidad individual.....	125
4.5.1	Análisis de los genotipos en la población expuesta y control.....	127
4.5.2	Análisis de los genotipos en la población total separada por etnia	129
4.5.3	Análisis de genotipos y micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.....	131
4.5.4	Análisis de genotipos y micronúcleos en células de la mucosa bucal	134
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
5.1	Grupos de análisis.....	137
5.2	As ambiental.....	140
5.3	Biomarcadores de exposición interna.....	144
5.4	Biomarcadores de efecto.....	148
5.5	Biomarcadores de sensibilidad individual.....	159
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>193</b>
8.1	Anexo 1: Encuesta.....	193
8.2	Anexo 2: Publicaciones.....	201
8.2.1	Artículo 1.....	201
8.2.2	Artículo 2.....	213

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1:	Principales compuestos de arsénico .....	4
Tabla 1.2:	Concentración de arsénico en agua, suelo, aire y alimentos.....	6
Tabla 1.3:	Efectos clínicos de la arsenicosis en estados sucesivos de gravedad.....	10
Tabla 1.4:	Resumen de los efectos sobre la salud de la exposición aguda al arsénico en distintos sistemas .....	12
Tabla 1.5:	Hidrografía de la región de Antofagasta .....	15
Tabla 1.6:	Polimorfismos genéticos de las glutatión S-transferasas ( <i>GSTs</i> ).....	53
Tabla 1.7:	Efectos de la exposición a As medidos con el ensayo de MN en linfocitos .....	59
Tabla 1.8:	Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de MN en células de la mucosa bucal .....	60
Tabla 1.9:	Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de MN en células uroteliales .....	62
Tabla 1.10:	Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de CA en linfocitos .....	63
Tabla 1.11:	Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de SCE en linfocitos .....	65
Tabla 3.1:	Cebadores utilizados en la PCR múltiple para la detección de los genotipos <i>GST</i> estudiados. ....	81
Tabla 3.2:	Ciclos de amplificación de la PCR múltiple para las <i>GSTs</i> .....	81
Tabla 3.3:	Genotipos <i>GST</i> estudiados .....	86
Tabla 4.1:	Grupos de análisis.....	88
Tabla 4.2:	Descripción poblacional.....	89
Tabla 4.3:	Descripción poblacional del grupo de hombres .....	94

Tabla 4.4:	Descripción poblacional del grupo de mujeres .....	97
Tabla 4.5:	Descripción poblacional según el lugar de residencia .....	102
Tabla 4.6:	Niveles de arsénico ambiental medidos en agua de consumo humano .....	105
Tabla 4.7:	Resumen del modelo estadístico para la concentración de As en orina .....	108
Tabla 4.8:	Resumen del modelo estadístico para la concentración de As en uñas .....	111
Tabla 4.9:	Daño citogenético en linfocitos, de la población estudiada .....	113
Tabla 4.10:	Daño citogenético en linfocitos, de la población analizada por lugar de residencia.....	116
Tabla 4.11:	Resumen del modelo estadístico para MN en linfocitos .....	117
Tabla 4.12:	Resumen del modelo estadístico par el CBPI.....	120
Tabla 4.13:	Daño citogenético medido en células de la mucosa bucal.....	122
Tabla 4.14:	Daño citogenético medido en células de la mucosa bucal en la población, analizada por lugar de residencia .....	124
Tabla 4.15:	Frecuencia de los genotipos para <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> y <i>GSTP1</i> en la población estudiada .....	126
Tabla 4.16:	Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci <i>M1</i> , <i>T1</i> y <i>P1</i> en los grupos expuesto y control .....	128
Tabla 4.17:	Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci <i>M1</i> , <i>T1</i> y <i>P1</i> en la población agrupada por etnia .....	130
Tabla 4.18:	Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci <i>M1</i> , <i>T1</i> y <i>P1</i> en relación con el daño citogenético medido en linfocitos .....	133
Tabla 4.19:	Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci <i>M1</i> , <i>T1</i> y <i>P1</i> en relación con el daño citogenético medido en células de la mucosa bucal.....	135

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Mapa de países en los que se han detectado problemas de arsenicismo .....	5
Figura 1.2: Mapa de América del Sur .....	14
Figura 1.3: Mapa de la región de Antofagasta .....	16
Figura 1.4: Esquema del metabolismo del As .....	28
Figura 1.5: Esquema del ensayo de MN usando citocalasina-B .....	49
Figura 3.1: Imágenes de linfocitos binucleados con MN .....	76
Figura 3.2: Imágenes de células bucales con y sin MN .....	78
Figura 3.3: Gel de electroforesis para la determinación de los genotipos <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> y <i>GSTP1</i> .....	83
Figura 4.1: Niveles de arsénico ambiental medidos en agua de consumo humano. ....	105
Figura 4.2: Concentración total de As en orina, en la población expuesta y control.....	107
Figura 4.3: Concentración de As total en uñas, de los grupos expuesto y control.....	109
Figura 4.4: Concentración de As total en uñas de la población expuesta, separada por etnia.....	109
Figura 4.5: Concentración de As en uñas, analizada por lugar de residencia ....	110
Figura 4.6: Correlación entre concentración de As en agua de consumo y As en uñas .....	112
Figura 4.7: BNMN en la población expuesta y control .....	114
Figura 4.8: BNMN en la población expuesta, separada por etnia .....	115
Figura 4.9: BNMN en la población, analizada por lugar de residencia .....	116
Figura 4.10: CBPI en la población expuesta y control .....	118

Figura 4.11: CBPI en la población expuesta, separada por etnia .....	119
Figura 4.12: CBPI en la población, analizada por lugar de residencia .....	120
Figura 4.13: CBMN en la población expuesta y control.....	123
Figura 4.14: CBMN en la población expuesta, separada por etnia .....	123
Figura 4.15: CBMN en la población, analizada por lugar de residencia.....	125

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL ARSÉNICO COMO PROBLEMA AMBIENTAL

¿Por qué estudiar el arsénico y por qué en Chile? El As es un elemento que se encuentra en todos los ambientes naturales a concentraciones traza. Sin embargo, su exposición a altas concentraciones provoca diversos efectos biológicos que han resultado de gran interés en el ámbito de la salud pública. A pesar de que los efectos de la intoxicación por As son conocidos desde hace mucho tiempo, todavía no se han podido determinar completamente sus mecanismos de acción. Así, el interés en el estudio del riesgo genotóxico del As, se debe tanto a la gran cantidad de población expuesta a altas concentraciones de As ambiental, como a la complejidad de los procesos involucrados.

El norte de Chile y de Argentina y el sur de Perú y de Bolivia abarcan una extensa región volcánica, con abundantes yacimientos minerales, donde el As se encuentra de forma natural y en altas concentraciones en los suelos y en las aguas. Hace más de once mil años, una reducida población indígena se asentó en la región del desierto de Atacama, donde se abastecía de agua en las escasas fuentes naturales de la zona. El descubrimiento del salitre y el auge de la minería provocaron la migración de importantes masas de población de otras zonas del país para trabajar en las faenas mineras del norte a partir del año 1966. Ignorando que consumían aguas contaminadas con una altísima concentración de As, los habitantes de estos núcleos de población estuvieron expuestos a los efectos del As hasta que, algunos años más tarde, se comenzaron a detectar los primeros casos de arsenicosis.

Aunque en todos los ambientes naturales, tierra, aire y agua, se encuentran niveles traza de As, en ciertas áreas del planeta su concentración aumenta considerablemente, dependiendo ya sea de las características geoquímicas de la zona, o de la realización de actividades humanas que incrementan su concentración ambiental. Se han detectado problemas de arsenicosis en diferentes partes del mundo, lo que ha provocando problemas de salud y un aumento de enfermedades tales como diferentes tipos de cáncer, entre otras patologías, que podrían estar relacionadas con el contacto prolongado de la población con el As.

El creciente interés de la comunidad científica en el conocimiento de la genotoxicidad y carcinogenicidad del As y sus posibles mecanismos de acción se debe tanto a la gran cantidad de población expuesta a este elemento en diferentes partes del mundo, como a la complejidad de los procesos involucrados.

Aunque los efectos que la intoxicación por As tiene sobre la salud son conocidos ya desde el siglo V A.C, no fue hasta 1998 cuando los problemas derivados de la exposición al As y sus patologías, conocidas como arsenicosis, atrajeron la atención mundial como consecuencia del masivo envenenamiento poblacional ocurrido en algunos países del nordeste asiático, particularmente en Bangladesh.

Como solución al problema de la escasez de agua para el consumo humano que tenía este país, varias organizaciones internacionales encabezadas por la UNICEF, y entre las que se encuentran el Banco Mundial y las Naciones Unidas, recomendaron el uso de aguas subterráneas como fuente de agua potable. Estas organizaciones entregaron los fondos necesarios para que se llevase a cabo dicho proyecto, lo que permitió que alrededor del 95% de la población de Bangladesh pudiera abastecerse de agua. Sin embargo, lo que parecía la solución al grave problema de la escasez de agua, resultó desencadenar lo que hoy todavía se considera como la causa del mayor caso de envenenamiento masivo poblacional jamás conocido, ya que, debido su particular geología, el agua subterránea de dicha región contiene altísimas concentraciones de As disuelto.

Dado el riesgo demostrado que supone para la salud la exposición al As, se ha legislado para evitar exposiciones consideradas peligrosas. Así, en el año 1942, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA), basándose en los datos del Servicio de Salud Pública, fijó el límite máximo permitido de concentración de As en el agua potable para Estados Unidos en 0,05 mg/L. Este límite es el que ha servido de guía para los demás países que, en general, han adoptado la misma norma, como es el caso actual de Chile.

La EPA ha revisado nuevos datos obtenidos en estudios de biomonitorización de poblaciones humanas, que revelan que se han presentado efectos de arsenicismo en poblaciones expuestas a niveles menores de 0,05 mg As/L. En consecuencia, en enero del año 2002 la EPA adoptó un nuevo límite máximo permitido para el agua de consumo humano, reemplazando la norma de 0,05 mg As/L por la de 0,01 mg

As/L y que ha de ser cumplida en Estados Unidos a partir del año 2006 (EPA, 2002). Este límite de 0,01 mg As/L coincide con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para niveles máximos permitidos de As en agua de consumo humano. Sin embargo, considerando que los niveles máximos se fijan por debajo del valor que se sabe que no produce ningún efecto perjudicial, la EPA ha propuesto como meta un nivel de As cero, debido a que en este caso no se conoce el valor bajo el cual el As no tenga efectos adversos. Lamentablemente, el nivel cero será muy difícil de conseguir en la práctica debido, entre otras razones, al alto costo que significa esta medida.

### 1.1.1 Características químicas del arsénico

El As es un elemento clasificado como no-metal o metaloide, perteneciente al grupo VA y periodo 4 de la tabla periódica, junto al nitrógeno, fósforo, antimonio y bismuto. Su número atómico es 33 y su masa atómica es 74,92. El As se puede encontrar en tres estados de oxidación: el elemental (0), el trivalente (+3 o -3) y el pentavalente (+5). En la tabla 1.1 se presentan en forma ordenada los principales compuestos de As, junto a su fórmula química (Wildfang *et al.*, 2000).

El As, se encuentra en raras ocasiones en estado puro, pero sí combinado con metales y azufre. Se puede encontrar como elemento inorgánico cuando está en combinación con algunos metales como el cobre, el plomo, el zinc o el oro y, en forma de elemento orgánico, en combinación con carbono e hidrógeno. El As puro tiene una coloración gris metálico, y la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos de As tienen una coloración blanca o incolora. El As no tiene un olor ni un sabor especial, por lo que su presencia en la comida, en el agua o en el aire pasa desapercibida.

La estabilidad de los compuestos inorgánicos de As depende de su valencia y de la naturaleza del medio; en un ambiente básico y oxigenado se favorece la formación de As pentavalente mientras que, en un medio ácido, se favorece la formación de As trivalente. Las formas más frecuentes de As inorgánico (As(i)) son el arsenito (As<sup>+3</sup>) y el arsenato (As<sup>+5</sup>) y las formas orgánicas más frecuentes son el ácido monometilarsónico (MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO).

Tabla 1.1: Principales compuestos de arsénico

Inorgánicos	
Compuestos	Formula química
arsenito ( $As^{+3}$ )	$AsO_2^-$ , $AsO_3^{-3}$
arsenato ( $As^{+5}$ )	$H_2AsO_4^-$ , $HAsO_4^{-2}$ , $AsO_4^{-3}$
ácido arsenoso	$H_3AsO_3$
ácido arsénico	$H_3AsO_4$
trióxido de arsénico	$As_2O_3$
pentóxido de arsénico	$As_2O_5$
arseniuro de galio	GaAs
arseniuro de indio	InAs
Arsina	$AsH_3$
Orgánicos	
Compuestos	Formula química
ácido monometilarsónico (MMA)	$CH_3AsO(OH)_2$
ácido dimetilarsínico (DMA)	$(CH_3)_2AsO(OH)$
óxido de trimetilarsina (TMAO)	$(CH_3)_3AsO$
arsenobetaína	$(CH_3)_3As+CH_2COO^-X^-$
arsenocolina	$(CH_3)_3As+CH_2CH_2OHX^-$

### 1.1.2 Distribución ambiental del arsénico

El arsénico tiene una amplia distribución en la naturaleza, estando presente en la tierra, el aire y el agua. Es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre, estando ampliamente difundido en las rocas ígneas y sedimentarias. En el ambiente el As se encuentra combinado con oxígeno, cloro y azufre formando compuestos inorgánicos. En animales y plantas se combina con carbono e hidrógeno, formando compuestos orgánicos. La contaminación ambiental por As puede aumentar debido a diversas actividades humanas tales como la minería, los procesos industriales en los que se usa el carbón como fuente de energía, la industria del vidrio y la agricultura (Léonard y Lauwerys, 1980).

Son cada vez más los países en los que se conocen problemas de arsenicismo, entre los que destacan en orden alfabético Argentina, Bangladesh, Bolivia, Canadá, Chile, China, EEUU, Eslovaquia, Hungría, India, Japón, Méjico, Mongolia, Perú, Polonia, Rumania, Tailandia y Taiwan (Santolaya *et al.*, 1995; Benko *et al.*, 1999;

Chien *et al.*, 1999; Aposhian *et al.*, 2000a y b; Basu *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2001), entre otros. En la figura 1.1 se presenta un mapa en el que se destacan los países en los que se han detectado problemas de arsenicismo.

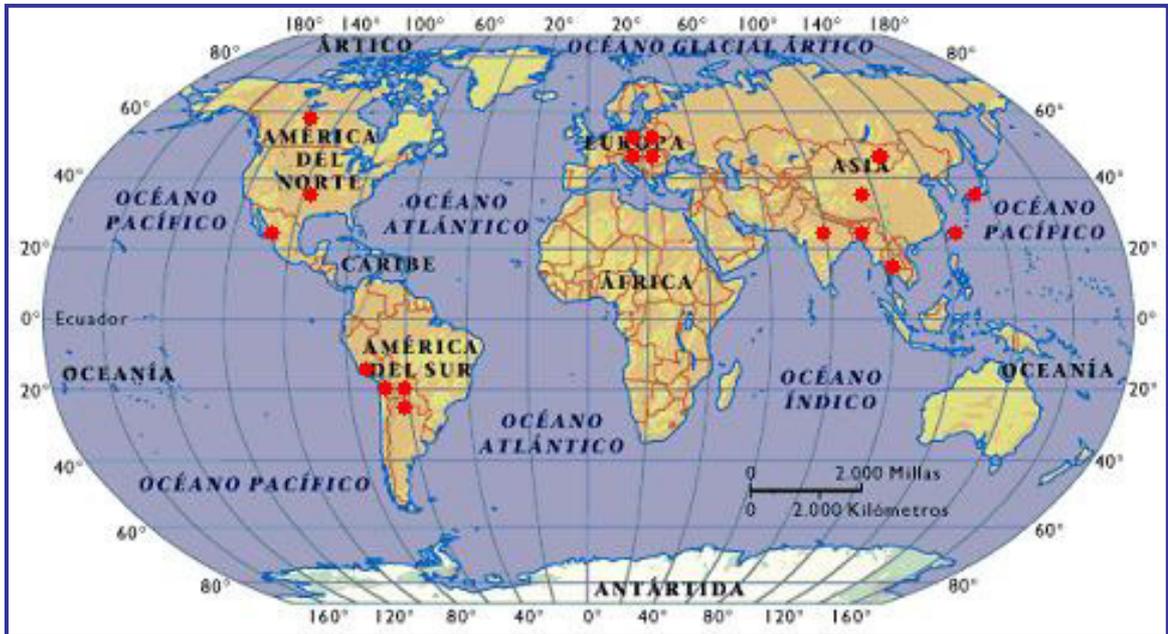


Figura 1.1: Mapa de países en los que se han detectado problemas de arsenicismo

La contaminación ambiental de las aguas con As puede ocurrir cuando estas se filtran a través de suelos que tienen altas concentraciones del elemento en forma natural o de manera antrópica. El agua tiene la capacidad de distribuir el As a otros focos secundarios de exposición. Los alimentos que están en contacto con altas concentraciones de As en alguna fase de su producción pueden concentrar el elemento, convirtiéndose en vías alternativas de exposición poblacional. Sin embargo, la mayor vía de exposición de la población humana al As ocurre a través del arsénico disuelto en agua y, a pesar de que son relativamente pocas las áreas donde esto ocurre, en conjunto afecta a una gran cantidad de población en distintos países del mundo, especialmente en países subdesarrollados de África, Asia, América Central y Sudamérica, donde no existen los medios económicos para combatir el problema. A continuación se analizan brevemente las diferentes vías de exposición poblacional al As y en la tabla 1.2 se presenta un resumen de algunos datos publicados de la concentración de As en agua, suelo, aire y alimentos.

Tabla 1.2: Concentración de arsénico en agua, suelo, aire y alimentos

Agua ( $\mu\text{g/L}$ )		
Medio analizado	Medio no Contaminado	Medio Contaminado
superficial	<10	500
subterránea	1-2	300
Suelo ( $\text{mg/kg}$ )		
Medio analizado	Medio no Contaminado	Medio Contaminado
suelo	5 (rango de 1 a 40)	
zonas con uso de pesticidas con As		50-500
refinerías mineras contaminantes		> 27.000
refinerías y uso de pesticidas con As		20.100-35.500
Aire ( $\text{ng/m}^3$ )		
Medio analizado	Medio no Contaminado	Medio Contaminado
área rural	0,02-4	
área urbana	0,04	3-200
área industrial		>1000
Alimentos ( $\text{ng As/Kg}$ )		
Medio analizado	Medio no Contaminado	Medio Contaminado
alimentos	<1,0	3.000,0
peces marinos	64,7	291,9
hojas	47,9	134,9
bulbos	1,9	124,8
semillas	16,0	22,7

**Arsénico en el agua:** El As está presente en el agua por la disolución natural de minerales de depósitos geológicos, la descarga de los efluentes industriales y la sedimentación atmosférica. El As en el agua, se encuentra generalmente como especie inorgánica y, mientras que en las aguas superficiales se encuentra mayoritariamente en forma de  $\text{As}^{+5}$ , en las aguas subterráneas se encuentra como  $\text{As}^{+3}$  (Basu *et al.*, 2001). La presencia de formas orgánicas de As es, en general, poco significativa y en el proceso de tratamiento de aguas estas especies organoarsenicales se consideran de poca importancia en comparación con las especies de As(i). En las aguas superficiales de un ambiente no contaminado, los niveles de As pueden llegar a ser de  $10 \mu\text{g/L}$  y en aguas superficiales contaminadas pueden aumentar hasta  $5 \text{ mg/L}$ . En cuanto a las aguas subterráneas, en zonas no contaminadas el valor traza es de  $1$  a  $2 \mu\text{g/L}$  y supera los  $3 \text{ mg/L}$  en zonas

contaminadas, llegando a superar en casos extremos los 6 mg/L en aguas de consumo humano, tal y como ocurre en Bangladesh (Morgan, 2001).

**Arsénico en el suelo:** En el suelo el As se encuentra principalmente en forma inorgánica, en rocas sedimentarias y volcánicas. El As se presenta en la naturaleza con mayor frecuencia como sulfuro de arsénico y arsenopirita, que se encuentran como impurezas en los depósitos mineros. Los depósitos minerales en algunas áreas del planeta tienen grandes cantidades de As, lo que puede resultar en elevados niveles de As(i) en las aguas que, si se usan para consumo humano, pueden provocar efectos adversos en la salud de la población. El As puede aumentar su concentración en los suelos debido a diversas actividades antrópicas como el uso de pesticidas y la deposición de material residual de diversos procesos industriales, pudiendo contaminar las aguas cercanas y aumentando las posibilidades de afectar a la población. Su concentración traza puede variar entre 1 y 40 mg/kg, siendo el valor promedio de 5 mg/kg. En suelos contaminados, la concentración de As puede ser superior a 35.000 mg/kg en zonas de refinería minera y en las zonas en que se fumiga con productos que contienen As, este valor puede llegar a 35.500 mg/kg (Morgan, 2001).

**Arsénico en el aire:** En el proceso de refinamiento del cobre y de la plata, el As se libera al ambiente en pequeñas partículas, que pueden ser inhaladas o absorbidas por la piel y las mucosas al depositarse sobre ellas, aumentando así la exposición de los trabajadores y de los residentes en zonas industriales o mineras. El As particulado se recupera y purifica para su venta, ya que se utiliza principalmente como conservante de la madera. En zonas libres de contaminación, el As se presenta en algunos ng/m<sup>3</sup> y en zonas contaminadas este valor supera los 1.000 ng/m<sup>3</sup> (Morgan, 2001).

**Arsénico en los alimentos:** Debido al uso de plaguicidas que contienen As orgánico o inorgánico como ingredientes activos, o al contacto con aguas de riego contaminadas con altos niveles del elemento, aquellos alimentos de origen vegetal o animal que han estado en contacto con estos compuestos arsenicales tienen la capacidad de acumularlo siendo una posible fuente de exposición. Según Morgan (2001), los valores de As en alimentos producidos en medios no contaminados son en promedio de menos de 1 mg/kg, llegando a los 3.000 mg/kg en ambientes contaminados. Un estudio realizado en Chile (Frenz y Sancha, 1997), indica que la concentración de As en el pescado puede variar de 291,9 ng As/Kg en un medio

contaminado a 64,7 ng As/Kg en un medio descontaminado. También indica que los vegetales presentan en hojas, un rango entre 134,9 y 47,9 ng As/Kg, en bulbos entre 124,8 y 1,9 ng As/Kg y en semillas entre un 22,7 y 1,6 ng As/Kg en las zonas contaminadas y descontaminadas respectivamente.

### 1.1.3 Usos del arsénico

Comercialmente, el As elemental se obtiene como subproducto del tratamiento de otros minerales metálicos como el oro, la plata y el cobre, o por calentamiento de la arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), en el que se produce As en estado puro. En la naturaleza, el As se encuentra como constituyente de una gran variedad de minerales usualmente combinado con minerales sulfurados como el oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) y el rejalgar ( $\text{AsS}$ ). Éstos han sido usados desde hace siglos como cosméticos debido a la coloración amarilla del oropimente y anaranjada del rejalgar.

Aunque el As en estado puro no es tóxico, muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de As son extremadamente tóxicos y han sido utilizados como insecticidas y plaguicidas. A modo de ejemplo, el arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) es efectivo contra la langosta, el trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) es un potente veneno para roedores, y el arsenito de calcio  $\text{Ca}(\text{AsO}_4)_2$  se usa como plaguicida contra el gorgojo del algodón y el escarabajo de la patata. Los compuestos de As conocidos como adamsita (cloroarsina difenilamínica) y lewisita (B-clorovinildicloroarsina) se utilizaron como gases venenosos a partir de la primera guerra mundial. El As se utiliza también en la fabricación de vidrio y como preservante de la madera, además de utilizarse comercialmente en aleación con el plomo para la fabricación de baterías de almacenamiento y en la fabricación de balas. Recientemente, el As se está utilizando para fabricar semiconductores de arseniuro de galio, para su uso en diodos emisores de luz y en células solares.

Todas las aleaciones de As son venenosas en altas dosis pero, a pesar de su demostrada toxicidad, el As también se ha utilizado como agente terapéutico frente a diversos procesos patológicos. El uso terapéutico del As se conoce desde unos 5 siglos A.C, cuando Hipócrates recomendaba su uso para tratar los abscesos ulcerados. Posteriormente, los médicos han prescrito preparaciones de As para tratar alteraciones de la piel, tuberculosis, asma y lepra. Durante la Edad Media se usaron diversos compuestos de As(i) como medicinas y también para producir

venenos. Durante el siglo XIX la solución de Fowler (a base de As) se utilizó como tratamiento contra la leucemia y la dermatitis. A dosis terapéuticas, los compuestos de As se han mostrado eficaces para combatir diversas enfermedades tales como la anemia, el asma, el reumatismo, la neuralgia, el cólera, la malaria, la psoriasis y la sífilis; utilizándose también como estimulante general en casos de debilidad. Sin embargo, basándose en la evidencia acumulada sobre la toxicidad y la carcinogenicidad de los compuestos de As(i), muchos de sus usos médicos se han reducido.

En 1905 se demostró que algunos compuestos de arsénico eran eficaces contra la tripanosomiasis o enfermedad del sueño. Esto condujo a un estudio sistemático del uso terapéutico y de las propiedades del As, liderado por Paul Ehrlich quien recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908. Ehrlich sintetizó un compuesto conocido como salvarsán o 606, que resultó ser extraordinariamente efectivo contra la sífilis y otras enfermedades infecciosas como la frambesia y la disentería amébrica (causadas por protozoos). Ehrlich mantuvo la teoría de que los compuestos sintéticos podían matar los parásitos sin causar serios daños al huésped, iniciándose así el desarrollo de la quimioterapia. Hoy el As es considerado obsoleto en su uso como tratamiento de la sífilis, habiéndose reemplazado por antibióticos más eficaces, pero todavía se utiliza contra la amebiasis y en estados avanzados de la enfermedad del sueño.

Actualmente se está investigando el uso del  $As_2O_3$  en la terapia contra el cáncer ya que, al parecer, este compuesto es capaz de llevar al proceso de apoptosis a las células con desórdenes en su ciclo de proliferación, sin dañar las células que se encuentran en estado normal (Tong *et al.*, 2001; Rojewski *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

#### **1.1.4 Efectos sobre la salud en poblaciones expuestas al arsénico**

La mayoría de los compuestos de As son altamente tóxicos. Se calcula que la dosis letal en humanos está entre los 100 y 500 mg de As y que la toxicidad aguda por vía oral se produce a concentraciones ente 5 y 50 mg en adultos. Sin un tratamiento apropiado, una dosis de 10 mg As/kg de anhídrido arsenioso puede ser mortal. Se sabe que el exceso de exposición a As provoca arsenicosis, pudiendo causar dermatitis, envenenamiento agudo o crónico y cáncer, entre otras

enfermedades. La exposición al As puede afectar de diferentes maneras a una población, dependiendo del tipo de exposición. El riesgo para la salud humana está asociado a la especie química en que éste se encuentre, a la concentración en que se dé, y al tiempo de exposición. En la tabla 1.3 se presentan las alteraciones de la salud provocadas por la exposición al As.

Tabla 1.3: Efectos clínicos de la arsenicosis en estados sucesivos de gravedad

Etapa	Efectos
preclínica	no hay alteraciones de la salud
inicial	malestar general, pérdida de peso, conjuntivitis, bronquitis, efectos gastrointestinales, melanosis y queratosis
secundaria	despigmentación (leucomelanosis) en distintas áreas del cuerpo, hiperqueratosis, neuropatías periféricas y hepatopatías
final	nefropatías, hepatopatías, gangrena, cáncer de piel, de pulmón, de vejiga y muerte

Los efectos de una exposición crónica al As (exposición a bajas dosis durante un tiempo prolongado) suelen tardar entre 5 y 20 años en manifestarse (WHO, 2004). Inicialmente consisten en un malestar general, que incluye adelgazamiento, cólicos, diarreas, astenia, mialgias, ataralgias y, en casos graves, dermatitis exfoliativas. Los principales síntomas en humanos son una severa inflamación del tracto gastrointestinal, anomalías cardíacas, colapsos y coma. El As también tiene una acción irritante que causa inflamación local de la piel, ulceración y perforación del septo nasal. Algunas especies de As también pueden funcionar como alérgicos de contacto. (Wildfang *et al.*, 2000; Morgan, 2001).

La exposición crónica al As se produce principalmente por el consumo de agua contaminada, lo que se denomina hidroarsenicismo (arsenicosis producida principalmente por el contacto con agua contaminada). En los casos de hidroarsenicismo crónico, los síntomas más frecuentes son: hiperqueratosis palmoplantar, dermatitis de verrugas alérgicas, estrías blancas en las uñas de las manos, problemas cardiovasculares, isquemia miocárdica, hipertensión, disfunciones hepáticas, cambios hematológicos y epitelomas de la piel (Léonard y Lauwerys, 1980; Santolaya *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1999; Brown, 1999;

Basu *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2001). Se ha determinado que la dosis total de As(i) necesaria para provocar hiperqueratosis palmoplantar en el 50% de los individuos es de 11 a 16 g por vía oral.

Los efectos de la toxicidad aguda frecuentemente se detectan a las pocas horas de la exposición y se caracterizan por vómitos intensos acompañados por una severa irritación, dolor en la faringe y el epigastrio, además de una sensación de quemadura local. Estos síntomas se manifiestan como un síndrome gastrointestinal severo que continúa con diarreas, pudiendo llegar al *shock* con coma y a la muerte (Morgan, 2001). Esta reacción clínica se debe a que el As actúa como un inhibidor enzimático que, al combinarse con los grupos sulfhidrilos, interfiere en el metabolismo celular, principalmente de las células endoteliales. Una de las principales manifestaciones de la intoxicación aguda es la vasodilatación parálitica de los capilares sanguíneos con una alteración de la permeabilidad, lo que explica los vómitos, la diarrea y los edemas subcutáneos que suelen aparecer. Como consecuencia, se observa hipotensión arterial y *shock*, además de lesiones parenquimatosas en casi todos los órganos. Los efectos de dosis subletales son náuseas, vómitos, diarreas, calambres musculares y polineuritis, y pueden ser causa de graves hepatitis con ictericia, hemorragias, glomerulonefritis y miocarditis, exantemas escarlatinoformes y morbiliformes. (Santolaya *et al.*, 1995; Wildfang *et al.*, 2000; Morgan 2001).

El hidroarsenicismo (los efectos de la exposición debido al contacto con agua contaminada con altos niveles de As) se ha relacionado con el aumento de cáncer de piel, de pulmón y de vejiga (Santolaya *et al.*, 1995; Jager y Ostrosky-Wegman, 1997). También se han descrito enfermedades propias de las poblaciones expuestas a As, como neoplasias de piel, incluyendo principalmente la enfermedad de Bowen y el carcinoma de células basales. Ocasionalmente, se observa el desarrollo de un carcinoma de células escamosas. Además de los efectos dérmicos, se ha descrito la llamada enfermedad de los pies negros (*blackfoot disease*), un trastorno vascular oclusivo que en casos graves provoca gangrena de las extremidades inferiores (Brown y Fan, 1994). Esta enfermedad fue descrita en Taiwan y se cree que está relacionada con el hidroarsenicismo y la mala nutrición poblacional de la zona (WHO, 2004); hoy en día, la enfermedad de los pies negros es un grave problema poblacional en Bangladesh. El As también se ha relacionado con malformaciones congénitas y con un aumento significativo de la tasa de abortos (Santolaya *et al.*, 1995).

En cuanto a la exposición aguda (exposición a altas dosis de As durante un tiempo corto), se han descrito diversos efectos sobre la salud de poblaciones afectadas (tabla 1.4) entre los que se incluyen diversos efectos sobre la piel como el cáncer, enfermedad de los pies negros, enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales y escamosas, melanosis, hiperqueratosis palmoplantar y despigmentación. Además de problemas de hígado como ictericia, agrandamiento del hígado, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica, en el sistema nervioso se han descrito problemas de neuropatías periféricas y pérdida de oído.

Tabla 1.4: Resumen de los efectos sobre la salud de la exposición aguda al arsénico en distintos sistemas

Sistema	Efectos
Piel	cáncer de piel, enfermedad de los pies negros, enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales y escamosas, melanosis, hiperqueratosis palmoplantar y despigmentación de la piel
Hígado	ictericia, agrandamiento del hígado, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica
Nervioso	neuropatías periféricas y pérdida de oído
Cardiovascular	manifestaciones cardiovasculares, acrocianosis, enfermedad de Raynaud, hipertensión, hipotensión arterial e infarto de miocardio
Hematopoyético	megaloblastosis
Respiratorio	disfunciones pulmonares y cáncer de pulmón
Endocrino	diabetes mellitus, bocio

En cuanto al sistema cardiovascular se han presentado manifestaciones cardiovasculares, acrocianosis, enfermedad de Raynaud, hipertensión, hipotensión arterial e infarto de miocardio. En el sistema hematopoyético se ha descrito megaloblastosis, en el sistema respiratorio, disfunciones pulmonares y cáncer de pulmón y en el sistema endocrino diabetes mellitus y bocio.

Afortunadamente, si la arsenicosis se detecta a tiempo se pueden evitar los efectos nocivos mediante el consumo de agua fresca, vitaminas y algunos fármacos como la penicilina D y el ácido dimercaptosuccínico. El problema es que, lamentablemente, estos compuestos son demasiado caros o inaccesibles para las personas afectadas, que muchas veces pertenecen a estratos sociales muy desfavorecidos.

## **1.2 EL ARSÉNICO EN CHILE**

Como ya se ha comentado anteriormente, el As tiene una distribución amplia y heterogénea en la corteza terrestre. Sin embargo, en algunos lugares del planeta, la concentración de As es especialmente alta en los suelos y en el agua que pasa a través de ellos, tal como sucede en el norte de Chile y Argentina y en el sur de Perú y Bolivia.

### **1.2.1 Distribución del arsénico en el norte de Chile**

En Chile, el As se encuentra heterogéneamente distribuido, focalizado principalmente en el norte de país. La distribución y concentración de As en el norte de Chile está relacionada con el vulcanismo cuaternario, que caracteriza a los Andes Centrales. Este vulcanismo se concentra entre los 26° y 21° sur, correspondiendo a la región de Antofagasta; esta extensa región abarca el desierto de Atacama, el más árido del mundo (*figura 1.2*). La geología del lugar es responsable de los altos contenidos de As y de otros elementos como vanadio, flúor y azufre, que se encuentran en las aguas originadas en la zona volcánica de los Andes Centrales, tanto en los flujos superficiales como freáticos, lagunas y géiseres.

Debido a las características geológicas de la región, las escasas fuentes de agua que se encuentran en el desierto de Atacama presentan distintos niveles de As, dependiendo de la concentración de éste en los suelos por los que fluyen las aguas. Así, por tanto, las diferentes poblaciones de la región presentan distintos niveles de exposición según sea el origen del agua que consumen.

Diversos estudios llevados a cabo en la zona han determinado que las concentraciones de As en el agua potable muestran un gradiente que disminuye de norte a sur, siendo las ciudades de Antofagasta y de Calama las que presentan

concentraciones medias más altas. En estas localidades el agua contiene concentraciones naturales de As tan altas que debe ser sometida a tratamiento para cumplir con la norma chilena de As en agua potable que es de 0,05 mg de As/L.



Figura 1.2: Mapa de América del Sur

El principal río de la zona es el río Loa, y a lo largo de su curso se ubican la mayoría de pueblos y ciudades de la región. El río Loa tiene varios ríos afluentes y cada uno de ellos, dependiendo de su origen, presenta distintos niveles de As disuelto. Debido a esto, la concentración de As en las aguas del río Loa dependerá del lugar en que se haga el muestreo. Lo mismo sucede en la hoya hidrográfica del Salar de Atacama, donde las dos fuentes de agua que se encuentran son el río San Pedro y el río Vilama, con 0,17 mg As/L y con 0,7 mg As/L, respectivamente (Santolaya *et al.*, 1995).

Para una mejor comprensión de la hidrografía de la zona de estudio se presenta la tabla 1.5 con los valores de concentración de As en el agua de algunas localidades medidas en un estudio anterior realizado por Santolaya y colaboradores (1995). También se incluye la figura 1.3 en la que se puede ver la ubicación espacial de los ríos en la región.

Tabla 1.5: Hidrografía de la región de Antofagasta

Hidrografía del Río Loa	
Lugar	mg As/L
Lasana	<0,01 - 0,37
Chiu-Chiu	0,11 - 0,77
Desembocadura del río Salado	0,43
Antofagasta	<0,01 - 0,04
Toconce	0,43 - 0,44
Calama	0,03 0,05
Río San Salvador	1,76
Chuquicamata	<0,01 - 0,06
Caspana	<0,01
Hidrografía del Salar de San Pedro de Atacama	
Lugar	mg As/L
Río San Pedro	0,17
Río Vilama	0,70

Dada la heterogeneidad ambiental indicada, los niveles de exposición poblacional dependerán tanto de la ubicación geográfica, como de las fuentes de aguas de consumo y de la movilidad de las personas dentro de la región. Una consideración importante es que en los pueblos pequeños se mantiene la agricultura de subsistencia, en que los cultivos se riegan con agua de los ríos o vertientes locales, por lo que también existe una exposición a través de los alimentos que será más o menos importante dependiendo del nivel de concentración de As en cada caso.

En cuanto a la exposición por la presencia del As en el aire en Chile, las concentraciones más altas se presentan en la zona norte del país, coincidiendo con la contaminación antrópica generada por la amplia actividad minera (Frenz y Sancha, 1997). En estudios realizados por Santolaya y colaboradores (1995), se han hecho mediciones puntuales de As en polvo total en zonas del interior y en la costa de la II Región, determinándose que si bien los valores medios son más altos en las zonas mineras, estos no superan la concentración ambiental máxima permitida (0,116 mg As/m<sup>3</sup>) en ninguna de las localidades muestreadas. Cabe señalar que estas mediciones pueden presentar variaciones importantes a lo largo del año.



Figura 1.3: Mapa de la región de Antofagasta

Como se ha indicado, los alimentos pueden constituir una fuente significativa de exposición al As. En ausencia de concentraciones importantes de As en el agua y en el aire, el As en alimentos puede representar la principal vía de exposición a este elemento. Sin embargo, como el norte de Chile está ubicado en una zona desértica, la mayoría de los alimentos provienen de otras regiones del país, no encontrándose grandes cultivos en la zona; es por ello que la exposición a As por

vía de los alimentos no es muy importante, al menos en los grandes núcleos urbanos. No sucede lo mismo en los pequeños núcleos rurales donde se practica una agricultura tradicional de subsistencia y, en consecuencia, se da una mayor exposición a través de los alimentos (Frenz y Sancha, 1997).

A continuación se presenta una breve reseña histórica de la región de Antofagasta que explica cómo se ha dado el contacto entre las principales fuentes de As y los distintos grupos poblacionales de la región, que se ven expuestos principalmente a través del agua de consumo. También se hace referencia al estado de salud poblacional desde que se detectaron los primeros casos de envenenamiento por arsénico. Es importante destacar que, el As se encuentra presente en todos los ecosistemas de la II región de Chile.

### **1.2.2 Breve reseña histórica del arsenicismo en Chile**

Hace más de once mil años la cultura atacameña se instaló en el altiplano de la cordillera de los Andes, ocupando una zona que incluye lo que hoy corresponde a la región de Antofagasta, en el norte de Chile. Como esta región es desértica, la población se instaló en la zona de la cordillera y precordillera donde contaban con los escasos recursos de agua necesarios para el consumo y la agricultura. En la zona costera también se instalaron pequeños poblados que se abastecieron de agua en pequeñas vertientes locales.

La población de la zona permaneció escasa hasta 1866, cuando se descubrió el salitre y abundantes recursos minerales como el cobre, que todavía hoy se continúan explotando. Esto provocó un gran desarrollo de la región y un crecimiento importante de la población debido a la llegada de gente de otras partes del país, que venía a trabajar. El abastecimiento de agua, recurso muy escaso en la zona, primero se realizó mediante la instalación de plantas desalinizadoras, pero luego se hicieron canalizaciones de agua de las fuentes cordilleranas, disminuyendo progresivamente el uso de la desalinización del agua del mar.

A partir de 1963, se hizo patente en Antofagasta la aparición de una serie de patologías graves asociadas con la exposición al As, provocándose una gran alarma pública. Se evidenció que el agua que abastecía esta ciudad, desde 1958, contenía niveles de As extraordinariamente altos (0,8 mg As/L) (Santolaya *et al.*, 1995).

Esto suponía una exposición 16 veces superior al nivel actual máximo permitido para agua de consumo en Chile (0,05 mg As/L).

La red de agua potable de la región de Antofagasta actualmente está compuesta por diferentes y variados suministros. Los diferentes pueblos pueden contar con un sistema de agua potable basado, ya sea en una red de agua potable domiciliaria, una serie de estanques de agua que son abastecidos por camiones aljibe, o abastecerse de agua directamente del río más cercano. De este modo, actualmente podemos encontrar diferencias significativas en la presencia y concentración de As al analizar el agua de consumo en diferentes pueblos e, incluso, dentro de un mismo pueblo, dependiendo de las diferentes fuentes de agua que llegan a él. Hay que destacar el hecho de que es frecuente que un pueblo tenga más de una fuente de abastecimiento de agua.

La presencia de altas concentraciones ambientales de As en la región de Antofagasta, principalmente en el agua de consumo humano, han presentado diversos problemas de salud pública. Esta situación se analiza en el siguiente apartado.

### **1.2.3 Salud poblacional en la región de Antofagasta**

En Chile, la región de Antofagasta ha presentado históricamente una mortalidad mayor que el resto del país para algunos cánceres como son el cáncer de pulmón, de piel y de vejiga; en tanto que para los cánceres más frecuentes a nivel nacional, como son el de estómago, de vesícula, de mama y de útero, presenta riesgos menores (Santolaya *et al.*, 1995). Este perfil corresponde a un exceso selectivo de cánceres que en la literatura científica se han asociado de modo causal con la exposición al arsénico (Basu *et al.*, 2001).

En el año 1963, se detectó por primera vez en Antofagasta un incremento de las tasas de mortalidad por cáncer bronquial y de vejiga en la población residente, que se asoció a los efectos del hidroarsenicismo de la región. En 1968, Borgoño y Greiber (1972) describieron que 100 pacientes del Hospital Regional, habían sido diagnosticados de envenenamiento crónico arsenical. En este grupo de enfermos, el 80% presentaba leucomelanodermia, el 22% acrocianosis y el 30% la enfermedad de Raynaud.

Los mismos autores describen varias enfermedades vasculares en niños y jóvenes, tales como angina, hipertensión, trombosis mesentérica e, incluso, infarto de miocardio. Asimismo, en el año 1977, Zaldivar (citado en Santolaya *et al.*, 1995) describe el engrosamiento de las paredes de las arterias de mediano y pequeño tamaño e hipertrofias cardíacas en autopsias realizadas en niños expuestos al As.

Las primeras observaciones de la asociación entre el As y el cáncer relacionaban la exposición a As en el agua con un exceso de cáncer de piel, en tanto que la exposición de As en el aire se asociaba al cáncer de pulmón. Evidencias posteriores sobre estas asociaciones han demostrado que, en realidad, el As ingerido en el agua tiene un efecto sistémico, aumentando el riesgo de varios tipos de cáncer interno, agregándosele al cáncer de piel, el cáncer de pulmón, de próstata, de riñón y de hígado (Santolaya *et al.*, 1995; Basu *et al.*, 2001). Hay que recordar que en la región de Antofagasta, existe exposición ambiental al As a través del agua potable y exposición laboral a As en el aire en las faenas de la minería, sugiriendo que los excesos de muertes por esos cánceres, así como el exceso de muertes por malformaciones congénitas, podrían atribuirse a esta exposición química del ambiente general y del ambiente laboral.

En 1992, Santolaya y colaboradores iniciaron un estudio de los certificados de defunción de la región de Antofagasta en el periodo comprendido entre 1976 y 1991. El estudio indica que el aumento del cáncer broncopulmonar es alarmante en la región siendo 3 veces mayor que la tasa promedio de todo el país y, en el caso particular de la ciudad de Antofagasta, esta cifra aumenta considerablemente, llegando a ser casi cuatro veces la tasa nacional. En el caso del cáncer de vejiga la mayor tasa también se encuentra en la región de Antofagasta, multiplicándose por 5 en comparación a la tasa nacional (Santolaya *et al.*, 1995).

La concentración de As en las aguas de bebida y de riego, así como la exposición laboral al As se han reglamentado por ley. En el caso de Chile, la norma de As en el agua de consumo humano, actualmente en vigencia, recomienda una concentración máxima de As de 0,05 mg/L (50 µg As/L). En 1993, la OMS estableció un valor guía para la concentración de As en agua potable de 0,010 mg As/L.

## 1.3 EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

Una vez que ya se ha determinado que el As está en el medio ambiente, es interesante estudiar cuál es la exposición real a la que se ven expuestas las poblaciones humanas que viven en este ambiente contaminado. Para ello, veremos cómo ocurre la entrada de As en el organismo y luego cómo este es metabolizado; finalmente nos referiremos a las herramientas que nos permitirán determinar la exposición real en cada uno de los individuos del estudio.

### 1.3.1 Entrada del arsénico en el organismo

En el medio ambiente, la biota está constantemente expuesta a una gran cantidad de sustancias con las cuales interacciona en sus actividades vitales. La mayoría de compuestos con los que está en contacto pueden ser tóxicos a determinadas dosis. Sin embargo, los organismos han generado mecanismos para reducir los niveles internos de dichos compuestos tóxicos hasta alcanzar niveles subtóxicos.

Para que un compuesto tóxico ambiental cause daño a los organismos, en primer lugar deben estar expuestos al mismo. Después, el compuesto tóxico tiene que vencer las defensas del organismo que tratan de impedir que éste llegue al tejido blanco en forma activa. Las defensas de los organismos consisten, fundamentalmente, en mecanismos que restringen el transporte y la difusión, disminuyendo el período de exposición del tejido blanco. Para ello, el organismo pone barreras al desplazamiento del agente tóxico hacia determinados tejidos, disminuyendo su difusibilidad a través de las membranas celulares y/o facilitando su excreción.

El proceso de transporte y transformación que experimenta el compuesto tóxico desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los que se almacena y en los que causa lesiones es muy complejo. Por conveniencia, para facilitar su estudio se considera que consta de cuatro pasos: absorción, distribución, excreción y metabolismo, los que se presentan a continuación.

**Absorción:** la absorción se define como el proceso por el cual, el xenobiótico atraviesa las membranas y capas celulares hasta llegar al torrente sanguíneo. El ingreso del compuesto tóxico en el organismo usa los mismos mecanismos de

transporte diseñados para movilizar compuestos de estructura similar. Los principales mecanismos de transporte son la difusión simple y el transporte activo. Una misma dosis química puede producir diferentes efectos, dependiendo de la vía por la cual ingresa. La ingestión es la vía de exposición más común; sin embargo, la inhalación y la absorción dérmica forman parte importante de varias rutas de exposición.

En cuanto al As, su absorción ocurre principalmente por medio de la exposición al agua con elevadas concentraciones del elemento, ya sea a través de la bebida, el baño, el riego, etc. La exposición también puede darse por inhalación, así como por contacto con el suelo. En los lugares con suelos contaminados con As la exposición entre los niños pequeños que se ponen las manos en la boca puede llegar a ser significativa (Wildfang *et al.*, 2000). No se ha podido determinar la absorción de As en aquellas personas en las que se ha confirmado la absorción dérmica como única fuente de exposición. Sin embargo, estudios con  $As^{+5}$  demostraron que el As se absorbe por la piel y es acumulado en el fluido receptor circulante (Wester *et al.*, 1993).

La tasa de absorción del As en el tracto gastrointestinal depende de su forma química y de la concentración en la que se encuentre. Además, existen diferencias en la absorción tanto entre individuos como entre especies. En 1977, Crecelius observó que el As(i) ingerido por un voluntario se eliminaba por la orina en un 80% pasadas 61 h, sugiriendo que la absorción del As es bastante baja. Los estudios de Charbonneau y colaboradores (1980) en hámsters expuestos a dosis orales de  $As^{+5}$  marcado, revelaron una absorción pobre, debido a que aproximadamente el 70% de la dosis fue detectada en las heces. Los resultados en ratas, publicados en 1994 por Hughes y colaboradores, muestran porcentajes similares de excreción a los de los humanos, después de la administración oral de  $As^{+5}$  (Hughes *et al.*, 1994). Por otro lado, en estos estudios se ha determinado que las formas organoarsenicales provenientes de los organismos marinos son absorbidas con bastante facilidad (Crecelius, 1977; Charbonneau *et al.*, 1978).

En las poblaciones humanas expuestas crónicamente al As mediante el consumo de agua contaminada, o por contacto con el suelo, la absorción dérmica del As representa una ruta de exposición limitada, aunque significativa y en el caso que esto ocurra, puede presentarse toxicidad severa, por ejemplo, después de la exposición a plaguicidas que contienen MMA; en estos casos, la inhalación

constituye otra vía de exposición importante (Hessl y Berman, 1982). Conviene señalar que los estudios de absorción dérmica del As en humanos son escasos.

**Distribución:** se entiende por distribución la localización y concentración del xenobiótico en los diferentes tejidos. La distribución no es sólo la acción de transportar el compuesto tóxico, sino el hecho de que el tóxico se encuentre en los órganos con una concentración determinada. La distribución de un compuesto dentro del organismo depende de varios factores, como sus características químicas, el tamaño molecular, la permeabilidad con la que se puede desplazar por las membranas, etc. En el camino hacia el sitio de acción, el compuesto puede ser captado por proteínas plasmáticas, transportado hacia determinadas células, ver restringido su paso por membranas selectivas o ser lo suficientemente liposoluble como para ser almacenado en el tejido graso. Como ya se ha comentado, la distribución del As es altamente dependiente de su forma química, de la ruta de administración, de la dosis y de la especie en que se estudie la exposición (Wildfang *et al.*, 2000).

En relación con ello, la Academia Nacional de Ciencias (NAS) de los EEUU no recomienda la rata como modelo para el estudio del metabolismo del As en humanos, debido a que los trabajos de Aso y Abiko (1978) determinaron que la rata retiene grandes cantidades de As en forma de DMA en los eritrocitos y mantiene altos niveles del elemento, por lo menos hasta dos meses después de la exposición. En el mismo estudio se determinó que otros órganos incluyendo riñón, hígado, pulmón, cerebro y pelo, no mostraban aumentos significativos de As tras la exposición. En 1979, Tam y colaboradores determinaron que el As no parecía ser metilado ni en el plasma ni en la orina de los humanos (Tam *et al.*, 1979), lo que sugirió que el As podría ser atrapado primero por las células, metilado y liberado al sistema circulatorio para ser purificado por los riñones.

Más tarde, Georis y colaboradores (1990) estudiaron cultivos *in vitro* de cortes de hígado de rata y demostraron que el  $As^{+3}$  absorbido dependía de la concentración presente en el medio y que, cuando el medio de cultivo tenía As trivalente, este se encontraba concentrado unas 10 veces en dicho órgano. Por otro lado, demostraron que el As se absorbe unas 8 veces menos si el medio de cultivo tiene As pentavalente, lo que sugirió que probablemente los mecanismos de absorción del As en cultivos de tejidos ocurren por difusión facilitada y no requiere energía (Fischer *et al.*, 1985). Asimismo, los datos de absorción y metabolismo del

As en fibroblastos de ratón presentaron una relación dependiente de la dosis (Fischer *et al.*, 1985).

**Excreción:** la concentración de un compuesto tóxico se puede disminuir mediante su excreción. Todas las secreciones corporales pueden excretar compuestos químicos, pero las tres principales vías son la orina, las heces y el aire exhalado. La excreción de los xenobióticos utiliza los mismos mecanismos que tiene el organismo para excretar los desechos metabólicos endógenos. Un compuesto tóxico puede, dependiendo de sus características, ser excretado por diferentes vías como la orina, las heces, la bilis, el sudor, el aire exhalado, etc. Los riñones son los órganos más importantes en la excreción ya que eliminan directamente las sustancias tóxicas de la sangre. Para que una sustancia sea eliminada por la orina es necesario que sea soluble en agua; así los compuestos liposolubles se tienen que biotransformar en hidrosolubles para poder ser excretados por esta vía.

El As se excreta tanto por vía urinaria como fecal (Wildfang *et al.*, 2000). En 1981, experimentos de Buchet y colaboradores determinaron que en humanos el As se excreta mayoritariamente por vía urinaria en unos 8 días después de la ingestión oral (Buchet *et al.*, 1981b). Sin embargo, la vida media para la excreción del As por la vía urinaria aumenta al aumentar la dosis de exposición (Wildfang *et al.*, 2000). En 1994 Hughes y colaboradores determinaron que, en ratones, no se observa una relación dependiente de la dosis en la eliminación de  $As^{+5}$  o de DMA; sin embargo, la eliminación de MMA sí que ocurre de una manera dependiente de la dosis. Buchet y colaboradores también estudiaron la excreción de As por vía urinaria en humanos y encontraron que la tasa de excreción de los metabolitos del As estaba relacionada linealmente con la cantidad absorbida (Buchet *et al.*, 1981b) y que, al ingerir unos 500  $\mu g$  de  $NaAsO_2$ , los tiempos medios de eliminación de MMA y DMA, fueron menos de 4 y 11 horas respectivamente (Buchet *et al.*, 1981a).

No cabe duda de que la dieta puede influir en las cantidades de As excretado. El As puede ser ingerido a través de diferentes alimentos como hortalizas, pescados, mariscos y otros alimentos procesados, que en alguna fase de su producción o preparación hayan estado en contacto con As. Así, por ejemplo, los alimentos marinos pueden contener grandes cantidades de As orgánico en diferentes formas y, al ser consumidos, el As es eliminado rápidamente, aumentando su concentración en la orina (Buchet *et al.*, 1994). Aproximadamente el 50% del As

contenido en el pescado es eliminado en 2 días, después de los cuales la tasa de excreción decrece hasta llegar a un nivel basal (Freeman *et al.*, 1979).

En 1994, Buchet y colaboradores encontraron que no había diferencias en la eliminación del As por vía urinaria entre hombres y mujeres. Previamente, Charbonneau y colaboradores (1980) habían encontrado resultados similares al estudiar las diferencias de eliminación en hámsters machos y hembras expuestos a  $As^{+5}$  por vía oral o intravenosa. Se sabe que el  $As^{+3}$  es oxidado internamente a  $As^{+5}$  y que el sitio del riñón donde más se reabsorbe es el túbulo proximal (Ginsburg, 1965).

La excreción biliar del As también parece depender de la forma química, de la ruta de exposición y de la especie de As absorbida por el organismo. En 1974, Klaassen determinó que en ratas el As está entre 300 y 600 veces más concentrado en la bilis que en el plasma, sugiriendo un transporte activo a través de la membrana. En este estudio, menos del 10% de la dosis de As administrado se excretó por las heces en un periodo de 7 días, lo que sugirió la importancia del sistema de circulación enterohepática del As en la rata.

En 1991, Gyurasics y colaboradores determinaron que el  $As^{+3}$  y  $As^{+5}$ , al ser administrados por vía intravenosa en ratas, aumentan la excreción biliar de tioles endógenos, incluyendo el glutation, de una manera dependiente de la dosis. Se observó que el  $As^{+3}$  era más fácilmente excretado por la bilis que el  $As^{+5}$  y que la mayor excreción de ambas especies de As ocurría a los 15 min después de la administración (Gyurasics *et al.*, 1991b). Se propuso que el  $As^{+3}$  y el  $As^{+5}$ , al ser reducido a  $As^{+3}$ , forman complejos poco estables con el glutation que son transportados a la bilis (Gyurasics *et al.*, 1991a).

La eliminación fecal del As inorgánico y sus metabolitos metilados representa, por lo general, menos de un 10% del total del As eliminado (Ducoff *et al.*, 1948; Hollins *et al.*, 1979; Cikrt *et al.*, 1980) aunque se han encontrado algunas excepciones (Charbonneau *et al.*, 1980). El estado de oxidación del As no parece tener mucho que ver su eliminación fecal, si bien existen pocos estudios en los que se determine la excreción fecal de As (Bettley y O'Shea, 1975).

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de los efectos de la exposición de los organismos al As es su metabolismo, ya que puede presentar una gran complejidad, y como ya se ha visto puede variar considerablemente dependiendo

de la especie que se estudie. Actualmente todavía existen muchas incógnitas y controversias referentes al metabolismo del As, el que se presenta en detalle en el siguiente apartado.

### **1.3.2 Metabolismo del arsénico**

El metabolismo es un proceso esencial que afecta el comportamiento de la gran mayoría de agentes químicos que entran al cuerpo, a los que están expuestos los organismos vivos en el medio ambiente. El metabolismo incide directamente en la toxicidad de los xenobióticos y sus derivados, por lo que se considera determinante en la toxicología y en la mutagénesis de numerosos compuestos.

Anteriormente hemos mencionado que, para reducir la posibilidad de que una sustancia produzca una respuesta tóxica, se puede disminuir la cantidad de sustancia que llega en forma activa al tejido blanco, así como disminuir su tiempo de permanencia en el lugar de acción. Lo anterior se logra disminuyendo la difusibilidad del tóxico e incrementando la velocidad de excreción, fenómenos que se producen cuando aumenta la polaridad del xenobiótico, dado que los lípidos se difunden menos rápidamente. Un compuesto xenobiótico puede ser transformado por el metabolismo aumentando su solubilidad en agua y facilitando su excreción por medio de la orina.

El mecanismo más común que usan los organismos para eliminar los tóxicos ambientales es la biotransformación, consistente en convertir los xenobióticos no polares en compuestos solubles en agua. En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito más tóxico que el compuesto original, a este proceso se le denomina bioactivación. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo, entonces pueden producir un daño que se manifieste en una respuesta tóxica. Las reacciones de biotransformación se agrupan en dos conjuntos de vías metabólicas: las reacciones de Fase I o de funcionalización y las reacciones de Fase II o de conjugación.

La biotransformación de Fase I comprende un conjunto de reacciones de las que la oxidación a nivel microsomal es la más importante. Otras vías son la oxidación extramicrosomal, la reducción y la hidrólisis. Gracias a las reacciones de la fase I se forman metabolitos que en general, son más hidrófilos y que, pueden ser transformados en las reacciones de Fase II.

Las reacciones de Fase II, de las cuales la glucuronoconjugación es la más característica, están catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citosol. Las reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la Fase I o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. El resultado que se logra con estas reacciones es un gran aumento de la solubilidad en agua del xenobiótico, o de su metabolito lo que facilita su eliminación del organismo.

El modelo actual sobre el metabolismo del As se caracteriza por dos tipos de reacciones en muchas especies, incluyendo la humana. El primero es una biotransformación de Fase I, consistente en una oxidación/reducción que cambia el estado de valencia del As, permitiendo el paso de  $As^{+5}$  a  $As^{+3}$ . El segundo tipo de reacción es la metilación en la que las formas de As trivalentes son metiladas secuencialmente a productos mono-, bi- o trimetilados, actuando la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo y la forma reducida del glutatión (GSH) como cofactor esencial (Morgan *et al.*, 2001).

En 1973, Braman y Foreback demostraron la presencia de As metilado en orina humana y, cuatro años más tarde, Creclius (1977) realizó un experimento *in vivo* en el cual demostró que existía un proceso de metilación del As en humanos. En este experimento, un voluntario ingirió vino, agua y carne de cangrejo en conserva, que contenían As(i), y luego se detectaron dos metabolitos metilados de As en su orina, en las siguientes proporciones: 15-20% MMA y 55-65% DMA; también se detectó un 20-25% de As(i). Estos datos fueron corroborados posteriormente por Buchet y colaboradores (1981a).

En otro estudio, cinco voluntarios ingirieron 3 mg de  $NaAsO_2$  y, mediante el análisis de orina para As total y especiada, se demostró que el 48% de la dosis era eliminada a los 5 días; asimismo se determinó que la vida media del As total era de aproximadamente 30 h. El As(i) fue eliminado mayoritariamente durante las primeras horas; sin embargo, esta eliminación disminuyó rápidamente al aumentar las proporciones de metabolitos metilados de As, mayoritariamente en forma de DMA (Buchet *et al.*, 1980). Otro experimento realizado por el mismo grupo, con voluntarios que ingirieron 500  $\mu$ g de As(i) en forma de  $NaAsO_2$ , permitió determinar que el efecto observado en el experimento anterior se

aceleraba con un pretratamiento con agentes lipotrópicos como la metionina, la colina o la vitamina B (Buchet *et al.*, 1981a).

Posteriormente se ha investigado cómo influye el estado nutricional en la capacidad metiladora del organismo. Así, un estudio llevado a cabo en ratas puso de manifiesto que la mala nutrición disminuye la capacidad metiladora del hígado (Tice *et al.*, 1997); otro estudio *in vitro*, realizado en tejido hepático humano, también plantea la influencia del estado nutricional sobre la metilación del As, en particular, el papel de la vitamina B12 y del selenio (Zakharyan y Aposhian, 1999). Un estudio de biomonitorización realizado en una población humana ambientalmente expuesta a altas concentraciones de As en Argentina, también llega a la conclusión de que el estado nutricional modula la metilación (Vahter, 1999). Estos últimos resultados no concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado en familias afectadas por el As a través del agua de consumo en el norte de Chile (Chung *et al.*, 2002). En dicho estudio se encontró una alta correlación de la metilación del As entre hermanos, datos que no se vieron alterados al ajustarlos según las variables de micronutrientes de la sangre (metionina, homocisteína, folato, vitamina B6, B12 y selenio).

En un principio se había sugerido que existían dos vías independientes para la producción de MMA y DMA (Buchet y Lauwerys, 1985, 1988; Buchet *et al.*, 1994), pero a partir del trabajo de Zakharyan *et al.* (1995) usando arsenito purificado y MMA metiltransferasa de hígado de conejo, se aceptó que una sola proteína realiza ambas metilaciones. En relación a ello, se ha propuesto que el índice de metilación del As puede ser una de las razones de la variación en los perfiles de excreción del As(i) y sus metabolitos metilados entre diferentes especies animales (Wildfang *et al.*, 1998).

Investigaciones llevadas a cabo usando MMA metiltransferasa de hígado de conejo demostraron que para realizar la primera metilación se usa  $As^{+3}$  y no  $As^{+5}$  (Zakharyan *et al.*, 1995). Al estudiar la actividad de la As metiltransferasa de hígado de hámster parcialmente purificada, se corroboraron dichos resultados (Wildfang *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* con concentraciones bajas de  $As^{+3}$  ( $1\mu M$ ) han evidenciado que la formación de DMA aumenta con el tiempo, mientras que la concentración de MMA se mantiene relativamente constante durante el tiempo de incubación (Georis *et al.*, 1990), lo que sugiere que, a bajas dosis, el  $As^{+3}$  es metilado hasta lograr disparar el segundo paso de la metilación en el que

se produce DMA. La secuencia de pasos aceptados que se suceden durante el metabolismo del As se presentan en la figura 1.4 (Marnell *et al.*, 2003).

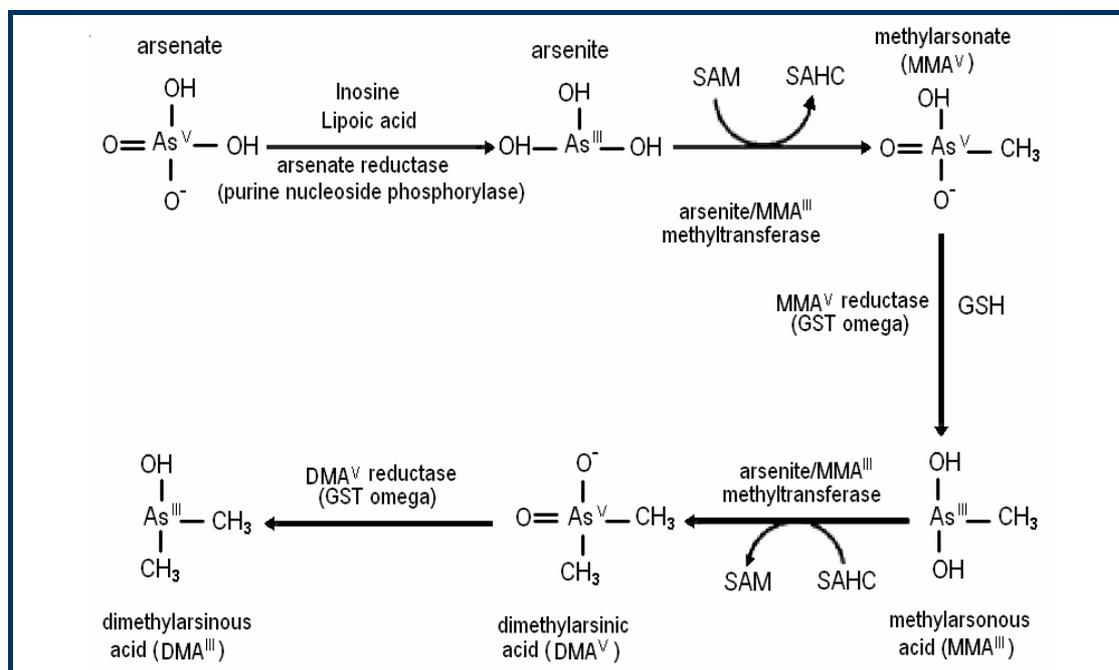


Figura 1.4: Esquema del metabolismo del As

En numerosos estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* se ha comprobado la existencia de cofactores esenciales para la metilación del As. Se ha determinado que estos factores esenciales son la S-adenosilmetionina (SAM) (Buchet y Lauwerys, 1985, 1988; Zakharyan *et al.*, 1995) y tioles reducidos, principalmente glutatión (GSH) (Buchet y Lauwerys, 1987; Buchet y Lauwerys 1988; Zakharyan *et al.*, 1995). Buchet y Lauwerys determinaron que el agotamiento de GSH *in vivo* mediante el tratamiento con phorone aumenta más del doble la excreción de As total durante las primeras 24 h después del tratamiento, debido mayoritariamente al aumento en la excreción de As(i), demostrando así la importancia del GSH endógeno en la metilación del As en ratas (Buchet y Lauwerys, 1988). Estos resultados fueron corroborados al usar arsenito metiltransferasa purificada de hígado de conejo, donde la cisteína era mas activa que el GSH (Zakharyan *et al.*, 1995).

Por otro lado, los estudios realizados por Zakharyan y colaboradores (1995) indican que el GSH puede proporcionar el ambiente reducido necesario para la metilación del As. También se ha observado que otros compuestos tiólicos, como el ditioneitol (DTT), el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido dimercapto-

propanosulfónico (DMPS), disminuyen la metilación del As al aumentar la concentración de tiol, mientras que el mercaptoetanol aumenta la metilación del As *in vitro* (Buchet y Lauwerys, 1988).

El hecho de que los metabolitos encontrados en la orina humana después de la exposición a  $As^{+3}$  y  $As^{+5}$  sean mayoritariamente ácido monometilarsónico ( $MMA^{+5}$ ) y ácido dimetilarsínico ( $DMA^{+5}$ ) y que, en ratas, después de la exposición a  $As^{+3}$  se encuentren mayoritariamente complejos de As y glutatión ( $As-GSH$ ), han llevado a Hayakawa y colaboradores (2005) a estudiar si los complejos  $As-GSH$  eran sustratos para la As metiltransferasa mediante el uso de la enzima Cyt19. Los análisis sugirieron que el As triglutatión (ATG) fue generado monoenzimáticamente a partir de  $As^{+3}$  cuando el GSH se encontraba a concentraciones de 2 mM o mayores. Los autores proponen que la enzima Cyt19 cataliza la transferencia del grupo metilo de SAM al As produciendo MMA y DMA.

En este estudio se vio que la metilación del As era catalizada por Cyt19 sólo cuando ATG estaba presente en la mezcla de reacción. Además, el diglutatión de monometilarsónico (MADG) fue el sustrato de Cyt19 para las sucesivas metilaciones a glutatión dimetilarsínico (DMAG). Por otro lado, ácido monometilarsenioso ( $MMA^{+3}$ ), el producto de la hidrólisis de MADG, no fue metilado a DMA por Cyt19. Estos resultados sugieren que los complejos  $As-GSH$  como ATG y MADG fueron convertidas a MADG y DMAG, respectivamente. Ambas MADG y DMAG presentaron inestabilidad en la solución cuando la concentración de GSH era menor a 1 mM, siendo hidrolizados y oxidados a  $MMA^{+5}$  y  $DMA^{+5}$ , respectivamente. Los autores proponen que el metabolismo del  $As^{+3}$  a As metilado via Cyt19 ocurre via ATG y MADG más que por oxidaciones y metilaciones de  $As^{+3}$  y  $MMA^{+3}$  y proponen una ruta metabólica diferente (Hayakawa *et al.*, 2005).

En un estudio con personas voluntarias se midieron los efectos de la administración de cinco dosis de  $NaAsO_2$ , durante cinco días consecutivos, encontrándose que el porcentaje de MMA y DMA excretado disminuye un 10% en respuesta al aumento de la dosis, lo que se vio reflejado principalmente en la excreción de DMA después de la mayor dosis (1 mg  $NaAsO_2$ ), y la producción de MMA permaneció casi lineal (Buchet *et al.*, 1981b). El hecho de que los metabolitos metilados del As estuvieran presentes en la orina en una concentración significativa, incluso a altas dosis, después de exposiciones repetidas, indica que la capacidad total de metilación no se satura. Hopenhayn-

Rich y colaboradores (1993), después de revisar estudios de poblaciones expuestas al As, concluyeron que los humanos no presentan un umbral para la metilación del As. Sin embargo, otros autores sugieren que hay una relación sublineal o umbral entre la ingestión de As y el cáncer de piel y de otros órganos internos (Rudell *et al.*, 1996).

Estudios en humanos indican que después de la administración oral de arsenito ( $As^{+3}$ ), los únicos metabolitos que se encuentran en la orina son: As(i), MMA y DMA. Buchet y colaboradores (1981a) encontraron que, después de la administración oral de 500  $\mu g$  de MMA, aproximadamente el 13% se metilaba a DMA. En un estudio realizado en 1987 por Marafante y colaboradores en voluntarios a quienes se había administrado DMA por vía oral, se detectaron bajos niveles (alrededor del 4%) de óxido trimetilarsénico (TMAO) en la orina. En este mismo estudio se encontró que tanto ratones como hámsters metabolizan el DMA administrado por vía oral a TMAO en una proporción de 3,5% y 6,4%, respectivamente (Marafante *et al.*, 1987). Se han detectado concentraciones más altas de TMAO en hámsters después de la administración de DMA por vía oral (Yamauchi y Yamamura, 1984a), pero no se han detectado compuestos trimetilados de As en sistemas homogeneizados de hígado de rata (Buchet *et al.*, 1981b). Sin embargo, en ratas a las que se les administró DMA por vía oral se encontró que el TMAO aumentaba en función de la dosis (H. Chen *et al.*, 1996).

El análisis de la cinética en estudios *in vitro* usando  $As^{+3}$  y MMA metiltransferasa parcialmente purificada de hígado, tanto de conejo como de hámster, indica que el  $K_m$  del  $As^{+3}$  está dos órdenes de magnitud por debajo del  $K_m$  del MMA (Zakharyan *et al.*, 1996; Wildfang *et al.*, 1998), lo que sugiere que el  $As^{+3}$  es el preferido para la metilación y que la metilación de MMA a DMA no ocurre a escala significativa hasta que se alcanza una cierta concentración de sustrato para la reacción. En un estudio realizado por Zakharyan y Aposhian (1999), estos investigadores propusieron que la formación de MMA puede ser el paso limitante para la metilación del As.

En cuanto a la toxicidad del As, generalmente se consideraba que la metilación era una vía de detoxificación en mamíferos. Los estudios de Buchet y colaboradores (1981a) indicaron que los metabolitos metilados del As se excretaban con mayor rapidez que el As no metilado. Más tarde, Vahter y

Marafante (1983) demostraron que estas especies eran menos reactivas en los tejidos y Lewis y Sweet (1985) determinaron que los metabolitos de As(i) presentaban una menor toxicidad aguda. Desde entonces, se consideró que la metilación era el primer paso para la biotransformación del As(i) y para su detoxificación en muchos animales.

Sin embargo, se ha observado que los monos titís (Vahter *et al.*, 1982), los chimpancés (Vahter *et al.*, 1995), los monos tamarin (Zakharyan *et al.*, 1996) y los conejillos de Indias (Healy *et al.*, 1997), son especies que no excretan derivados metilados de As en la orina después de estar expuestas a As(i). Posteriormente, se ha determinado que estas especies son deficientes para la actividad de la arsenitometiltransferasa en el hígado, por lo que no metilan este elemento (Aposhian, 1997b; Healy *et al.*, 1997). Wildfang y colaboradores estudiaron 17 especies de primates no humanos y confirmaron que la metilación no es un proceso de detoxificación del As para la mayoría de los primates (Wildfang, *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios con otras especies han determinado que tanto el mono Rhesus, como el hámster, el perro, el ratón, la rata, el conejo y el hombre sí metilan el As (Vahter, 1994). Esto está llevando a un creciente debate sobre si la metilación ha de ser considerada como un proceso de detoxificación.

Desde que se descubrió que en el metabolismo del As los productos metilados incluían MMA<sup>+3</sup>, MMA<sup>+5</sup>, ácido dimetilarsenioso (DMA<sup>+3</sup>) y DMA<sup>+5</sup>, se ha estudiado cada uno de ellos por separado en cuanto a su potencial toxicológico. Un experimento en el que se incubaron distintos tipos celulares con As<sup>+3</sup>, As<sup>+5</sup>, MMA<sup>+3</sup> y DMA<sup>+3</sup>, determinó que los compuestos metilados trivalentes son más tóxicos que el As<sup>+3</sup> datos que han sido confirmados por estudios posteriores (Petrick *et al.*, 2001). Aposhian y colaboradores (1999, 2000a), basándose en estudios poblacionales en humanos consideran que el MMA<sup>+3</sup> es más tóxico que el As<sup>+3</sup> y sugieren que la metilación es sólo un proceso de biotransformación. Posteriormente, un estudio de Styblo y colaboradores evidenció que la metilación es un proceso que incrementa la toxicidad y la carcinogénesis (Styblo *et al.*, 2002). Los resultados de un estudio realizado en hámster dorado por Sampayo Reyes y colaboradores (2000) revelan la presencia de MMA<sup>+3</sup> y DMA<sup>+3</sup> en el hígado de hámster después de la exposición a As<sup>+5</sup>, señalando la necesidad de reexaminar los resultados de toxicidad y de carcinogenicidad del As(i) en tejidos de mamíferos.

Aposhian y colaboradores detectaron por primera vez MMA<sup>+3</sup> en la orina humana. Los resultados de este estudio plantean muchos interrogantes acerca de la toxicidad del As(i) y del papel del MMA<sup>+3</sup> en la etiología de la hiperqueratosis, de la hiperpigmentación y del cáncer de piel después de la exposición a As(i) (Aposhian *et al.*, 2000a). En el estudio de una población rumana expuesta al As a través del agua de consumo, el análisis de las muestras de orina detectó, MMA<sup>+5</sup> además de MMA<sup>+3</sup>. Como el MMA<sup>+3</sup> presenta una mayor toxicidad que el As<sup>+3</sup>, nuevamente se replantean las hipótesis de que la metilación sea una vía de detoxificación del As(i) y que el As<sup>+3</sup> sea el mayor causante de toxicidad y carcinogenicidad del As(i) (Aposhian *et al.*, 2000b).

Algunos estudios parecen indicar que el As(i), al ser metilado, libera radicales peróxido que reaccionan con la guanina produciendo aductos que provocan daño genético (Yamanaka *et al.*, 1997, Pi *et al.*, 2002). La variación en los perfiles de excreción que se ha ido encontrando en los diferentes estudios realizados, tanto en humanos como en otras especies animales, apuntaron la posibilidad de la existencia de polimorfismos genéticos en relación con la metilación del As(i).

En 1977 Creelius determinó que después de la exposición a As, los humanos excretaban un 20-25% de As(i), 15-20% de MMA y 55-65% de DMA, datos que fueron corroborados en posteriores estudios (Buchet *et al.*, 1981a). En Taiwan, en una población expuesta al As en el agua de consumo estudiada por Chiou y colaboradores, se encontraron los siguientes valores de excreción: 11,8 de As(i), 26,8 de MMA y 61,3% de DMA (Chiou *et al.*, 1997). Sin embargo en investigaciones más recientes se ha determinado que, en promedio, en la orina de los humanos expuestos a As se encuentra 10-30% de As(i), 10-20% de MMA y 60-80% de DMA (Vahter y Concha, 2001). Sin embargo, estudios realizados en Argentina por Vahter y colaboradores (1995) evidenciaron que la población andina expuesta a As por el consumo de agua contaminada excretaba una media de 2,2% de MMA en la orina, en vez del 10-20% esperado, estos datos han sido corroborados posteriormente por Seoane y colaboradores (1998).

Un estudio de Vahter (2002) parece indicar que los individuos con un bajo porcentaje de MMA en la orina son más rápidos en eliminar el As ingerido. Además de los perfiles de excreción en las diferentes poblaciones, se han estudiado diferentes factores que influyen en la capacidad metiladora de los individuos expuestos al As, como son la edad, el sexo y el embarazo. En relación a

la edad de la población, un estudio realizado por Kurttio y colaboradores ha evidenciado que las personas mayores metilan más que las jóvenes (Kurttio *et al.*, 1998). Otro estudio realizado en mujeres adultas y niños expuestos en Argentina, por Concha y colaboradores, encontró que los niños y las mujeres del mismo grupo poblacional excretaban diferentes concentraciones de As(i) en orina (50% *vs.* 32%) y que la población estudiada presentaba niveles de excreción de MMA inferiores a los de otras poblaciones. Estos resultados indican una inducción de la metilación del As con el aumento de la exposición (Concha *et al.*, 1998a).

En un estudio realizado en una población infantil en Méjico, se determinó que los niños excretaban más As total en la orina, en relación con los adultos, y que los que estaban más expuestos excretaban más As(i) y MMA y menos DMA. Al contrario del estudio realizado en Argentina, estos resultados sugieren que la exposición crónica disminuye la capacidad metiladora de los niños (Del Razo *et al.*, 1999). Otro estudio realizado por Vahter, también en Argentina, aporta resultados similares hallando que los niños excretaban una menor cantidad de DMA en la orina, en comparación con los adultos, a igual exposición. Asimismo, también se encuentra un aumento del porcentaje de DMA en la orina al aumentar la exposición (Vahter 1999a). Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio realizado en Finlandia en el que se sugiere que los individuos expuestos son mejores metiladores que los controles (Kurttio *et al.*, 1998). En el estudio de la población de Taiwan, no se detectó ninguna relación entre el contenido de As en el agua de consumo, la capacidad metiladora y el contenido de As en la orina (Chiou *et al.*, 1997).

Al estudiar poblaciones expuestas ambientalmente al As en Taiwan no se detectaron diferencias en los perfiles de excreción entre hombres y mujeres (Chiou *et al.*, 1997), ni en EEUU (Calderón *et al.*, 1999), pero sí que se encontraron diferencias en el patrón de excreción de As entre hombres y mujeres en poblaciones de Méjico, China y Chile (Loffredo *et al.*, 2003). También se han estudiado los perfiles de excreción de As en mujeres expuestas durante el embarazo, habiéndose encontrado un aumento de la metilación durante este periodo (Concha *et al.*, 1998b), lo que protege al feto del contacto con otras formas de As más tóxicas.

El conjunto de resultados conduce a la conclusión de que el metabolismo del As debe estar regulado genéticamente y que, posiblemente, existen polimorfismos

asociados que determinan la capacidad metiladora en las diferentes poblaciones y, dentro de ellas, de cada uno de los individuos (Vahter *et al.*, 1995; Vahter 1999, 2000; Healy *et al.*, 1997; Concha *et al.*, 1998a; Loffredo *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el factor polimórfico es más determinante que el factor ambiental (Concha *et al.*, 2002). De hecho, como ya se ha comentado, en un estudio realizado en Chile, se analizaron los patrones familiares de una población expuesta y se encontró una alta correlación entre los patrones de metilación familiar, sobre todo entre hermanos, patrones que no se vieron alterados al ajustar los datos en función de las variables de micronutrientes en sangre. De este modo, se pudo evidenciar la importancia de los factores genéticos en la metilación del As (Chung *et al.*, 2002)

Para estudiar las poblaciones expuestas a As (o a otro compuesto) es muy importante determinar la diferencia entre los niveles ambientales de un compuesto y los niveles internos de exposición en los individuos, para ello se utilizan los biomarcadores de exposición de los cuales se trata a continuación.

### **1.3.3 Biomarcadores de exposición**

Un biomarcador es un evento o estado biológico, una señal química, celular, molecular, inmunológica, genética o fisiológica, que se puede medir en un organismo, célula o material biológico. Asimismo, lo puede ser cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el organismo, que inflencie o prediga la incidencia o consecuencias de una enfermedad, asociado a la exposición a un agente tóxico o a una mezcla compleja. Simplificando, los biomarcadores son los cambios medibles, ya sean bioquímicos fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico. El uso de biomarcadores permite detectar efectos que no se pueden medir de otra manera, reduciendo el impacto de diferentes exposiciones no tomadas en consideración al hacer un estudio, e introduciendo parámetros individuales en su diseño.

Los biomarcadores son una herramienta útil para detectar la exposición ambiental a sustancias tóxicas. Con su uso se analiza una situación más real ya que se considera la exposición general que incluye, no sólo el agente, objeto de estudio, sino también el ambiente complejo en que se encuentra. Los biomarcadores se utilizan para detectar la existencia de una exposición y determinar sus

consecuencias biológicas, detectar los estados iniciales o intermedios de una enfermedad, realizar estudios más rápidos y precisos a nivel preclínico, relacionar la exposición individual a la historia particular de cada individuo, identificar a los individuos sensibles de una población y para fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental. Es por ello que, con el uso de biomarcadores, se aumenta la probabilidad de detectar asociaciones entre posibles causas y efectos.

Según Albertini y colaboradores (1996), los biomarcadores se pueden dividir en: tres grupos: biomarcadores de exposición, de efecto y de sensibilidad. Los biomarcadores de exposición indican que el agente ha entrado en el organismo, proporcionando información cuantitativa sobre la exposición y corroborando el ingreso de sustancias tóxicas en el organismo. Se basan en estimas y mediciones de dosimetría interna, o sea de la valoración de la concentración de los xenobióticos y/o sus metabolitos en los medios biológicos. Los biomarcadores de exposición detectan también la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinógenos o sus metabolitos en diversos tejidos o secreciones corporales.

En humanos, los biomarcadores de exposición más utilizados para determinar los valores internos de As son la concentración de As en sangre, uñas, pelo y orina (Morgan 2001). Debido a que el As se acumula en los tejidos ricos en queratina, un buen bioindicador es su acumulación en el pelo y en las uñas. El As en la sangre sólo se usa como un biomarcador de exposición reciente ya que es rápidamente eliminado de la circulación sanguínea. La concentración de As en la orina se utiliza como una buena medida de la exposición reciente debido a que el As es rápidamente metabolizado y excretado. Podemos encontrar ejemplos del uso de estos marcadores en los estudios llevados a cabo en los últimos años por Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Chiou *et al.*, 1997; Gebel, 1998; Kurttio *et al.*, 1998; Harrington-Brock *et al.*, 1999; Concha 2001, Watanabe *et al.*, 2001.

## 1.4 EFECTOS BIOLÓGICOS DEL ARSÉNICO

Los efectos biológicos del As son variados y han resultado de enorme interés para la comunidad científica, debido a su complejidad e importancia en el ámbito de la salud pública. Sus efectos, tal como ya se ha descrito, son diversos, pasando desde malestar general a afecciones cardíacas, pulmonares, desórdenes de la piel o

diversos tipos de cáncer. Para completar el estudio de los efectos biológicos del As, es de vital importancia estudiar su genotoxicidad.

#### 1.4.1 Genotoxicidad del arsénico

Un compuesto es considerado genotóxico si induce daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas con un bajo grado de toxicidad. El As ha resultado ser genotóxico en diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo capaz de inducir alteraciones tales como micronúcleos (MN), aberraciones cromosómicas (CA) e intercambios de cromátidas hermanas (SCE).

Se sabe que el  $\text{As}^{+3}$  es más genotóxico que el  $\text{As}^{+5}$ . En distintos estudios se han analizado por separado los compuestos de As metilados, tanto trivalentes como pentavalentes, y parece ser que los compuestos pentavalentes,  $\text{MMA}^{+5}$  y  $\text{DMA}^{+5}$ , son menos genotóxicos que el  $\text{As}^{+3}$ , pero sus análogos trivalentes,  $\text{MMA}^{+3}$  y  $\text{DMA}^{+3}$ , son por lo menos tan citotóxicos como el  $\text{As}^{+3}$  (Gebel, 2001). Esto indica que el As trivalente parece ser altamente tóxico aunque esté metilado (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000). Por esta razón como ya se ha comentado, actualmente se ha puesto en duda la hipótesis de que la metilación es un proceso de detoxificación del As.

Hasta el momento, tanto el  $\text{MMA}^{+3}$ , como el  $\text{DMA}^{+3}$ , el  $\text{MMA}^{+5}$  y el  $\text{DMA}^{+5}$ , no han sido correctamente evaluados en cuanto a su capacidad para producir CA, SCE o citotoxicidad en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica y tampoco han sido evaluados en cuanto a su mutagenicidad en *Salmonella* o para la inducción del profago en *E. coli*. Para llegar a caracterizar la genotoxicidad del As, deben generarse todavía más datos, sobre todo mediante ensayos de mutación cromosómica. Para poder identificar las formas más genotóxicas del As hay que comparar los datos ya existentes con nuevos datos y entender mejor las vías de toxicidad y de detoxificación (Kligerman *et al.*, 2003).

**Genotoxicidad de los compuestos de arsénico *in vitro*:** El As(i) presenta resultados negativos de mutación puntual en los ensayos estándar y presenta resultados positivos de mutación cromosómica en distintos tipos celulares. Los estados trivalentes muestran mayor genotoxicidad que los pentavalentes, ya sean especies orgánicas o inorgánicas. En varios estudios se ha determinado que el  $\text{DMA}^{+3}$  presenta altos niveles de citotoxicidad y genotoxicidad (Kenyon y Hughes, 2001).

A altas concentraciones (10 mM) tanto el DMA<sup>+3</sup> como el DMA<sup>+5</sup> presentan resultados positivos de mutación génica en *E. coli* (Yamanaka *et al.*, 1997). El DMA<sup>+5</sup> también resulta genotóxico en ensayos con células humanas y de otros mamíferos (Endo *et al.*, 1992; Oya-Ohta *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1997). Después de la exposición a As se han observado incrementos significativos en la frecuencia de enlaces cruzados DNA-proteína, en cultivos de células embrionarias de hámster (Rossman *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1985b; Kochhar *et al.*, 1996), en linfocitos humanos (Larramendy *et al.*, 1981; Jha *et al.*, 1992; Rasmussen y Menzel, 1997) y en fibroblastos (Okui y Fujiwara, 1986; Jha *et al.*, 1992; Dong y Luo, 1993)

Se ha demostrado que el As<sup>+3</sup> induce MN en células CHO y V79 utilizando el test de MN con y sin bloqueo de la citocinesis mediante el uso de citocalasina-B (cyt-B) (Wang *et al.*, 1997; Gebel, 1998). El As<sup>+3</sup> también induce MN en linfocitos periféricos humanos, tanto aislados como en sangre completa, después del bloqueo de la citoquinesis con cyt-B (Schaumloffel y Gebel, 1998).

En los estudios realizados con cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, el As<sup>+3</sup> es más potente en la inducción de MN que contienen fragmentos cromosómicos que en la inducción de MN que contienen cromosomas enteros (Eastmond y Tucker, 1989), lo que indica que si bien el As actúa tanto como clastogénico como aneugénico, predomina la clastogenicidad es decir, la inducción de roturas cromosómicas. El efecto aneugénico podría ser explicado por la interferencia con el huso mitótico de la célula (P. Ramírez *et al.*, 1997; Yih *et al.*, 1997).

Diversos estudios han demostrado que el As<sup>+3</sup> induce CA en diferentes tipos celulares. Los tipos de alteraciones encontradas han sido: lesiones acromáticas (*gaps*), fragmentaciones, endoreduplicaciones y roturas cromosómicas (Beckman *et al.*, 1977; Nakamuro y Sayato, 1981; Nordenson *et al.*, 1981; Nordenson y Beckman, 1982; Lee *et al.*, 1985a y b; 1986; Jha *et al.*, 1992; Wiencke y Yager, 1992; Gurr *et al.*, 1993; Dulout *et al.*, 1996; Kochhar *et al.*, 1996).

Asimismo, se ha demostrado que después del tratamiento con As<sup>+3</sup> se inducen frecuencias significativamente elevadas de SCE, tanto en experimentos con linfocitos humanos y líneas celulares linfoblastoides (Gebel *et al.*, 1997; Rasmussen y Menzel, 1997), como en células epiteliales de hámster chino (Lee *et*

*al.*, 1985b). Se ha puesto de manifiesto que el  $As^{+3}$  tiene una potencia de inducción de SCE de más de un orden de magnitud superior en comparación con el  $As^{+5}$ . Esto puede explicarse debido a la menor absorción de  $As^{+5}$  por las células en relación con la absorción de  $As^{+3}$ . Sin embargo hay que señalar que *in vitro*, solo una baja proporción de  $As^{+5}$  es reducida a  $As^{+3}$  (Gebel, 2001).

Un estudio realizado por Mass y colaboradores (2001) ha demostrado que los arsénicos metilados trivalentes,  $MMA^{+3}$  y  $DMA^{+3}$ , son agentes genotóxicos directos, siendo capaces de cortar DNA superenrollado. Este efecto no se encontró al analizar sus análogos pentavalentes  $MMA^{+5}$  y  $DMA^{+5}$ , ni al estudiar los efectos del  $As^{+3}$  o del  $As^{+5}$ .

**Genotoxicidad de los compuestos de arsénico *in vivo*:** En cuanto a los estudios realizados en animales, la frecuencia de MN aumenta en ratones expuestos a arsenito de sodio y arsenito potásico mediante administración intraperitoneal (Tinwell *et al.*, 1991; Deknudt, 1986) o por vía oral (Tice *et al.*, 1997), mientras que el  $As_2S_3$  no es capaz de inducir MN, presumiblemente debido a su baja solubilidad y, por lo tanto, de su escasa biodisponibilidad (Tinwell *et al.*, 1991). Estudios realizados en ratas han demostrado que después del tratamiento con  $As^{+3}$  por vía oral se produce un aumento de la frecuencia de CA (Das *et al.*, 1993; Roy-Choudhury *et al.*, 1996). Kashiwada y colaboradores (1998) encontraron que las ratas, después del tratamiento con DMA, presentaban un elevado número de células aneuploides.

Existen bastantes estudios que evalúan los efectos genotóxicos del As ocasionados por exposiciones humanas crónicas a través del consumo de agua contaminada. Sin embargo, los estudios de exposiciones laborales son menos frecuentes. En la mayoría de estos trabajos se estudia la exposición al  $As^{+3}$ , pero como en el hombre el As es metilado metabólicamente, se estudia a la vez la exposición al  $As^{+5}$ , al MMA y al DMA.

Los estudios de biomonitorización de poblaciones laboralmente expuestas a As han determinado que el riesgo de contraer cáncer aumenta en los trabajadores debido a su exposición a compuestos de As (Welch *et al.*, 1982; Pershagen, 1985; Gerhardsson y Nordberg, 1993; Buchet y Lison, 1998; Lubin *et al.*, 2000). A pesar de que el MMA y el DMA son utilizados como herbicidas, pesticidas o conservantes de la madera, entre otros usos, no hay estudios de evaluación de la genotoxicidad de estos compuestos después de la exposición laboral. Esto se debe

en parte, a que normalmente se dan exposiciones a mezclas más o menos complejas de distintos compuestos, lo que dificulta el análisis de los efectos individuales de los distintos elementos o compuestos (Gebel, 2001).

La mayoría de los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a As ponen de manifiesto frecuencias elevadas de MN (Warner *et al.*, 1994; Dulout *et al.*, 1996; Biggs *et al.*, 1997; Gonsebatt *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Seoane *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2001), SCE (Lerda, 1994; Hsu *et al.*, 1997; Mahata *et al.*, 2003) y CA (Beckman *et al.*, 1977; Nordenson *et al.*, 1978; Nordenson y Beckman, 1982; Mäki-Paakkanen *et al.*, 1998; Mahata *et al.*, 2003), tanto en linfocitos de sangre periférica como en células uroteliales. De lo indicado se deduce que en humanos se ha demostrado claramente que, en casos de alta exposición, el As actúa como mutágeno a nivel cromosómico, a pesar de que su potencial para inducir mutaciones puntuales es bajo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en las poblaciones humanas que presentan una exposición crónica al As aumenta la incidencia de diversos tipos de cáncer. Es por ello que la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado el As y sus compuestos como carcinógenos en humanos (IARC, 2004). En el apartado siguiente se tratan con mayor detalle los efectos carcinógenos del As.

**Carcinogénesis del arsénico:** Hasta el momento no se ha encontrado un modelo animal adecuado para el estudio de la carcinogénesis del As; a pesar de ello, los datos epidemiológicos procedentes de los estudios realizados en poblaciones humanas expuestas a As, ya sea ambiental o laboralmente, se consideran más que suficientes para confirmar los efectos carcinógenos del As. Un modelo animal adecuado para el estudio de la carcinogénesis del As *in vivo*, permitiría reforzar los datos epidemiológicos y también sería de gran utilidad para estudiar los mecanismos de acción del As y sus derivados. Basándose en los resultados de estudios *in vitro*, se han formulado diversas hipótesis acerca de los mecanismos implicados en la carcinogénesis del As y sus compuestos, pero todavía no se han llegado a establecer. Hay que tener en cuenta que la carcinogénesis debida al As puede ser muy compleja e implicar diferentes modos de acción.

En cuanto a los animales de experimentación utilizados para investigar la carcinogénesis del As, se han empleado principalmente ratas (Katsnel'son *et al.*,

1986; Wei *et al.*, 1999; Kitchin, 2001), ratones (Ng *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Rossman *et al.*, 2001), hámsters (Pershagen *et al.*, 1984; Wildfang *et al.*, 1998), perros (Byron *et al.*, 1967) y monos (Thorgeirsson *et al.*, 1994). A pesar de los esfuerzos realizados, las evidencias obtenidas de estos estudios *in vivo* son bastante limitadas. Uno de los roedores más utilizados ha sido la rata, si bien los resultados obtenidos son difíciles de extrapolar al hombre debido a las diferencias en el metabolismo (Vahter *et al.*, 1995). En los últimos años se ha investigado con distintos animales transgénicos, habiéndose obtenido resultados de interés para el estudio de la carcinogénesis del As y sus compuestos (Germolec *et al.*, 1998; Salim *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2000).

Hay pocos estudios que demuestren de forma concluyente que el As es carcinogénico en animales (Rudnay y Borzsonyi, 1981; Pershagen *et al.*, 1984; Katsnel'son *et al.*, 1986). Por lo general, en estos estudios se emplean concentraciones de As muy altas, que no se dan en las distintas situaciones de exposición humana. Actualmente, los estudios de carcinogénesis con animales se realizan de manera que las dosis se parezcan a las que pueden encontrarse en las distintas situaciones de exposición humana. En concreto se disminuyen las concentraciones, se alarga el tiempo de exposición y se utilizan especies de As(i).

Uno de los modelos animales más interesantes de la carcinogénesis del As fue desarrollado por Ng y colaboradores en 1998 en ratones C57B1/6J, esta cepa tiene una incidencia muy baja en la producción de tumores (cerca al 0%). La importancia de este estudio no sólo radica en que se obtuvieron resultados positivos en cuanto a la inducción de tumores en diferentes órganos, sino en que se usaron especies de As(i) con niveles de exposición bajos y durante un largo periodo de tiempo, de modo que las condiciones experimentales del estudio fueron semejantes a las de las zonas de arsenicosis endémica. Posteriormente se han obtenido resultados similares de tumorogénesis en otros estudios con roedores (Chen *et al.*, 2000).

Los estudios realizados en poblaciones humanas expuestas a As, han encontrado una respuesta directamente dependiente de la dosis, al relacionar la exposición a altas concentraciones de As en el agua de consumo humano y la incidencia de cáncer (Chen *et al.*, 1992; Lerda, 1994; Santolaya *et al.*, 1995; Gonsbatt *et al.*, 1997; Nakadaria *et al.*, 2002). Un estudio realizado en una población de Taiwan en

un área caracterizada por presentar endémicamente la enfermedad de los pies negros, reveló que la tasa de cáncer de piel era de 10,6 por cada 1.000 habitantes (Tseng, 1968). Otros estudios realizados en esta zona han demostrado un alto índice de mortalidad por cáncer de vejiga, pulmón e hígado, además de detectar cáncer de piel en más de un 6% de la población mayor de 30 años (Hsu *et al.*, 1997).

Como ya hemos apuntado, el As ha resultado ser un dilema para los investigadores debido a la dificultad para encontrar un buen modelo animal cuyos resultados sean extrapolables a la carcinogénesis en humanos (Wang *et al.*, 2002a) y, además, a que sus mecanismos de genotoxicidad no han sido completamente caracterizados (Goering *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2001; Gebel, 2001). Esto ha llevado a formular diferentes hipótesis sobre la carcinogénesis del As, que incluyen varios mecanismos de genotoxicidad, entre los que se cuentan alteraciones de la reparación del DNA, metilación del DNA, cambios en la expresión génica y amplificación génica, entre otros (Simeonova y Luster, 2000; Kitchin, 2001; IARC, 2004).

Además, tanto el As como sus metabolitos metilados han sido considerados carcinógenos (Rossman *et al.*, 2001), comutagénicos (Li y Rossman, 1991), promotores del cáncer (Yamamoto *et al.*, 1995; Yamanaka *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998), e inhibidores de la reparación del DNA (Okui y Fujiwara, 1986; Hartman y Speit, 1996; Andrew *et al.*, 2003). Aunque el As induce efectos clastogénicos y aneugénicos, su papel como iniciador en el proceso de la carcinogénesis a través de mutaciones puntuales ha sido cuestionado debido a las débiles evidencias de efectividad en la inducción de mutaciones génicas (Noda *et al.*, 2002; IARC, 2004).

Varios investigadores han estudiado el efecto del As en la reparación del daño génico (Lee-Chen *et al.*, 1992; Hartman y Speit, 1996; Yamanaka *et al.*, 1997; Hartwing *et al.*, 1997; Yager y Wiencke, 1997; Snow *et al.*, 1999). En 1991 se demostró que el As<sup>+3</sup> inhibe la reparación postreplicativa en células (CHO)K1 irradiadas con UV y que, en fibroblastos humanos, inhibe principalmente el mecanismo de reparación por escisión de los dímeros de pirimidina (Lee-Chen *et al.*, 1992). Al estudiar células alveolares humanas de tipo II (L-132), se comprobó que la metilación metabólica del As a DMA está implicada en la inducción de daño en el DNA, demostrándose que la metilación del As(i) tiene consecuencias genotóxicas debido a la inhibición de las enzimas de reparación (Yamanaka *et al.*, 1997). En el mismo año, otro estudio en células humanas puso de manifiesto que

el  $As^{+3}$  puede potenciar el daño genético a través de su reacción con ditioles e interfiriendo en las funciones normales de las proteínas de reparación del DNA (Yager y Wiencke, 1997). Hartwing y colaboradores, utilizando fibroblastos humanos irradiados con UV, demostraron que el  $As^{+3}$  afecta al mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER), concretamente en las etapas de escisión y ligación (Hartwing *et al.*, 1997).

También se ha encontrado que el As(i) presenta efectos comutagénicos con otros agentes químicos y con la luz ultravioleta en células de mamífero (Lee *et al.*, 1985a; Okui y Fujiwara, 1986; Li y Rossman, 1991). Al igual que en células animales, el As también es comutagénico en células humanas cuando interacciona con varios agentes químicos y físicos. El  $As^{+3}$  potencia los efectos del diepoxibutano, un agente inductor de enlaces cruzados que aumenta significativamente la frecuencia de CA en linfocitos (Wiencke y Yager, 1992), y de los rayos X y la luz UV en fibroblastos (Jha *et al.*, 1992).

La comutagénesis del As ha sido ampliamente estudiada en los últimos años por varios grupos de investigadores y se ha postulado que ocurre mediante la inhibición de la reparación del daño causado por diversos agentes. Los estudios de Yamanaka y colaboradores sobre la comutagénesis del As y la luz ultravioleta (UVB) han encontrado una mayor incidencia de tumores en los individuos expuestos (Yamanaka *et al.*, 2000, 2001). Resultados similares han sido publicados en relación al efecto de la exposición conjunta del As con otros carcinógenos (Yamanaka *et al.*, 1996; Rossman *et al.*, 2001).

En un estudio realizado por Hu y colaboradores se determinó que la comutagénesis inducida por el As y la inhibición de la reparación del DNA probablemente no sean el resultado de la inhibición enzimática directa, sino que pueden ser un efecto indirecto, causado por cambios inducidos por el As en los niveles redox celulares y/o en las alteraciones en las vías de transducción de señales con los consiguientes cambios de la expresión génica (Hu *et al.*, 1998). Un estudio realizado en queratocitos humanos expuestos a  $As^{+3}$  sugirió que el As puede modular la reparación del DNA y los niveles redox a través de mecanismos transcripcionales o postranscripcionales (Snow *et al.*, 1999).

La alteración de los patrones de metilación del DNA ha sido observada en poblaciones expuestas a As en Taiwan y en Australia (Castren *et al.*, 1998;

Boonchai *et al.*, 2000). Yamanaka y colaboradores (1990) demostraron que en el proceso de metilación de MMA<sup>+5</sup> a DMA<sup>+5</sup>, se induce síntesis reparadora del DNA, lo que indica la inducción previa de daño genético y, que se ha puesto en marcha algún tipo de mecanismo de reparación por escisión. Como ya se ha indicado, el As es metilado enzimáticamente, consumiéndose S- adenosilmetionina (SAM) en el proceso. Como las DNA metiltransferasas también requieren SAM, podría ser que la metilación estuviera relacionada con la carcinogénesis del As. La hipótesis es que la metilación del As produce una hipometilación del DNA lo que facilitaría la transformación maligna de las células con niveles bajos de SAM. La inducción de hipometilación del DNA debida al As resultó ser directamente dependiente de la dosis y del tiempo de exposición (Zhao *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Mass y Wang (1997), se determinó que la exposición crónica al As produce la hipermetilación del gen p53, impidiendo la expresión normal del gen.

Recientemente, algunos investigadores han reexaminado tanto la citotoxicidad como la genotoxicidad de los metabolitos trivalentes del As (MMA<sup>+3</sup> y DMA<sup>+3</sup>) y algunos estudios han indicado que la metilación puede aumentar la toxicidad del As<sup>+3</sup> (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000). Mass y colaboradores (2001) encontraron que el MMA<sup>+3</sup> y el DMA<sup>+3</sup> son las especies químicas del As que inducen roturas en el DNA de linfocitos humanos de sangre periférica. También se demostró que el DMA<sup>+3</sup> corta el plásmido artificial pBR322, y que su actividad se incrementa en presencia de ferritina (Ahmad *et al.*, 2002). El corte del DNA por MMA<sup>+3</sup> y DMA<sup>+3</sup> es producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ahmad *et al.*, 2002; Nesnow *et al.*, 2002). Varios estudios recientes confirman la inducción de daño oxidativo por los metabolitos metilados de As (Liu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002b; Kitchin y Ahmad, 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003).

Los estudios relativos a la genotoxicidad de los metabolitos pentavalentes del As (MMA<sup>+5</sup> y DMA<sup>+5</sup>) han aportado generalmente resultados negativos, o bien han evidenciado una genotoxicidad débil, en comparación con las especies de As(i) (IARC, 2004). Sin embargo, estudios realizados por Yamanaka y colaboradores (Yamanaka *et al.*, 1989a y b, 1990) demostraron que el DMA<sup>+3</sup>, metabolito del DMA<sup>+5</sup>, produce radicales peroxilo que son capaces de romper el DNA. Los mismos autores han demostrado recientemente que se produce estrés oxidativo después de la exposición al óxido de dimetilarсениco (DMI), un compuesto modelo del DMA<sup>+3</sup>, por la producción de peróxido de arsénico dimetilado, resultando en la formación de cis-imina glicol (Yamanaka *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha

demostrado que el As induce factores de crecimiento celular que causan un aumento de la proliferación celular y, en último término, favorecen la carcinogénesis (Germolec *et al.*, 1998).

Los resultados de varios estudios con animales de experimentación sugieren que el As es un promotor del cáncer, más que un carcinógeno. (Yamamoto *et al.*, 1995,1997; Benko *et al.*, 1999; Salim *et al.*, 1999; Morikawa *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 2000, 2001). Los estudios en que se evalúa la exposición al As junto con otros carcinógenos han permitido confirmar la actividad promotora del As en el proceso de la carcinogénesis. En investigaciones recientes se ha demostrado que los tumores que se encuentran frecuentemente en las poblaciones humanas expuestas a As se pueden inducir en animales al usar el As como promotor (Wang *et al.*, 2002b). Las especies orgánicas de As (MMA y DMA) han demostrado tener actividad promotora, pero las especies inorgánicas  $As^{+3}$  y  $As^{+5}$  no muestran producir los mismos efectos; es por ello que se requieren más estudios relacionados con los efectos carcinógenos de las diferentes especies de As (Wang *et al.*, 2002b).

#### **1.4.2 Biomarcadores de efecto**

Los biomarcadores de efecto nos indican estados avanzados del proceso de daño. Estos biomarcadores miden el daño que se ha producido cuando el organismo ya lo ha procesado, pudiendo llegar a ser cambios permanentes en la célula, órgano u organismo. Los efectos ya fijados, reflejan daños producidos por exposiciones pasadas, lo que los hace útiles para el estudio de daño acumulativo. Si se quiere detectar un daño cromosómico, los biomarcadores de efecto que se pueden utilizar incluyen las aberraciones cromosómicas (CA), los micronúcleos (MN), y las roturas del DNA y, si se quiere detectar un daño génico, se pueden analizar las mutaciones puntuales.

Los biomarcadores de efecto también pueden determinar cambios cromosómicos o génicos en lugares específicos relacionados con el desarrollo de alguna enfermedad. En tal caso, nos referimos a los biomarcadores de enfermedades, que constituyen manifestaciones tempranas o preclínicas, que se presentan antes de que se establezca la enfermedad producida por la exposición. Si hay daño cromosómico, se pueden buscar alteraciones estructurales o numéricas específicas de la enfermedad en estudio y, si hay daño génico, se pueden evaluar mutaciones

en protooncogenes, en genes supresores de tumores o en genes de reparación. Los biomarcadores de efecto que no entregan información específica de una enfermedad, se denominan biomarcadores de riesgo. Los biomarcadores de riesgo y de enfermedad no pueden identificar el tóxico que produjo el daño, pero sí indican al investigador qué el daño ha ocurrido.

En los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas al As se han usado diferentes biomarcadores de efecto, entre los que podemos señalar los MN (Biggs *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Martínez *et al.*, 2004 y 2005), los SCE (Lerda, 1994; Seoane *et al.*, 1998; Mahata *et al.*, 2003), las CA (Liou *et al.*, 1999; Mahata *et al.*, 2003) y las mutaciones puntuales en el gen *hprt* (Harrington-Brock *et al.*, 1999), entre otros.

Como en este trabajo de tesis se usan los MN como marcadores de efecto genotóxico, a continuación pasamos a detallar cómo se originan, su significado biológico y el uso de distintos tipos celulares como son los linfocitos de sangre periférica y las células de descamación de la mucosa bucal como dianas donde analizar su frecuencia.

### 1.4.3 Los micronúcleos

El DNA puede ser alterado de manera espontánea o por la acción de diversos agentes. Muchas de estas alteraciones se traducen en roturas del DNA y en pérdida de material genético. Estas anomalías pueden detectarse mediante distintas técnicas moleculares y/o citogenéticas. Entre las técnicas citogenéticas más utilizadas están las que permiten detectar los cambios cromosómicos, tanto estructurales como numéricos. Así, para evaluar el riesgo genético de poblaciones humanas expuestas a mutágenos, las técnicas más frecuentemente usadas son las de CA y MN. El ensayo de MN es uno de los ensayos de genotoxicidad más utilizado en la biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos, como es el caso del As (Biggs *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Seoane *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2004 y 2005).

El ensayo de MN ha sido muy usado en la evaluación genotóxica *in vitro* de una gran cantidad y diversidad de mutágenos químicos, en diversos tipos celulares. El uso de cultivos de linfocitos humanos que iniciaron Heddle y colaboradores en 1976, permitió por su parte, biomonitorizar una población *in vivo* y llevar a cabo

el estudio citogénético de cada individuo, pudiendo correlacionar las alteraciones citogenéticas sufridas con la exposición a las sustancias o agentes cuyos efectos adversos se pretende evaluar.

Los micronúcleos pueden corresponder tanto a cromosomas enteros como a fragmentos acéntricos que, al no orientarse correctamente durante la división celular, quedan fuera de ambos núcleos hijos. Los MN tienen un aspecto similar al del núcleo principal y se ven como pequeños núcleos en el citoplasma de las células interfásicas. La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), en la cual se utiliza una sonda pancentromérica, permite detectar si el centrómero está presente o no en el MN y, por lo tanto, determinar su origen. Si el MN presenta marca centromérica significa que contiene un cromosoma completo; en cambio, si el MN no presenta marca centromérica, significa que contiene un fragmento acéntrico, debido a una rotura cromosómica y, por lo tanto, puede deberse al efecto de un agente clastogénico.

La clastogenicidad ha sido relacionada con procesos de envejecimiento prematuro, alteraciones vasculares e inducción de diversos tipos de cáncer (Ames y Gold, 1990). Un aumento significativo de la frecuencia de MN que contengan cromosomas enteros puede tener consecuencias negativas para la salud humana dado que las aneuploidías, ya sean somáticas o germinales, se han correlacionado con abortos espontáneos, retraso mental y carcinogénesis, entre otras alteraciones (Hassold *et al.*, 1996; Hagmar *et al.*, 1998). El ensayo de MN es uno de los pocos ensayos disponibles para analizar alteraciones citogenéticas tempranas en tejidos epiteliales, antes de que ocurran los cambios malignos.

Se sabe que la frecuencia basal de MN depende del tipo celular. La frecuencia espontánea de MN en células de mucosa bucal tiene un rango de 0,3 a 4,7 en 1000 células (Titenko-Holland *et al.*, 1994), mientras que, en linfocitos humanos, oscila entre 3 y 23 ‰ (Surrallés y Natarajan, 1997). También se sabe que esta frecuencia basal varía en diferentes etnias, que en mujeres la frecuencia de MN es aproximadamente 1,4 veces mayor a la de los hombres (Fenech, 1993) y que, a medida que aumenta la edad, e independientemente del sexo, la frecuencia de MN también aumenta (Fenech y Morley, 1986). Dependiendo de las características de cada estudio, se pueden usar diferentes tipos celulares para aplicar el ensayo de MN, en el siguiente apartado se detalla el uso de linfocitos y células de la mucosa bucal.

En resumen, entre las ventajas del ensayo de MN se pueden mencionar: el ser una técnica simple, de fácil recuento y tener un coste reducido. Tiene la habilidad de valorar exposiciones prolongadas y se puede analizar un gran número de células en poco tiempo. Presenta la posibilidad de dar una estima cuantitativa de riesgo en condiciones tales como las esperadas en una situación de interés y posibilita el menor uso de animales de experimentación. Entre las desventajas se pueden mencionar: la existencia de factores de confusión que modulan la frecuencia de MN como son la edad, el sexo, etnia, técnicas de tinción, etc (Fenech y Morley, 1986; Fenech, 1993; Surrallés *et al.*, 1995b) los cuales deben ser considerados en el momento del análisis. En los estudios de biomonitorización a veces es difícil interpretar los datos debido a la gran variabilidad intra e interindividual (Radack *et al.*, 1995). Se ha determinado que la variabilidad intraindividual puede llegar a ser de hasta un 67%, atribuible a un error experimental (Fenech y Neville, 1992), y otras veces debido a la tinción (Surrallés *et al.*, 1995b). Otra limitación del ensayo es el no poderse determinar la exposición que causa aberraciones inestables, ya que estas se pierden (Surrallés *et al.*, 1997).

**El uso de linfocitos en el ensayo de MN:** a partir del tejido sanguíneo se pueden realizar dos tipos de cultivos diferentes. Por un lado, pueden utilizarse linfocitos aislados, que representan un sistema de evaluación muy sensible para el análisis del potencial genotóxico (Elhajouji *et al.*, 1994; Surrallés *et al.*, 1995a), con la desventaja de que se necesitan mayores volúmenes de muestra. Por otra parte, los cultivos de sangre completa tienen la ventaja de que, al conservar los componentes del plasma, reflejan más fielmente la situación *in vivo*. Esto se debe a que los eritrocitos y demás componentes del plasma tienen un papel muy importante en la activación metabólica de los promutágenos (Elhajouji *et al.*, 1994; Surrallés *et al.*, 1995a) y también en la degradación de los potenciales agentes genotóxicos (Stocker y Ames, 1987).

El uso de linfocitos humanos de sangre periférica permite hacer una evaluación citogenética empleando células de larga duración que están circulando constantemente por todo el cuerpo y que, en consecuencia, están en contacto con los diversos xenobióticos y sus metabolitos. Por otro lado, los linfocitos son fáciles de obtener y sólo se requiere una pequeña cantidad de sangre para poder realizar el ensayo.

Como la mayoría de los linfocitos están en estado no proliferativo ( $G_0$ ), han de ser estimulados para que, al dividirse puedan formar los MN. Durante el cultivo en

presencia de fitohemaglutinina (PHA), un extracto de la judía *Phaseolus vulgaris*, estimula eficazmente los linfocitos, logrando que las células reingresen en el ciclo celular (G1, S, G2 y Mitosis) y se dividan. Por otro lado, la cinética del crecimiento de los linfocitos humanos en cultivo está bien conocida, lo que es importante tanto para la aplicación de la técnica como para facilitar el análisis de los resultados.

Es conveniente que el ensayo de micronúcleos se aplique a células que han experimentado sólo una división celular después de la exposición al agente genotóxico ya que, los MN se pueden perder en divisiones sucesivas, lo que conduciría a subestimar el daño genético inducido (Evans, 1988). Para facilitar la evaluación, se utiliza un bloqueador de la citocinesis para obtener células binucleadas (con una división) y detectar también las células mononucleadas y polinucleadas, las cuales no se incluyen en la evaluación debido a que, si no se han dividido y son células dañadas no han tenido la oportunidad de expresar el daño, y si se han dividido más de una vez, pueden haber perdido material genético sin que lo podamos detectar. En ambos casos se puede subestimar la evaluación del daño.

El uso de la citocalasina-B (cyt-B) fue propuesto por Fenech y Morley (1985) como un método sencillo y efectivo. La cyt-B es una sustancia que inhibe el ensamblaje de los microfilamentos de actina e impide la citocinesis sin afectar la mitosis. Como resultado de la división celular en presencia de cyt-B, se obtiene una célula binucleada, la cual será evaluada para detectar la presencia de MN. En la figura 1.5 se presenta un esquema gráfico del ensayo de MN usando cyt-B.

El ensayo de MN usando cyt-B detecta tanto la acción de los agentes clastogénicos como agentes aneugénicos. Sin embargo, parece que puede existir cierta interacción entre los agentes aneugénicos y la cyt-B, debido a que los MN inducidos por agentes aneugénicos podrían verse alterados por la acción que la cyt-B ejerce sobre los microfilamentos de actina (Antoccia *et al.*, 1993). En dicho caso, la distancia entre los polos de la célula se acorta (Norppa *et al.*, 1993; Falck *et al.*, 1997), favoreciendo que los cromosomas aislados queden dentro de alguno de los núcleos hijos. Hay que tener en cuenta, pues, que al evaluar agentes aneugénicos en presencia de cyt-B, se podría subestimar la frecuencia de MN, dar resultados contradictorios o poco reproducibles.

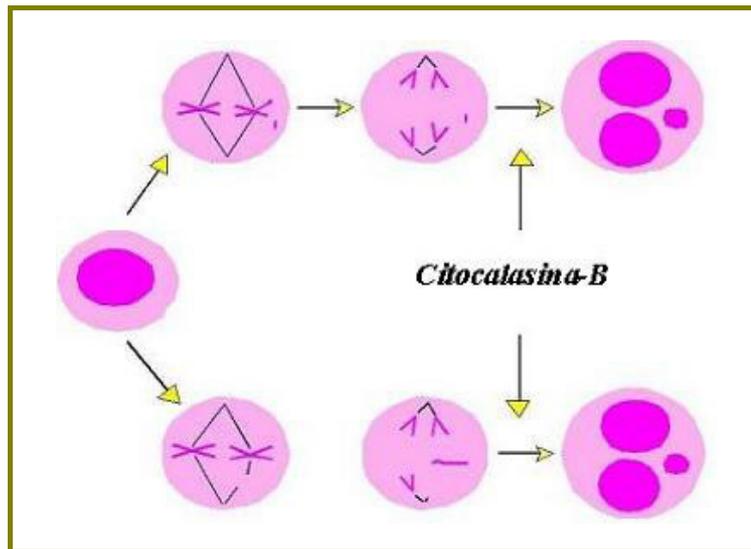


Figura 1.5: Esquema del ensayo de MN usando citocalasina-B

#### El uso de células de mucosa bucal en el ensayo de MN:

Los tejidos epiteliales proliferan muy rápidamente y están en constante contacto con el medio; por ello, las células de exfoliación de las capas superficiales del epitelio pueden reflejar el daño genotóxico inducido en estos tejidos. Además, son de fácil obtención y el método de extracción no es invasivo. Debido a que más del 90% de los cánceres se originan en células epiteliales (Cairns, 1975), y a que las mutaciones juegan un papel fundamental en el desarrollo tumoral (Weinstein, 1988), el uso de los tejidos epiteliales es de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico.

En 1983, Stich y Rosin adaptaron la metodología del ensayo de MN de linfocitos a células de exfoliación de la mucosa bucal (Stich y Rosin, 1983a). La relevancia de la utilización de células epiteliales en el análisis de MN fue reforzada por Van Pelt y colaboradores. (1991) y, desde entonces, el ensayo se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células para medir los efectos genotóxicos de exposiciones ambientales y ocupacionales.

Se ha demostrado que el ensayo de MN en células de exfoliación es un biomarcador sensible a la exposición a altas concentraciones de As en agua de consumo (Gonsebatt *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2002 y 2004), así como a la radiación ionizante (Stich *et al.*, 1985; Sarto *et al.*, 1987), al tabaco (Fontham *et al.*, 1986;

Sarto *et al.*, 1987), a ciertos alimentos (Picker y Fox, 1986), al alcohol (Stich y Rosin, 1983b) y otros compuestos, por lo que permite el estudio de una amplia gama de exposiciones.

En las células de exfoliación, la frecuencia de MN tiende a ser inferior a la observada en células sanguíneas. En un estudio realizado por Sarto y colaboradores, se encontró que en una misma población la frecuencia de MN era de 9,35‰ en linfocitos y de 0,51‰ en células de mucosa bucal (Sarto *et al.*, 1990). En nuestro laboratorio se han realizado diferentes estudios utilizando los micronúcleos de mucosa bucal como biomarcadores. Pastor y colaboradores (2002) en un estudio de poblaciones expuestas a plaguicidas, encontraron una media de 2,36‰ de MN en células de mucosa bucal y un 1,98‰ de células bucales micronucleadas, en una población control de Hungría. En otro estudio (Pastor *et al.*, 2003) en el que se compararon poblaciones de cuatro países europeos expuestos a plaguicidas, se encontraron los siguientes valores de MN totales en células de mucosa bucal en las poblaciones control: Grecia 1,00‰; Polonia 1,05‰; Hungría 1,18‰ y España 1,45‰ y los valores de células bucales con MN fueron de 0,99‰ en Hungría, 0,96‰ en Polonia, 1,54‰ en España y 0,87‰ en Grecia. En este estudio, los valores medios globales fueron de 1,18‰ MN en células de mucosa bucal y de 1,06‰ de células bucales con MN.

## 1.5 SENSIBILIDAD INDIVIDUAL AL ARSÉNICO

Se sabe que la respuesta tóxica puede variar de un organismo a otro, aunque los individuos sean de la misma especie, raza o sexo. Aunque las respuestas de organismos de diferentes especies pueden ser similares a dosis similares, esto no ocurre necesariamente. La toxicidad de una sustancia en el organismo receptor esta influenciada por factores genéticos (especie, cepa, sexo, individuo, etc.) y fisiológicos (embarazo, edad, dieta, estado nutricional, estado hormonal, estado de salud, etc.).

De hecho, diversos estudios en humanos indican que hay una variación considerable en la respuesta a la exposición a As entre distintos individuos, por lo que es difícil determinar con certeza cuáles son los rangos de su toxicidad. Se ha visto que algunas personas pueden llegar a ingerir hasta 150 µg As/kg sin presentar signos de malestar; mientras que hay personas más sensibles que

presentan signos de arsenicismo al ingerir dosis de 20  $\mu\text{g As/kg}$  al día (ATSDR, 1989).

Para intentar comprender porqué los individuos de una misma población reaccionan de diferente manera frente a diversos tipos de exposición, la caracterización genotípica esta adquiriendo cada vez mayor importancia en los estudios de biomonitorización y es también de mucha utilidad en los estudios e interpretación de los procesos carcinógenos.

Aunque muchos mutágenos y carcinógenos son desactivados mediante procesos metabólicos, otros requieren ser activados metabólicamente. Es por ello que las características genéticas individuales de los procesos metabólicos son importantes en la inducción de mutaciones y el desarrollo de enfermedades como el cáncer, por lo que presentan relevancia en los estudios de biomonitorización. La importancia de las variaciones de un mismo gen en un individuo, llamadas polimorfismos, le confieren una mayor o menor susceptibilidad al organismo, frente a diversas exposiciones con potencial genotóxico, como es el caso del As.

Para el estudio de las diferencias individuales en cuanto a los efectos biológicos que se producen frente a la exposición al As, se pueden utilizar diferentes biomarcadores. En el caso particular de esta Tesis, se ha usado los genes polimórficos de las glutation S-transferasas (*GST*), que son unos de los genes polimórficos más estudiados en los estudios de biomonitorización, y como ya se ha dicho en el apartado de metabolismo, participan en las reacciones de metilación del As(i) como cofactor esencial.

### **1.5.1 Biomarcadores de sensibilidad individual**

Los biomarcadores de sensibilidad individual se utilizan para identificar aquellos individuos dentro de una población que, por sus características genéticas, son más susceptibles a los daños causados por diversos agentes ambientales. Algunos individuos tienen probabilidades más altas que otros de sufrir los efectos de una exposición debido a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades para detoxificar, excretar y/o reparar daños. Como indicadores de susceptibilidad también se deben tomar en cuenta los factores nutricionales tales como las diferencias en folato, la vitamina C (Aidoo *et*

*al.*,1994), las diferencias inmunológicas (Richeldi *et al.*, 1993), el estado hormonal (Concha *et al.*, 1998b) y la edad (Vahter, 1999).

Se ha demostrado que los genes polimórficos que codifican para las GSTs participan en el metabolismo del As (Chiou *et al.*, 1997; Taningher *et al.*, 1999; Chouchane y Snow, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Maiti y Chatterjee, 2001). Esto significa que hay distintos alelos en los loci que codifican estas enzimas metabolizadoras, los cuales definen la susceptibilidad individual frente a una misma exposición. Es por ello que en los estudios sobre la genotoxicidad del As se pueden usar biomarcadores de susceptibilidad individual, tales como algunos de los genes *GST*, (Chiou *et al.*, 1997).

### 1.5.2 Las glutathion S-transferasas

Las glutathion S-transferasas (GST) constituyen una familia de proteínas diméricas multifuncionales que catalizan la conjugación entre los glutathiones reducidos (GSH) electrófilos y neutrófilos. Su función primaria es la de detoxificar los compuestos electrofílicos capaces de unirse al DNA, típica reacción metabólica de fase II (Pickett y Lu, 1989). Las GSTs también catalizan una serie de reacciones que implican al GSH, incluyendo la reducción del hidroperóxido orgánico (Mannervik, 1985), las cuales juegan un papel importante en la protección de los tejidos frente al estrés oxidativo.

Las enzimas GST se dividen en proteínas solubles y proteínas de membrana, entre ellas, no hay ninguna relación estructural. La mayoría de estudios se centran en las GST solubles ya que se sabe que presentan variantes alelicas con consecuencias funcionales. Para su estudio, se han clasificado en nueve clases agrupadas en cinco familias,  $\alpha$  (*GSTA*),  $\mu$  (*GSTM*),  $\pi$  (*GSTP*),  $\theta$  (*GSTT*) y  $\Omega$  (*GSTO*) (Rushmore y Pickett, 1993; Mannervik, 2003). En la tabla 1.6 se presentan de forma ordenada los diferentes polimorfismos genéticos conocidos de las GSTs, entre los que se detalla la información de los polimorfismos estudiados en esta tesis.

Todas las GSTs solubles están formadas por dos subunidades de la misma clase, que pueden ser iguales o diferentes. Todas las GSTs tienen diferentes perfiles de afinidad por los substratos y, aunque existe un pequeño solapamiento entre ellos, cada una de estas subunidades es importante al definir la capacidad de

detoxificación en el tejido diana, es por ello que la presencia o ausencia de una GST en particular o la modificación de su eficiencia catalítica es significativa (Mannervik, 2003). A continuación se analizan en mayor detalle los polimorfismos que se han estudiado en este trabajo, correspondientes a las clases *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*.

Tabla 1.6: Polimorfismos genéticos de las glutathion S-transferasas (*GSTs*)

Familia	Clase	Polimorfismos conocidos	Mutación
<i>GSTA</i> ( $\alpha$ )			
<i>GSTM</i> ( $\mu$ )	<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1</i> *A	Alelo salvaje
		<i>GSTM1</i> *B	Sustitución de base C534G Cambio de aminoácido Lis172Asp
		<i>GSTM1</i> *O	Delección del gen
	<i>GSTM2</i>		
	<i>GSTM3</i>		
<i>GSTT</i> ( $\theta$ )	<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1</i> *O	Delección del gen
	<i>GSTT2</i>		
<i>GSTP</i> ( $\pi$ )	<i>GSTP1</i>	<i>GSTP1</i> *A	Alelo salvaje
		<i>GSTP1</i> *B	Transición A118G en exón 5' Cambio de aminoácido Ile105/Val
		<i>GSTP1</i> *C	(Cambio*B)+ Transición C341T C Cambio de aminoácido Ala 114/Val
<i>GSTO</i> ( $\Omega$ )	<i>GSTO1</i>	Por clasificar	
	<i>GSTO2</i>	Por estudiar	
	<i>GSTO3</i>	Por estudiar	

En la familia *GST* $\mu$  se distinguen tres clases, *M1*, *M2* y *M3*. La más estudiada es la clase *GSTM1*, debido a que entre sus polimorfismos existe la completa delección del gen, lo que provoca la ausencia total de la enzima. El gen que codifica para la *GSTM1* se encuentra en el cromosoma 1 (1p13.3). Existen tres variantes del gen *GSTM1*, la *GSTM1*\*A es el alelo salvaje, la *GSTM1*\*B, difiere de la \*A sólo en una base en el exón 7 que codifica monómeros que pueden generar enzimas

homodiméricas y heterodiméricas de efectividad catalítica muy similar *in vitro* (Mannervik *et al.*, 1992, Hayes y Pulford, 1995), en este caso ocurre la sustitución de base C534G, que conlleva un cambio de aminoácido Lis172Asp. Finalmente la *GSTM1\*O* es la delección total del gen lo que provoca una ausencia de la actividad enzimática (Smith *et al.*, 1995; Tsuchida, 1997; Taningher *et al.*, 1999).

Las delecciones de *GSTM1*, tanto en homocigosis como en heterocigosis, se han asociado con un aumento de susceptibilidad al cáncer debido a una detoxificación deficiente. El genotipo homocigoto para el alelo nulo de *GSTM1* (-/-), se denomina genotipo nulo *GSTM1*. La frecuencia de individuos con genotipo nulo es de aproximadamente el 50% en la población caucásica (Seidegard *et al.*, 1988,) y varía entre el 30% y el 90% en diferentes grupos étnicos (Lin *et al.*, 1994; Rebbeck 1997). El impacto de la delección de este gen en la salud humana puede ser muy importante debido a la alta frecuencia en que se presenta en las distintas poblaciones.

En la familia *GSTθ* existen dos clases descritas, la *GSTT1* y la *GSTT2*. Ambas clases comparten el 55% de la secuencia de aminoácidos y sus estructuras son similares aunque presentan diferentes afinidades por los sustratos. La clase polimórfica es la *GSTT1*, razón por la cual es la más estudiada, se encuentra localizada en el cromosoma 22 (22q11.23). Los individuos homocigotos para el alelo nulo presentan la ausencia total de la función de la proteína (Smith *et al.*, 1995; Tsuchida, 1997; Taningher *et al.*, 1999). En un estudio realizado por Garte y colaboradores (2001) se analizaron todos los datos publicados sobre enzimas del metabolismo determinándose las frecuencias alélicas de las diferentes variantes, y en diferentes poblaciones ya que estos valores pueden variar en función de la etnia (C.L. Chen *et al.*, 1996). En él se concluyó que la frecuencia de los homocigotos para el alelo *GSTT1\*O* (delección completa del gen) era de 19,7 en la población caucásica y de 47,0 en la población asiática (Garte *et al.*, 2001).

La *GSTM1* y la *GSTT1* detoxifican tanto los productos de muchas reacciones catalizadas por el citocromo, como los lípidos y peróxidos resultantes del estrés oxidativo (Mannervik y Danielson 1988; Pickett y Lu, 1989; Ketterer *et al.*, 1992; Berhane *et al.*, 1994), lo que sugiere una acción coordinada. Tanto la actividad *GSTM1* como *GSTT1* pueden verse completamente suprimidas en algunos individuos debido a que pueden presentar la delección completa del gen en ambos casos (*M1* y *T1*) (Seidegard *et al.*, 1988, Pemble *et al.*, 1994). Esto ha hecho

interesante su análisis conjunto y la interacción entre ambas ha sido comúnmente estudiada. Los individuos con genotipo nulo tanto para *GSTT1* como para *GSTMI* son particularmente sensibles a los carcinógenos químicos. C.L. Chen y colaboradores (1996) estudiaron poblaciones caucásicas y afroamericanas determinando que la prevalencia del genotipo nulo para *GSTMI* era mayor en los caucásicos (53,5% vs. 27,6%), mientras que la del genotipo nulo para *GSTT1* era mayor en los afroamericanos (24,1% vs. 15,0%). Sin embargo, no se encontraron diferencias étnicas para el doble genotipo nulo. Otros estudios realizados en el mismo año (Abdel-Rahman *et al.*, 1996) encontraron resultados similares en poblaciones norteamericanas y egipcias, en donde la prevalencia del genotipo nulo para *GSTMI* fue de 51% y 44%, para *GSTT1* fue de 15% y 14,7%, y para el doble genotipo nulo fue de 6,3% y 8,8%, respectivamente.

La familia *GST $\pi$*  consta solo de una clase la *GSTP1*, localizada en el cromosoma 11 (11q13). Esta clase consta de dos polimorfismos, el primer polimorfismo del gen *GSTP1* fue descrito por Board y colaboradores en 1989 este polimorfismo, denominado *GSTP1\*B* consiste en una transición de A a G en el nucleótido 118 en el exón 5 y el cambio de aminoácido Ile105/Val. El polimorfismo *GSTP1\*C* consta del cambio ocurrido en *B* más una transición de C a T en el nucleótido 341 en el exón 6 que da lugar a un cambio de aminoácido Ala114/Val (Smith *et al.*, 1995; Tsuchida, 1997; Taningher *et al.*, 1999; Krajnovic *et al.*, 2002), ambos cambios se dan en el lugar activo de unión de la enzima al substrato (Ali-Osman *et al.*, 1997). En el caso de *GSTP1\*B* se genera una enzima con actividad disminuida (Zimmniak *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1998) y en el caso de *GSTP1\*C* se genera una enzima con la actividad incrementada (Taningher *et al.*, 1999).

Se han realizado muchos estudios que intentan asociar la variante que genera una reducción de la actividad enzimática (*B*) con la susceptibilidad al cáncer, el estudio de Garte y colaboradores (2001) indicó que la frecuencia de este alelo era de un 26,2% en la población caucásica. Hay que destacar que la sustitución de la isoleucina por la valina se ha asociado a una actividad reducida de conjugación de la enzima (Zimniak *et al.*, 1994). Posteriormente, trabajos realizados por Watson y colaboradores (1998) demostraron una disminución proporcional en la actividad de la GST en tejido de pulmón de individuos con uno o dos alelos portadores de dicha sustitución de aminoácidos. La presencia de *GSTP1* en muchos tejidos diferentes, combinado con su capacidad para inactivar carcinógenos potentes (como los benzo(a)pirenos y los diolepóxidos), sugiere que esta enzima tiene un

papel clave en vías de detoxificación y, como demostraron los trabajos de Harries y colaboradores (1997), el polimorfismo de la *GSTP1* está implicado en una diferente susceptibilidad al cáncer. Además, la alta expresión enzimática que se ha encontrado en tejidos tumorales, asociada a la resistencia de los tumores a los fármacos antitumorales, junto con una menor supervivencia de los pacientes, sugiere que el polimorfismo de *GSTP1* puede presentar un papel importante tanto en la etiología como en la terapia del cáncer.

La familia *GSTO* se clasifica en dos clases *GSTO1* y *GSTO2*. La *GSTO1*, descubierta por Board y colaboradores (2000), presenta algunas particularidades con relación a su función y estructura, en comparación con las demás familias, una de estas es la presencia de un residuo de cisteína en el centro activo de la molécula. El grupo tiol de ésta, le confiere la capacidad de intervenir en un amplio espectro de reacciones de reducción que se desconocía que podían estar al alcance de las GSTs. Basados en los recientes descubrimientos Zakharyan y colaboradores (2001) se dedujo que una de las funciones de esta enzima es la de participar como reductasa en el metabolismo del arsénico.

En el trabajo de Rouimi y colaboradores (2001) se encontró una nueva clase de *GSTO* en algunos sistemas de mamíferos y se denominó *GSTO2*, la cual también está presente en humanos (Whitbread *et al.*, 2003). Tanto la clase *GSTO1* como la *GSTO2* se expresan en todos los tejidos (Yin *et al.*, 2001). Tienen estructuras similares y se encuentran próximas en el genoma, separadas solo por 7,5 Kb en el cromosoma 10, por lo que se piensa que podrían haber sido generadas por duplicación (Whitbread *et al.*, 2003). El mismo autor encontró un pseudogen perteneciente a esta familia en el cromosoma 3 y que se denomina *GSTO3p*.

La familia *GSTO* es polimórfica, en el estudio de Tanaka-Kagawa y colaboradores (2003) se ha conseguido asociar la presencia de polimorfismos con variaciones en la actividad enzimática. Ya se sabe que la sustitución Ala140Asp reduce la actividad tioltransferasa en un 75% y que la sustitución Thr217Asn la reduce en un 40%. La actividad MMA<sup>+5</sup> reductasa del metabolismo del As también se ve disminuida por el cambio Thr217Asn. En los estudios de biomonitorización en que se estudia el gen *GSTO1* (Marnell *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003), se evidencia la existencia de variantes a lo largo del gen, al igual que diferencias en su frecuencia dependiendo de la zona geográfica en que se hace el estudio. En un estudio reciente realizado por Hernández y colaboradores (comunicación personal) en

una población chilena expuesta a As, las diferencias en la excreción de As fueron la base de la clasificación de la población en diferentes grupos, suponiendo que estas variaciones podrían estar relacionadas con diferencias en la susceptibilidad de los individuos y determinadas a su vez por diferentes polimorfismos. En este trabajo se encontraron siete diferentes polimorfismos de *GSTO1-1*, cuatro de ellos ya se habían descrito anteriormente. Entre los polimorfismos nuevos que se describen en este trabajo, se da una especial atención a Glu50Gly, una sustitución no conservativa encontrada exclusivamente entre los individuos que presentaron altos niveles de MMA en la orina. Este nuevo polimorfismo descrito, parece afectar la estabilidad de la proteína, sugiriendo que los individuos portadores podrían presentar diferencias en la reducción de MMA<sup>+5</sup> con las consecuentes implicaciones en cuanto a la susceptibilidad de la exposición al As. La confirmación de dichos resultados requiere un número más elevado de estudios.

## **1.6 ESTUDIOS DE RIESGO GENÉTICO EN POBLACIONES HUMANAS EXPUESTAS AL ARSÉNICO**

Los estudios de riesgo genético evalúan el efecto que tiene una sustancia nociva a nivel genómico. Lo primero es la identificación de la sustancia a evaluar (en este caso el As), luego hay que confirmar su presencia en el ambiente al cual esta expuesta la población de estudio y posteriormente los efectos genotóxicos que se han causado debido a la exposición, todo esto puede realizarse mediante el uso de biomarcadores de los cuales ya se ha tratado anteriormente. En el medio ambiente los contaminantes ocurren en mezclas complejas y son afectados por diversos factores ambientales. Esta situación dificulta su estudio, debido a que es muy difícil reproducir las condiciones de la exposición natural en un laboratorio. Para ello pueden realizarse estudios de biomonitorización, los cuales se detallan a continuación.

### **1.6.1 Estudios de biomonitorización**

En los estudios de biomonitorización, las muestras son tomadas directamente a la población, por lo que se toman en cuenta los factores naturales de exposición como un conjunto real. De esta manera, los estudios de biomonitorización intentan establecer la relación entre los factores ambientales y la salud de una

población de la manera más inequívoca posible. La biomonitorización es una herramienta de valoración que está siendo cada vez más usada en estudios de diversos tipos.

La manera más directa de evaluar el riesgo de la exposición humana a algún elemento o mezcla, consiste en analizar las alteraciones genéticas inducidas en las poblaciones expuestas a estos agentes. Los estudios de biomonitorización, nos proporcionan una estima real de cuál es el riesgo genotóxico ocasionado por una exposición determinada, como puede ser al arsénico, evitando los sesgos generados por los estudios *in vitro* o los estudios *in vivo* utilizando animales de experimentación. En el caso de los compuestos genotóxicos, la biomonitorización utiliza ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad para hacer la evaluación del posible daño genético causado por la exposición.

### **1.6.2 Poblaciones en estudio de riesgo genotóxico**

A continuación se presenta un resumen de los estudios de biomonitorización genotóxica de poblaciones expuestas ambientalmente a As mediante el agua de consumo, en los que se han utilizado MN, CA y SCA como biomarcadores de efecto genotóxico. Para mayor comodidad, la información se ha ordenado según el biomarcador utilizado, MN, CA y SCE. En el caso del estudio de frecuencia de MNs, la información se ha organizado según el tipo de células analizadas, en linfocitos, en mucosa bucal y en células uroteliales.

De los 20 estudios analizados, 12 de ellos estudian la frecuencia de MN como biomarcador de daño genético. Entre ellos, 8 estudian MN en linfocitos (*tabla 1.7*), 6 en células de la mucosa bucal (*tabla 1.8*) y 5 en células uroteliales (*tabla 1.9*). En todos los estudios, la frecuencia de MN en linfocitos y en células uroteliales presenta un aumento significativo al comparar las poblaciones expuestas y control. De los 6 estudios de biomonitorización en que se usan los MN en mucosa bucal como biomarcadores de daño, cuatro de ellos presentan resultados positivos de aumento de la frecuencia de MN y dos presentan resultados negativos.

La frecuencia de CA se analiza en 7 trabajos diferentes (*tabla 1.10*), en los que 5 de ellos presentan resultados positivos y 2 negativos del aumento de la frecuencia de

CA en linfocitos de las poblaciones expuestas comparadas con las poblaciones control. El estudio de los SCE se analiza en 10 estudios (tabla 1.11) entre los que la mitad de ellos presenta resultados positivos y la otra mitad negativos al comparar las frecuencias de SCE entre las poblaciones expuestas y control.

Tabla 1.7: Efectos de la exposición a As medidos con el ensayo de MN en linfocitos

Lugar	N	Niveles de exposición (mg As/L)	Efectos de la exposición	Cita
Argentina	N: 22	0,2	positivo	Dulout <i>et al.</i> (1996)
Chile	E: 107	0,67	positivo	Biggs <i>et al.</i> (1997)
	C: 123	0,015		
Chile	E: 34	0,6 0,045	positivo	Moore <i>et al.</i> (1997a)
Chile	E: 70	0,6	positivo	Moore <i>et al.</i> (1997b)
	C: 55	0,015		
Argentina	N: 86	0,2	positivo	Seoane <i>et al.</i> (1998)
India	E: 45	0,368	positivo	Basu <i>et al.</i> (2002)
	C: 21	0,005		
India	E: 163	0,214	positivo	Basu <i>et al.</i> (2004)
	C: 154	0.003		
Chile	E: 106	0,75	positivo	Martínez <i>et al.</i> (2004)
	C: 111	0,002		

Entre los estudios analizados hay tres realizados en Argentina (Dulout *et al.*, 1996; Seoane *et al.*, 1998; Lerda 1994). Los estudios de Dulout y Seoane cuentan con una población de 22 y 86 individuos respectivamente. Ambos estudios presentan los mismos niveles de exposición de 0,2 mg As/L en agua de consumo humano y se han realizado en una población de mujeres y niños indígenas atacameños y criollos. En ambos trabajos se estudiaron las frecuencias de MN, mediante la técnica de FISH, y de SCE. Los resultados mostraron un aumento en la frecuencia de MN al comparar las poblaciones expuestas y control, observándose claramente los efectos aneugénicos y clastogénicos del As en linfocitos. No se observaron aumentos en la frecuencia de SCE en linfocitos al comparar las poblaciones expuestas y control de ambos estudios.

La población indígena presentó niveles inusualmente bajos en la frecuencia de cáncer de piel y lesiones parenquimatosas, a pesar de su exposición a altas concentraciones de As. Mediante el análisis de las muestras de orina (Seoane *et al.*, 1998) se determinó que los indígenas atacameños presentan un metabolismo diferente al visto en otras poblaciones previamente estudiadas, excretando muy poco MMA. Los resultados obtenidos indican que los efectos encontrados pueden corresponder a diferencias de susceptibilidad individual.

El estudio de Lerda (1994), se realizó en una población de 282 individuos expuesta a 0,13 mg As/L y una población control de 155 individuos con una baja exposición a As (0,02 mg As/L). En este estudio se correlacionó la frecuencia de SCE en linfocitos de sangre periférica con la concentración de As en agua y orina, además se buscó la correlación de SCE con la edad y el sexo de la población. Los resultados indican un aumento en la concentración de As en la orina y en la frecuencia de SCE en la población expuesta, se vio que ni el sexo ni la edad afectan la frecuencia de SCE.

Tabla 1.8: Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de MN en células de la mucosa bucal

Lugar	N	Niveles de exposición (mg As/L)	Efectos de la exposición	Cita	
Méjico	E:	35	0,408	positivo	Gonsebatt <i>et al.</i> (1997)
	C:	34	0,030		
China	E:	19	0,582	positivo	Tian <i>et al.</i> (2001)
	C:	13	0,004		
India	E:	45	0,368	positivo	Basu <i>et al.</i> (2002)
	C:	21	0,005		
India	E:	163	0,214	positivo	Basu <i>et al.</i> (2004)
	C:	154	0,009		
Chile	E:	105	0.750	negativo	Martínez <i>et al.</i> (2005)
	C:	102	0.002		
USA	N:	18	1,300 0,016	negativo	Warner <i>et al.</i> (1994)

Los cinco estudios realizados en Chile que se analizan a continuación (Biggs *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Martínez *et al.*, 2004, 2005), presentan un rango de exposición ambiental que varía entre 0,6-0,75 mg As/L en agua de consumo humano, en las poblaciones expuestas. El estudio de Biggs y colaboradores (1997) se realizó en el Norte de Chile, tomando como expuestos a los residentes de San Pedro de Atacama (0,67 mg As/L) y a los controles de Toconao (0,015 mg As/L). En este trabajo se utilizaron diferentes índices de exposición basándose en el As en orina y en la ingesta de líquido, además de la frecuencia MN en linfocitos de sangre periférica. Los resultados del estudio indicaron que existe un aumento de la frecuencia de MN en linfocitos en la población expuesta, en comparación con la control y que este incremento se correlaciona bastante bien con la concentración de As en la orina.

El trabajo de Moore y colaboradores (1997b) estudió una población de hombres que contaba con 55 controles y 70 expuestos, en los que se estudiaron las frecuencias de MN con la técnica de FISH. Los resultados indican un incremento de MN en la población expuesta. Los MN formados mayormente por fragmentos más que por cromosomas enteros, indican que el As actúa más como clastogénico que como aneugénico. En otro estudio realizado por Moore y colaboradores (1997a), a la población de hombres expuestos a 600 mg As/L se le administró una fuente de agua con niveles reducidos de As (45 mg As/L) por 8 semanas. Los resultados indican que la frecuencia de MN disminuyó al igual que la excreción de As por vía urinaria. Ambos estudios parecen indicar que la ingesta de agua contaminada con As induce daño genético en las células sanguíneas.

Los estudios de Martínez y colaboradores (2004 y 2005) no se presentan en detalle en esta sección debido a que son publicaciones provenientes de esta Tesis Doctoral (anexo 2). En estos trabajos se obtuvieron resultados positivos en el aumento de la frecuencia de MN en linfocitos (Martínez *et al.*, 2004), y un aumento no significativo de la frecuencia de MN en mucosa bucal (Martínez *et al.*, 2005), al comparar las poblaciones expuestas y control.

En la India se han llevado a cabo 4 estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a As a través del consumo de agua (Basu *et al.*, 2002 y 2004; Mahata *et al.*, 2003 y 2004). En el estudio de Basu y colaboradores (2002) un grupo de 45 individuos que presentaron signos cutáneos de arsenicismo con una exposición a As de 0,368 mg As/L en el agua de consumo, se comparó con un

grupo control de 21 personas sanas con niveles de As en agua de 0,005 mg As/L. La exposición a As se confirmó mediante la medición de As en agua, uñas, pelo y orina de los participantes.

El otro estudio de Basu y colaboradores (2004), realizado en Paraganas (India), estudió un grupo de 163 residentes expuestos a niveles de 0,214 mg As/L y un grupo control de 154 individuos en el que los niveles de As en el agua de consumo era de 0,003 mg As/L. En ambos grupos se midieron las frecuencias de MN en linfocitos, en mucosa bucal y en células uroteliales. Los resultados muestran un aumento significativo en la frecuencia de MN en los distintos tipos celulares, indicando que los individuos de Bengala occidental (India), que presentan síntomas cutáneos de arsenicismo, también presentan un nivel de daño citogenético significativo. Así, pues, la exposición crónica a As a través del agua de consumo está ligada al aumento de la frecuencia de MN en todos los tipos celulares estudiados.

Tabla 1.9: Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de MN en células uroteliales

Lugar	N	Niveles de exposición (mg As/L)	Efectos de la exposición	Cita
EEUU	N: 18	1,3 0,016	positivo	Warner <i>et al.</i> (1994)
Méjico	E: 35 C: 34	0,408 0.03	positivo	Gonsebatt <i>et al.</i> (1997)
China	E: 19 C: 13	0,582 0,004	positivo	Tian <i>et al.</i> (2001)
India	E: 45 C: 21	0,368 0,005	positivo	Basu <i>et al.</i> (2002)
India	E: 163 C: 154	0,214 0,009	positivo	Basu <i>et al.</i> (2004)

Dos estudios realizados en Paraganas (India) por Mahata y colaboradores (2003, 2004) analizaron poblaciones de 95 y 320 personas respectivamente, entre expuestos y controles. En ellos, la población estaba expuesta a una concentración de 0,2 mg As/L en el agua de consumo. En ambos estudios se midieron las

frecuencias de CA y SCE y se encontraron aumentos significativos en la frecuencia de ambos biomarcadores al comparar las poblaciones expuestas y control.

El estudio de Tian y colaboradores (2001) se realizó en Ba Men, en la Mongolia interior (China), donde los niveles de As en agua de consumo humano varían entre 0,527 y 0,004 mg As/L. En este estudio se analizaron las frecuencias de MN en linfocitos de sangre periférica, en mucosa bucal y en el septo nasal. Los resultados indican un aumento de la frecuencia de MN en linfocitos, que es 2,7 veces mayor en la población expuesta que en la control. Esta frecuencia aumentó también en los otros tipos celulares, lo que indica que la población de Ba Men, crónicamente expuesta a As en el agua de consumo, revela evidencias de genotoxicidad en los distintos tipos celulares.

Tabla 1.10: Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de CA en linfocitos

Lugar	N	Niveles de exposición (mg As/L)	Efectos de la exposición	Cita
Méjico	E: 35	0,408	positivo	Gonsebatt <i>et al.</i> (1997)
	C: 34	0,03		
Finlandia	E: 42	0,41	positivo	Mäki-Paakkanen <i>et al.</i> (1998)
	C: 8	0,001		
Taiwan	E: 22	0,7-0,93	positivo	Liou <i>et al.</i> (1999)
	C: 22			
India	E: 59	0,2-0,8	positivo	Mahata <i>et al.</i> (2003)
	C: 36	0,006		
India	E: 165	0,214	positivo	Mahata <i>et al.</i> (2004)
	C: 155	0,006		
USA	E: 104	>0,05	negativo	Vig <i>et al.</i> (1984)
	C: 86			
Méjico	E: 11	0,39	negativo	Ostrosky- Wegman <i>et al.</i> (1991)
	C: 13	0,019		

En los EEUU se han realizado dos estudios, en uno se ha analizando las frecuencias de MN (Warner *et al.*, 1994) y el otro las frecuencias de CA y SCE (Vig *et al.*, 1984). Warner y colaboradores realizaron un estudio en Nevada, EEUU, donde una población de 18 individuos expuestos a 1,3 mg As/L fue comparada con una población control con niveles de 0,016 mg As/L. Se midieron MN en mucosa bucal y en células uroteliales. Los resultados revelaron que había un aumento significativo en la frecuencia de MN en células uroteliales, pero no había aumento en los MN de mucosa bucal al comparar las poblaciones expuesta y control. El trabajo realizado por Vig y colaboradores estudió la exposición a niveles superiores a 0,05 mg As/L en agua de consumo humano. En este trabajo se evaluaron las frecuencias de CA en una población de 104 expuestos y 86 controles, y la frecuencia de SCE en una población de 98 expuestos y 83 controles, concluyéndose que no habían diferencias significativas en la frecuencia de CA ni de SCE entre ambas poblaciones.

As en orina 10 veces mayores que los niveles de la población control. Los resultados citogenéticos indicaron que no habían diferencias significativas en la frecuencia de SCE ni de CA. Sin embargo las frecuencias de CA complejas (anillo, dicéntricos y translocaciones) fueron mayores en la población expuesta, que también mostró una mayor frecuencia de variación en el ensayo HGPRT, aunque en ambos casos las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además. los resultados del daño genético causado por las muestras de orina, medios por el ensayo rec en *B. subtilis*, fueron negativos en todas las muestras.

El estudio de Gonsebatt y colaboradores, en una población mejicana, analizó a 35 personas expuestas a niveles de 0,408 mg As/L a través del agua de consumo y una población control de 34 individuos expuestos a 0,03 mg As/L. Se realizó un examen médico para detectar lesiones cutáneas en los participantes. Se determinaron las frecuencias de MN en mucosa bucal y en células uroteliales, CA en linfocitos y As en orina. Los resultados indican un aumento significativo de la frecuencia de MN en ambos tipos celulares; asimismo, la población expuesta también presentó un aumento de la frecuencia de CA al compararla con la población control. Se observó que el efecto era mayor en las mujeres, y se observó un mayor daño citogenético entre aquellas personas que presentaron signos cutáneos de arsenicismo. El tipo de daño citogenético evaluado indica que el As tiene efectos clastogénicos y aneugénicos.

El estudio realizado por el grupo de Ostrosky-Wegman, también en Méjico, analizó una población de 11 individuos expuestos a niveles de 0,39 mg As/L en agua de consumo y 13 individuos control con niveles de exposición de 0,019 mg As/L. Se midieron las frecuencias de SCE, CA, así como el As en orina. En este trabajo también se realizó el ensayo de HGPRT en linfocitos y el ensayo rec en *B. subtilis* con muestras de orina. Los resultados pusieron de manifiesto un aumento en la frecuencia de Mn en ambos tipos celulares, a la vez que un aumento en la frecuencia de CA. Se observó que las mujeres estaban más afectadas que los hombres y un daño mayor entre las que presentaban signos cutáneos de arsenicismo. El tipo de daño citogenético indica que el As presenta efectos clastogénicos y aneugénicos.

Tabla 1.11: Efectos de la exposición al As medidos con el ensayo de SCE en linfocitos

Lugar	N	Niveles de exposición (mg As/L)	Efectos de la exposición	Cita
Argentina	E: 282	0,13	positivo	Lerda (1994)
	C: 155	0,02		
Méjico	E: 35	0,408	positivo	Gonsebatt <i>et al.</i> (1997)
	C: 34	0,03		
Taiwan	E: 15	0,7-0,93	positivo	Hsu <i>et al.</i> (1997)
	C: 34			
India	E: 59	0,2-0,8	positivo	Mahata <i>et al.</i> (2003)
	C: 36	0,006		
India	E: 165	0,214	positivo	Mahata <i>et al.</i> (2004)
	C: 155	0,006		
USA	E: 98	>0,05	negativo	Vig <i>et al.</i> (1984)
	C: 83			
Méjico	E: 11	0,39	negativo	Ostrosky- Wegman <i>et al.</i> (1991)
	C: 13	0,019		
Argentina	N: 22	>0,2	negativo	Dulout <i>et al.</i> (1996)
Argentina	N: 86	0,2	negativo	Seoane <i>et al.</i> (1998)
Taiwan	E: 22	0,7-0,93	negativo	Liou <i>et al.</i> (1999)
	C: 22			

En Taiwan se han llevado a cabo dos estudios en los que se midieron frecuencias de SCE en poblaciones expuestas a niveles de As en agua de consumo entre 0,7 y 0,93 mg As/L (Hsu *et al.*, 1997; Liou *et al.*, 1999). En el estudio realizado por Hsu y colaboradores se analizó una población de 15 individuos con la enfermedad de Bowen y 34 controles sanos. Los resultados indicaron un aumento en la frecuencia de SCE al comparar los dos grupos. Por otro lado, el estudio realizado por Liou y colaboradores presenta una población de 22 pacientes con cáncer y 22 individuos sanos como grupo control y estudia las frecuencias de SCE y CA de tipos cromatídico y cromosómico como biomarcadores de riesgo de cáncer. Los resultados del estudio indican que las CA de tipo cromosómico son un buen biomarcador para el cáncer. También indican que las frecuencias de SCE y las de CA de tipo cromatídico, no lo son.

En un estudio realizado en Finlandia por Mäki-Paakkanen y colaboradores (1998), se analizó la frecuencia de CA en 32 individuos expuestos a una concentración de 0,41 mg As/L en agua de consumo y 10 ex usuarios de las fuentes de aguas contaminadas por un periodo de 2 a 4 meses, que conforman la población de 42 expuestos y una población de 8 controles con niveles de exposición de 0,001 mg As/L. Los resultados muestran un aumento significativo de la frecuencia de CA en linfocitos de la población expuesta

Todos los estudios de biomonitorización genotóxica de poblaciones expuestas a As por medio del agua de consumo que se han analizado, presentan resultados positivos del aumento del daño citogenético medido mediante los ensayos de MN en linfocitos y en células uroteliales. Sin embargo se presentn resultados contradictorios al analizar la frecuencia de MN en células bucales, o al utilizar los ensayos de CA, y de SCE. Hay que destacar que al utilizar los ensayos de MN en células bucales y CA en linfocitos, se presenta una mayor cantidad de resultados positivos en el aumento de la frecuencia de daño citogenético. Esto no se observa al analizar los estudios en que se usó la frecuencia de SCE como indicador de daño.

## 2 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es el de evaluar el posible daño genotóxico de una población expuesta a altas concentraciones de As en el agua de consumo mediante el ensayo de micronúcleos utilizando linfocitos y células de la mucosa bucal. La población estudiada ha sido seleccionada en el norte de Chile, donde hay un problema crónico de elevados niveles de As en el agua de consumo. Los resultados obtenidos en esta población se comparan con los obtenidos en una población control, seleccionada en la ciudad de Concepción, situada 2.000 km al sur del primer lugar de muestreo, en donde no existe contaminación de las aguas por As.

Teniendo en cuenta que el daño genético ocasionado por la exposición ambiental al As puede venir modulado por las características genéticas individuales, otro de los objetivos propuestos ha sido genotipar las poblaciones de estudio para los polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*, para poder evaluar su posible influencia sobre el daño genotóxico analizado.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 POBLACIÓN ESTUDIADA

La población analizada en este estudio ha sido de 217 personas, divididas en dos grupos, que se diferencian en su exposición ambiental al arsénico. En la población expuesta, los niveles ambientales de As en el agua son significativamente altos llegando a ser 3.750 veces mayores en la zona expuesta que en la control.

Las muestras del grupo control fueron tomadas en la ciudad de Concepción, alejada de la zona expuesta unos 2.000 Km hacia el sur de Chile, donde no se detectan niveles ambientales de As, y se asume un nivel traza regional de 0,0002 mg As/L. La población expuesta corresponde a personas residentes en los pueblos de Calama, Peine, San Pedro de Atacama, Socaire y Toconao, donde los niveles de As en las aguas medidos en este estudio han llegado a 0,75 mg As/L.

#### 3.1.1 Grupo expuesto

Como se ha indicado, los individuos expuestos son residentes en la región norte de Chile. Este grupo está formado por un total de 106 personas, de las cuales 24 son hombres y 82 mujeres. La edad media del grupo expuesto es de 40 años.

En la población expuesta hay 50 personas de etnia atacameña, residentes en los poblados de San Pedro de Atacama, Socaire, Peine y Toconao, de las cuales 8 son hombres y 42 mujeres. Por otro lado tenemos 56 personas (16 hombres y 40 mujeres) que no son de etnia atacameña, que habitan mayoritariamente de la ciudad de Calama. La ubicación de los pueblos se presenta en la figura 1.3, donde se encuentran señalados con un punto rojo.

#### 3.1.2 Grupo control

El grupo control consta de 111 personas residentes en la ciudad de Concepción, en el sur de Chile. Este grupo está compuesto por 42 hombres y 69 mujeres, con una edad promedio de 38 años. Entre los individuos control no existen diferencias de etnia, por lo que se consideran como un único grupo.

## **3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Todas las muestras biológicas se tomaron durante el mes de julio de 2001. Las personas que aceptaron participar en el estudio fueron informadas adecuadamente de los objetivos y metodología del mismo y consultadas acerca de su interés y libre voluntad en colaborar, antes de obtener su consentimiento por escrito.

Los individuos que forman el grupo control corresponden a personas que se sometían a un examen médico rutinario. El personal encargado de tomar las muestras se trasladó a la consulta médica para proceder a la obtención de las mismas. En el caso de los individuos expuestos de etnia no atacameña, el equipo de muestreo se trasladó a dos centros de asistencia médica de la ciudad de Calama, concretamente el Consultorio Calama y el Consultorio Alemania, donde se tomaron las muestras de personas que asistían a dichas consultas. En el caso de las personas expuestas de etnia atacameña, el equipo de muestreo se incorporó a la ronda médica del servicio de salud primaria de San Pedro de Atacama, viajando con el equipo médico, formado por un médico, una enfermera y una matrona, quienes cooperaron tanto en la información de los objetivos y metodologías del estudio como en la extracción de las muestras biológicas.

### **3.2.1 Encuesta**

#### **3.2.1.1 Elaboración de la encuesta**

Para obtener la información, tanto individual como general, de las personas incluidas en el estudio, se realizó una completa encuesta diseñada con la finalidad de obtener información detallada acerca de los antecedentes y características personales de cada participante. En líneas generales, la encuesta recoge información que incluye: datos personales, actividad laboral actual y previa, otras actividades, dieta, hábitos toxicológicos (consumo de tabaco, de alcohol, té y café) e historial médico. En el anexo 1 se presenta una copia de la encuesta.

#### **3.2.1.2 Evaluación de la encuesta**

Las encuestas fueron primero codificadas antes de la introducción de la información en una base de datos y, posteriormente, se procedió a su análisis. Así, se obtuvo la descriptiva poblacional de cada uno de los grupos de estudio, y luego

se efectuó el estudio con los resultados obtenidos de los análisis de las muestras biológicas recogidas. La base de datos para este análisis conjunto se realizó con el programa estadístico SPSS versión 11.5, cuyos detalles se indicarán en la sección correspondiente.

## **3.2.2 Muestras de agua**

### **3.2.2.1 Obtención y preparación de las muestras**

Para tener una medida de la exposición ambiental se han tomado muestras de agua de los distintos lugares. En cada pueblo se tomó una muestra de 45 mL de agua de consumo humano a la que se le añadió HNO<sub>3</sub> al 65% para que se conservara en buen estado. Posteriormente las muestras obtenidas se enviaron al laboratorio de higiene y salud ambiental de la Universidad de Göttingen, Alemania, donde fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de fluorescencia atómica (HPLC-AFS), para determinar los niveles totales de As de cada muestra.

### **3.2.2.2 Protocolo de la espectroscopía atómica fluorescente HPLC-AFS**

Para determinar las concentraciones de arsénico en las distintas muestras de agua se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución junto con la espectroscopía de fluorescencia atómica (HPLC). Para este propósito, se conectó un sistema HPLC (520 Bio-Tek Kontron, Neufahrn) a un sistema de generación de hidruro (FIAS 400) y a un espectrómetro de fluorescencia atómica AFS (Excalibur, PS Analytical, Orpington).

El sistema HPLC se usó con una columna PRP-X100 y 30 mM de tampón sodio fosfato (pH 6,0) y el pH se ajustó con NH<sub>4</sub>OH. La generación de hidruro de arsénico se llevó a cabo añadiendo 3 M y 1,5% (w/v) NaBH<sub>4</sub> en 1% (w/v) NaOH con una bomba peristáltica, ambas a un flujo de 1 mL/min. Los As volátiles fueron liberados mediante un separador gas-líquido y transportados a un detector AFS mediante un flujo de argón de 300 mL/min.

Los límites de detección fueron calculados con la desviación estándar de tres pruebas con solución estándar de 1 µg/L. Cada especie fue inyectada 10 veces en un bucle de 100 µL y el valor de la pendiente de la curva de calibración se dividió

por el rango más bajo (0,1-1 ng). Los límites de detección para el  $As^{+3}$  y  $As^{+5}$  fueron de 0,25 y 0,75  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

La validación de este análisis está avalada por la participación del laboratorio del Instituto Médico de Higiene General y Salud Ambiental de la Universidad de Göttingen en el programa bianual de calidad y control interlaboratorios organizado por la Sociedad Alemana de Medicina Ocupacional, para los análisis de toxicología ambiental y laboral y por los estándares internos y externos adoptados.

Los datos obtenidos usados para el análisis posterior de las muestras de agua fueron los mg de As disueltos en 1 litro de agua (mg As/L). Los resultados fueron introducidos en la base de datos general del estudio para su análisis, para el que se ha usado el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

### **3.2.3 Muestras de orina**

#### **3.2.3.1 Obtención y preparación de las muestras**

Las muestras de orina fueron recolectadas junto a las demás muestras, una vez obtenido el consentimiento del donante para ser utilizadas con fines de estudio. Las muestras de orina se recogieron en frascos de plástico estériles de 100 mL de capacidad, luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  y los frascos se guardaron refrigerados a  $4^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Las determinaciones de los niveles de arsénico inorgánico y de sus metabolitos en la orina se llevaron a cabo mediante HPLC-AFS en el Instituto Médico de Higiene General y Salud Ambiental de la Universidad de Göttingen, Alemania.

#### **3.2.3.2 Protocolo**

El sistema HPLC se conectó a un sistema de generación de hidruros (FIAS 400) y a un espectrómetro de fluorescencia atómica (Excalibur, PS Analytical, Orpington). El sistema HPLC se usó con una columna PRP-X100 y 30 mM de tampón sodio fosfato (pH 6,0), ajustándose el pH con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La generación de hidruros de los arsenos se llevó a cabo añadiendo 3 M y 1,5% (w/v)  $\text{NaBH}_4$  en 1,0% (w/v) de  $\text{NaOH}$  con una bomba peristáltica y un flujo de 1 mL/min. Los arsenos volátiles fueron liberados en un separador gas-líquido y transportados a un detector AFS

con un flujo de argón de 300 mL/min. La cuantificación de las especies de As se llevó a cabo usando un integrador Shimadzu C-R6A (Shimadzu, Duisburg). Los límites de detección se calcularon como tres veces la desviación típica de una solución estándar de 1 µg/L, de cada una de las especies, inyectadas 10 veces en un bucle de 100 µL, dividido por la pendiente de la línea de calibración para el rango inferior (0,1-1 ng). Los límites de detección para el As<sup>+3</sup>, DMA<sup>+5</sup>, MMA<sup>+5</sup>, y As<sup>+5</sup> fueron de 0,25; 1,2; 0,5 y 0,75 µg/L, respectivamente. Las muestras fueron analizadas aleatoriamente.

### **3.2.4 Muestras de uñas**

#### **3.2.4.1 Obtención y preparación de las muestras**

Las muestras de uñas se obtuvieron mediante corte de las uñas de los donantes. Se recogieron en *eppendorffs* y se codificaron adecuadamente para su posterior análisis. La concentración de As en las uñas se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) en el Instituto Medico de Higiene General y Salud Ambiental de la Universidad de Göttingen, Alemania.

#### **3.2.4.2 Protocolo**

Para la limpieza y digestión de las muestras y su posterior análisis mediante la técnica de AAS se usaron 60% de ácido nítrico (ultrapuro), 30% de peróxido de hidrógeno (p.a.), acetona (p.a.) y un modificador de matriz de magnesio, (Merck). Se utilizó agua de elevada pureza (0,055 µS cm<sup>-1</sup>) obtenida mediante un sistema de purificación de tipo HP-4 (TKA-Lab). Los estándares para la calibración de la AAS se prepararon con una solución patrón de arsénico (Certipur, Merck).

Las uñas se rasparon para eliminar los restos de suciedad y, en su caso, el esmalte de uñas fué eliminado con acetona. Luego las muestras se limpiaron mediante el método de Karagas (Karagas *et al.*, 1996, 2000) por ultrasonificación en agua de alto grado de pureza durante 10 minutos. Después, las uñas fueron lavadas tres veces con agua de elevada pureza. Se controló la limpieza de las muestras usando una lupa, se realizó ultrasonificación extra en caso de impurezas y, en su caso, se cortaron aquellos trozos que no se habían podido limpiar completamente. Las uñas fueron secadas en un horno a 65°C durante toda la noche. Luego fueron pesadas y digeridas en un sistema microondas de digestión (mls 1200 mega,

Microwave Laboratory Systems). Posteriormente se agregó a la mezcla 1 mL de ácido nítrico ultrapuro al 60% (Merck), 0,5 mL de peróxido de hidrógeno (p.a., Merck), y 0,75 mL de agua de alta pureza. El programa de digestión en el sistema de microondas consistió en 6 pasos: 3 min a 250 W, 1 min a 0 W, 4 min a 250 W, 5 min a 500 W, 3 min a 400 W y 4 min a 300 W. Después de enfriarse, la muestra fue diluida (1:5) con agua de alto nivel de pureza y analizada en un horno de grafito AAS (SIMAA 6000, Pekin Elmer). El límite de detección fue de 1 µg As/L.

### **3.2.5 Ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica**

#### **3.2.5.1 Obtención y preparación de las muestras**

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa y se guardaron en tubos de extracción (*vacutainers*) heparinizados, previamente identificados con el código de cada uno de los donantes. Las muestras fueron enviadas inmediatamente por vía aérea a la Universidad de Concepción, Chile, donde se realizaron los cultivos y se hicieron las preparaciones, cuya evaluación se llevó a cabo en su totalidad en la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

#### **3.2.5.2 Protocolo**

Después de homogeneizar la muestra, se agregaron 0,5 mL de sangre total a 4,5 mL de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomicina) y 1% de L-glutamina. Los distintos productos químicos fueron obtenidos de la casa Gibco. Los linfocitos se estimularon con un 1% de fitohemaglutinina. Como es habitual en este tipo de estudios, los cultivos se realizaron por duplicado.

Los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 h, lo que corresponde a dos ciclos celulares. Pasadas 44 h, se agregaron 10 µL de citocalasina B (Sigma), a una concentración final de 6 µg/mL. Se ha demostrado que esta concentración permite detener la citocinesis de forma óptima, resultando mejores valores del índice de división celular y una mejor estima de la frecuencia de MN, al evitarse la sobrevaloración ya que se pueden diferenciar con mayor precisión las células correspondientes a la segunda división mitótica (Surrallés *et al.*, 1994).

Pasadas 72 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron a 101,8  $\times g$  durante 8 min. Después de aspirar el sobrenadante, las células fueron sometidas a choque hipotónico mediante una solución de KCl 0,075 M fría a 4°C, agitando enérgicamente con el vórtex; de esta manera se eliminan los hematíes preservando el citoplasma de los leucocitos.

Después de centrifugar nuevamente los tubos en las mismas condiciones y eliminar el sobrenadante, se procedió a la fijación de las células con una solución de metanol y ácido acético fría en proporción 3:1 (vol/vol), recién preparada, agregándola suavemente para evitar la formación de precipitados celulares. Se centrifugó nuevamente para eliminar el sobrenadante, repitiendo el proceso dos o más veces hasta que el botón celular quede suficientemente limpio.

El botón celular se resuspendió en una pequeña proporción de la solución de fijación y se goteó sobre un portaobjetos limpio. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche, para luego ser teñidas con una solución al 10% de Giemsa (Merck) en tampón fosfato (pH 6,8) durante 10 minutos. Después de lavadas y secadas al aire, las preparaciones se sellaron con un cubreobjetos utilizando Entellan.

Una vez teñidas, las preparaciones fueron examinadas para determinar la frecuencia de MN. Los portaobjetos de todos los individuos, tanto expuestos como controles, se codificaron antes de su análisis para evitar al máximo la subjetividad en el recuento. A modo de ejemplo, en la figura 3.1 se presentan dos imágenes en las que se pueden ver con claridad, linfocitos binucleados con MN. Estas imágenes se han obtenido utilizando los métodos descritos y la foto se ha realizado conectando una cámara fotográfica al microscopio, por lo que la imagen que se presenta es equivalente a las obtenidas durante el conteo.

De cada individuo se analizaron 1.000 células binucleadas con el citoplasma bien conservado, 500 por cada réplica de cultivo. La observación de los núcleos se realizó en un microscopio óptico (Leitz Aristoplan, Alemania) con el objetivo de 1.000 aumentos. En el recuento se agruparon las células, según el número de MN que presentaban, para determinar tanto el número de células binucleadas con micronúcleos (CBMN) como el número total de MN.

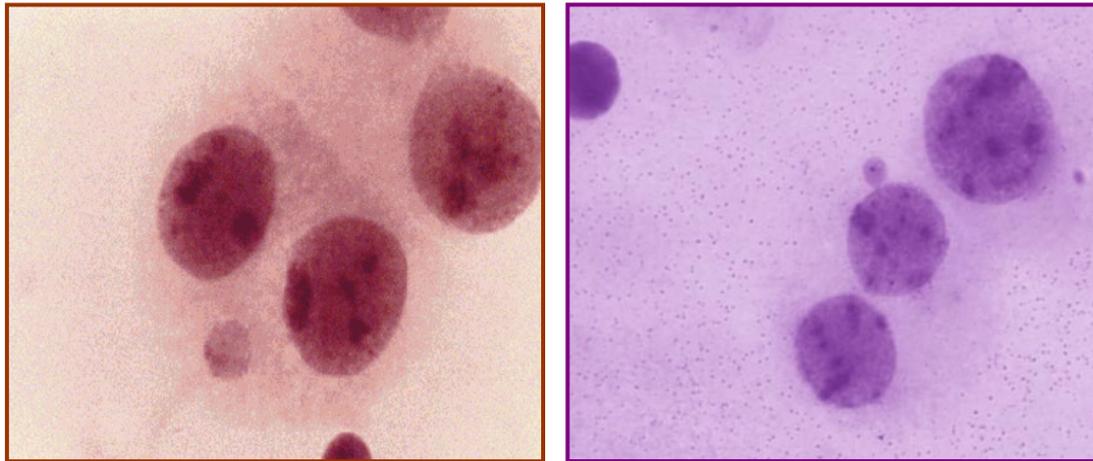


Figura 3.1: Imágenes de linfocitos binucleados con MN

También se procedió a determinar el parámetro conocido como índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI), para detectar efectos de citotoxicidad. El CBPI (*cytokinesis block proliferation index*) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CBPI} = [M1 + 2 M2 + 3 (M3 + M4)] / N$$

donde M1 a M4 representan el número de células con uno a cuatro núcleos, respectivamente, y N es el número total de células contadas. Las células con tres y cuatro núcleos se han considerado equivalentes y correspondientes a la tercera división mitótica (Surrallés *et al.*, 1995a).

### 3.2.6 Ensayo de MN en células de mucosa bucal

#### 3.2.6.1 Obtención y preparación de las muestras

Antes de obtener las muestras, cada donante se enjuagó la boca con agua corriente para eliminar posibles restos de alimentos. Las células de descamación de la mucosa bucal se obtuvieron raspando el interior de las mejillas con un cepillo dental suave, evitando tocar la lengua y los dientes. Estas muestras fueron inmediatamente disueltas en 20 mL de solución tampón PBS (solución salina fosfatada), apretando el cepillo contra la pared del tubo para obtener el mayor número posible de células. Luego fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis en los laboratorios del grupo de Mutagénesis de la

Unidad de Genética de la Universidad Autónoma de Barcelona, en donde se procedió a su análisis y evaluación. El protocolo aplicado se detalla a continuación.

### 3.2.6.2 Protocolo

Las muestras de mucosa bucal se centrifugaron durante 10 minutos a 473,9  $\times$ g, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 15 mL de PBS. Se volvieron a realizar 2 lavados más. Luego se añadieron 15 mL de tampón (0,1M EDTA, 0,01M tris-HCl, 0,02 M NaCl, pH = 7) y se centrifugó durante 15 minutos a 473,9  $\times$ g, repitiendo este último paso hasta tres lavados. Acabado el tercer lavado, se aspiró el sobrenadante dejando una cantidad suficiente de tampón para tener una concentración suficiente de células. Los lavados con el tampón ayudan a inactivar las DNAsas endógenas presentes en la cavidad oral y eliminan las bacterias y restos celulares que pueden interferir en el recuento (Titenko-Holland *et al.*, 1994). Para gotear las preparaciones, se pusieron 4 portaobjetos por muestra a calentar en una placa calefactora a 55°C durante 15 min.

Para comprobar que la concentración celular era la adecuada, se realizaron goteos de prueba para cada donante, con gotas de 50  $\mu$ L de muestra, y se determinó la concentración celular mediante observación al microscopio óptico. Los portaobjetos de prueba se dejaron secar durante 15 min en la placa calefactora, después de ser goteados se introdujeron en metanol al 80% durante 5 min a 0°C, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se observaron al microscopio de contraste de fases. Cuando la densidad celular era insuficiente, la muestra se concentró mediante centrifugación, y cuando la muestra estaba muy concentrada, se diluyó con tampón y se repitió el procedimiento hasta obtener la concentración deseada. Una vez conseguida la concentración adecuada, se prepararon tres portaobjetos por muestra, con un total de 3 gotas de 50  $\mu$ L cada uno (9 gotas por muestra).

Para secar las muestras, los portaobjetos se gotearon sobre la placa a 55°C y se dejaron durante 15 minutos, luego se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Para su fijación, las muestras se introdujeron en metanol a una temperatura de 0°C durante 15 min, transcurrido ese tiempo, las preparaciones se sacaron del metanol y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Una vez que estaban bien secas, se guardaron a -20°C hasta su evaluación.

La evaluación de las muestras de mucosa bucal se realizó mediante observación microscópica de los portaobjetos previamente codificados, para realizar el estudio “a ciegas”. Las muestras fueron teñidas con DAPI (4'6-diamidina-2-fenilindol), una solución específica que detecta DNA. De cada muestra se evaluaron 2000 células mononucleadas, en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50, Japón) con aumento  $\times 1000$ . Cada muestra fue examinada por dos personas (1000 células cada una) para disminuir el sesgo en la evaluación debido a la percepción individual. Los criterios seguidos para la evaluación de los MN fueron los propuestos por Titenko-Holland (1998). Los resultados fueron introducidos en una base de datos para su posterior análisis estadístico. En la figura 3.2 se presentan dos fotos en las que se pueden ver con claridad dos de células de la mucosa bucal con MN obtenidas mediante los métodos descritos.

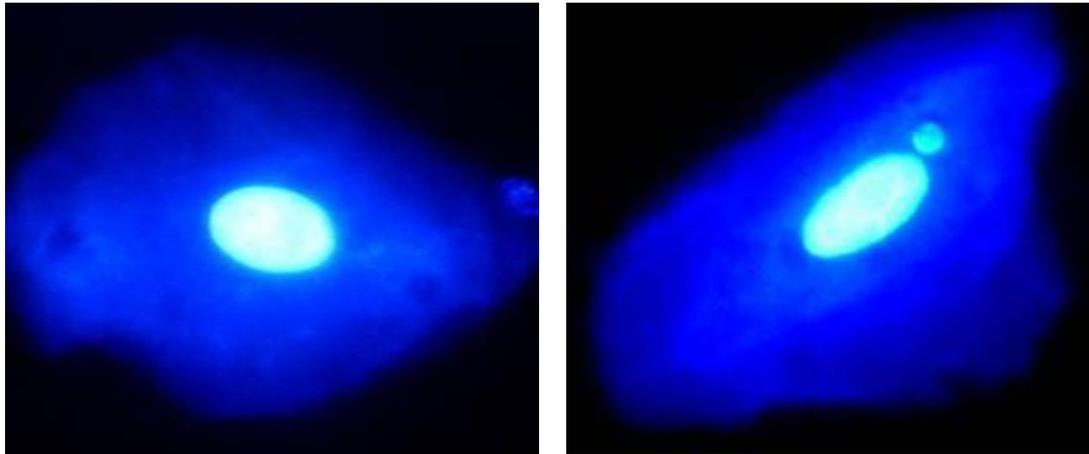


Figura 3.2: Imágenes de células bucales con y sin MN

### 3.2.7 Análisis de las glutathion S-transferasas

#### 3.2.7.1 Obtención y preparación de las muestras

Para el análisis de los genotipos de las GSTs se obtuvieron muestras de sangre de cada uno de los individuos que participaron en el estudio. Las muestras fueron recogidas por una enfermera mediante punción venosa y se guardaron en tubos de extracción (*vacutainers*) con EDTA, previamente identificados con el código de cada uno de los donantes. Las muestras fueron enviadas por vía aérea a la Universidad Autónoma de Barcelona, donde se extrajo el DNA y se realizó el

análisis. La identificación de los genotipos *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* se hizo simultáneamente mediante una PCR múltiple, siguiendo el protocolo seguido por Hernández y colaboradores (2003).

### 3.2.7.2 Protocolo

Para realizar el análisis de los polimorfismos, lo primero fue extraer el DNA de cada una de las muestras de sangre, mediante el siguiente protocolo:

#### **Extracción de DNA a partir de muestras de sangre**

**Para lavar la muestra:** se pusieron 4 mL de sangre y 6 mL de suero fisiológico en tubos de 10 ml, se centrifugó 8 min a 994,3  $\times g$  a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y enrasó hasta 10 mL con tampón de lisis de eritrocitos (TLE) que se prepara con 5 mL de Tris 2M pH 7,5 (Roche Diagnostics), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1M (Panreac Química SA) y enrasando hasta 500 mL con agua miliQ. Se agitó suavemente y se dejó en hielo durante 5 min, luego se centrifugó 15 min a 1431,8  $\times g$  y a 4°C. Se aspiró el sobrenadante, se enrasó hasta 10 mL con TLE, se agitó suavemente hasta disolver el botón y luego se centrifugó 15 min a 1431,8  $\times g$  y a 4°C, esto se repitió 3 o 4 veces (hasta que el sobrenadante quedó transparente). Finalmente se aspiró el sobrenadante.

**Digestión de las proteínas:** dependiendo del tamaño del botón se agregó lo siguiente: botón pequeño: 3 mL de tampón de lisis de linfocitos (TLL), 200  $\mu$ L de SDS 10% y 500  $\mu$ L de proteinasa K (PK) (Roche). Botón grande: 6 mL de TLL, 400  $\mu$ L de SDS 10% y 1.000  $\mu$ L de PK. Luego, se agitó con el vórtex hasta obtener una solución de aspecto homogéneo y se dejó en la estufa a 37°C toda la noche (máx. 18 h). La solución de TLL se preparó con 40 mL de NaCl 5M (Panreac Química SA), 4 mL de EDTA 0,25 M a pH 8,0 (USB Corporation), 2,5 mL de Tris 2M a pH 7,5 (Roche Diagnostics) y se enrasó hasta 500 mL con agua miliQ. La solución de PK se preparó con 100 mg de proteinasa K (Roche Diagnostics), 5 mL de SDS 10%, 400  $\mu$ L de EDTA 0,25 M a pH 8,0 (USB Corporation) y se enrasó hasta 50 mL con agua miliQ.

**Extracción del DNA:** se agregó 1 mL de solución saturada de NaCl 5M (Cymit Química), se agitó en el vórtex 15 - 20 s, hasta obtener una emulsión, se centrifugó 15 min a 1948,7  $\times g$  a 4°C. Luego se decantó el sobrenadante a otro tubo

de 10 mL y se volvió a centrifugar durante 15 min a 1948,7  $\times g$  a 4°C, para eliminar definitivamente el exceso de sales. El sobrenadante se repartió en dos tubos de polipropileno (que resisten el cloroformo) de 10 mL, se agregó v/v de cloroformo (Carlo Erba Reagenti) (aprox 4 mL) a cada una de las muestras y para separar las proteínas del DNA, se agitó manualmente y con suavidad durante 15 a 20 s; después se centrifugó 15 min a 1948,7  $\times g$  a 4°C. Se traspasó la fase superior a un tubo de 30 mL con una pipeta *Pasteur*. Se agregó etanol absoluto en proporción 2v/v (8 mL aprox), tomando el tubo con los dedos desde ambos extremos se subió y bajó uno y otro extremo respectivamente agitando con suavidad, hasta que apareció la “medusa” de DNA, que se dejó 1/2 h (o toda la noche si no se veía “medusa”) a -20°C para obtener una mejor precipitación del DNA. Se cerró una pipeta *Pasteur* con fuego, se pescó el DNA con la punta cerrada de la pipeta, se sumergió el DNA en etanol 70% y luego en etanol 100%, se dejó secar el DNA un momento en la punta de la pipeta (hasta que se puso un poco transparente). Finalmente se pusieron 50  $\mu L$  de TE (Tris 10mM-EDTS 0,2 mM) en un ependorf, se sumergió la punta de la pipeta en el TE y se movió un poco hasta que el DNA se desprendió y se dejó 2 h a 37°C. Luego, las muestras fueron guardadas a 4°C hasta su utilización en la PCR. La solución de TE se preparó con 250  $\mu L$  de Tris 2M a pH 7,5 (Roche Diagnostics), 40  $\mu L$  de EDTA 0,25 M a pH 8,0 (USB Corporation) y se enrasó hasta 50 mL con agua miliQ.

**PCR multiple:** se amplificó 1 $\mu L$  de DNA en un volumen de reacción de 25  $\mu L$  que contenía 0,2 mM de cada dNTP (GeneCraft), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1x tampón de PCR (KCL 10 mM + Tris-HCL 20 mM con pH 8,8 a 25°C + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM +Tritón X-100 0,1%) (Promega), 1 U Taq polimerasa (Promega), 0,5  $\mu M$  de los cebadores que amplifican las regiones de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, y 0,56  $\mu M$  de los cebadores que cubren el *GSTP1*. También se utilizó un cebador reverso adicional que junto con el cebador directo de *GSTM1*, amplifica una región de 175 pb usada como control de amplificación. En la tabla 3.1 se indica la secuencia de los cebadores utilizados y la longitud de los productos amplificados en pares de bases (pb), además del tamaño de los fragmentos antes y después de ser digeridos por la enzima BsmA1. Las secuencias de los cebadores se han obtenido de Kristensen *et al.* (1998), excepto *GSTT1* que se ha obtenido de Krajnovic *et al.* (1999). Todos los cebadores han sido sintetizados por Tib Molbiol Syntheselabor y distribuidos por Roche Diagnostics S.L.

Tabla 3.1: Cebadores utilizados en la PCR múltiple para la detección de los genotipos *GST* estudiados.

Gen	Cebador	Secuencia	Antes (pb)	Después (pb)
<i>GSTM1</i>	Directo	5' CTGCCCTACTTGATTGATG 3'		
<i>GSTM1</i>	Reverso	5' CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3'	275	195 +80
<i>GSTmu2</i>	Reverso	5' GACTCACTCTGAGCATAGCAC 3'	175	175
<i>GSTT1</i>	Directo	5' GCCCTGGCTAGTTGCTGAAG 3'		
<i>GSTT1</i>	Reverso	5' GTATCTGATTTGGGGACCACA 3'	112	112
<i>GSTP1</i>	Directo	5' TCCTTCCACGCACATCCTCT 3'		
<i>GSTP1</i>	Reverso	5' AGCCCCTTTCTTTGTTTCAGC 3'	294	294 (A) 234 +60 (G)

Antes: producto de amplificación antes de la digestión por la enzima BsmA1.

Después: producto de amplificación antes de la digestión por la enzima BsmA1.

Las condiciones de la PCR consisten en un paso de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación a 51°C y una extensión de 45 s a 72°C. Un paso de extensión final durante 5 min a 72°C termina el proceso de amplificación (tabla 3.2). Todo el análisis se llevó a cabo en un termociclador Programmable Thermal Controller PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

Tabla 3.2: Ciclos de amplificación de la PCR múltiple para las GSTs

Ciclos	Temp.	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Desnaturalización	} x 32	94 °C
Hibridación		51 °C
Extensión		72 °C
Extensión final	72 °C	5 min

El producto de la PCR fue después digerido a 55°C durante toda la noche con la enzima de restricción BsmA1 (New England Biolabs). Las condiciones de digestión se estipularon usando como referencia las indicaciones de la casa comercial: en un volumen total de 70 µL, se incubaron 5 U de la enzima con 1x tampón de digestión (New England Biolabs) y 16 µL del producto de la PCR anterior.

Para diferenciar las muestras homocigotas de las heterocigotas se ha utilizado la enzima BsmA1 que tiene una diana de restricción en el fragmento amplificado del gen *GSTP1* y lleva a la sustitución (A113G), de forma que se genera un corte en las bandas de aquellas muestras en que esté presente el alelo con la sustitución; de este modo se pueden diferenciar los homocigotos salvajes (por la presencia de una sola banda), de los heterocigotos (por la presencia de las dos bandas, cortada y sin contar) y de los homocigotos para el cambio de base (por la presencia de una sola banda cortada). Además, la enzima siempre cortará el fragmento amplificado del gen *GSTM1*, de forma que indica que el proceso de digestión ha ocurrido satisfactoriamente. En cuanto a los genotipos *GSTM1* y *GSTT1*, los individuos se clasificaron por la presencia o ausencia de las bandas específicas para esos dos genes. La ausencia de amplificación determina los genotipos nulos (delección homocigota del gen), mientras que la presencia de las bandas corresponde a los sujetos con al menos una copia del gen.

La detección de todos los fragmentos amplificados y digeridos se realizó a partir de 12 µL de producto de digestión en 3 µL de tampón de carga (10% de TAE 50x, 30% de glicerol –Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,– y 60% de agua miliQ, todo teñido con azul de bromofenol –Sigma, MO, EEUU–) cargados en un gel al 3,5% de agarosa Metaphor (Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland) y teñido posteriormente con una solución 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Pharmacia Biotech AB) durante 15 a 20 min. La electroforesis se llevó a cabo a 120 voltios durante aproximadamente 2 h, y el tamaño de las bandas se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools). En la figura 3.3 se presenta la foto de un gel de electroforesis, tras la digestión para la determinación de los genotipos *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. En este gel se han corrido muestras seleccionadas de los diferentes genotipos para ser utilizado como ejemplo.

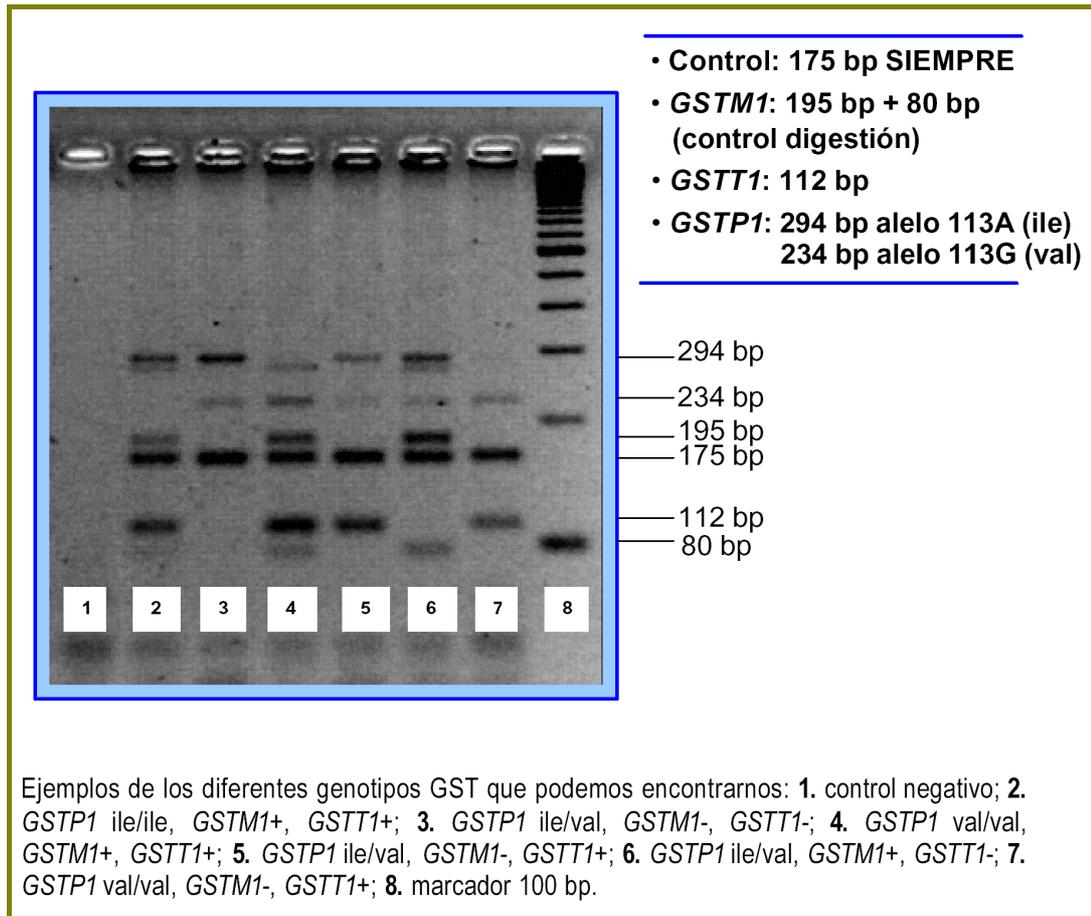


Figura 3.3: Gel de electroforesis para la determinación de los genotipos *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*

### 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio, primero se confeccionó una completa base de datos incluyendo tanto los datos obtenidos a través de la encuesta, como los resultados de los análisis de las muestras realizados en el laboratorio. La base de datos se confeccionó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11.5 (SPSS, Chicago, EEUU).

Aparte del análisis de los grupos expuesto y control, y debido a que dentro del grupo expuesto hay dos etnias claramente definidas, los individuos expuestos se han analizado por separado entre expuestos atacameños y expuestos no atacameños. Para realizar un análisis más detallado, cada grupo de exposición y etnia se ha dividido por sexos y se han analizado hombres y mujeres por separado para ver posibles diferencias entre ellos. La población muestreada se ha analizado

también según su lugar de residencia. La población control proviene de la ciudad de Concepción y se ha analizado siempre como un solo grupo.

Para determinar la significación estadística de los resultados, en el caso de que la variable tuviera una distribución normal de los datos se ha aplicado la *t* de Student y, en el caso que los datos no presentaran una distribución normal, se ha empleado la prueba de Mann-Whitney. En ambos casos el nivel de confianza escogido ha sido de un 95%.

Para determinar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (de una muestra) a la variable dependiente estudiada en cada uno de los grupos. En los casos en que los datos no presentaban una distribución normal, se trataron de transformar para conseguir la normalidad. Las variables concentración de As en uñas, MN en linfocitos y en mucosa bucal, se transformaron mediante la raíz cuadrada.

Para determinar los posibles factores de confusión en los análisis efectuados, las distintas variables se han introducido en modelos estadísticos capaces de determinar cuál es su efecto sobre la variable dependiente objeto de estudio. La selección de los factores de confusión se ha realizado mediante *backward* manual.

En los análisis de varianza univariante, se usó la suma de cuadrados tipo III, para que los factores incluidos en el mismo se considerasen de forma independiente para su análisis. Los factores de confusión que se han considerado en estos modelos se han introducido como covariables.

Los micronúcleos en linfocitos y la concentración de As en uñas se han analizado mediante un análisis de varianza univariante, mientras que el CBPI se ha analizado mediante una regresión lineal múltiple. Los MN en mucosa bucal se han estudiado mediante los dos modelos y en ninguno de los casos se han detectado factores de confusión, por lo que no se presenta el modelo estadístico para esta variable.

La etnia poblacional presenta una alta correlación con la exposición ( $R=0,560$ ), por lo que para analizar ambas características en el modelo estadístico, se ha creado una variable denominada “expoetnia” en la cual se encuentran los siguientes grupos; control (C), expuesto atacameño (EA) y expuesto no atacameño (ENA). De este modo se pueden analizar ambos factores de manera conjunta.

Para analizar los resultados de los genotipos de las poblaciones, estos se han introducido como variables de confusión en los modelos estadísticos para el análisis del daño genético, pero no se han obtenido resultados estadísticamente significativos. Se ha hecho una distribución de frecuencias del polimorfismo en los diferentes locus. También se ha realizado un análisis de regresión logística binaria, en la que se obtuvieron los valores de *odds ratio* (OR) para cada grupo de estudio, se ha trabajado con el 95% de confianza. Para el análisis de los diferentes genotipos además de analizar cada genotipo por separado se realizó el análisis de todas las combinaciones que incluyeran algún genotipo mutado (tabla 3.3). Estos grupos se han realizado basándose en la presencia de los distintos genotipos de riesgo, estos son la ausencia de *M1* y *T1* y en el caso de *GSTP1* la presencia del polimorfismo mutante *val/val* o *ile/val*. En los tres últimos casos, se presenta la ausencia de los genotipos *M1* y/o *T1* con al menos una copia del gen mutado en *P1*.

El análisis de la frecuencia de polimorfismos de *GST* en los locus *M1*, *T1* y *P1* mediante *odds ratio*, se ha realizado en una población total de 215 personas, se han comparado según grupos de exposición, etnia y en relación con el número de MN, tanto en linfocitos como en mucosa bucal. Primero se analizó la frecuencia genotípica para los grupos de exposición. Para ello, los grupos expuesto y control se estudiaron en grupos de 104 y 111 individuos respectivamente. La población también se ha analizó según su etnia, así, se agruparon todos los individuos de etnia atacameña (50 personas) y se compararon con los no atacameños independientemente de su exposición (167 personas).

Para determinar si había alguna relación clara entre los niveles de daño citogenético y el genotipo de la población, esta se ordenó según su frecuencia de daño, en ambos tipos celulares. Para ello se analizaron los genotipos comparando los grupos de los extremos (bajo el percentil 25 y sobre el percentil 75) y los grupos bajo y sobre la media. Sin embargo, se ha decidido presentar los resultados correspondientes a la comparación de los grupos de los extremos, por presentar datos más significativos.

Tabla 3.3: Genotipos *GST* estudiados

Código	Genotipo <i>GST</i> estudiado
<i>M</i> <sup>+</sup>	<i>GSTM1</i> presente
<i>M</i> <sup>-</sup>	<i>GSTM1</i> ausente
<i>T</i> <sup>+</sup>	<i>GSTT1</i> presente
<i>T</i> <sup>-</sup>	<i>GSTT1</i> ausente
<i>ile/ile</i>	homocigosis del gen salvaje en <i>GSTP1</i>
<i>ile/val</i>	heterocigosis en <i>GSTP1</i>
<i>val/val</i>	homocigosis del gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>M</i> , <i>T</i> <sup>-</sup>	<i>GSTM1</i> ausente y <i>GSTT1</i> ausente
<i>M</i> , <i>ile/ile</i>	<i>GSTM1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje <i>GSTP1</i>
<i>M</i> , <i>ile/val</i>	<i>GSTM1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>M</i> , <i>val/val</i>	<i>GSTM1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>T</i> , <i>ile/ile</i>	<i>GSTT1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje <i>GSTP1</i>
<i>T</i> , <i>ile/val</i>	<i>GSTT1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>T</i> , <i>val/val</i>	<i>GSTT1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>MT</i> , <i>ile/ile</i>	<i>GSTM1</i> ausente, <i>GSTT1</i> ausente y homocigosis del gen salvaje <i>GSTP1</i>
<i>MT</i> , <i>ile/val</i>	<i>GSTM1</i> ausente, <i>GSTT1</i> ausente y heterocigosis en el gen <i>GSTP1</i>
<i>MT</i> , <i>val/val</i>	<i>GSTM1</i> ausente <i>GSTT1</i> ausente y homocigosis en el gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>M</i> , <i>val</i>	<i>GSTM1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>T</i> , <i>val</i>	<i>GSTT1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>
<i>MT</i> , <i>val</i>	<i>GSTM1</i> ausente, <i>GSTT1</i> ausente y al menos una copia del gen mutado en <i>GSTP1</i>

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Los datos poblacionales que aquí se presentan han sido obtenidos a partir del análisis de las encuestas efectuadas a cada una de las personas incluidas en el estudio. El modelo de cuestionario utilizado se adjunta en el anexo 1. En esta sección se presentan las características poblacionales más importantes y que se han considerado como posibles factores de confusión en el análisis de las variables en estudio. Las tablas se estructuran considerando la población expuesta (E) y la población control (C). Debido a que en la población expuesta se distinguen claramente dos grupos étnicos, el grupo expuesto de 106 personas se divide en dos subgrupos, uno compuesto por 50 atacameños (EA) y el otro por 56 no atacameños (ENA). El grupo control se ha evaluado siempre como un solo grupo de 111 personas. También se han analizado las poblaciones de hombres y mujeres por separado. En la tabla 4.1 se presentan los distintos grupos de análisis.

Después de hacer un análisis de las distintas variables, se ha considerado que los posibles factores de confusión a tener en cuenta en este estudio son los siguientes: la edad, el sexo, el consumo de té, de café y de pescado. Dado que la incidencia de cáncer entre familiares podría ser un indicador de una cierta sensibilidad frente a la exposición a agentes genotóxicos, la variable “cáncer entre familiares” indica los casos de parientes directos que hayan sufrido la enfermedad. También se han incluido en el estudio el hábito de fumar, y el consumo de alcohol, aunque no se ha revelado como un factor de confusión al realizar el análisis correspondiente. Las variables indicadas se presentan en las tablas 4.2 a 4.5, en las que se describe la población para los diferentes grupos analizados, comparando grupos de exposición, etnia, sexo y lugar de residencia.

#### 4.1.1 Descripción poblacional

En la tabla 4.2 se presenta la descripción de la población correspondiente a los grupos expuesto y control. La población expuesta se compone de dos grupos étnicos, los atacameños y los no atacameños. Para que la consulta de los datos sea más informativa, en las tablas 4.3 y 4.4 se presenta la información de la

descripción poblacional relativa a hombres y mujeres, respectivamente, tomando en consideración la exposición y la etnia de cada uno de los grupos. La tabla 4.5 muestra la descriptiva poblacional según el lugar de residencia. En todas las tablas, los valores de las medias se presentan junto con el error típico y los valores de N (tamaño de la muestra) se presentan junto al porcentaje respecto de la población total analizada. Para determinar la significación estadística de los datos para las variables edad, sexo, tamaño de la población, consumo de pescado y cáncer entre familiares se ha usado la prueba *t* de Student; para las variables consumo de tabaco y cigarrillos, consumo de alcohol, de té y de café se ha usado la prueba de Mann-Whitney.

Tabla 4.1: Grupos de análisis

Abreviatura	Grupos de análisis
C	control
E	expuesto
EA	expuesto atacameño
ENA	expuesto no atacameño
HC	hombres control
MC	mujeres control
HE	hombres expuestos
ME	mujeres expuestas
HA	hombres atacameños
MA	mujeres atacameñas
HNA	hombres expuestos no atacameños
MNA	mujeres expuestas no atacameñas
SP	San Pedro de Atacama
T	Toconao
P	Peine
S	Socaire
Ca	Calama
C	Concepción (control)

Tabla 4.2: Descripción poblacional

<b>Población:</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>EA</b>	<b>ENA</b>
<b>Nº de personas:</b>	111 (100%)	106 (100%)	50 (47%)	56 (53%)
<b>Edad:</b>				
años	37,68 ± 1,08	39,5 ± 1,31	40,2 ± 2,22	38,87 ± 1,51
<b>Sexo:</b>				
hombres	42 (37,8%)	24 (22,6%) <sup>C</sup>	8 (16%) <sup>**C</sup>	16 (28,6%)
mujeres	69 (62,2%)	82 (77,4%)	42 (84%)	40 (71,4%)
<b>Consumo de alcohol:</b>				
g por semana	29,86 ± 4,12	17,1 ± 4,5 <sup>***C</sup>	25,8 ± 8,9	9,18 ± 2,6 <sup>***C</sup>
<b>Consumo de té y café (tazas por día):</b>				
té	1,47 ± 0,12	1,63 ± 0,12	1,54 ± 0,13	1,71 ± 0,2
café	2,05 ± 0,18	0,73 ± 0,14 <sup>***C</sup>	0,32 ± 0,08 <sup>***C</sup>	1,11 ± 0,24 <sup>**EA, **C</sup>
<b>Hábito de fumar:</b>				
no fumador	64 (57,7%)	78 (74,3%)	43 (86%)	35 (63,6%)
ex fumador	11 (9,9%)	7 (6,7%)	3 (6%)	4 (7,3%)
fumador	36 (32,4%)	20 (19%) <sup>**C</sup>	4 (8%) <sup>***C</sup>	16 (29,1%) <sup>**EA</sup>
no disponibles	0	1	0	1
<b>Consumo de cigarrillos por día:</b>				
toda la población	2,46 ± 0,45	1,83 ± 0,41 <sup>**C</sup>	0,92 ± 0,48 <sup>***C</sup>	2,65 ± 0,64 <sup>**EA</sup>
sólo fumadores	4,81 ± 0,5	7,65 ± 1,3	8,75 ± 3,9	7,38 ± 1,37
<b>Consumo de pescado:</b>				
ingesta semanal	1,01 ± 0,07	0,55 ± 0,07 <sup>***C</sup>	0,08 ± 0,04 <sup>***C</sup>	0,96 ± 0,04 <sup>***EA</sup>
<b>Cáncer entre familiares (% de casos):</b>				
no	62 (55,9%)	77 (73,3%)	41 (82%)	36 (65,5%)
sí	49 (44,1%)	28 (26,7%) <sup>**C</sup>	9 (18%) <sup>***C</sup>	19 (34,5%)
no disponibles	0	1	0	1

Los valores de N se presentan junto al % en relación con el total de casos. Las medias se acompañan del error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

**Tamaño de la población:** tanto el grupo de expuestos como el control presentan un tamaño similar, un poco superior a los 100 individuos (106 y 111, respectivamente). En el caso de la división por etnias del grupo expuesto, podemos ver que las poblaciones de atacameños y no atacameños también son similares entre sí en número, presentando un tamaño de 50 y 56 personas cada uno. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar el tamaño poblacional de los grupos expuesto y control, así como el de los expuestos atacameños con el de los expuestos no atacameños.

**Edad:** en cuanto a la edad promedio de la población, esta también es bastante parecida entre los grupos analizados. La población control presenta una media de 37,68 años, la población expuesta de 39,5 años. El grupo de expuestos atacameños de 40,2 años, y la población de expuestos no atacameños de 38,87 años. La población presenta un rango de edad comprendido entre 17 y 78 años y no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados en función de la variable edad.

**Sexo:** en todos los grupos hay más mujeres que hombres. En la población control hay un 62,2% de mujeres y un 37,8% de hombres, mientras que en el grupo expuesto un 77,4% son mujeres y un 22,6% hombres. Al separar la población expuesta por etnias resulta que la población atacameña está compuesta por un 84% son mujeres y un 16% son hombres y de los expuestos no atacameños un 71,4% de mujeres y un 28,6% de hombres. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el expuesto ( $p=0,015$ ) y con el de los atacameños ( $p=0,003$ ).

**Consumo de alcohol:** el consumo de alcohol se ha estimado a partir de las respuestas de la encuesta y, utilizando una tabla de conversión, se ha calculado el consumo individual en gramos de alcohol por semana. Podemos observar que los individuos del grupo control son los que consumen más alcohol, presentando una media de 29,86 g de alcohol por semana, en comparación con los expuestos que consumen una media de 17,1 g. Entre los expuestos, los atacameños consumen mucho más (25,8 g por semana) que los no atacameños (9,18 g de alcohol a la semana). Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar la población control con la población expuesta ( $p=0,000$ ) y con los expuestos no atacameños ( $p=0,000$ ).

**Consumo de té:** en cuanto al consumo de té existen pocas diferencias entre los individuos de los distintos grupos, que beben aproximadamente 1,5 tazas por día. Los grupos de análisis presentan los siguientes valores promedio de consumo diario de tazas de té: el grupo control presenta una media de 1,47; el grupo expuesto de 1,63; el grupo de atacameños presenta una media de 1,54 y el grupo expuesto no atacameño de 1,71. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos analizados.

**Consumo de café:** los individuos del grupo control consumen una media de 2,05 tazas diarias y los expuestos presentan una media de 0,73. Entre los expuestos, los atacameños consumen 0,32 tazas, mientras que el consumo de los no atacameños es de 1,11 tazas diarias. Así, se ha determinado que los controles consumen más café que los expuestos ( $p=0,000$ ), que los atacameños ( $p=0,000$ ), y que los expuestos no atacameños ( $p=0,000$ ). Asimismo, los expuestos no atacameños consumen más café que los atacameños ( $p=0,003$ ).

**Hábito de fumar:** para analizar esta variable, la población se ha dividido en tres categorías: fumadores, ex fumadores y no fumadores. En todos los grupos poblacionales, el grupo de fumadores es el menos representado. En el grupo control, un 32,4% de los individuos fuman y en el grupo expuesto fuma un 19%. El grupo de atacameños presenta sólo un 8% de fumadores, mientras que en el grupo de expuestos no atacameños fuma un 29,1%. Así pues, en la población estudiada los controles fuman más que los expuestos ( $p=0,010$ ) y más que los atacameños ( $p=0,000$ ). Además, los expuestos no atacameños fuman más que los atacameños ( $p=0,007$ ). Hay que señalar que la diferencia en el hábito de fumar de los individuos atacameños en comparación con los no atacameños (controles y habitantes de Calama) puede deberse, en parte, a que las personas residentes en los pueblos del altiplano tienen dificultades en adquirir tabaco, por lo que no han adquirido el hábito de su consumo.

**Consumo diario de cigarrillos:** al analizar los cigarrillos que consumen diariamente los distintos grupos vemos que la media es muy baja. Los individuos de la población control fuman un promedio de 2,46 cigarrillos diarios y los expuestos fuman en promedio 1,83 cigarrillos al día. Al dividir la población expuesta por etnias tenemos que los atacameños son los que menos fuman (0,92 cigarrillos diarios) y los expuestos no atacameños fuman un promedio de 2,65 cigarrillos por día. Se ha encontrado que los controles fuman más que los

expuestos ( $p=0,012$ ); y que los expuestos no atacameños fuman más que los atacameños ( $p=0,006$ ).

**Consumo diario de cigarrillos en el grupo de fumadores:** es interesante considerar cuantos cigarrillos fuman diariamente los fumadores de cada uno de los grupos analizados, prescindiendo de los ex fumadores y de los no fumadores. Al analizar por separado a los fumadores vemos que el grupo control presenta la media más baja (4,81 cigarrillos diarios), los expuestos presentan una media de 7,65, los atacameños presentan la media más alta (8,75), y los expuestos no atacameños presentan una media de 7,38. Sin embargo, las diferencias entre grupo no alcanzan en ningún caso la significación estadística. Hay que considerar que el porcentaje de fumadores en los distintos grupos es muy diferente. Los atacameños fumadores, si bien tienen la media más alta de consumo de cigarrillos, sólo representan el 8% de la población atacameña estudiada. En el caso de la población control, aunque presente una media más baja de consumo de cigarrillos, el porcentaje de fumadores es del 32,4%.

**Consumo de pescado:** el consumo de pescado se ha evaluado según las veces que se come por semana. La población control consume el doble que la población expuesta, si bien ambas poblaciones consumen poco pescado (1,01 y 0,55 veces por semana, respectivamente). Al analizar la población expuesta separada por etnias, vemos que los atacameños tienen un consumo de pescado casi nulo (0,08 veces por semana) y los expuestos no atacameños comen pescado 0,96 veces por semana. Como resumen, en esta población los controles consumen más pescado que los expuestos ( $p=0,000$ ) y que los atacameños ( $p=0,000$ ); mientras que los expuestos no atacameños consumen más pescado que los atacameños ( $p=0,000$ ).

Al considerar esta variable hay que destacar que la población expuesta se encuentra en el desierto de Atacama y, en particular, que los atacameños habitan en pequeños pueblos del altiplano, lejos del mar y de abundantes cursos de agua. La población de expuestos no atacameños ubicada en la ciudad de Calama, tiene mayor acceso al pescado procedente de las ciudades costeras. La población control, ubicada en la ciudad de Concepción, está cerca de la costa, por lo que consume más pescado que la expuesta. A pesar de ello, el consumo de pescado es bajo en todas las poblaciones analizadas.

**Cáncer entre familiares:** en cuanto a la incidencia de cáncer entre los familiares más próximos, tenemos que el grupo control presenta la mayor frecuencia de casos, con un 44,1% de individuos con algún pariente directo que ha sufrido la enfermedad, mientras que, en la población expuesta, este porcentaje es del 26,7%. El grupo con menos casos de cáncer entre familiares corresponde al grupo atacameño, en el que sólo el 18% presenta casos y, entre los expuestos no atacameños, un 34,5% presenta casos de cáncer en la familia. En esta población, por tanto, los controles presentan más casos que los expuestos ( $p=0,007$ ) y que los atacameños ( $p=0,001$ ). Al comparar los grupos de atacameños y los expuestos no atacameños, el valor de  $p$  está en el límite de la significación estadística ( $p=0,057$ ).

#### 4.1.2 Descripción poblacional del grupo de hombres

**Tamaño de la población:** en cuanto al grupo de hombres, tenemos el grupo control con 42 individuos y el grupo de expuestos con 24. El grupo más pequeño es el de los hombres atacameños, que cuenta sólo con 8 individuos, representando un 33,3% de la población de hombres expuestos. El grupo de hombres expuestos no atacameños cuenta con 16 hombres, lo que representa el 66,7% de la población de hombres expuestos.

**Edad:** el grupo de hombres control presenta una media de edad ligeramente inferior a la del grupo de hombres expuestos, aunque esta diferencia no es significativa (39,74 y 42,13 años, respectivamente). El grupo con una mayor media de edad es el de los hombres atacameños, que presenta un valor de 49,5 años, mientras que los hombres no atacameños presentan una edad promedio de 38,44 años. Se constata que el grupo de hombres atacameños es de mayor edad que el de los hombres control ( $p=0,050$ ). Merece especial atención el pequeño tamaño del grupo de hombres atacameños (8 individuos).

**Consumo de alcohol:** los hombres del grupo control beben 35,17 g de alcohol por semana y los hombres expuestos 41,7 g. Cuando analizamos los individuos del grupo de hombres expuestos separados por etnias, se observa que los hombres atacameños beben más que los otros grupos de hombres, presentando una media de 89,75 g de alcohol a la semana, mientras que los hombres expuestos no atacameños tienen un consumo medio de 16,07 g por semana. No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al consumo de alcohol entre los distintos grupos de hombres.

Tabla 4.3: Descripción poblacional del grupo de hombres

<b>Población:</b>	<b>HC</b>	<b>HE</b>	<b>HA</b>	<b>HNA</b>
<b>Nº de personas:</b>	42 (100%)	24 (100%)	8 (33,3%)	16 (66,7%)
<b>Edad:</b>				
años	39,74 ± 1,8	42,13 ± 2,91	49,5 ± 6,04 <sup>*HC</sup>	38,44 ± 2,86
<b>Consumo de alcohol:</b>				
g por semana	35,17 ± 6,66	41,7 ± 14,86 <sup>*ME</sup>	89,75 ± 5,53 <sup>***MA</sup>	16,07 ± 7,79
<b>Consumo de té y café (tazas por día):</b>				
té	1,24 ± 0,19	2,09 ± 0,33 <sup>**HC</sup>	1,87±0,13 <sup>*HC</sup>	2,2 ± 0,5 <sup>*HC</sup>
café	1,56 ± 0,31 <sup>**MC</sup>	0,39 ± 0,14 <sup>***HC</sup>	0 <sup>***HC</sup>	0,73 ± 0,14 <sup>*HA, HC</sup>
<b>Hábito de fumar:</b>				
no fumador	21 (50%)	11 (47,8%)	3 (37,5%)	8 (53,3%)
ex fumador	4 (9,5%)	4 (17,4%)	2 (25%)	2 (13,3%)
fumador	17 (40,5%)	8 (34,8%) <sup>**ME</sup>	3 (37,5%) <sup>**MA</sup>	5 (33,3%)
no disponibles	0	1	0	1
<b>Consumo de cigarrillos por día</b>				
toda la población	3,67 ± 1,06	4,14 ± 1,28 <sup>**ME</sup>	2,14 ± 1,16	5,07 ± 1,77
sólo fumadores	5,18 ± 0,89	9,5 ± 2,24	5 ± 1,53	12,2 ± 2,92 <sup>*HC, *MNA</sup>
<b>Consumo de pescado</b>				
ingesta semanal	1,24 ± 0,14 <sup>*MC</sup>	0,71 ± 0,19 <sup>**HC</sup>	0,13 ± 0,13 <sup>***HC</sup>	1 ± 0,24 <sup>*HA</sup>
<b>Cáncer entre familiares (% de casos)</b>				
no	28 (66,7%)	17 (70,8%)	8 (100%)	9 (56,3%)
sí	14 (33,3%)	7 (29,2%)	0	7 (43,8%)
no disponibles	0	0	0	0

Los valores de n se presentan junto al % en relación con el total de casos. Las medias se acompañan del error típico. MC: mujeres control; ME: mujeres expuestas; MA: mujeres atacameñas; MNA: mujeres no atacameñas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

**Consumo de té:** los hombres del grupo control consumen una media de 1,24 tazas de té diarias, los hombres expuestos 2,09, los hombres atacameños 1,87 y los hombres expuestos no atacameños 2,2. Por tanto, los hombres controles consumen significativamente menos té que los hombres expuestos ( $p=0,010$ ), que los hombres atacameños ( $p=0,049$ ) y que los hombres expuestos no atacameños ( $p=0,045$ ).

**Consumo de café:** el consumo más alto de café entre los hombres se encuentra en la población control, con una media de 1,56 tazas por día, mientras que los hombres expuestos consumen una media de 0,39, los hombres atacameños no consumen café y los hombres expuestos no atacameños consumen 0,73 tazas por día. El análisis indica que en la población analizada los hombres control consumen más café que los hombres expuestos ( $p=0,001$ ), que los hombres atacameños ( $p=0,001$ ), y que los hombres expuestos no atacameños ( $p=0,040$ ). A la vez, los hombres expuestos no atacameños consumen más que los hombres atacameños ( $p=0,025$ ).

**Hábito de fumar:** los distintos grupos de hombres presentan un bajo consumo de tabaco. En todos los casos, los fumadores representan menos de la mitad de los individuos de cada grupo. En el grupo control, un 40,5% de los hombres fuman y en el grupo expuesto un 34,8% de los hombres son fumadores. Al separar la población expuesta según su etnia, vemos que fuma un 37,5% de los hombres atacameños mientras que un 33,3% de los hombres expuestos no atacameños son fumadores. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar estos grupos.

**Consumo diario de cigarrillos:** al analizar la media de cigarrillos consumidos diariamente por los hombres, vemos que los del grupo control consumen una media de 3,67 cigarrillos diarios, mientras que en los expuestos es de 4,14. En el grupo expuesto, los hombres atacameños consumen una media de 2,14 cigarrillos y los hombres expuestos no atacameños 5,07 cigarrillos diarios. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos analizados.

**Consumo diario de cigarrillos en el grupo de fumadores:** al analizar el promedio de cigarrillos consumidos diariamente por los hombres fumadores (excluyendo a los ex fumadores y no fumadores), podemos ver que los hombres del grupo control que son fumadores consumen una media de 5,18 cigarrillos diarios, mientras que los del grupo expuesto fuman una media de 9,5. Entre los

expuestos, los hombres atacameños consumen menos cigarrillos (5) que los hombres expuestos no atacameños (12,2). Al analizar el consumo de tabaco entre los hombres fumadores se ha encontrado que los hombres expuestos no atacameños fuman más que los hombres control ( $p=0,019$ ). Hay que señalar que los grupos de hombres fumadores son de tamaño pequeño.

**Consumo de pescado:** la población masculina consume muy poco pescado, no llegando en ninguno de los casos a consumirlo más de 1,5 veces a la semana. Los que más pescado consumen son los hombres del grupo control, con una media de 1,24. Los hombres expuestos consumen una media de 0,71, aunque los atacameños consumen mucho menos (0,13) que los hombres expuestos no atacameños (1 vez por semana). Se concluye que los hombres del grupo control consumen significativamente más pescado que los hombres expuestos ( $p=0,010$ ) y que los hombres atacameños ( $p=0,001$ ). Asimismo, los hombres expuestos no atacameños consumen más pescado que los hombres atacameños ( $p=0,019$ ).

**Cáncer entre familiares:** en cuanto a la frecuencia de casos de familiares directos con cáncer tenemos que, entre los hombres control, un 33,3% presenta casos, entre los hombres expuestos un 29,2%. En cuanto al grupo expuesto, los hombres atacameños no presentan ningún caso de cáncer entre familiares, mientras que los hombres expuestos no atacameños presentan un 43,8% de casos. El análisis estadístico muestra que la población de hombres no presenta diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los casos de cáncer entre familiares en ninguno de los grupos analizados.

#### 4.1.3 Descripción poblacional del grupo de mujeres

**Tamaño de la población:** en cuanto a la población femenina, podemos decir que es un grupo significativamente mayor que el de los hombres. El grupo de mujeres control consta de 69 mujeres y el grupo de mujeres expuestas de 82. Al dividir el grupo expuesto por etnias vemos que el tamaño está equilibrado, con 42 mujeres atacameñas (48,8% de la población) y 40 en el grupo de mujeres expuestas no atacameñas, lo que corresponde a un 51,2% de la población de mujeres expuestas. No se presentan diferencias significativas en cuanto al tamaño muestral.

Tabla 4.4: Descripción poblacional del grupo de mujeres

Población:	MC	ME	MA	MNA
<b>Nº de personas:</b>	69 (100%)	82 (100%)	42 (48,8%)	40 (51,2%)
<b>Edad:</b>				
años	36,42 ± 1,33	38,73 ± 1,46	38,43 ± 2,31	39,05 ± 1,8
<b>Consumo de alcohol:</b>				
g por semana	26,62 ± 5,25	10,2 ± 3,72 ***MC	13,62 ± 6,99 ***MC	6,6 ± 2,06 ***MA
<b>Consumo de té y café (tazas por día):</b>				
té	1,61 ± 0,15	1,5 ± 0,12	1,48 ± 0,15	1,52 ± 0,19
café	2,33 ± 0,21	0,83 ± 0,17 ***MC	0,38 ± 0,1 *MNA, ***MC	1,3 ± 0,32 ***MC
<b>Hábito de fumar:</b>				
no fumador	43 (62,3%)	67 (81,7%)	40 (95,2%)	27 (67,5%)
ex fumador	7 (10,1%)	3 (3,7%)	1 (2,4%)	2 (5%)
fumador	19 (27,5%)	12 (14,6%) **MC	1 (2,4%) ***MC	11 (27,5%) ***MA
no disponibles	0	0	0	0
<b>Consumo de cigarrillos por día:</b>				
toda la población	1,72 ± 0,32	1,2 ± 0,37	0,71 ± 0,53	1,72 ± 0,51
solo fumadores	4,47 ± 0,51	6,42 ± 1,54	20 ± 0	5,18 ± 1,01
<b>Consumo de pescado:</b>				
ingesta semanal	0,87 ± 0,09	0,5 ± 0,09 ***MC	0,07 ± 0,04 ***MC	0,95 ± 0,14 ***MA
<b>Cáncer entre familiares (% de casos):</b>				
no	34 (49,3%)	60 (74,1%)	33 (78,6%)	27 (69,2%)
sí	35 (50,7%)	21 (25,9%) **MC	9 (21,4%) ***MC	12 (30,8%)
no disponibles	0	1	0	1

Los valores de n se presentan junto al % en relación con el total de casos. Las medias se acompañan del error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

**Edad:** Las mujeres control presentan una media de 36,42 años, las mujeres expuestas de 38,73, las mujeres atacameñas de 38,43 y las mujeres expuestas no atacameñas, de 39,05. No existen diferencias estadísticamente significativas para la edad entre ninguno de los grupos analizados.

**Consumo de alcohol:** las mujeres que más alcohol consumen son las mujeres del grupo control, con una media de 26,62 g por día. Las mujeres expuestas beben 10,2 g, que se distribuyen entre los 13,62 g de las mujeres atacameñas y los 6,6 g diarios de las mujeres expuestas no atacameñas. Se concluye que las mujeres control beben más que las mujeres expuestas ( $p=0,000$ ), que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ) y que las mujeres expuestas no atacameñas ( $p=0,000$ ).

**Consumo de té:** el consumo diario de té es muy parecido entre los distintos grupos de mujeres y, al igual que en el caso de los hombres, es aproximadamente de 1,5 tazas de té al día. Los distintos grupos analizados presentan las siguientes medias: mujeres control, 1,61; mujeres expuestas, 1,50; mujeres atacameñas, 1,48 y mujeres expuestas no atacameñas, 1,52. Ninguno de los grupos presenta diferencias estadísticamente significativas respecto de la variable consumo de té.

**Consumo de café:** en cuanto al consumo de café, las mujeres control presentan una media de 2,33 tazas por día, las mujeres expuestas, de 0,83, las mujeres atacameñas, de 0,38 y las mujeres expuestas no atacameñas, de 1,3. En cuanto a la significación estadística, las mujeres control consumen más café que las mujeres expuestas ( $p=0,000$ ), que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ) y que las mujeres expuestas no atacameñas ( $p=0,000$ ). Además, las mujeres expuestas no atacameñas consumen más café que las mujeres atacameñas ( $p=0,012$ ).

**Hábito de fumar:** el grupo de mujeres control presenta un 27,5% de fumadoras mientras que, en el grupo de mujeres expuestas, un 14,6% son fumadoras. En el grupo de mujeres atacameñas sólo fuma una mujer, lo que representa el 2,4% y entre las mujeres expuestas no atacameñas hay un 27,5% de mujeres fumadoras. En la población estudiada, las mujeres controles fuman más que las expuestas ( $p=0,010$ ) y que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ). Así mismo, las mujeres expuestas no atacameñas fuman más que las mujeres atacameñas ( $p=0,001$ ).

**Consumo diario de cigarrillos:** en cuanto al número de cigarrillos consumidos diariamente por la población femenina, se obtienen los siguientes valores medios: las mujeres control, 1,72; las mujeres expuestas, 1,2; las mujeres atacameñas, 0,71; y las mujeres expuestas no atacameñas, 1,72 cigarrillos diarios. En cuanto a la significación estadística del consumo diario de cigarrillos, se desprende que las

mujeres control fuman más que las mujeres expuestas ( $p=0,009$ ) y que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ). Asimismo, las mujeres expuestas no atacameñas fuman más que las mujeres atacameñas ( $p=0,007$ ).

**Consumo diario de cigarrillos en el grupo de fumadoras:** al hacer el análisis del consumo diario de cigarrillos en el grupo de mujeres fumadoras observamos que las mujeres fumadoras del grupo control consumen 4,47 cigarrillos diarios y las mujeres expuestas fumadoras 6,42. En el caso de las mujeres atacameñas, sólo hay una mujer fumadora y las mujeres expuestas no atacameñas fumadoras consumen 5,18 cigarrillos diariamente. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de mujeres fumadoras analizados.

**Consumo de pescado:** todos los grupos de mujeres consumen pescado menos de una vez a la semana. Las mujeres controles presentan una media semanal de 0,87, las mujeres expuestas, de 0,5; las mujeres atacameñas casi nunca lo consumen, presentando un valor promedio de 0,07 y las mujeres expuestas no atacameñas son las que más pescado consumen, con una media de 0,95 veces por semana. Se ha determinado que, las mujeres del grupo control comen más pescado que las mujeres expuestas ( $p=0,001$ ) y que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ). Las mujeres expuestas no atacameñas comen más pescado que las mujeres atacameñas ( $p=0,000$ ). Hay que recordar que la situación geográfica en la que se encuentran los distintos grupos influye en la accesibilidad al consumo de pescado.

**Cáncer entre familiares:** en el grupo de mujeres control, un 50,7% presenta casos de cáncer en familiares directos, el grupo de mujeres expuestas presenta un 25,9% de casos, el de las mujeres atacameñas, un 21,4% y el de las mujeres expuestas no atacameñas, un 30,8%. En la población estudiada, las mujeres controles presentan más casos de cáncer entre familiares que las mujeres expuestas ( $p=0,002$ ) y que las mujeres atacameñas ( $p=0,001$ ).

#### 4.1.4 Comparación entre los diferentes grupos de hombres y mujeres

En este apartado se presenta el análisis de la comparación entre los distintos grupos de hombres y mujeres. Este análisis se refiere a las comparación de los siguientes grupos: hombres control con mujeres control, hombres expuestos con mujeres expuestas, hombres atacameños con mujeres atacameñas y

hombres expuestos no atacameños con mujeres expuestas no atacameñas. Para consulta de los datos, véanse las tablas 4.3 y 4.4.

**Tamaño de la población:** en todos los grupos analizados se presentan más mujeres que hombres.

**Edad:** las mujeres de todos los grupos poblacionales analizados presentan una media de edad más baja que la de los hombres de los grupos correspondientes. Sin embargo, no se presentan diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los grupos analizados.

**Consumo de alcohol:** para esta variable se ha encontrado que los hombres expuestos consumen más alcohol que las mujeres expuestas ( $p=0,000$ ).

**Consumo de té:** el consumo de tazas de té diarias no presenta diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las comparaciones.

**Consumo de café:** las mujeres control consumen significativamente más café que los hombres control ( $p=0,002$ ).

**Hábito de fumar:** se ha determinado que los hombres expuestos fuman más que las mujeres expuestas ( $p=0,002$ ) y los hombres atacameños más que las mujeres atacameñas ( $p=0,008$ ).

**Consumo diario de cigarrillos:** para el número de cigarrillos consumidos diariamente, los hombres expuestos consumen significativamente más cigarrillos que las mujeres expuestas ( $p=0,003$ ).

**Consumo diario de cigarrillos en el grupo de fumadores:** al hacer el análisis considerando sólo los fumadores (excluyendo ex fumadores y no fumadores), tenemos que los hombres no atacameños fuman más que las mujeres no atacameñas ( $p=0,038$ ).

**Cáncer entre familiares:** en cuanto a los casos de cáncer en familiares directos, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar ninguno de los grupos de hombres y mujeres.

**Consumo de pescado:** para el consumo semanal de pescado, se ha encontrado que los hombres control consumen más que las mujeres control ( $p=0,024$ ).

#### 4.1.5 Descripción de la población según el lugar de residencia

Como los niveles de exposición al As detectados en el agua de consumo varían según el lugar de residencia, se elaboró la descriptiva poblacional en función de la residencia. Hay que señalar que hay grupos muy pequeños como es el caso de Peine, con 8 individuos y Socaire, con 4. En estos casos no se pueden obtener conclusiones, pero se puede tener una idea aproximada de la situación.

**Tamaño de la población:** todos los habitantes de la población control pertenecen a la ciudad de Concepción, constituyendo un grupo de 111 individuos. El grupo expuesto se ha dividido en cinco subgrupos, correspondientes a los distintos lugares de residencia. Calama cuenta con el 50% de la población expuesta (53 personas), San Pedro de Atacama con 25 personas representa el 23,58%, Toconao con 16 (15,09%), y Peine y Socaire con 8 y 4 personas (7,54% y 3,77%, respectivamente).

**Edad:** la población de San Pedro de Atacama presenta una media de 39,8 años; Toconao de 47,63; Peine de 36,13; Socaire de 41,75; Calama de 37,25 y Concepción de 37,68. Al comparar cada uno de los pueblos expuestos con el control, encontramos que la edad media de los habitantes de Toconao es significativamente mayor a la de Concepción ( $p=0,035$ ).

**Sexo:** como ya se ha comentado anteriormente, en todos los grupos hay más mujeres que hombres. Hay que señalar que en el grupo de Peine sólo había un hombre y que en Socaire sólo se obtuvieron mujeres voluntarias para participar en el estudio.

**Consumo de alcohol:** la población control consume una media de 29,86 g de alcohol por semana. Entre los pueblos expuestos, la población que más alcohol consume es la de San Pedro de Atacama, con una media de 37,8 g por semana. El consumo en Toconao es de 19 g, en Peine de 6,38 g, en Socaire es de 0 g y en Calama de 9,52 g. Al comparar cada pueblo expuesto con el control, obtenemos diferencias estadísticamente significativas en todos los casos. Así, en Concepción se consume más alcohol que en Toconao ( $p=0,022$ ), que en Peine ( $p=0,031$ ), que en Socaire ( $p=0,019$ ) y que en Calama ( $p=0,000$ ). A la vez, en San Pedro de Atacama se consume más que en Concepción ( $p=0,031$ ).

Tabla 4.5: Descripción poblacional según el lugar de residencia

<b>Población:</b>	<b>C</b>	<b>SP</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Ca</b>
<b>Nº de personas</b>	111 (100%)	25 (23,58%)	16 (15,09%)	8 (7,54%)	4 (3,77%)	53 (50%)
<b>Edad:</b>						
años	37,68 ± 1,08	39,8 ± 2,48	47,63 ± 4,21	36,13 ± 6,81	41,75 ± 9,45	37,25±1,48
<b>Sexo:</b>						
hombres	42 (37,8%)	8 (32%)	3 (18,8%)	1 (12,5%)	0	12 (22,6%)
mujeres	69 (62,2%)	17 (68%)	13 (81,3%)	7 (87,5%)	4 (100%) ***C	41 (77,4%) *C
<b>Consumo de alcohol:</b>						
g por semana	29,86 ± 4,12	37,8 ± 16,23 *C	19 ± 10,4 *C	6,38 ± 4,47 *C	0 ***C	9,52 ± 2,77 ***C
<b>Consumo de té y café (tazas por día):</b>						
té	1,47 ± 0,12	1,88 ± 0,32	1,63 ± 0,15	1,25 ± 0,37	1,25 ± 0,48	1,6 ± 0,17
café	2,05 ± 0,18	0,4 ± 0,13 ***C	0,06 ± 0,06 ***C	0,5 ± 0,33 **C	0,75 ± 0,48	1,13 ± 0,26 ***C
<b>Hábito de fumar:</b>						
no fumador	64 (57,7%)	18 (72%)	15 (93,8%)	7 (87,5%)	4 (100%)	34 (65,4%)
ex fumador	11 (9,9%)	2 (8%)	1 (6,3%)	0	0	4 (7,7%)
fumador	36 (32,4%)	5 (20%)	0 ***C	1 (12,5%)	0 ***C	14 (26,9%)
no disponibles	0	0	0	0	0	1
<b>Consumo de cigarrillos por día:</b>						
toda la población	2,46±0,45	1,72±0,51	0 ***C	2,5±2,5	0 ***C	2,2±0,58
sólo fumadores	8,75 ± 3,9	9 ± 2,59	0	20 ± 0	0	6,29 ± 1,32
<b>Consumo de pescado:</b>						
ingesta semanal	1,01 ± 0,08	0,08 ± 0,06 ***C	0,19 ± 0,1 ***C	0 ***C	0 **C	1 ± 0,12
<b>Familiares con cáncer (% de casos):</b>						
no	62 (55,9%)	21 (84%)	15 (93,8%)	5 (62,5%)	4 (100%)	32 (61,5%)
sí	49 (44,1%)	4 (16%) **C	1 (6,3%) **C	3 (37,5%)	0	20 (38,5%)
no disponibles	0	0	0	0	0	1

C: Control; SP: San Pedro de Atacama; T: Toconao; P: Peine; S: Socaire; Ca: Calama. Los valores de n se presentan junto al % en relación con el total de casos. Las medias se acompañan del error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

**Consumo de té:** el consumo de té es muy similar en los distintos pueblos, variando entre 1,25 y 1,88 tazas por día, y no presentando diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

**Consumo de café:** la población control es la que más café consume (2,05 tazas por día). Entre los pueblos expuestos, en San Pedro de Atacama la media es de 0,4 tazas por día, en Toconao de 0,06, en Peine de 0,5, en Socaire de 0,75 y en Calama

de 1,13 tazas diarias. En Concepción se consume significativamente más café que en San Pedro de Atacama, en Toconao, en Peine y en Calama (en todos los casos,  $p=0,000$ ).

**Hábito de fumar:** tenemos que el 32,4% del grupo control es fumador. En el grupo de San Pedro de Atacama fuma un 20%, en Toconao no fuma nadie y sólo hay 1 ex fumador, en Peine sólo hay un fumador y representa el 12,5%, en Socaire no tenemos fumadores y en el grupo de Calama fuma un 26,9%. En el grupo control hay un hábito de fumar significativamente mayor que en Toconao ( $p=0,000$ ) y en Socaire ( $p=0,000$ ).

**Consumo de cigarrillos:** el grupo control fuma una media de 2,46 cigarrillos diarios, el de San Pedro de Atacama 1,72, en los de Toconao y Socaire no se consume tabaco y en los grupos de Peine y Calama se consumen 2,5 y 2,2 cigarrillos diarios, respectivamente. En el grupo control se consumen significativamente más cigarrillos que en Peine ( $p=0,000$ ) y en Socaire ( $p=0,000$ ).

**Consumo diario de cigarrillos en el grupo de fumadores:** al analizar sólo los fumadores de cada grupo tenemos que, en el control se consume una media de 8,75 cigarrillos diarios, en San Pedro de Atacama 9 y en Calama 6,29. En el grupo de Peine sólo fuma una persona. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos grupos con el control.

**Consumo de pescado:** en la población control (Concepción) se consume pescado una media de 1,01 veces por semana, en Calama se consume 1 vez por semana, en San Pedro de Atacama el consumo es de 0,08, en Toconao de 0,19, mientras que en los grupos de Peine y Socaire no se consume. Por lo tanto, se consume significativamente más pescado en la población control que en San Pedro de Atacama ( $p=0,000$ ), que en Toconao ( $p=0,000$ ), que en Peine ( $p=0,000$ ) y que en Socaire ( $p=0,008$ ).

**Cáncer entre familiares:** en todos los pueblos muestreados, más de la mitad de la población no presenta casos de cáncer entre familiares. El valor más alto de incidencia se encuentra en la población control, donde el 44,1% de la población estudiada presenta casos de cáncer en familiares directos. En cuanto a la población expuesta en San Pedro de Atacama, un 16% presenta casos, en Toconao un 6,3%, en Peine un 37,5%, en Socaire ninguna persona encuestada tiene familiares

directos que hayan tenido cáncer y en Calama un 38,5% de la población presenta casos. La incidencia de casos de cáncer en familiares directos en la población control es significativamente más alta al compararla con los valores obtenidos en San Pedro de Atacama ( $p=0,009$ ), Toconao ( $p=0,004$ ) y Socaire ( $p=0,000$ ).

## 4.2 INDICADORES DE EXPOSICIÓN AMBIENTAL

### 4.2.1 Arsénico en agua

En cuanto a los niveles de exposición ambiental, en la tabla 4.6 se presentan los valores de arsénico total de las 15 muestras de agua de consumo humano, expresados en mg As/L de agua. Los datos se han ordenado en forma creciente en cuanto a la concentración de arsénico. Hay que destacar que no se tomaron muestras biológicas en todos los lugares en que se tomaron muestras de agua, pero los sitios muestreados se consideraron importantes, debido a que son cercanos a los lugares de estudio y pueden afectar el consumo de As mediante la producción de verduras u otras prácticas. La concentración de As en agua se ha tomado como un indicador ambiental de referencia, que será analizado en conjunto con la concentración de As en orina y uñas, como indicadores de exposición interna.

En la figura 4.1 se puede observar claramente que hay una gran diferencia en cuanto a la concentración de As del agua entre las zonas expuestas y la control. Concepción presenta niveles traza de As de 0,0002 mg/L, pero en las zonas expuestas la concentración de As aumenta considerablemente llegando a ser en San Pedro de Atacama de hasta 1,08 mg As/L, superando ampliamente la norma chilena de As en agua potable, que tiene un valor máximo de 0,05 mg As/L.

Los pueblos de Peine, Toconao, Calama, Chuquicamata y Antofagasta, presentan niveles de As en agua potable < 0,05 mg/L (debajo de los niveles máximos permitidos), mientras que los pueblos de Lasana, Socaire y San Pedro de Atacama presentan niveles por encima de la norma. Si consideramos las recomendaciones de la EPA, podemos ver que sólo Peine está por bajo del nivel de 0,01 mg As/L. Este grupo representa un 7,54% de la población expuesta estudiada.

Tabla 4.6: Niveles de arsénico ambiental medidos en agua de consumo humano

Código	Origen de las muestras	mg As/L
C	Concepción- universidad	0,0002
C	Concepción- universidad	0,0002
P	Peine	0,0034
T	Toconao- servicio de Salud	0,0199
T	Toconao- servicio de Salud	0,0199
Ca	Calama	0,0208
Ch	Chuquicamata	0,0262
A	Antofagasta	0,0306
L	Lasana- pukará	0,1306
L	Lasana- río Loa	0,1464
S	Socaire- servicio de Salud	0,2522
S	Socaire- agua de riego	0,2596
SP	San Pedro de Atacama- mañana	0,55
SP	San Pedro de Atacama- noche	0,619
SP	San Pedro de Atacama - antes de la planta de abatimiento de As	1,087

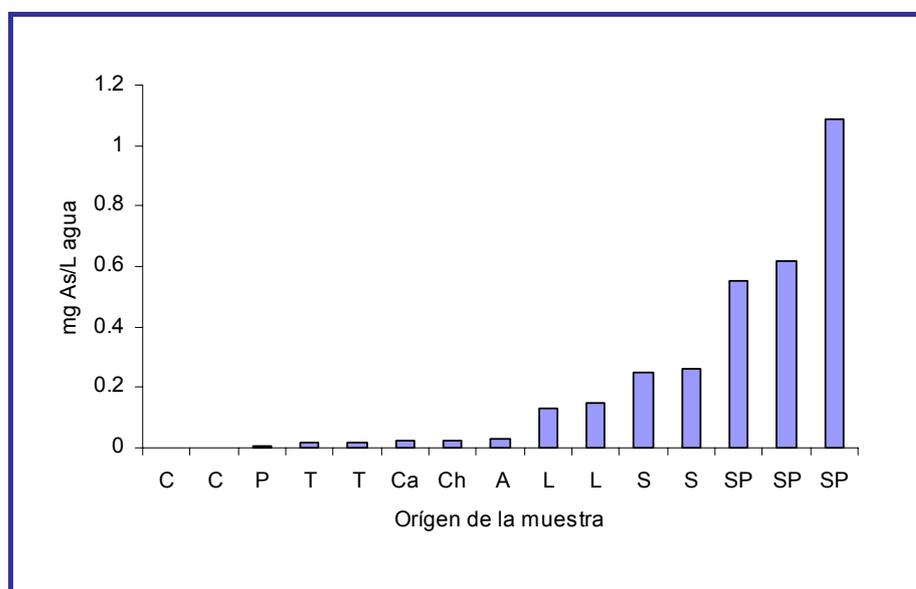


Figura 4.1: Niveles de arsénico ambiental medidos en agua de consumo humano.

Los datos analizados indican la presencia de alto niveles de As disuelto en las aguas de consumo humano, en la zona expuesta al compararla con la zona control. El hecho de que Peine presente niveles bajos de As en las aguas de consumo no quiere decir que su población no esté expuesta. En toda la zona norte de Chile el As está presente en forma natural en los distintos ambientes, pudiendo acceder a él por otras vías o bien cuando la población se desplaza de un sitio a otro, dentro de la región. Biggs y colaboradores realizaron un estudio en que se comparó la población de San Pedro de Atacama como expuesta al As y Toconao como control. En él no se encontró correlación entre el As medido en la orina de la población y la estimación de As ingerido con el agua, con lo que se concluyó que, probablemente, en Toconao la mayor fuente de As sea la comida (Biggs *et al.*, 1997) lo que podría aplicarse también al caso de Peine.

## 4.3 INDICADORES DE EXPOSICIÓN INTERNA

### 4.3.1 Arsénico en orina

La concentración de As en el agua de consumo da una idea de la exposición ambiental a la que está sometida la población en estudio; sin embargo este es un marcador de exposición general dado que los hábitos individuales pueden hacer que la cantidad de agua ingerida por día sea muy variable entre una persona y otra. Es por esto que, la concentración de As en orina, se ha propuesto como un buen indicador de exposición interna (Biggs *et al.*, 1997; Aposhian *et al.*, 2000b). Este indicador se ha utilizado ampliamente en diversos estudios de biomonitorización (Gonsebatt *et al.*, 1997; Kurttio *et al.*, 1998; Máki-Paakkanen *et al.*, 1998; Del Razo *et al.*, 1999; Harrington-Brook *et al.*, 1999).

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente, el modelo actual del metabolismo del As en diversas especies, incluyendo la humana, se caracteriza por una oxidación/reducción que cambia su estado de valencia seguido por metilaciones sucesivas produciendo compuestos nono-, bi-, o trimetilados. Es por ello que la excreción del As en la orina y su especiación permite detectar los diversos compuestos de forma precisa y estudiar el metabolismo en diferentes poblaciones. Se ha determinado que, en promedio, en la orina humana, el As se excreta en un 10-30%, en forma de As(i), en un 10-20%, en forma de MMA, y en un 60-80%, en

forma de DMA. Sin embargo el estudio de poblaciones indígenas en la zona, ha evidenciado que la población presenta un metabolismo único, debido a que excretan una media de MMA de sólo un 2,2% (Vather *et al.*, 1995).

Las muestras de orina de la población atacameña fueron extraviadas en la Universidad de Göttingen, donde fueron enviadas para su análisis, por ello, el análisis sólo se ha efectuado según exposición y sexo sin dividir la población expuesta por etnias. Para realizar este análisis se cuenta con un total de 161 muestras. En la figura 4.2 se indican las medias de concentración de As en orina en la población, medida en  $\mu\text{g As/L}$ , realizada mediante análisis HPLC-AFC.

En cuanto a su especiación la gran mayoría de los datos de detección de  $\text{As}^{+3}$  y  $\text{MMA}^{+5}$  presentaron valores por debajo del límite de detección del análisis, por lo que éste se ha realizado con los valores de As total. Mediante la prueba *t* de Student se determinó que la población expuesta presenta significativamente más As en orina que la población control ( $p=0,000$ ). Esto también se observa al analizar las poblaciones de hombres ( $p=0,000$ ) y mujeres por separado ( $p=0,000$ ). También se determinó que dentro del grupo control, los hombres presentan más As en orina que las mujeres ( $p=0,014$ ) indicando una mayor exposición.

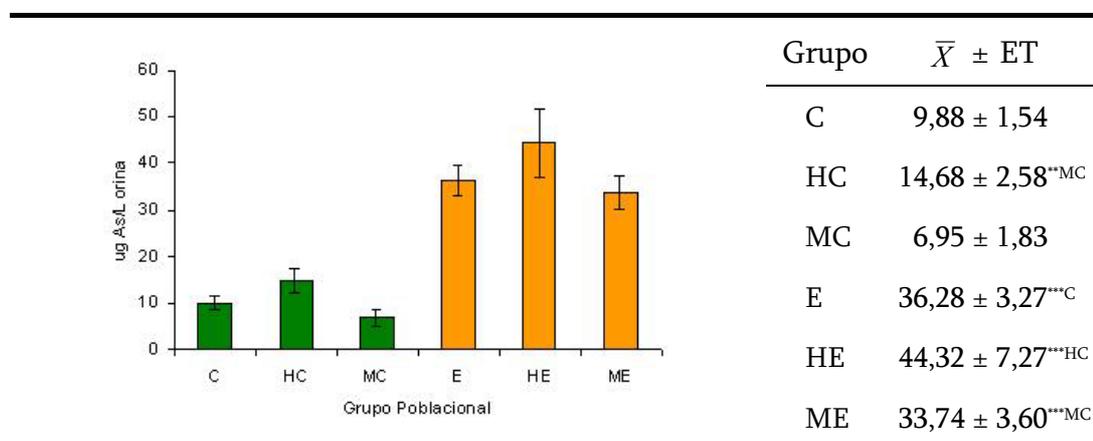


Figura 4.2: Concentración total de As en orina, en la población expuesta y control

Para analizar la relación que existe entre la concentración de As en el agua de consumo y la orina de la población se realizó un gráfico de dispersión con líneas de tendencia. Debido a que no se cuenta con los datos de As en orina para la población atacameña, sólo se graficaron los valores de las poblaciones de

Concepción y de Calama. Los resultados indican que al aumentar la concentración de As en el agua de consumo, aumenta también la concentración de As en las uñas de la población. Sin embargo, para obtener el valor de correlación de estas variables sería necesario contar con un mayor volumen de datos, de los cuales no se dispone.

La determinación de los factores de confusión asociados a la concentración de As en orina se realizó mediante un análisis de varianza univariante. El único factor de confusión detectado por este análisis es el sexo ( $p=0,000$ ). Así, el modelo indica que los hombres concentran una mayor cantidad de As en las orina que las mujeres. Esto explicaría en parte los resultados obtenidos en la población del grupo control. De la  $R^2$  corregida, tenemos que el modelo explica un 32,8% de los resultados obtenidos. En la tabla 4.7 se presenta un resumen del modelo estadístico.

Tabla 4.7: Resumen del modelo estadístico para la concentración de As en orina

As en orina	B	F	$p$
Modelo corregido	26554,206	39,984	0,000***
intersección	73594,386	221,627	0,007**
sexo	2523,975	7,601	0,000***

$R^2$  corregida = 0,328. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

### 4.3.2 Arsénico en uñas

La acumulación de As en las uñas es un indicador de los niveles de exposición individual y, más específicamente, da cuenta de la acumulación de As a largo plazo. Para este análisis se dispone de un total de 193 datos. En la figura 4.3 se presentan los valores medios de la concentración de As en las uñas medida en  $\mu\text{g As/g}$  de uña, junto al error típico, en la población separada por exposición y sexo.

Por medio de la prueba  $t$  de Student se ha determinado que, la población expuesta presenta mayores niveles de As total en uñas que la población control ( $p=0,000$ ). Lo que también se observa al analizar la población de mujeres, en que las

expuestas presentan más As en uñas que las controles ( $p=0,000$ ). Dentro de la población control, los hombres presentan mayores niveles de As en uñas niveles que las mujeres ( $p=0,000$ ), lo que coincide con los análisis de As en orina.

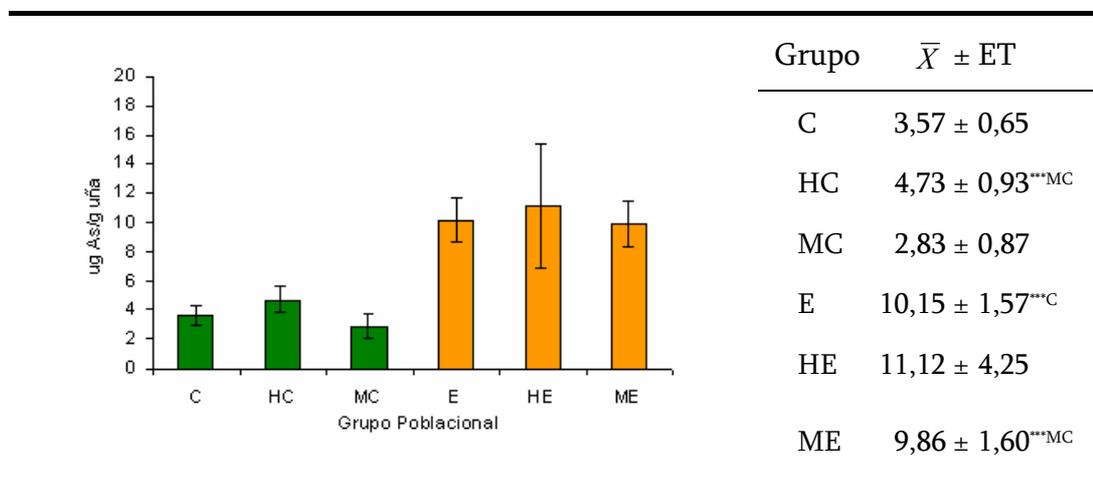


Figura 4.3: Concentración de As total en uñas, de los grupos expuesto y control

La población expuesta también se ha analizado comparando los grupos por etnia y sexo. Los resultados se presentan en la figura 4.4, en la que se pueden ver los valores medios de la concentración de As total en uñas junto al error típico. No se presentan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos analizados, ya sea comparando los grupos étnicos, o los grupos de hombres y mujeres.

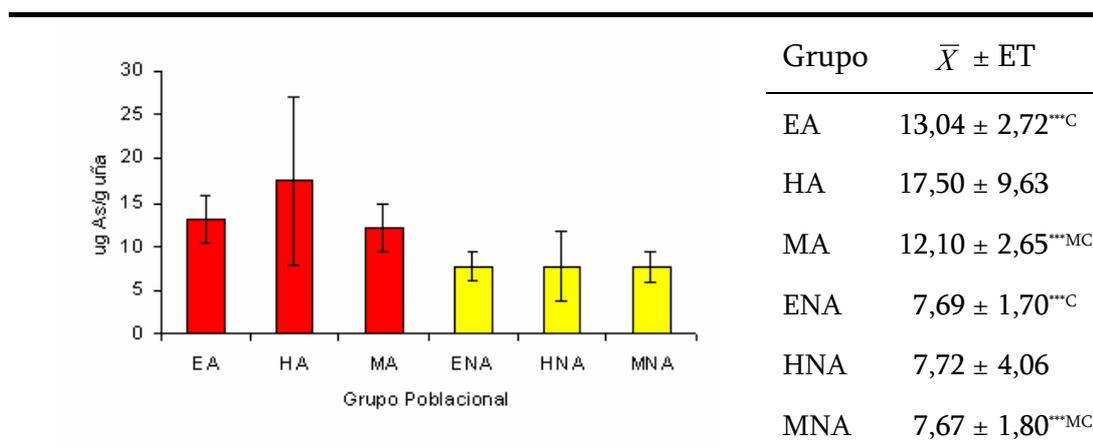


Figura 4.4: Concentración de As total en uñas de la población expuesta, separada por etnia

Al comparar los grupos de la población con los de la población control, se ha encontrado que la población expuesta presenta significativamente más As en uñas que la población control independientemente de la etnia ( $p=0,000$ ). Esto se repite al comparar la población de mujeres, donde las atacameñas y las no atacameñas presentan un mayor nivel de As en uñas comparado con las mujeres control ( $p=0,000$ ). En el caso de la población de hombres, los valores del error típico entre los expuestos son suficientemente grandes como para que no se presenten medias significativamente diferentes al comparar los grupos de hombres expuestos y controles.

Al analizar la población separando los grupos por lugar de residencia, se ha determinado que la población control presenta menores niveles de As en uñas que las poblaciones de: San Pedro de Atacama ( $p=0,000$ ), Toconao ( $p=0,001$ ), Socaire ( $p=0,034$ ) y Calama ( $p=0,000$ ). En la figura 4.5 se presentan los resultados del análisis de la concentración de As en uñas de la población, separada por el lugar de residencia. Se destaca el hecho de que el único lugar en que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de As en uñas al ser comparada con la población control es Peine. Esto coincide con los datos obtenidos mediante el análisis de la concentración de As en agua.

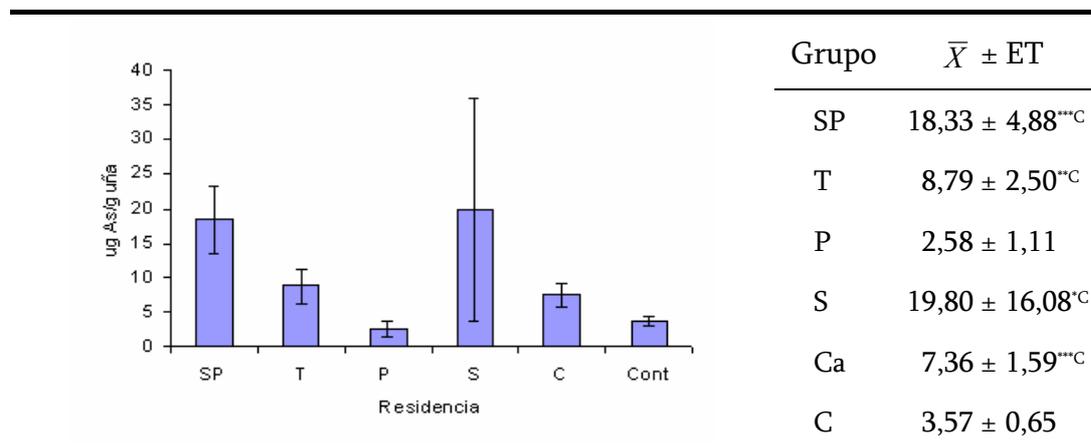


Figura 4.5: Concentración de As en uñas, analizada por lugar de residencia

Para determinar los factores de confusión asociados a la concentración de As en las uñas, se ha realizado un análisis de varianza univariante, con el paquete estadístico SPSS. Para cumplir con la normalidad de distribución de los datos,

determinada mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov, la variable se ha transformado utilizando logaritmos decimales. En la tabla 4.8 se presenta el resumen del modelo.

Tabla 4.8: Resumen del modelo estadístico para la concentración de As en uñas

	B	F	<i>p</i>
Modelo corregido	84,881	11,973	0,000***
intersección	2277,414	1285,022	0,000***
expoetnia	73,857	20,837	0,000***
sexo	11,784	6,649	0,011**
té	7,151	4,035	0,046*

R<sup>2</sup> corregida = 0,194. \**p*≤0,05; \*\**p*≤0,01; \*\*\**p*≤0,001

Las variables que se consideran como factores de confusión para la concentración de As en las uñas utilizando el modelo estadístico seleccionado son: la expoetnia (*p*=0,000), el sexo (*p*=0,011) y el consumo de té (*p*=0,046). De las estimaciones de los parámetros del modelo estadístico se desprende que los hombres tienen una mayor concentración de As en uñas que las mujeres. Que el grupo que tiene más As en uñas es el de los atacameños, luego los expuestos no atacameños y, finalmente, los controles, que tienen mucho menos As en uñas que los dos grupos expuestos. En cuanto al consumo de té se ha determinado que los grupos que consumen más te presentan una mayor concentración de As en las uñas. De la R<sup>2</sup> corregida podemos decir que este modelo explica el 19,4% de los resultados obtenidos.

Finalmente, para determinar la correlación existente entre el As en agua de consumo y el As en las uñas de la población, se ha realizado un gráfico de dispersión y se han obtenido la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación. Los resultados indican que el coeficiente de correlación es de R<sup>2</sup>=0,585 lo que indica que la concentración de As en las uñas y en el agua de consumo humano, son variables que están correlacionadas. Es por ello que al cambiar la concentración de As en el agua de consumo, varía también su concentración en las uñas de la población. En la figura 4.6 se presenta el gráfico obtenido junto a las ecuaciones de la recta y el valor de R<sup>2</sup>.

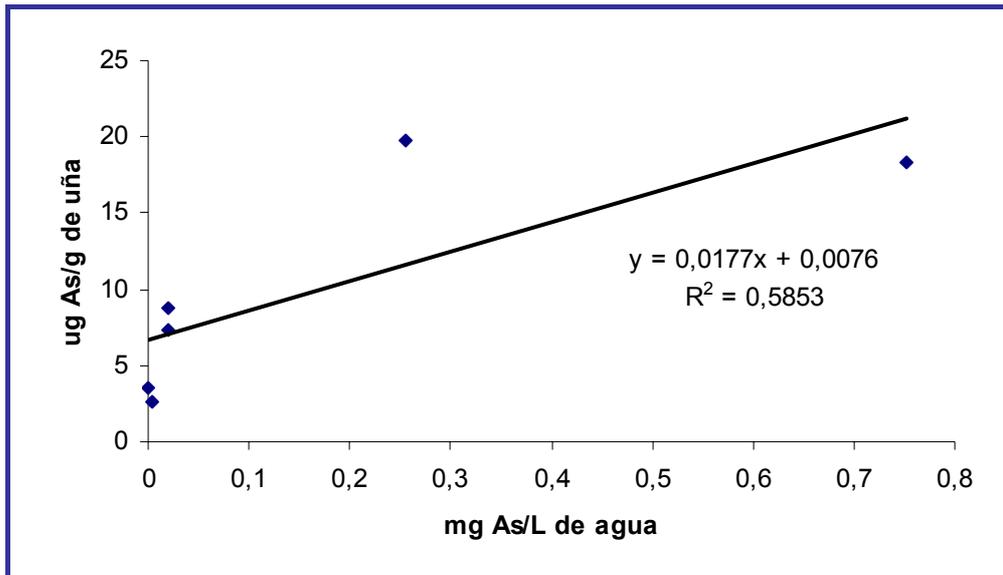


Figura 4.6: Correlación entre concentración de As en agua de consumo y As en uñas

## 4.4 BIOMARCADORES DE EFECTO BIOLÓGICO

### 4.4.1 MN en linfocitos

Se ha utilizado el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica para evaluar el daño citogenético en la población. Es interesante destacar que esta técnica ha sido la más usada en los estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas a As, además de usarse en numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*.

El análisis de MN en linfocitos de sangre periférica se ha realizado con el objetivo de determinar un posible efecto de rotura o mala segregación cromosómica durante la división celular. A este respecto se consideran dos variables, la primera es el número de células binucleadas con MN (BNMN), que son las células que presentan daño citogenético independientemente del número de MN que presente. También se han evaluado los MN totales (MN), que es el número total de MN encontrados en el total de muestras analizadas. Para determinar la significación estadística de los resultados de los diferentes grupos de estudio se ha realizado la prueba *t* de Student.

La información se presenta reunida en la tabla 4.9 donde se pueden ver los valores medios de BNMN, de MN, la concentración de As en uñas y el tamaño de cada uno de los grupos analizados. Debido a que tanto los valores de BNMN como los de MN totales siguen el mismo patrón, en los distintos grupos estudiados, el análisis del daño citogenético se ha realizado sólo para la variable BNMN, que tiene un significado biológico más claro que los MN totales. Lo que nos interesa es cuantas células presentan daño, ya sea con uno o más MN.

Tabla 4.9: Daño citogenético en linfocitos, de la población estudiada

Total	C	E	E A	ENA
Nº de individuos	111 (100%)	106 (100%)	50 (47%)	56 (53%)
BNMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	11,96 $\pm$ 1,02	14,44 $\pm$ 0,99 <sup>c</sup>	14,83 $\pm$ 1,43	14,11 $\pm$ 1,39
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	14,20 $\pm$ 1,30	16,74 $\pm$ 1,17	17,17 $\pm$ 1,70	16,38 $\pm$ 1,64
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	3,57 $\pm$ 0,65	10,15 $\pm$ 1,56	13,04 $\pm$ 2,72	7,69 $\pm$ 1,70
Hombres	HC	HE	HA	HNA
Nº de individuos	40 (36%)	23 (22%)	8 (8%)	15 (14%)
BNMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	12,65 $\pm$ 1,90	10,27 $\pm$ 1,58 <sup>ME</sup>	16,57 $\pm$ 3,41	7,33 $\pm$ 1,10 <sup>HA</sup>
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	16,26 $\pm$ 2,57	12,52 $\pm$ 1,80	20,00 $\pm$ 3,96	9,25 $\pm$ 1,32
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	4,73 $\pm$ 0,93	11,12 $\pm$ 4,25	17,50 $\pm$ 9,63	7,72 $\pm$ 4,06
Mujeres	MC	ME	MA	MNA
Nº de individuos	71 (64%)	83 (78%)	42 (40%)	41 (39%)
BNMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	11,57 $\pm$ 1,90	15,56 $\pm$ 1,58 <sup>MC</sup>	14,54 $\pm$ 1,58	16,59 $\pm$ 1,70 <sup>MC</sup> <sup>HA</sup>
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	12,93 $\pm$ 1,37	17,94 $\pm$ 1,39	16,68 $\pm$ 1,88	19,23 $\pm$ 2,07
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	2,85 $\pm$ 0,87	9,86 $\pm$ 1,60	12,10 $\pm$ 2,65	7,67 $\pm$ 1,80

Los valores de n se presentan junto al % en relación con la población total, las medias se presentan junto al error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

Para una visualización más cómoda, los valores de BNMN también se han graficado y se presentan agrupados por exposición y sexo en la figura 4.7, por etnia y sexo en la población expuesta en la figura 4.8 y en la figura 4.9, separados por lugares de residencia. Al analizar la variable BNMN en la población total separada por exposición y sexo (figura 4.7) podemos ver que la población expuesta

presenta una mayor frecuencia de BNMN que la población control ( $p=0,048$ ). Al analizar la población de mujeres vemos que, las del grupo expuesto presentan una mayor frecuencia de daño citogenético que las del grupo control ( $p=0,015$ ). Al analizar la población expuesta, se ha encontrado que las mujeres presentan un nivel de daño citogenético significativamente mayor que los hombres ( $p=0,038$ ).

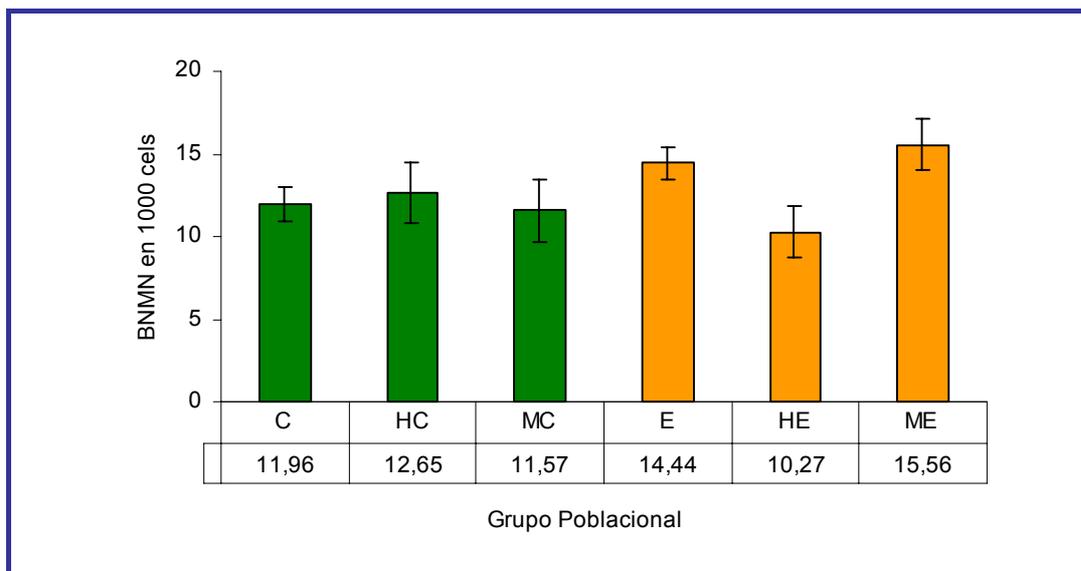


Figura 4.7: BNMN en la población expuesta y control

Los resultados obtenidos al analizar la población expuesta, separando los grupos por etnia y sexo se presentan en la figura 4.8. Estos resultados indican que no se han encontrado diferencias en cuanto al nivel de daño citogenético, medido con el ensayo de MN en linfocitos, entre las poblaciones expuestas de ambos grupos étnicos. Al analizar la población de hombres, podemos ver que los atacameños presentan un mayor nivel de daño que los expuestos no atacameños ( $p=0,010$ ). Al analizar con mayor detalle el grupo de expuestos no atacameños, se ha determinado que las mujeres presentan una mayor frecuencia de daño citogenético que los hombres ( $p=0,002$ ). Finalmente el análisis de la población de mujeres indica que las mujeres expuestas no atacameñas presentan un mayor nivel de daño citogenético que las del grupo control ( $p=0,014$ ).

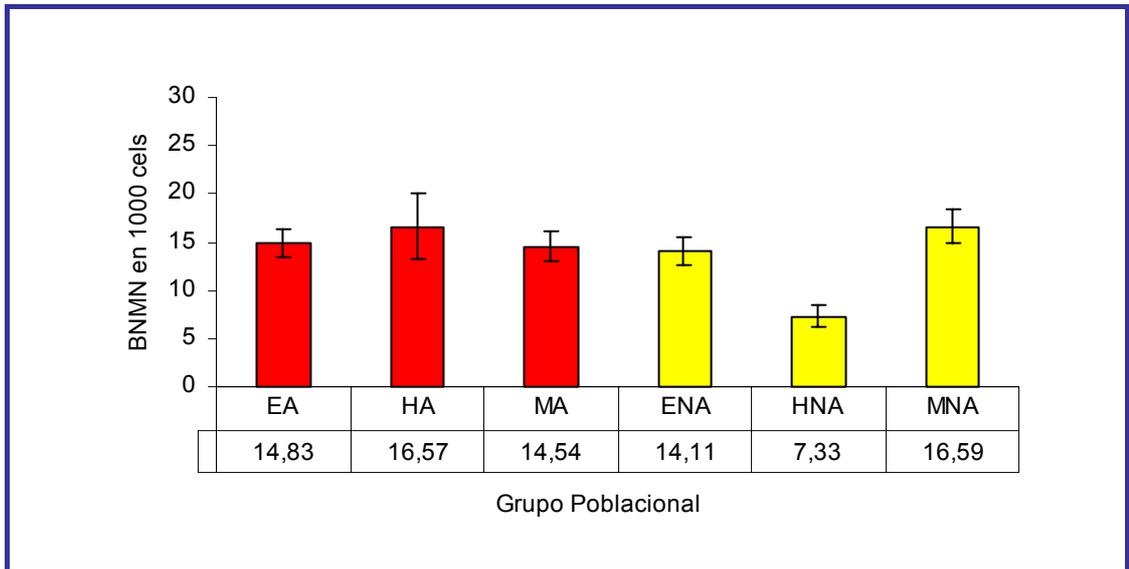


Figura 4.8: BNMN en la población expuesta, separada por etnia

Debido a que en los diferentes lugares muestreados, hay diferentes niveles de As ambiental, se ha determinado el daño citogenético causado en la población, separando los grupos según el lugar de residencia. En la tabla 4.10 se presentan los valores de As en agua (mg As/L), As en uñas ( $\mu\text{g As/g}$ ), BNMN y MN, para cada uno de los puntos analizados, junto con el tamaño muestral para cada caso. Los datos se presentan graficados en la figura 4.9. Al igual que en el análisis anterior, se puede ver que las variables BNMN y MN oscilan de la misma manera por lo que, en este caso, el análisis del daño citogenético también se realiza con la variable BNMN.

Los resultados del análisis indican que al separar la población según el lugar de residencia y compararlas con el grupo control, el único lugar en que se han detectado diferencias estadísticamente significativas es Toconao ( $p=0,000$ ), que presenta un mayor nivel de daño citogenético respecto al control. Hay que destacar que la población de Toconao cuenta con un bajo número poblacional.

Tabla 4.10: Daño citogenético en linfocitos, de la población analizada por lugar de residencia

Residencia	N	mg As/L	$\mu\text{g As/g uña}$	BNMN	MN
San Pedro	25	0,75	18,33 $\pm$ 4,88	11,77 $\pm$ 1,88	13,26 $\pm$ 2,14
Toconao	16	0,02	8,79 $\pm$ 2,50	21,81 $\pm$ 2,14 *** <sup>c</sup>	25,13 $\pm$ 2,42
Peine	8	0,003	2,58 $\pm$ 1,11	11,88 $\pm$ 3,47	15,00 $\pm$ 4,81
Socaire	4	0,26	19,80 $\pm$ 16,08	12,50 $\pm$ 0,35	13,25 $\pm$ 7,43
Calama	53	0,021	7,36 $\pm$ 1,59	13,94 $\pm$ 1,45	16,25 $\pm$ 7,43
Concepción	102	0,0002	3,57 $\pm$ 0,65	11,96 $\pm$ 1,02	14,20 $\pm$ 1,3

Los valores de n se presentan junto al % en relación con la población total, las medias junto al error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

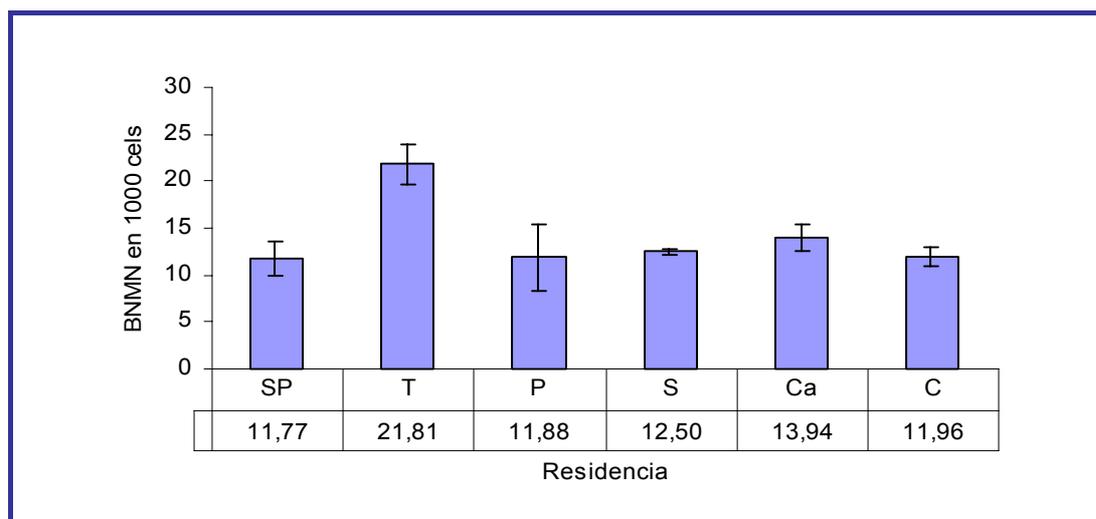


Figura 4.9: BNMN en la población, analizada por lugar de residencia

Para analizar los posibles factores de confusión que influyen la variable BNMN, se ha realizado un análisis de varianza univariante. De ese modo se han evaluado las distintas variables consideradas en la encuesta y se ha determinado su influencia frente a la variable BNMN. Para aplicar este análisis, se ha tenido que transformar la variable BNMN mediante la raíz cuadrada. De este modo se cumple con la normalidad de la distribución de los datos, necesaria para aplicar el modelo.

En la tabla 4.11 se presenta un resumen del modelo seleccionado donde podemos ver que las variables que se presentan como factores de confusión para la frecuencia de BNMN son: el sexo ( $p=0,035$ ), la edad ( $p=0,000$ ) y el consumo de café ( $p=0,000$ ). De la estimación de los parámetros del modelo, se concluye que, en las mismas condiciones, las mujeres tienen más BNMN que los hombres, que a mayor edad se presenta una mayor frecuencia de BNMN y que, a mayor consumo de café, se presentan más BNMN. Estos efectos se producen independientemente de la exposición a As, por lo que se consideran factores de confusión para esta variable. La  $R^2$  corregida indica que este modelo explica el 34,2% de los resultados obtenidos.

Tabla 4.11: Resumen del modelo estadístico para MN en linfocitos

	<b>B</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
modelo corregido	148,369	22,887	0,000***
Intersección	10,913	8,417	0,004**
Expoetnia	4,314	1,664	0,192
Sexo	5,825	4,492	0,035*
Edad	125,394	96,714	0,000***
Café	5,127	3,954	0,048*

$R^2$  corregida = 0,342. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

Finalmente, para determinar la correlación existente entre el daño genético en linfocitos de sangre periférica y la concentración de As en uñas, se han hecho gráficos de dispersión en los cuales se ha incluido la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación  $R^2$ . Los resultados indican que no se presenta correlación entre la concentración de As en las uñas y la frecuencia de daño citogenético medida mediante el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica.

Al evaluar los MN en linfocitos, también se ha aprovechado para calcular el índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI) en cada uno de los grupos de estudio. El significado, valor y resultado de este índice se presenta en detalle a continuación.

#### 4.4.2 Índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI)

El CBPI da cuenta de la velocidad de división celular y se usa como indicativo del grado de toxicidad al que se encuentran expuestas las células ya que, a mayor toxicidad, disminuye la velocidad de división celular. Se analizó la población organizada según exposición y sexo, los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.10; en la figura 4.11 se presentan los resultados obtenidos al analizar la población expuesta separada por etnia y sexo. Finalmente, se presenta el análisis según el lugar de residencia (figura 4.12). Los datos se presentan en forma gráfica, junto a las tablas correspondientes. El CBPI se analizó mediante la prueba *t* de Student.

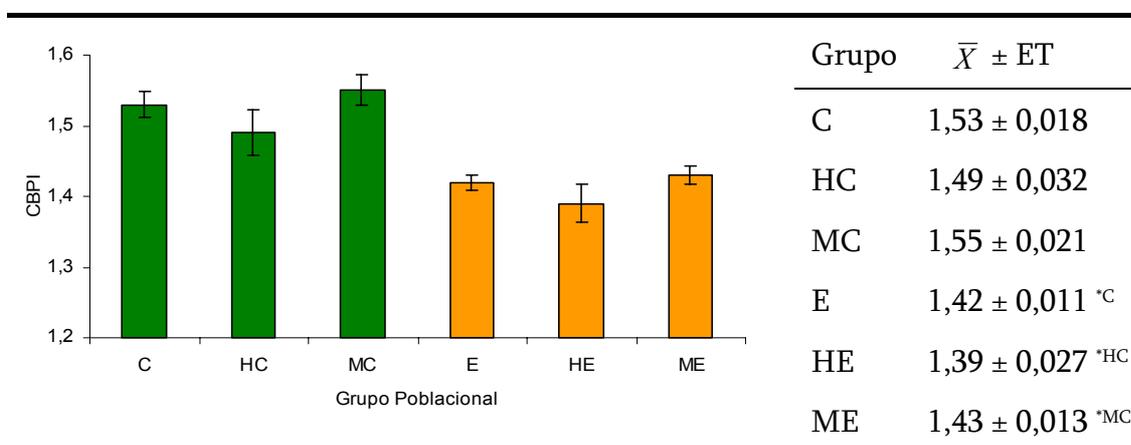


Figura 4.10: CBPI en la población expuesta y control

Al hacer el análisis del CBPI en la población total, y tal como se ve claramente en la figura, el grupo control presenta un CBPI mayor que el grupo expuesto ( $p=0,048$ ). Al analizar la población de mujeres se observa que las mujeres control presentan una media de CBPI mayor que las mujeres expuestas ( $p=0,015$ ). Esto también se observa al analizar la población de hombres ( $p=0,02$ ). Estos resultados indican que la población expuesta presenta un mayor índice de toxicidad al ser comparada con la población control.

Se ha analizado la población expuesta comparando los grupos por etnia y sexo. Para mayor comodidad, los resultados se presentan graficados en la figura 4.11. En la figura se puede ver que el análisis de CBPI indica que los atacameños presentan un mayor grado de toxicidad celular que los no atacameños ya sean del grupo expuesto ( $p=0,042$ ) o del grupo control ( $0,000$ ). Al analizar el grupo de

población no atacameña, vemos que los expuestos presentan un mayor índice de toxicidad celular que los controles. Estos resultados indican que se presenta un mayor grado de toxicidad celular en la población expuesta que en la población control independientemente de la etnia. También se ha encontrado un mayor grado de citotoxicidad en la población atacameña.

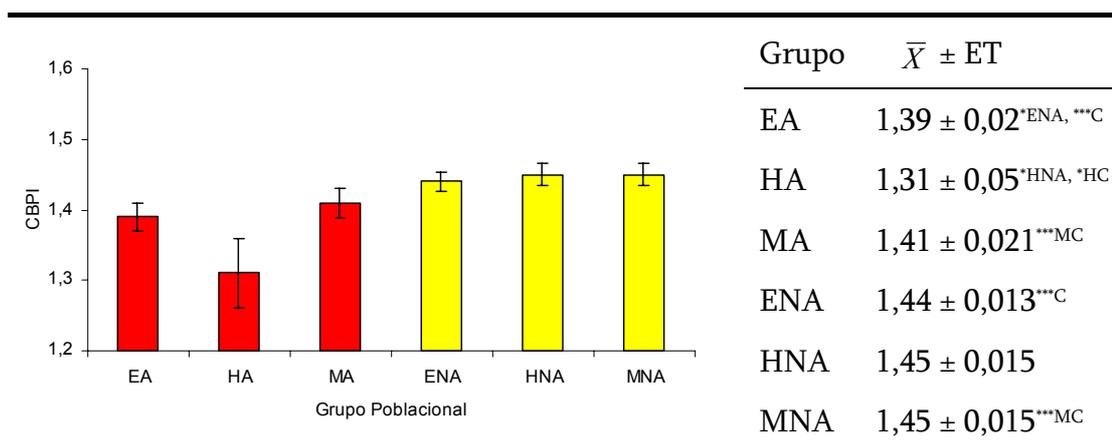


Figura 4.11: CBPI en la población expuesta, separada por etnia

Al analizar la población de mujeres, se observa que independientemente de la etnia, las expuestas presentan valores de toxicidad más altos que las del grupo control ( $p=0,000$ ). Además, en el grupo de mujeres la población atacameña presenta el valor de CBPI más bajo. Esto también se ha obtenido al analizar la población de hombres, en que, los atacameños presentan una media menor del CBPI que los hombres no atacameños ya sean del grupo expuesto ( $p=0,031$ ), como del grupo control ( $p=0,000$ ).

Los resultados del análisis del CBPI por lugar de residencia se presentan en la figura 4.12. Se ha determinado que la población control presenta un mayor valor de CBPI que las poblaciones de San Pedro de Atacama ( $p=0,000$ ), Toconao ( $p=0,001$ ) y Calama ( $p=0,001$ ).

Para estudiar los factores de confusión de la variable CBPI se ha utilizado un modelo de regresión lineal múltiple (tabla 4.12), y se ha visto que los factores que influyen la variable en estudio son: la edad ( $p=0,000$ ), la expoetnia ( $p=0,000$ ), la concentración de As en uñas ( $p=0,014$ ) y el consumo de pescado por semana

(0,009). La  $R^2$  corregida=0,349 nos indica que el modelo explica un 34,9% de los resultados.

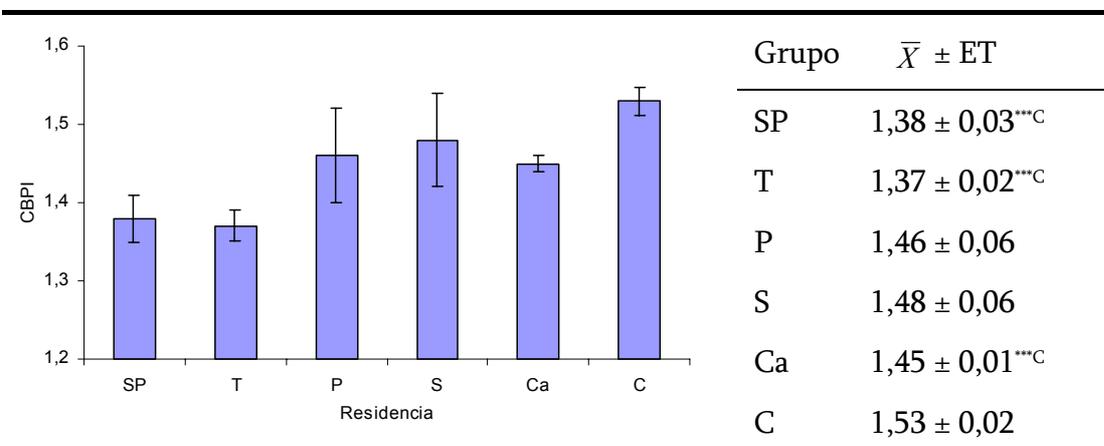


Figura 4.12: CBPI en la población, analizada por lugar de residencia

Tabla 4.12: Resumen del modelo estadístico par el CBPI

	<b>B</b>	<b>p</b>
Edad	-0,006	0,000***
Epoetnia	-0,067	0,000***
Consumo de pescado	-0,033	0,009**
Concentración de As en uñas	-2,64 E-05	0,014*

$R^2$  corregida= 0,349

En el modelo se indica que a mayor edad disminuye el valor del CBPI. También indica que el mayor índice de toxicidad lo presten los atacameños, luego los expuestos no atacameños y finalmente los controles. Esto coincide con los niveles de exposición, en que los atacameños presentan mayores niveles de exposición que los no atacameños (en la variable expoetnia se analizan los dos parámetros en conjunto). La concentración de As en las uñas, también se presenta como un factor de confusión al evaluar el CBPI. Al igual que en el caso de la expoetnia, el CBPI varía en relación con la exposición al As, presentando un mayor grado de toxicidad a mayor exposición.

Finalmente, el consumo de pescado también presenta un valor significativo como factor de confusión, resultando que, a mayor consumo de pescado, mayor es el

valor del CBPI. Esto es inesperado ya que se sabe que los peces acumulan As en su organismo al estar en un ambiente contaminado, por lo que su consumo podría tener consecuencias citotóxicas. De todos modos, hay que señalar que los peces metabolizan el arsénico acumulándolo en su forma orgánica mayormente en forma de arsenobetaínas, que son más excretables que las formas de As inorgánicas y que no ha demostrado presentar niveles de citotoxicidad.

Es importante destacar que al analizar el consumo semanal de pescado mediante la correlación de Pearson, vemos que esta variable está correlacionada negativamente con la etnia ( $-0.453$ ,  $p=0,000$ ), con la exposición ( $-0.272$ ,  $p=0,000$ ) y con la expoetnia, como variable conjunta ( $-0.398$ ,  $p=0,000$ ). Estas correlaciones corresponden a la realidad geográfica del muestreo ya que, en este estudio, la población control está ubicada en una ciudad costera donde el consumo de pescado fresco es más habitual. La población expuesta está ubicada en el desierto de Atacama, lejos del mar, donde no hay cursos abundantes de agua para poder pescar. En estos sitios el consumo de pescado es muy pobre y, generalmente, cuando se consume es pescado este proviene de otras regiones. A pesar de estas consideraciones, los estadísticos de colinealidad dan un valor de tolerancia de la variable de 0.842, por lo que se ha decidido mantenerla en el modelo.

#### **4.4.3 MN en mucosa bucal**

La evaluación genotóxica de las células epiteliales es de gran utilidad desde el punto de vista epidemiológico. Hay que considerar que más del 90% de los cánceres se originan en tejidos epiteliales (Carins, 1975). Se ha demostrado que el ensayo de MN en células de exfoliación es un biomarcador sensible a diversos factores (Stich y Rosin, 1993b; Picker y Fox, 1986; Sarto *et al.*, 1987). Además, el uso de células de la mucosa bucal ha sido empleado en diversos estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas a elevadas concentraciones de As en el agua para determinar el daño genotóxico, evaluado por medio de la frecuencia de MN (tabla 1.8).

Para determinar el daño citogenético en células epiteliales se ha utilizado el test de MN en células de la mucosa bucal, en el que se han determinado tanto las células bucales con MN (CBMN), como los MN totales. En la tabla 4.13 se presentan los valores de CBMN, MN totales, As en uñas y número de personas

analizadas en cada grupo. Para determinar la significación de las diferencias en la frecuencia de micronúcleos entre los distintos grupos, se ha usado la prueba *t* de Student. Como se puede observar, los valores de CBMN y MN totales oscilan de manera parecida en los distintos grupos. Además, al calcular el coeficiente entre MN totales y CBMN encontramos que, en todos los grupos, las CBMN presentan un valor apenas superior a un MN. Como en el caso de los MN en linfocitos, se ha decidido analizar la frecuencia de células que presentan daño genético (CBMN), ya sea con uno o más MN.

Tabla 4.13: Daño citogenético medido en células de la mucosa bucal

Total	C	E	EA	ENA
Nº de personas	111 (100%)	106 (100%)	50 (47%)	56 (53%)
CBMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	2,74 $\pm$ 0,26	3,14 $\pm$ 0,32	3,02 $\pm$ 0,34	3,24 $\pm$ 0,54
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	3,51 $\pm$ 0,33	4,10 $\pm$ 0,45	3,90 $\pm$ 0,50	4,29 $\pm$ 0,74
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	3,57 $\pm$ 0,65	10,15 $\pm$ 1,56	13,04 $\pm$ 2,72	7,69 $\pm$ 1,70
Hombres	HC	HE	HEA	HNA
Nº de individuos	40 (36%)	23 (22%)	8 (8%)	15 (14%)
CBMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	3,21 $\pm$ 0,45	2,83 $\pm$ 0,73	3,56 $\pm$ 1,28	2,47 $\pm$ 0,91
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	4,26 $\pm$ 0,59	3,96 $\pm$ 1,03	5,44 $\pm$ 2,15	3,22 $\pm$ 1,12
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	4,73 $\pm$ 0,93	11,12 $\pm$ 4,25	17,50 $\pm$ 9,63	7,72 $\pm$ 4,06
Mujeres	MC	ME	MA	MNA
Nº de individuos	71 (64%)	83 (78%)	42 (40%)	41 (39%)
CBMN ( $\bar{X} \pm ET$ )	2,44 $\pm$ 0,30	3,23 $\pm$ 0,36	2,91 $\pm$ 0,33	3,56 $\pm$ 0,66
MN ( $\bar{X} \pm ET$ )	3,03 $\pm$ 0,39	4,15 $\pm$ 0,50	3,60 $\pm$ 0,44	4,73 $\pm$ 0,93
Uñas ( $\mu\text{gAs/g}$ )	2,85 $\pm$ 0,87	9,86 $\pm$ 1,60	12,10 $\pm$ 2,65	7,67 $\pm$ 1,80

CBMN: células bucales micronucleadas, MN: micronúcleos totales.

Los valores de n se presentan junto al % en relación con la población total, las medias se presentan junto al error típico

Para una mayor comodidad, los resultados, ordenados por exposición y sexo, se han representado gráficamente en la figura 4.13, la que se presenta a continuación. Como se puede ver en la figura, los resultados indican que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nivel de daño citogenético, al utilizar la variable CBMN, para comparar la población

expuesta con la población control. Tampoco se obtuvieron valores significativos en cuanto a la diferencia de daño citogenético al analizar los grupos de hombres y mujeres por separado.

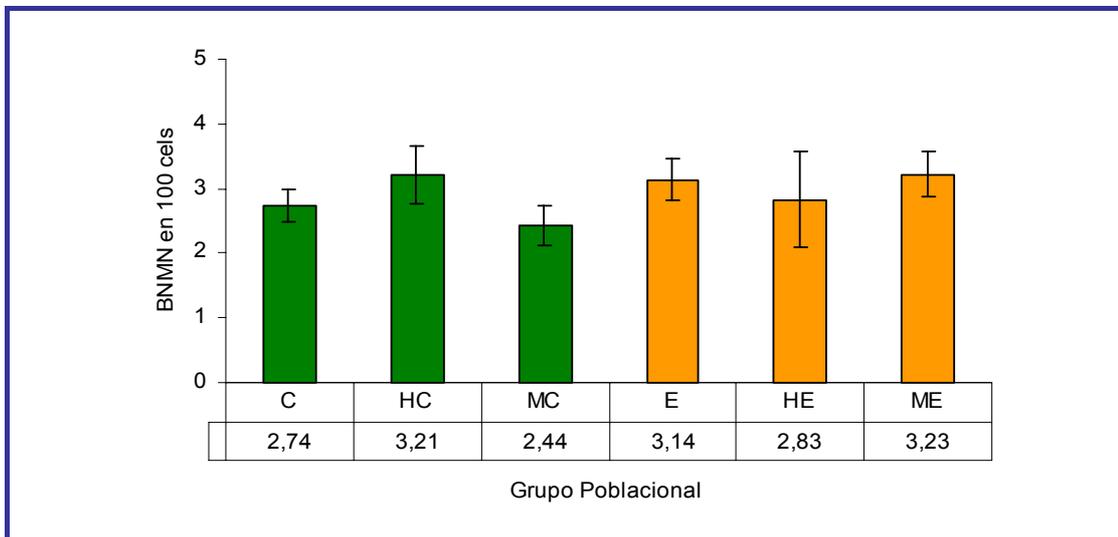


Figura 4.13: CBMN en la población expuesta y control

Los datos obtenidos al analizar la población expuesta y comparar los grupos según la etnia y el sexo se presentan en la figura 4.14. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de CBMN, al comparar los distintos grupos de estudio.

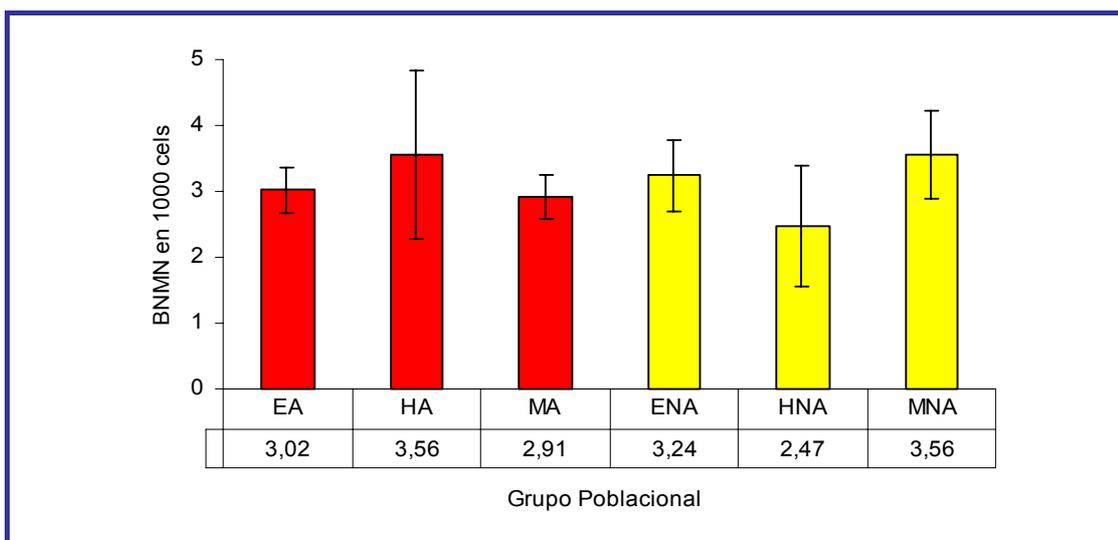


Figura 4.14: CBMN en la población expuesta, separada por etnia

Para analizar la población total agrupada según los diferentes lugares de residencia, se ha confeccionado la tabla 4.14 en la que, además de los valores de CBMN y MN totales, se presentan los valores de As en agua, la concentración media de As en uñas y el número de individuos de cada grupo. Los datos de CBMN también se presentan gráficamente en la figura 4.15.

Tabla 4.14: Daño citogenético medido en células de la mucosa bucal en la población, analizada por lugar de residencia

Residencia	n	mg As/L	µg As/g uña	CBMN	MN
San Pedro	25	0,75	18,33 ± 4,88	2,16 ± 0,26	2,52 ± 0,34
Toconao	16	0,02	8,79 ± 2,50	4,18 ± 0,91	5,84 ± 1,34
Peine	8	0,003	2,58 ± 1,11	1,63 ± 0,47	2,13 ± 0,49
Socaire	4	0,26	19,80 ± 16,08	4,00 ± 0,35 *** <sup>c</sup>	4,75 ± 0,52
Calama	53	0,021	7,36 ± 1,59	3,45 ± 0,56	4,59 ± 0,77
Concepción	102	0,0002	3,57 ± 0,65	2,74 ± 0,26	3,51 ± 0,33

Los valores de n se presentan junto al % en relación con la población total, las medias junto al error típico. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Los resultados indican que al comparar las frecuencias de CBMN para los distintos lugares de residencia de la población expuesta y compararlas con la población del grupo control (tabla 4.14), sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre Socaire y Concepción ( $p=0,001$ ). En que la población de Socaire presenta una mayor frecuencia de CBMN que la población de Concepción ( $p=0,001$ ).

Para estudiar los posibles factores de confusión sobre la variable CBMN, se realizó un análisis de varianza univariante. Para ello se ha tenido que transformar la variable CBMN a  $(CBMN)^{1/2}$  ya que es necesario cumplir con la normalidad de distribución de los datos. Para verificar la normalidad de los datos se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Al aplicar el modelo introduciendo las variables evaluadas en la encuesta, encontramos que ninguna de ellas presenta ningún efecto sobre la variable en estudio. También se utilizó un modelo de regresión lineal multivariante para confirmar lo anterior y se volvió a encontrar el mismo resultado, por lo que podemos concluir que ninguno de los factores evaluados en la encuesta tienen un efecto detectable sobre la variable CBMN.

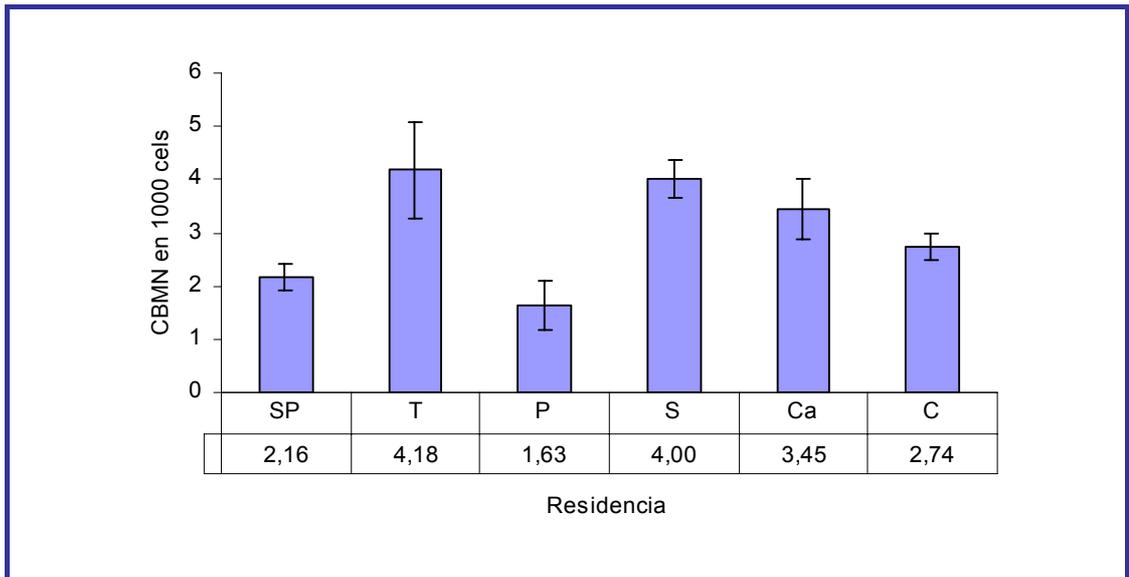


Figura 4.15: CBMN en la población, analizada por lugar de residencia

Para estudiar la correlación entre las CBMN y la concentración de As en agua y uñas, se han realizado las gráficas de dispersión con la correspondiente línea de tendencia y, en cada caso, se ha determinado la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de correlación  $R^2$ . Se ha trabajado con el programa Excel. Los valores del coeficiente de correlación obtenidos son muy pequeños indicando que las variables en estudio no están correlacionadas.

#### 4.5 BIOMARCADOR DE SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL

La susceptibilidad individual frente a los compuestos xenobióticos está determinada por la existencia de polimorfismos genéticos involucrados en su metabolismo. Esto supone diferentes capacidades enzimáticas en diversas rutas metabólicas y, por lo tanto, explica que las personas reaccionen de manera diferente, en iguales condiciones, frente a una misma exposición. En este estudio se han analizado tres genes polimórficos que codifican las GSTs, que se ha postulado que participan en el metabolismo del As (Chiou *et al.*, 1997; Taningher *et al.*, 1999; Chouchane y Snow, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Maiti y Chatterjee, 2002).

## Polimorfismos de las *GSTs*

El análisis de los polimorfismos genéticos se ha llevado a cabo sobre un total de 215 personas. En la tabla 4.15 se presenta la frecuencia de los distintos genotipos para los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *GSTP1* observados en la población total estudiada.

Tabla 4.15: Frecuencia de los genotipos para *GSTT1*, *GSTM1* y *GSTP1* en la población estudiada

Alelo	Frecuencia	%
<i>MT<sup>+</sup></i>	123	57,2
<i>MT<sup>-</sup></i>	92	42,8
<i>TT<sup>+</sup></i>	176	81,9
<i>TT<sup>-</sup></i>	39	18,1
<i>ile/ile</i>	111	51,6
<i>Ile/val</i>	65	30,2
<i>val/val</i>	39	18,1

La población estudiada en este trabajo cuenta con 92 personas que presentan la delección del gen *GSTM1*, lo que representa un 42,8% del total de la población. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en una población española estudiada por Hernández y colaboradores (comunicación personal), en la que un 46,6% de la población presentaba la delección del gen y con la población egipcia estudiada por Abdel-Rahman y colaboradores (1996), en la que un 44% de la población también presentaba la delección de *GSTM1*.

Para el genotipo *GSTT1*, un 81,9% de la población presenta el genotipo salvaje y un 18,1% presenta la delección del gen. Estos valores son similares a los obtenidos por Garte y colaboradores (2001) para una población caucásica, en la que un 19,7%, de los individuos presenta la delección del gen.

Para el genotipo *GSTP1* se cuenta con una población total analizada de 215 individuos, de los cuales el 51,6% son homocigotos salvajes (presentan el genotipo *ile/ile*), el 30,2% son heterocigotos (*ile/val*), y el 18,1% presenta en homocigosis el alelo mutado (*val/val*). La población estudiada no está en equilibrio de Hardy-Weinberg, encontrándose más representantes de lo esperado en los genotipos homocigotos. Sin embargo, estos resultados son similares a los

encontrados por Hernández y colaboradores (comunicación personal), en una población española, donde el 50,9% presenta el genotipo *ile/ile* (homocigoto salvaje), un 36,2% es heterocigoto (*ile/val*) y un 12,9% presenta homocigosis para el alelo mutado (*val/val*).

#### 4.5.1 Análisis de los genotipos en la población expuesta y control

En una población total de 215 personas, se ha realizado el análisis de regresión logística binaria, comparando la población expuesta con el control. Aunque, en principio los polimorfismos genéticos no varían entre los habitantes de una zona geográfica concreta, dado que en este estudio la población expuesta presenta dos grupos de etnia diferente, estos grupos también se han analizado por separado. Para este análisis contamos con 104 individuos expuestos y 111 individuos controles. Los resultados del análisis de regresión para cada uno de los loci estudiados se presentan en la tabla 4.16, en la que se puede ver el número de casos analizados para cada genotipo, la frecuencia, los *odds ratio* y la correspondiente significación estadística. Se destacan los casos en que se han obtenido resultados estadísticamente significativos o que rozan el nivel de significación.

Como podemos observar, los resultados del análisis de *odds ratio* no son estadísticamente significativos al comparar los grupos expuesto y control para los polimorfismos de *GSTM1* y de *GSTT1*. En cuanto al polimorfismo para *GSTP1*, podemos constatar que la población control está en perfecto equilibrio de Hardy-Weinberg; en cambio, la población del grupo expuesto está en desequilibrio, encontrándose desplazada hacia los genotipos homocigotos y presentando un menor número de heterocigotos de lo esperado.

El único polimorfismo que presenta resultados estadísticamente significativos al comparar los grupos expuesto y control corresponde al genotipo *val/val* para *GSTP1*, que corresponde al homocigoto para el alelo mutado. El genotipo *val/val* se presenta en el 8,1% de los controles y en el 29,1% de los expuestos. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (2,059-10,254), nos indica que el genotipo *val/val* está 4,6 veces más representado en la población expuesta que en la población control. De hecho, del total de personas que tienen el genotipo *val/val*, el 23,1% son controles y el 76,9% expuestos ( $p=0,000$ ).

Tabla 4.16: Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci *MI*, *T1* y *PI* en los grupos expuesto y control

Genotipos n (%)			OR (IC 95%)	<i>p</i>
<u><i>MI</i><sup>+</sup></u>		<u><i>MI</i><sup>-</sup></u>		
C	64 (57,7)	47 (42,3)		
E	59 (56,7)	45 (43,3)	<i>M</i> 1,039 (0,605-1,783)	0,891
<u><i>T1</i><sup>+</sup></u>		<u><i>T1</i><sup>-</sup></u>		
C	94 (84,7)	17 (15,3)		
E	82 (78,8)	22 (21,2)	<i>T</i> 1,484 (0,738-2,894)	0,269
<u><i>ile/ile</i></u>		<u><i>ile/val</i></u>	<u><i>val/val</i></u>	
C	64 (57,7)	38 (34,2)	9 (8,1)	<i>i/i</i> 0,606 (0,353-1,038) 0,068
E	47 (45,2)	27 (26)	30 (29,1)	<i>i/v</i> 0,674 (0,374-1,213) 0,188
			<i>v/v</i> 4,595 (2,059-10,254) 0,000***	
<u><i>M, ile/ile</i></u>		<u><i>M, ile/val</i></u>	<u><i>M, val/val</i></u>	
C	27 (11,7)	13 (11,7)	7 (6,3)	<i>M, i/i</i> 0,741 (0,386-1,423) 0,367
E	20 (18,9)	10 (9,4)	15 (14,2)	<i>M, i/v</i> 0,802 (0,335-1,917) 0,62
			<i>M, v/v</i> 2,504 (0,977-6,415) 0,056	
<u><i>T, ile/ile</i></u>		<u><i>T, ile/val</i></u>	<u><i>T, val/val</i></u>	
C	10 (9)	4 (3,6)	3 (2,7)	<i>T, i/i</i> 0,842 (0,319-2,222) 0,728
E	8 (7,5)	7 (6,6)	7 (6,6)	<i>T, i/v</i> 1,930 (0,548-6,798) 0,306
			<i>T, v/v</i> 2,598 (0,654-10,327) 0,175	
<u><i>MT, ile/ile</i></u>		<u><i>MT, ile/val</i></u>	<u><i>MT, val/val</i></u>	
C	4 (3,6)	0	2 (1,8)	<i>M, T, i/i</i> 0,795 (0,174-3,638) 0,767
E	3 (2,8)	1 (0,9)	4 (3,8)	<i>M, T, i/v</i>
			<i>M, T, v/v</i> 2,202 (0,395-12,286) 0,368	
<u><i>M, val</i></u>		<u><i>T, val</i></u>	<u><i>MT, val</i></u>	
C	20 (18)	7 (6,3)	2 (1,8)	<i>M, v</i> 1,440 (0,744-2,788) 0,28
E	25 (23,6)	14 (13,2)	5 (4,7)	<i>T, v</i> 2,311 (0,894-5,977) 0,084
			<i>M, T, v</i> 2,753 (0,522-14,509) 0,233	
<u><i>MT</i></u>				
C	6 (5,4)			
E	8 (7,7)			<i>M, T</i> 1,458 (0,488-4,355) 0,499

Desde *MT* hasta *MT, val*, los valores de % son en relación con el total de los otros genotipos combinados. \**p*≤0,05; \*\**p*≤0,01; \*\*\**p*≤0,001

El genotipo *ile/ile* para *GSTP1*, (homocigoto para el alelo salvaje), se presenta en un 57,7% de los controles y en un 45,2% de los expuestos. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,353-1,038), nos indica que el genotipo *ile/ile* está más representado en la población control. En este caso, del total de personas que tienen el genotipo *ile/ile*, 57,7% son controles y 42,3% son expuestos (*p*=0,068).

Finalmente se presentan los valores para genotipos combinados. De las distintas combinaciones analizadas, destacamos la *M, val/val*, que corresponde a la delección del gen *M1* y al genotipo *val/val* para el gen *GSTP1*. En este caso podemos ver que el genotipo *M, val/val* se presenta en el 6,3% de la población control y el 14,2% de la población expuesta. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (977-6,415), nos indica que el genotipo *M, val/val* está 2,5 veces más representado en el grupo expuesto que en el control. Al analizar el total de individuos con este genotipo se puede ver que el 31,8% son controles y el 68,2 son expuestos ( $p=0,056$ ).

#### 4.5.2 Análisis de los genotipos en la población total separada por etnia

Dada la existencia de dos etnias diferentes en la población estudiada, resulta apropiado efectuar el análisis poblacional de los genotipos separando la población por etnias. Para hacer este análisis se dispone de 48 personas de etnia atacameña (EA) y con 167 personas de etnia no atacameña (NA), entre expuestos y controles. Los resultados del análisis se presentan en la tabla 4.17, en la que se puede ver el número de casos analizados para cada genotipo, la frecuencia, el valor de *odds ratio* con su intervalo de confianza, y la significación estadística para cada uno de los casos. Se destacan los resultados que han presentado diferencias estadísticamente significativas.

Como podemos ver al separar la población por etnia, independientemente de su exposición, no se presentan resultados estadísticamente significativos para los loci *GSTM1* y *GSTT1* cuando se consideran de forma independiente. En cuanto al polimorfismo en *GSTP1*, podemos decir que la población atacameña no está en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=5,18$ ) encontrándose más representados los genotipos homocigotos. La población no atacameña tampoco está en equilibrio ( $\chi^2=21$ ), presentando una mayor frecuencia de homocigotos salvajes (*ile/ile*), una menor frecuencia de heterocigotos y una frecuencia de acuerdo con lo esperado de homocigotos mutantes (*val/val*).

Tabla 4.17: Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci *MI*, *T1* y *P1* en la población agrupada por etnia

	Genotipo n (%)			OR (I.C 95%)	<i>p</i>
	<i>MI</i> <sup>+</sup>	<i>MI</i> <sup>-</sup>			
EA	26 (54,2)	22 (45,8)			
NA	97 (58,1)	70 (41,9)		<i>M</i> 0,835 (0,447-1,627)	0,629
	<i>T1</i> <sup>+</sup>	<i>T1</i> <sup>-</sup>			
EA	37 (77,1)	11 (22,9)			
NA	139 (83,2)	28 (16,8)		<i>T</i> 0,678 (0,309-1,487)	0,332
	<i>ile/ile</i>	<i>ile/val</i>	<i>val/val</i>		
EA	14 (29,2)	16 (33,3)	18 (38,3)	<i>i/i</i> 3,365 (1,681-6,737)	0,001***
NA	97 (58,1)	49 (29,3)	21 (12,6)	<i>i/v</i> 0,831 (0,418-1,650)	0,596
				<i>v/v</i> 0,240 (0,114-0,504)	0,000***
	<i>M, ile/ile</i>	<i>M, ile/val</i>	<i>M, val/val</i>		
EA	7 (14)	5 (10)	10 (20)	<i>M, i/i</i> 1,845 (0,768-4,433)	0,171
NA	40 (24)	18 (10,8)	12 (7,2)	<i>M, i/v</i> 1,039 (0,365-2,961)	0,943
				<i>M, v/v</i> 0,294 (0,118-0,732)	0,008**
	<i>T, ile/ile</i>	<i>T, ile/val</i>	<i>T, val/val</i>		
EA	4 (8)	3 (6)	4 (8)	<i>T, i/i</i> 1,007 (0,315-3,213)	0,991
NA	14 (8,4)	8 (4,8)	6 (3,6)	<i>T, i/v</i> 0,755 (0,192-2,963)	0,687
				<i>T, v/v</i> 0,410 (0,111-1,517)	0,182
	<i>MT, ile/ile</i>	<i>MT, ile/val</i>	<i>MT, val/val</i>		
EA	2 (4)	0	3 (6)	<i>M, T, i/i</i> 0,710 (0,133-3,779)	0,688
NA	5 (3)	1 (0,6)	3 (1,8)	<i>M, T, i/v</i> -	-
				<i>M, T, v/v</i> 0,276 (0,054-1,415)	0,123
	<i>M, val</i>	<i>T, val</i>	<i>MT, val</i>		
EA	15 (30)	7 (14)	3 (6)	<i>M, v</i> 0,482 (0,233-0,997)	0,049*
NA	30 (18)	14 (8,4)	4 (2,4)	<i>T, v</i> 0,536 (0,203-1,415)	0,208
				<i>M, T, v</i> 0,368 (0,790-1,705)	0,201
	<i>MT</i>				
EA	9 (5,4)				
NA	5 (10,4)			<i>M, T</i> 0,490 (0,156-1,538)	0,221

Desde *MT* hasta *MT, val*, los valores de % son en relación con el total de los otros genotipos combinados. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

Hay cuatro polimorfismos que presentan diferencias estadísticamente significativas al separar la población por etnias, tres de los cuales coinciden con el análisis realizado en la población separada por exposición. Así, el genotipo *ile/ile* (homocigoto para el alelo salvaje en *GSTPI*) está presente en el 29,2% de los atacameños y en el 58,1% de los no atacameños. El valor de *odds ratio* con un

intervalo de confianza del 95% (1,681-6,737) nos indica que el polimorfismo *ile/ile* está 3,4 veces más representado en la población no atacameña ( $p=0,001$ ).

El genotipo *val/val* (homocigoto para el alelo mutado en *GSTPI*) está presente en el 38,3% de atacameños y en el 12,6% de los no atacameños. Como nos indica el valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,114-0,504), el polimorfismo *val/val* está más representado en la población atacameña ( $p=0,000$ ).

El polimorfismo *M, val/val* (ausencia del gen *GSTM1* y homocigosis para el alelo mutado en *GSTPI*) está presente en el 20% de los atacameños y en el 7,2% de los no atacameños. Como nos indica el valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,118-0,732), el polimorfismo *val/val* se encuentra más representado en la población atacameña ( $p=0,008$ ).

El polimorfismo *M, val* (Delección del gen *GSTM1* y al menos a una copia para el alelo en *GSTPI*) está presente en el 30% de los atacameños y en el 18% de los no atacameños. Como nos indica el valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,233-0,997), el polimorfismo *M, val* está más representado en la población atacameña ( $p=0,049$ ).

#### **4.5.3 Análisis de genotipos y micronúcleos en linfocitos de sangre periférica**

Para realizar este análisis se compararon las frecuencias genotípicas en aquellos subgrupos con un valor de MN (BNMN) por bajo y por encima de la media de células binucleadas con MN (BNMN), que en la población total es de 10 BNMN, Este análisis comparativo también se efectuó entre los subgrupos extremos correspondientes al percentil 25 ( $\leq 5\%$  BNMN) y al percentil 75 ( $\geq 19\%$  BNMN). Debido a que el análisis presenta significación estadística para los mismos genotipos, se presenta tan sólo la comparación de los subgrupos de los extremos. En la población total hay 58 personas que tienen un valor de hasta 5 MN y 48 personas que tienen 19 o más MN. A continuación se presenta la tabla 4.18, que muestra la distribución de la frecuencia de los polimorfismos de las *GSTs* en los diferentes loci estudiados, en la población ordenada y analizada según el número de BNMN en linfocitos de sangre periférica. En la tabla se puede ver el número de casos analizados para cada genotipo, la frecuencia, el valor de *odds ratio*, con su

intervalo de confianza y la significación estadística para cada uno de los casos. Se destacan los resultados que han mostrando diferencias estadísticamente significativas.

Como podemos ver en la tabla 4.18, los valores del análisis de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* no presentan resultados estadísticamente significativos al analizarlos por separado. En cuanto al polimorfismo de *GSTP1* podemos decir que, al agrupar la población según el número de células binucleadas con MN, el subgrupo correspondiente al percentil 25 (BNMN $\leq$ 5‰) no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=7,29$ ), estando más desplazada hacia los homocigotos salvajes (*ile/ile*) de lo esperado, con menos heterocigotos y un número esperado de homocigotos mutantes (*val/val*). En cuanto al subgrupo correspondiente al percentil 75 (BNMN $>$ 19‰), la población tampoco se encuentra en equilibrio ( $\chi^2=5,18$ ) hallándose desplazada hacia los homocigotos. Sin embargo, hay que señalar que parte de estas desviaciones del equilibrio se podrían atribuir al pequeño tamaño muestral.

Al analizar la población según el número de BNMN en linfocitos de sangre periférica podemos ver que hay tres genotipos en los que se presentan resultados estadísticamente significativos al comparar los subgrupos extremos. El genotipo *ile/ile* (homocigoto para el alelo salvaje *GSTP1*), se encuentra en un 60,3% individuos que tienen un valor de BNMN  $\leq$  5‰ y en el 37,5% de los individuos con un valor de BNMN  $\geq$  19‰. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,171-0,832), nos indica que el fenotipo *ile/ile* está más representado en el grupo con menor daño celular medido mediante el ensayo de MN en linfocitos ( $p=0,016$ ).

Por lo que se refiere al genotipo *val/val* (homocigoto para el alelo mutado *GSTP1*), este se presenta en un 12,1% de individuos con un valor de BNMN  $\leq$  5‰ y en un 29,2% de individuos con un valor de BNMN  $\geq$  19‰. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (1,075-8,047), nos indica que el genotipo *val/val* está 2,94 veces más representado en la población con mayor daño citogenético ( $p=0,036$ ).

Tabla 4.18: Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci *MI*, *TI* y *PI* en relación con el daño citogenético medido en linfocitos

BNMN	Genotipo n (%)			OR (I.C 95%)	<i>p</i>
	<i>MI</i> <sup>+</sup>	<i>MI</i> <sup>-</sup>			
≤5‰	27 (46,6)	31 (53,4)			
≥19‰	28 (58,3)	20 (41,7)		<i>M</i> 0,599 (0,276-1,301)	0,195
	<i>TI</i> <sup>+</sup>	<i>TI</i> <sup>-</sup>			
≤5‰	49 (84,5)	9 (15,5)			
≥19‰	38 (79,2)	10 (20,8)		<i>T</i> 1,612 (0,580-4,477)	0,360
	<i>ile/ile</i>	<i>ile/val</i>	<i>val/val</i>		
≤5‰	35 (60,3)	16 (27,6)	7 (12,1)	<i>i/i</i> 0,377 (0,171-0,832)	0,016*
≥19‰	18 (37,5)	16 (33,3)	14 (29,2)	<i>i/v</i> 1,400 (0,604-3,247)	0,433
				<i>v/v</i> 2,941 (1,075-8,047)	0,036*
	<i>M, ile/ile</i>	<i>M, ile/val</i>	<i>M, val/val</i>		
≤5‰	19 (32,8)	5 (8,6)	7 (12,1)	<i>M, i/i</i> 0,286 (0,103-0,790)	0,016*
≥19‰	6 (12,5)	6 (12,5)	8 (16,7)	<i>M, i/v</i> 1,486 (0,424-5,209)	0,536
				<i>M, v/v</i> 1,429 (0,477-4,276)	0,524
	<i>T, ile/ile</i>	<i>T, ile/val</i>	<i>T, val/val</i>		
≤5‰	2 (3,4)	4 (6,9)	3 (5,2)	<i>T, i/i</i> 3,198 (0,591-17,289)	0,177
≥19‰	5 (10,4)	1 (2,1)	4 (8,3)	<i>T, i/v</i> 0,383 (0,039-3,807)	0,413
				<i>T, v/v</i> 1,636 (0,348-7,702)	0,533
	<i>M, T, ile/ile</i>	<i>M, T, ile/val</i>	<i>M, T, val/val</i>		
≤5‰	1 (1,7)	0	3 (5,2)	<i>M, T, i/i</i> 1,191 (0,073-19,570)	0,902
≥19‰	1 (2,1)	0	3 (6,3)	<i>M, T, i/v</i> -	-
				<i>M, T, v/v</i> 1,200 (0,231-6,239)	0,828
	<i>M, val</i>	<i>T, val</i>	<i>M, T, val</i>		
≤5‰	12 (20,7)	7 (12,1)	3 (5,2)	<i>M, v</i> 1,544 (0,634-3,762)	0,339
≥19‰	14 (29,2)	5 (10,4)	3 (6,3)	<i>T, v</i> 0,988 (0,282-3,465)	0,985
				<i>M, T, v</i> 1,200 (0,231-6,239)	0,828
	<i>M, T</i>				
≤5‰	4 (6,9)				
≥19‰	4 (8,3)			<i>M, T</i> 1,205 (0,285-5,096)	0,800

Desde MT hasta MT<sup>-</sup>,val, los valores de % son en relación con el total de los otros genotipos combinados. \**p*≤0,05; \*\**p*≤0,01; \*\*\**p*≤0,001

Finalmente, en cuanto al genotipo *M, ile/ile* (genotipo nulo para *GSTM1* y homocigoto para el alelo salvaje *GSTPI*), se presenta en el 32,8% de los individuos con un valor de BNMN ≤ 5‰ y en el 12,5% de los individuos con un valor de BNMN ≥ 19‰. El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95%

(0,103-0,790), nos indica que el polimorfismo *M, ile/ile* está más representado en el grupo con menor daño citogenético ( $p=0,016$ ).

#### 4.5.4 Análisis de genotipos y micronúcleos en células de la mucosa bucal

Este análisis se ha realizado sobre la frecuencia de daño citogenético en células bucales con MN (CBMN) en 1.000 células. Se han determinado las frecuencias genotípicas para los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. Se han estudiado los grupos pertenecientes a los percentiles 25 (CBMN $\leq$ 1‰) y 75 (3,8‰ $\geq$ CBMN). En la tabla 4.19 se presentan los resultados obtenidos para todos los genotipos estudiados, el número de individuos correspondientes a cada genotipo, su frecuencia, el valor de *odds ratio* y la significación estadística para cada uno. Se destacan aquellos resultados que han mostrado diferencias estadísticamente significativas.

Podemos observar que, al analizar la población de los extremos en cuanto a la frecuencia de BNMN, los valores de *odds ratio* para los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* no presentan significación estadística cuando se analizan individualmente. En cuanto al polimorfismo de *GSTP1*, podemos decir que el grupo correspondiente al percentil 25 (CBMN $\leq$ 1‰) no está en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=3,89$ ), encontrándose desplazado hacia los genotipos homocigotos. En cuanto al grupo correspondiente al percentil 75 (CBMN $\geq$ 3,8‰), la población se encuentra en desequilibrio presentándose desplazado también hacia los genotipos homocigotos ( $\chi^2=8,23$ ).

Como podemos ver, los resultados muestran que hay tres genotipos que presentan diferencias estadísticamente significativas al hacer las comparaciones y otro que roza el límite de la significación. El genotipo *val/val* (homocigoto para el alelo mutado *GSTP1*) se presenta en el 13,6% de los individuos con una o menos de 1‰ CBMN y en el 24% de los individuos con al menos 3,8‰ CBMN. Los valores de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (1,061-7,519), indican que el genotipo *val/val* se encuentra 2,8 veces más representado en la población con mayor daño celular. Hay que tener en cuenta que el tamaño muestral para este genotipo es de tan sólo 20 personas ( $p=0,038$ ).

El genotipo *M, ile/ile* (*GSTM1* ausente y homocigosis del genotipo salvaje para *GSTP1*) se presenta en el 32,2% de la población con CBMN $\leq$ 1‰ y en un 14% de

la población que presenta  $CBMN \geq 3,8\%$ . Los valores de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (0,167-0,980), nos indican que el genotipo *M*, *ile/ile* esta 0,6 veces más representado en el grupo perteneciente al percentil 25 ( $p=0,045$ ).

Tabla 4.19: Distribución de las frecuencias genotípicas en los loci *MI*, *TI* y *PI* en relación con el daño citogenético medido en células de la mucosa bucal

CBMN	Genotipo n (%)			OR (I.C 95%)	<i>p</i>
	<u><i>MI</i><sup>+</sup></u>	<u><i>MI</i><sup>-</sup></u>			
≤1	27 (45,8)	32 (54,8)			
≥3,8	31 (62)	19 (38)		<i>M</i> 0,670 (0,330-1,363)	0,269
	<u><i>TI</i><sup>+</sup></u>	<u><i>TI</i><sup>-</sup></u>			
≤1	47 (79,7)	12 (20,3)			
≥3,8	40 (80)	10 (20)		<i>T</i> 0,917 (0,375-2,240)	0,849
	<u><i>ile/ile</i></u>	<u><i>ile/val</i></u>	<u><i>val/val</i></u>		
≤1	33 (55,9)	18 (30,5)	8 (13,6)	<i>i/i</i> 0,917 (0,375-2,240)	0,154
≥3,8	24 (48)	14 (28)	12 (24)	<i>i/v</i> 0,920 (0,430-1,967)	0,829
				<i>v/v</i> 2,825 (1,061-7,519)	0,038*
	<u><i>M, ile/ile</i></u>	<u><i>M, ile/val</i></u>	<u><i>M, val/val</i></u>		
≤1	19 (32,2)	9 (15,3)	4 (6,8)	<i>M, i/i</i> 0,405 (0,167-0,980)	0,045*
≥3,8	7(14)	5 (10)	7 (14)	<i>M, i/v</i> 0,509 (0,163-1,588)	0,245
				<i>M, v/v</i> 3,495 (1,047-11,664)	0,042*
	<u><i>T, ile/ile</i></u>	<u><i>T, ile/val</i></u>	<u><i>T, val/val</i></u>		
≤1	7 (11,9)	1 (1,7)	4 (6,8)	<i>T, i/i</i> 0,218 (0,045-1,056)	0,058
≥3,8	3 (6)	4 (8)	3 (6)	<i>T, i/v</i> 7,245 (0,846-62,080)	0,071
				<i>T, v/v</i> 1,107 (0,215-5,711)	0,903
	<u><i>M, T, ile/ile</i></u>	<u><i>M, T, ile/val</i></u>	<u><i>M, T, val/val</i></u>		
≤1	3 (5,1)	1 (1,7)	3 (5,2)	<i>M, T, i/i</i> 0,356 (0,036-3,523)	0,377
≥3,8	1 (2)	0	2 (4)	<i>M, T, i/v</i> 0	
				<i>M, T, v/v</i> 1,661 (0,268-10,304)	0,586
	<u><i>M, val</i></u>	<u><i>T, val</i></u>	<u><i>M, T, val</i></u>		
≤1	13 (22)	5 (8,5)	4 (6,8)	<i>M, v</i> 1,355 (0,595-3,090)	0,469
≥3,8	12 (24)	7 (14)	2 (4)	<i>T, v</i> 2,745 (0,798-9,445)	0,109
				<i>M, T, v</i> 1,107 (0,215-5,711)	0,903
	<u><i>M, T</i></u>				
≤1	7 (11,9)				
≥3,8	3 (6)			<i>M, T</i> 0,715 (0,192-2,670)	0,618

Desde MT hasta MT<sup>val</sup>, los valores de % son en relación con el total de los otros genotipos combinados. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

El genotipo *M, val/val* (*GSTM1* ausente y homocigosis del genotipo mutante de *GSTP1*) se presenta en el 6,8% de la población con  $CBMN \leq 1\text{‰}$  y en el 14% de la población que presenta  $CBMN \geq 3,8\text{‰}$ . El valor de *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (1,047-11,664), indican que el genotipo *M, val/val* está 3,5 veces más representado en el grupo perteneciente al percentil 75 ( $p=0,042$ ). Hay que resaltar el escaso número de personas con este genotipo.

Finalmente y a modo de resumen podemos decir que no se han encontrado diferencias en cuanto a la distribución de los genotipos de *GSTM1* ni *GSTP1* en ninguna de las poblaciones estudiadas. Sin embargo, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de frecuencias para el genotipo *GSTP1*. Así, el genotipo *val/val* (homocigoto del genotipo mutante de *GSTP1*) se encuentra más representado en la población expuesta que en el control. Este genotipo también se encuentra más frecuentemente en la población de etnia atacameña. Al analizar las frecuencias genotípicas en relación con el daño citogenético se ha encontrado que el genotipo *val/val* se presenta con mayor frecuencia en los grupos que presentan un mayor nivel de daño tanto en linfocitos como en mucosa bucal.

## 5 DISCUSIÓN

No cabe duda de que la presencia de altas concentraciones de As en los distintos medios, representa un grave problema ambiental y de salud para las diversas poblaciones expuestas. Su amplia distribución en los distintos ambientes naturales y la amplificación de su exposición debido a diversas actividades antropicas, como el uso de pesticidas arsenicados, quema de carbón, y diversos usos industriales, entre otras, supone un aumento considerable de la población expuesta a altas concentraciones de dicho elemento. Hoy en día, son muchos los países que presentan problemas de arsenicismo por diferentes vías (figura 1.1), siendo la más destacada la exposición al As a través del agua de consumo.

Se ha comprobado que la presencia de altas concentraciones de As en el agua produce una serie de efectos adversos, sobre la salud de las poblaciones humanas. Los estudios de biomonitorización genotóxica de poblaciones expuestas a dichas condiciones presentan evidencias significativas de daño citogenético evaluado por distintos ensayos, como son los de MN, CA y SCE, en diversos estudios llevados a cabo tanto in vitro como in vivo, y utilizando diferentes especies y tipos celulares.

Si bien la IARC ha clasificado al As y sus compuestos como carcinógenos humanos (IARC, 2003), el hecho de que no se conozcan bien los mecanismos de acción en cuanto a su genotoxicidad, conlleva cierta ambigüedad en cuanto a la estima del riesgo real de la exposición al As y a los compuestos de As. De hecho, la OMS propone un nivel de exposición menor que la IARC para el agua de consumo (0,01 mg As/L y 0,05 mg As/L, respectivamente) y argumenta que si el nivel mínimo de exposición debe ubicarse por debajo del nivel más bajo que produce daño (que en el caso del As no se conoce), entonces la concentración de As en el agua de consumo humano debería tender a cero.

### 5.1 GRUPOS DE ANÁLISIS

La población estudiada se divide en dos grupos principales que se diferencian básicamente en los niveles de exposición ambiental al As. El hecho de que la población expuesta esté dividida en dos grupos étnicos bien definidos hace aún más interesante su estudio, ya que nos permite analizarlos bajo las mismas

condiciones y aportar más conocimientos acerca de la supuesta resistencia de los atacameños frente a la exposición ambiental a As, a la que se han visto sometidos a lo largo de tantas generaciones. Es por esta razón que nos ha interesado estudiar los efectos genotóxicos del As en ambos grupos étnicos. Debido a que la población en estudio reside en distintos pueblos en que se presentan distintas fuentes de agua de consumo humano, ha sido de interés el estudio de la población agrupada por lugar de residencia. Cada grupo de análisis se ha dividido también entre hombres y mujeres.

La población expuesta no atacameña, está compuesta principalmente por mestizos y caucásicos que, debido al auge de la minería iniciada en 1.866 y que hoy continua vigente, se han desplazado a esta zona. Esta población es la que ha presentado graves problemas de salud pública, lo que llevó a determinar con gran sorpresa que el agua de la cual se abastecían contenía elevadas concentraciones de As. Si bien los niveles actuales son menores que entonces, siguen siendo un problema para la salud de esta población y de las demás poblaciones en situaciones similares.

Por otro lado, tenemos a la población atacameña, que habita en la zona norte de Chile y Argentina hace más de 11.000 años y que constituye un 47% de la población expuesta. La etnia atacameña ha sido objeto de estudios anteriores, en los que se ha puesto de manifiesto que no muestra los típicos efectos del hidroarsenicismo detectados en poblaciones de otras etnias, que presentan problemas en la piel o un aumento de la incidencia de varias enfermedades, entre ellas el cáncer (Seoane *et al*, 1998). Al participar en el muestreo de la población de estudio un dermatólogo experto (Dr. Alex Arroyo, del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Antofagasta), se pudo verificar que ninguno de los 50 individuos atacameños estudiados presentaba lesiones dérmicas. Es por ello que los resultados de esta tesis pueden aportar información acerca de la supuesta resistencia a los efectos del arsenicismo de la población atacameña.

A este respecto, en 1993 Sancha y colaboradores estudiaron una población de 761 atacameños y encontraron una clara relación dosis-respuesta entre la concentración de As en el agua de consumo y la frecuencia de lesiones dérmicas. Sin embargo, se observó una escasez de efectos sobre la salud de la población atacameña que proponen podría ser explicada por una menor susceptibilidad a los efectos del As, debido a una mayor capacidad de detoxificación que podría estar

influenciada por factores genéticos, nutricionales o por distintos hábitos. De hecho, estudios posteriores han determinado que los atacameños tienen un metabolismo del As particular, diferente al encontrado en otras poblaciones, excretando más DMA y As(i) y una baja cantidad de MMA, en comparación con otras poblaciones estudiadas (Vahter *et al.*, 1995; Dulout *et al.*, 1998).

En 1998 Seoane y colaboradores publicaron un estudio sobre una población atacameña de 86 individuos en Argentina, de los que 55 estaban expuestos a altas concentraciones de As (0,2 mg As/L). Se determinó que la población expuesta no presentaba antecedentes de cáncer de piel ni lesiones precancerosas entre sus integrantes. A pesar de que se encontró un aumento significativo en la frecuencia de MN en la población expuesta, paradójicamente se encontraron frecuencias normales de MN en personas con lesiones cutáneas derivadas de la exposición al As.

Un estudio realizado en la zona de Atacama por Smith y colaboradores (2000), analizando 11 familias atacameñas, no detectó problemas cutáneos debido a las altas concentraciones de As en la zona en las mujeres expuestas. Sin embargo, la prevalencia de lesiones cutáneas encontrada en hombres y niños de la pequeña población estudiada fueron similares a los encontrados en Taiwan e India, en donde los problemas nutricionales han aumentado la susceptibilidad de las personas expuestas a los efectos adversos del arsenicismo crónico. En Taiwan se presenta una patología endémica, conocida con el nombre de enfermedad de los pies negros (blackfoot disease), que consiste en un desorden vascular oclusivo que en casos graves provoca gangrena de las extremidades inferiores (Brown y Fan, 1994). En contraposición podemos destacar la buena nutrición del pueblo atacameño, si bien no hay que olvidar que el tamaño muestral del trabajo de Smith es bajo. En relación con nuestro estudio, hay que señalar que la población atacameña analizada es mayoritariamente femenina, al igual que en el trabajo de Smith y colaboradores. Por otro lado hay que remarcar que el médico que practicó la exploración dermatológica e hizo la correspondiente evaluación en términos de salud en nuestro estudio había participado en el trabajo de Smith, por lo que los métodos y criterios seguidos para la detección y evaluación de los efectos adversos son muy similares.

Como ya se ha comentado anteriormente, debido a las características geológicas de la zona, la concentración de As en las escasas fuentes de agua varía

dependiendo de la concentración en que se presente en los suelos. Es por este motivo que hay un interés especial por estudiar la población según el lugar de residencia, aunque en algunos casos el tamaño muestral sea muy pequeño.

La población control siempre se analiza como un solo grupo de 111 personas, ya que no presenta diferencias étnicas ni de exposición. La población expuesta se divide en 5 subgrupos, en los que hay que tener en cuenta las diferencias de tamaño. Así en Peine y Socaire sólo contamos con 8 y 4 personas, respectivamente. En los casos en que la población es pequeña, si bien no podemos sacar conclusiones generalizables, podemos tener cierta idea de lo que está sucediendo.

La población también se ha analizado separando los hombres y las mujeres. Debido a las particularidades del muestreo, en todos los grupos de estudio hay entre un 60% y un 80% de mujeres. El total de hombres es de 63, entre los que hay 40 controles y 23 expuestos. Al hacer el análisis por etnias, podemos ver que los grupos de hombres expuestos consisten en 8 atacameños y 15 no atacameños y, al analizar según el lugar de residencia, los valores son bastante bajos no presentándose ningún hombre en la muestra de Socaire.

Como podemos ver la población analizada en este estudio presenta un numero poblacional grande comparada con la mayoría de los estudios similares que se ha analizado. El hecho de que la población expuesta presente dos grupos étnicos claramente definidos y balanceados, permite hacer una evaluación comparándolos entre ellos y cada uno con el grupo control. El análisis poblacional también se ha realizado separando las poblaciones de hombres y mujeres, lo que ha permitido conocer el comportamiento de ambos grupos por separado. En el caso del análisis poblacional en relación con el lugar de residencia, algunos grupos han resultado ser muy pequeños. Sin embargo, y a pesar de las limitaciones del diseño del muestreo, el análisis de los distintos grupos se ha obtenido información nueva, que permite comprar nuestra población con la obtenida en estudios anteriores.

## **5.2 AS AMBIENTAL**

Actualmente la mayor vía de exposición al As, en los diferentes países, es a través del agua de consumo. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado una población expuesta a As en el norte de Chile, donde tanto la concentración como la

distribución del As están determinadas por la geología de la zona, que presenta una gran cantidad de volcanes y géiseres, asociados a abundantes yacimientos minerales. Esta situación provoca una gran variabilidad en cuanto a la concentración de As en las aguas de la región, que varía dependiendo de los suelos por los que esta fluye. Es por esta razón que, en los escasos ríos de la zona, la concentración de As presenta grandes variaciones a lo largo de su curso, determinando a su vez la exposición a la que se encuentran las diferentes poblaciones. Esto explica que en la población expuesta estudiada se presenten variaciones en cuanto a los niveles de As en el agua de consumo, dependiendo del lugar de residencia.

En la región de Antofagasta, la aparición de una serie de patologías asociadas con la exposición al As llevaron a determinar su concentración en el agua de consumo humano y se encontró que el agua que abastecía la ciudad desde 1958 contenía niveles de hasta 0,8 mg As/L. Actualmente, el agua de consumo se somete a sistemas de abatimiento de As, aunque no se alcanzan a cumplir los niveles reglamentarios en toda la región. Es por ello que, dependiendo de la zona geográfica en que se realice el análisis, estos niveles varían considerablemente.

El hecho de que la población expuesta esté ubicada en el desierto de Atacama, acota las vías y fuentes de exposición poblacional ya que, por ejemplo, no se pueden desarrollar actividades agrícolas o ganaderas importantes, no se realizan fumigaciones, y no se han instalado industrias importantes debido a que todas estas actividades requieren un elevado consumo de agua, recurso muy escaso en la zona. Los distintos pueblos de la región, dependiendo de su ubicación, de sus habitantes y de sus necesidades pueden contar con una red de agua potable domiciliaria, disponer de estanques que son abastecidos por camiones aljibe, o tomar el agua directamente de los cursos más cercanos; en algunos pueblos puede darse una combinación de estos sistemas de abastecimiento. Esta situación explica la alta variabilidad de concentración de As en el agua de consumo a la que está expuesta la población en los distintos pueblos muestreados (tabla 4.6). Dado que la movilidad implica la exposición de los individuos a distintas fuentes de agua, también se realizó el muestreo en otras zonas como son: Chuquicamata, la principal mina de cobre de la región, una gran ciudad como Antofagasta, y lugares del desierto donde se practica una agricultura a pequeña escala, como es el caso de Lasana.

Como se puede ver en la tabla 4.6, en este estudio se ha corroborado que existe una gran diferencia en los niveles de concentración de As en agua potable de las poblaciones expuesta y control. Si bien en esta tabla se puede apreciar claramente la heterogeneidad de los niveles de concentración de As en los distintos puntos muestreados, hay que destacar también que los pueblos de Antofagasta, Chuquicamata, Toconao, Peine y Calama presentan niveles que están por debajo de la norma chilena (0,05 mg As/L), mientras que Lasana, Socaire y San Pedro de Atacama presentan niveles por encima de la norma.

Los datos obtenidos en nuestro estudio coinciden básicamente con los obtenidos previamente por Santolaya y colaboradores (1995), en los que los análisis realizados indican una gran heterogeneidad en los niveles de concentración de As en el agua de consumo (tabla 1.5). En dicho muestreo, realizado en 1992, los valores de As en el agua de Antofagasta medidos en mg As/L varían entre >0,01 y 0,06; en Chuquicamata, oscilan entre >0,01 y 0,06; en Calama, entre 0,03 y 0,05; en Lasana, entre >0,01 y 0,37 y en San Pedro de Atacama, entre 0,17 y 0,70.

En 1993, Sancha y colaboradores determinaron los niveles de As total en distintas localidades de la región de Antofagasta, encontrando concentraciones de As (mg/L) de 0,019 en Toconao; 0,1 en Peine; 0,372 en Lasana; 0,22 en Socaire y 0,619 en San Pedro de Atacama. En el estudio de Moore y colaboradores (1997) se midieron los niveles de As en el agua de San Pedro de Atacama y se detectó una concentración de 0,6 mgAs/L. En el año 2000, un estudio realizado en Chiu-Chiu indicó una concentración de As en agua potable entre 0,75 y 0,80 mg As/L (Smith *et al.*, 2000) y, dos años más tarde, otro estudio encontró concentraciones entre 0,735 y 0,762 mg As/L en la misma zona (Joyce *et al.*, 2002). Así, la concentración de As en el agua de consumo determinada en estudios anteriores corrobora una exposición elevada y heterogénea, a lo largo del tiempo, en la población objeto de estudio.

En cuanto a la exposición a As a través de los alimentos, se ha determinado que los alimentos que se cultivan en presencia de altas concentraciones de As son capaces de concentrarlo en diferentes magnitudes. Un estudio realizado en la zona norte del país indica que la concentración de As en los vegetales cultivados en esta zona es significativamente más elevada que la de los cultivos de zonas no contaminadas (tabla 1.2). Resultados similares se encuentran en los peces obtenidos de zonas contaminadas (Frenz y Sancha, 1997). En este estudio también

se calculó el aporte de As recibido con los diferentes alimentos y se encontró un aumento significativo en las zonas contaminadas, al compararlas con las zonas no contaminadas.

En el caso de los grandes núcleos urbanos, como es el caso de Calama (en donde se realizó el muestreo de la población expuesta no atacameña), la mayor parte de los alimentos procede de otras zonas del país ya que su clima desértico no les permite una producción propia suficiente. Por esto, se puede considerar que esta fuente de exposición tiene poca importancia para los habitantes de Calama. En cuanto a los pueblos de San Pedro de Atacama, Toconao, Peine y Socaire (donde se realizó el muestreo de la población atacameña), se practica una agricultura de subsistencia utilizando las escasas fuentes de agua local. Por tanto, esta vía sí que podría actuar como fuente suplementaria de exposición al As (Muñoz *et al.*, 2002).

En cuanto a la exposición por consumo de productos del mar, se ha determinado que tanto el pescado, como el marisco y los crustáceos contienen una alta concentración de As en forma de arsenobetaína. Aunque este compuesto es bastante estable y se excreta a través de la orina sin presentar cambios, puede alterar la concentración total de As medible en la orina. Las algas también pueden contener altas concentraciones de As en forma de arsenoazúcares y se sabe que su ingesta puede alterar los resultados del estudio de la excreción del As, induciendo a error cuando se usa la concentración de arsénico total en orina como indicador de exposición a As(i). Se ha observado que los bivalvos presentan concentraciones elevadas de arsenobetaína y arsenocolina y, en otros organismos marinos, se han detectado otras formas de arsénico orgánico como el óxido de trimetilarsina y la trimetilarsina, pero en menor proporción que la arsenobetaína y los arsenoazúcares (Ma y Le, 1998).

En nuestro estudio, el consumo de pescado y de marisco fue evaluado mediante la encuesta. Conviene destacar que la población control es residente de una ciudad costera y que la población expuesta habita en una región desértica, en donde la probabilidad de consumir pescado fresco es muy pequeña; esta situación es aún más marcada en los pueblos de San Pedro de Atacama, Toconao, Peine y Socaire, en que prácticamente no se consume pescado (tabla 4.5)

La exposición a As a través del aire puede ser muy variable en función de la zona. En el estudio realizado por Frenz y Sancha en 1997, se determinó que la

contribución porcentual de la exposición por vía aérea era de un 1% en la ciudad de Calama (donde se realizó el muestreo de nuestra población expuesta no atacameña) y de 1,3% en la ciudad de Concepción (donde se realizó el muestreo de nuestra población control). En el estudio se determinó que, entre enero de 1991 y abril de 1995, la concentración de As en el material particulado atmosférico de Chuquicamata presentaba un valor promedio de 1,276  $\mu\text{g As/m}^3$  y en Calama de 0,129  $\mu\text{g As/m}^3$  entre junio de 1994 y junio de 1995. Los otros valores que se obtuvieron fueron 0,056  $\mu\text{g As/m}^3$  en Antofagasta y 0,007  $\mu\text{g As/m}^3$  en Concepción. Podemos ver que los niveles de As en el material particulado atmosférico disminuyen rápidamente al alejarse de la zona de influencia de la actividad minera y que, en la zona control, estos niveles son significativamente más bajos. Así, se ha considerado que los efectos del As por vía aérea, para el caso particular de nuestro estudio, son irrelevantes al ser comparados con las cantidades ingeridas a través del agua.

El análisis de los resultados de la concentración a As en el agua de consumo humano ha indicado que las poblaciones expuesta y control difieren en cuanto a la exposición a As ambiental. Estudios anteriores, indican que la concentración de As en el agua varía en relación con ciertos factores ambientales. Por otro lado, y considerando que los hábitos personales pueden variar los niveles de exposición de la población, la exposición se ha determinado de manera más precisa mediante el uso de biomarcadores de exposición interna, en este caso la concentración total de As en orina y en uñas.

### **5.3 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN INTERNA**

Para determinar de manera más precisa la exposición a la que se encuentran las distintas poblaciones estudiadas, se han analizado dos parámetros que indican la exposición interna, de cada uno de los grupos analizados. Como ya se ha comentado, para ello se han analizado la concentración de As en orina, como biomarcador de exposición reciente y la concentración de As en uñas, como indicador de exposición a largo plazo.

El metabolismo del As ha sido estudiado en muchas poblaciones y el análisis de su excreción en la orina ha sido útil para precisar su metabolización en diferentes especies animales, incluyendo el hombre. En diversos estudios se ha observado

que algunas especies no excretan derivados metilados de As en la orina después de estar expuestas a As(i) (Vahter *et al.*, 1982 y 1995; Zakharyan *et al.*, 1996; Healy *et al.*, 1997). También, se ha confirmado que la metilación no es un proceso de detoxificación del As para la mayoría de los primates (Wildfang *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios han determinado que algunas especies, incluyendo el hombre, son metiladoras de As (Vahter, 1994).

Se ha determinado que, en promedio, en la orina de los humanos expuestos a As se encuentra 10-30% de As(i), 10-20% de MMA y 60-80% de DMA (Vahter y Concha, 2001). Estudios realizados en Argentina por Vahter y colaboradores (1995) evidenciaron que la población andina expuesta a As por el consumo de agua contaminada excretaba por término medio un 2,2% de MMA en la orina, en vez del 10-20% esperado. Estos datos han sido corroborados posteriormente al estudiar poblaciones indígenas, tanto en Chile (Aposhian *et al.*, 1997) como en Argentina (Seoane *et al.*, 1998). Un estudio realizado por Vahter (2002) parece indicar que los individuos con un bajo porcentaje de MMA en la orina son más rápidos en eliminar el As ingerido. Este hecho apoya la hipótesis de que los indígenas atacameños podrían presentar cierta resistencia frente a la exposición crónica al As.

La concentración de As en orina se considera como una buena medida de exposición reciente al As y se ha usado comúnmente para monitorizar la exposición ambiental y laboral de diversas poblaciones (Biggs *et al.*, 1997). A pesar de que la población de Calama presenta niveles de As en agua por debajo de la norma chilena, al comparar las poblaciones expuesta y control se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al igual que al comparar los grupos de hombres y de mujeres. Lamentablemente, las muestras de orina de las poblaciones de San Pedro de Atacama, Toconao, Peine y Socaire se extraviaron incomprensiblemente al ser enviadas a la Universidad de Göttingen, por lo que la población expuesta no ha podido ser analizada según los grupos étnicos.

Finalmente hay que destacar que los hombres del grupo control presentan una mayor concentración de As en la orina que las mujeres control. Este hecho podría explicarse por medio de los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza univariante para la variable orina. En dicho análisis se ha determinado que bajo situaciones similares, los hombres concentran más As en orina que las mujeres. Sin embargo esto no se ve reflejado en las poblaciones expuestas.

La concentración de As en las uñas se ha considerado un buen biomarcador de la exposición individual a As a largo plazo, debido a que el rápido crecimiento de las uñas permite aislar el As de otros procesos metabólicos (Tagaki *et al.*, 1988). En este estudio, Al hacer el análisis de correlación entre As en uñas y concentración de As en el agua de consumo, se ha obtenido un coeficiente de correlación que indica que estas variables están correlacionadas positivamente ( $R^2=0,585$ ) y que, al aumentar la concentración de As en el agua, también aumenta su concentración en las uñas. Por otro lado, la concentración de As en uñas, obtenidos en este análisis, coincide cualitativamente con los niveles de contaminación ambiental y alcanza valores similares a los encontrados en poblaciones altamente expuestas (Hinwood *et al.*, 2003, Mandal *et al.*, 2003).

También se realizó un análisis de varianza univariante mediante el cual se determino que la expoetnia, el sexo y el consumo de té son factores de confusión para la concentración de As en uñas. Así los hombres presentan una mayor concentración de As en las uñas que las mujeres, los atacameños son el grupo que presenta una mayor concentración de As en uñas y finalmente se ha determinado que a mayor consumo de té se encuentra una menor concentración de As en las uñas de la población analizada.

Con respecto a la variable expoetnia, el resultado es el esperado ya que los individuos de la población control tienen menos exposición al As y, a su vez, entre la población expuesta, el grupo de atacameños está más expuesto que los no atacameños (tabla 4.9). En cuanto a la mayor concentración de As en uñas de los hombres, comparado con las mujeres, podría deberse a diferencias en el consumo de agua y de alimentos. También podría existir una relación con el mayor consumo de alcohol de los hombres, que si es destilado en la zona, podría tener concentraciones importantes de As.

Finalmente, vemos que se presenta una mayor concentración de As en uñas en aquellos grupos que presentan un mayor consumo de té. El consumo medio de té en la población analizada por exposición y etnia no es significativamente diferente. Sin embargo, al analizar la población de hombres podemos ver que los del grupo control consumen significativamente menos té que los expuestos, independientemente de su etnia (tabla 4.3). Es interesante destacar que en los pequeños pueblos del desierto se toman diferentes infusiones de hierbas a las que la gente suele llamar “té”, estos podrían representar un a mayor exposición a As al prepararse con el agua de consumo local.

El análisis de As en uñas (figura 4.3) revela diferencias estadísticamente significativas al comparar las poblaciones expuesta y control, al igual que al comparar los grupos de mujeres (expuestas y controles); sin embargo, esto no ocurre al comparar los grupos de hombres. Al analizar la población expuesta según etnia y sexo (figura 4.5), podemos ver que los atacameños presentan niveles más altos de As en uñas que los no atacameños, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas. Al comparar la población control con los distintos grupos de expuestos reunidos según el lugar de residencia, se puede ver que el único lugar que no presenta una concentración mayor de As en uñas comparado con el control es Peine.

Es importante tener en cuenta que la población expuesta no atacameña, ubicada mayoritariamente en Calama, cuenta con una red de suministro domiciliario de agua potable sometida a sistemas de abatimiento de As que cumplen la norma chilena. La población atacameña ubicada en pequeños pueblos del altiplano no cuenta con sistemas de abatimiento de As, además, al practicar agricultura y ganadería de subsistencia presentan mayores vías de exposición. En el caso de San Pedro de Atacama, si bien hay una planta de abatimiento de As, resulta insuficiente para las necesidades de la población, por lo que se ha optado por mezclar el agua resultante con agua sin tratar. De este modo, aunque se disminuya el nivel de exposición, permanece por encima de los niveles de la norma chilena.

El análisis de As en uñas de la población analizada por pueblos de residencia ha indicado que el único pueblo en que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con el control ha sido Peine. Este hecho corrobora lo encontrado en los análisis de agua, en que Peine presenta niveles muy bajos de As en el agua de consumo (tabla 4.6). Esta situación cuestiona el que la población de Peine este igualmente expuesta a As por otras vías alternativas, como podrían ser los alimentos, o el desplazamiento poblacional dentro de la región. Sin embargo hay que considerar el bajo número poblacional de Peine que es de solo 8 personas.

A modo de resumen podemos decir que después de analizar los valores obtenidos en el análisis de los biomarcadores de exposición interna, tanto la concentración de As en orina como en uñas, indican que la población expuesta presenta valores significativamente mayores en cuanto a la exposición ambiental a As.

## 5.4 BIOMARCADORES DE EFECTO

Como ya se ha comentado, uno de los principales efectos adversos sobre la salud de la exposición al arsénico es el incremento en la incidencia de cáncer (IARC, 2003). Aunque el mecanismo de acción del As no esté completamente determinado, existe abundante información que apoya la actividad genotóxica del As (Basu, 2001), produciendo fundamentalmente daño citogenético. En relación con los diferentes biomarcadores de daño citogenético, la evaluación de la frecuencia de MN se ha propuesto como una herramienta útil para estimar la magnitud del daño genotóxico. Dada la sensibilidad del ensayo de MN y su relativa simplicidad y objetividad en el análisis de los resultados, hemos decidido usarlo para medir el posible efecto genotóxico asociado a la exposición ambiental a As a través del agua de consumo.

Por otro lado, hay que enfatizar que otra de las ventajas importantes del ensayo de MN es que, además de permitir evaluar con relativa facilidad, el efecto clastogénico de una exposición, también permite determinar el efecto aneugénico. La complementación del ensayo de MN con la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas pancentroméricas (M.J. Ramírez *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 1999) permite determinar el mecanismo que ha originado los MN observados. Cabe destacar que, hasta el momento, este es el único procedimiento por el cual se puede detectar de manera inequívoca los efectos aneugénicos en células de mamíferos. Si bien esta Tesis no incluye dicha evaluación, la técnica de FISH con sondas pancentroméricas puede aplicarse más adelante sobre las mismas preparaciones analizadas en este estudio, ampliando el trabajo y aprovechando la posibilidad para obtener más información relevante acerca de los efectos genotóxicos de la exposición al As.

Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, el ensayo de MN ha sido uno de los más utilizados en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a As (Warner *et al.*, 1994; Dulout *et al.*, 1996; Biggs *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Gonsebatt *et al.*, 1997; Seoane *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2002 y 2004; Martínez *et al.*, 2004 y 2005).

El uso del ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica permite hacer una evaluación citogenética de células que están en constante circulación por el cuerpo y que, debido a ello, están en contacto con diversos xenobióticos y sus metabolitos. Además, al ser células de larga duración (unos tres años) nos indican el efecto causado en un periodo de tiempo prolongado. El uso de células de la mucosa bucal en dicho ensayo permite, además, determinar el efecto genotóxico en células de descamación que están en constante proliferación y que reflejan el daño causado recientemente. Como la exposición poblacional viene dada mayormente por el consumo de agua, es interesante estudiar el efecto genotóxico en células que estén en contacto con el medio contaminado, en este caso, las células bucales.

Es importante destacar que, además de las diferencias intrínsecas entre poblaciones, las diferencias en el recuento y evaluación del daño medido en función del laboratorio pueden ser significativas, lo que puede llevar a confusión al comparar los datos de la literatura. La media de BNMN obtenida en este trabajo presenta un valor en la población control de 11,96 en 1.000 células. Este valor es similar al obtenido recientemente en un estudio europeo realizado en una población de 475 individuos, en donde se obtuvo una media de 12,10‰ (Pastor *et al.*, 2003), y al de un estudio previo realizado en Chile en el que la media fue de 11,69‰ (Venegas *et al.*, 1998); también es similar a un estudio realizado por Nilsson y colaboradores en Bulgaria, donde se analizó una población expuesta laboralmente a As y se obtuvo un valor de 14,6‰ (Nilsson *et al.*, 1983). Sin embargo, el valor hallado por nosotros está por encima de los obtenidos en otros trabajos tales como el de revisión de resultados de distintos laboratorios europeos (Surrallés *et al.*, 1997) en el que el valor promedio usando linfocitos de sangre periférica era de 7,8‰ células (DS=5,2). En un estudio realizado en Argentina (Dulout *et al.*, 1996) se obtuvo una media parecida de 6,9‰ (SD=1.65) y, como ejemplo de valor muy bajo, podemos mencionar un en la India (Basu *et al.*, 2002) donde se obtuvo una media de 0,53‰ (SD=0,349).

#### **5.4.1.1 Daño genotóxico medido por el ensayo de MN en linfocitos**

En cuanto al nivel de daño genotóxico medido por el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica, en nuestro estudio se ha encontrado que la frecuencia de células binucleadas con MN (BNMN) en la población expuesta es significativamente mayor que en la población control. Estos datos coinciden con

los resultados obtenidos con los biomarcadores de exposición, que presentan diferencias estadísticamente significativas al analizar tanto el nivel de As en orina como el nivel de As en uñas entre ambas poblaciones y que, para ambos parámetros, es mayor en la población expuesta.

Al hacer el análisis de correlación entre As en uñas y BNMN se ha encontrado un coeficiente de correlación muy bajo ( $R^2=0,0024$ ). Esto quiere decir que el daño genético de la población está determinado por más variables que la concentración de As en uñas; por lo tanto, no es posible obtener una ecuación en que a partir de la concentración de As en uñas se pueda predecir el valor de BNMN.

El análisis de varianza univariante realizado para determinar los posibles factores de confusión para la frecuencia de BNMN ha determinado que, bajo las mismas condiciones, las mujeres presentan una mayor frecuencia de BNMN que los hombres; que a mayor edad mayor frecuencia de BNMN y que a mayor consumo de café más BNMN. Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura (Fenech, 1993; Fenech y Morley, 1986).

Los resultados cualitativos de la frecuencia de BNMN obtenida en este estudio coinciden con los de otros estudios de biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a As a través del agua de consumo (Dulout *et al.*, 1996; Seoane *et al.*, 1998; Biggs *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997a y b; Basu *et al.*, 2002 y 2004). Como puede verse en la tabla 1.7. Si bien el nivel de significación estadística de nuestros resultados es menor que el encontrado por algunos autores, hay que destacar que la población estudiada en este trabajo supera ampliamente el tamaño muestral de cinco de los siete estudios referidos.

Es un hecho demostrado que los tamaños muestrales pequeños pueden conducir a una interpretación errónea del significado biológico de los resultados y que, cuando se analizan muestras grandes, éstos son más fiables. Aunque, en nuestro estudio, los grupos muestrales resultantes al hacer el análisis de la población según el lugar de residencia han sido pequeños, la potencia del análisis es suficiente al considerar todos los expuestos como un solo grupo al igual que en el caso de dividir el grupo expuesto en función de la etnia. En las tablas 1.7 a 1.11 podemos ver que hay bastantes estudios de biomonitorización citogenética con un tamaño muestral cercano a 60 individuos (Gonsebatt *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 1997; Mäki-Paakkanen *et al.*, 1998) y algunos con tamaños menores (Warner

*et al.*, 1994 Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Dulout *et al.*, 1996; Liou *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2001).

Al analizar la frecuencia de BNMN de la población expuesta separada por etnia, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar las poblaciones de atacameños y no atacameños en cuanto al daño citogenético. Sin embargo, el valor de CBPI indica un mayor grado de toxicidad celular en los expuestos no atacameños que en los atacameños. Ambos grupos presentan un valor del CBPI significativamente mayor que el grupo control. Si bien los atacameños presentan una mayor concentración de As en uñas que los no atacameños, estas diferencias no son significativas.

Al analizar la frecuencia de BNMN en los grupos étnicos de hombres y mujeres podemos ver que los hombres no atacameños son el grupo que presenta un menor daño citogenético en linfocitos presentando diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo de hombres atacameños y con el grupo de mujeres no atacameñas. El análisis de As en uñas indica que no hay diferencias estadísticamente significativas al comparar dichas poblaciones. Sin embargo, los atacameños presentan medias más altas de concentración de As en uñas (figura 4.4).

Al analizar las variables evaluadas en la encuesta, se observa que el grupo de hombres no atacameños consume más café que los atacameños. También podemos ver que al comparar los grupos de hombres y mujeres no atacameños, la única diferencia que se ha encontrado es que los hombres son más fumadores que las mujeres; sin embargo, hay que resaltar que el consumo de tabaco es bajo comparado con otras poblaciones. Por lo tanto, no se dispone de ningún argumento para explicar las diferencias en el daño genético obtenidas en el análisis de estas poblaciones.

En relación con el consumo de café podemos decir que éste no es detectado habitualmente como un factor de confusión que altere los resultados de la frecuencia de MN en distintas poblaciones expuestas a diversos mutágenos químicos (Lucero *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2001 a y b; Pastor *et al.*, 2002), ni en estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas a As (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Vahter *et al.*, 1995; Gonshebbatt *et al.*, 1997). Si bien algunos estudios realizados en ratas indican que el café no altera la frecuencia de micronúcleos

(Shimizu y Yano, 1987; Aeschbacher *et al.*, 1994), otros indican que el café tiene acción antígenotóxica, disminuyendo la genotoxicidad de diversos compuestos (Abraham, 1989, 1991 y 1995; Abraham y Singh, 1999; Abraham y Stopper, 2004).

Estudios del efecto genotóxico del tabaco, indican que éste induce una mayor frecuencia de MN en distintos tipos celulares (Stich *et al.*, 1992). Al comparar el efecto causado por el tabaco en células de mucosa bucal y en células sanguíneas, se ha determinado que las células sanguíneas son más sensibles a sus efectos (Sarto *et al.*, 1987; Ozkul *et al.*, 1997; Majher *et al.*, 2001); sin embargo, existe evidencia suficiente de que el tabaco produce cáncer afectando a ambos, tipos celulares (IARC, 1986).

En algunos estudios, el tabaco aparece como un factor de confusión al analizar la frecuencia de MN en poblaciones expuestas a diversos compuestos químicos (Pastor *et al.*, 2002). En cambio, en poblaciones expuestas a As, el tabaco no es detectado comúnmente como un factor de confusión que incida en las variables citogenéticas (Ostrosky-Wegman *et al.*, 1991; Gonsebatt *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 1997; Mäki-Paakkanen *et al.*, 1998; Mahata *et al.*, 2003). Esto también podría deberse a que las poblaciones expuestas y control presentaran igual proporción de fumadores y no fumadores, o que los fumadores presentasen bajos niveles de consumo, lo que impediría detectar el efecto causado por el tabaco de manera aislada.

Al analizar la frecuencia de BNMN en la población de mujeres, se ha determinado que las mujeres expuestas presentan mayor daño citogenético que las mujeres control y que los hombres expuestos, siendo las diferencias significativas. En la tabla 4.9 y en la figura 4.7 se pueden consultar los datos obtenidos. Hay que resaltar que al analizar los biomarcadores de exposición interna encontramos que las mujeres expuestas presentan un nivel de As en orina significativamente mayor que el de las mujeres control, pero menor que el de los hombres expuestos (figura 4.2). Sin embargo, no hay que olvidar que el análisis de As en orina no se pudo llevar a cabo con la población atacameña. El análisis de As total en uñas, corrobora los resultados obtenidos en el análisis de orina. Persiste la duda de porqué si los hombres expuestos presentan mayores niveles de As en orina y uñas que las mujeres expuestas, manifiestan menor daño citogenético.

Al considerar las distintas variables de la encuesta y analizar los resultados de la comparación entre estos grupos, encontramos diferencias significativas en cuanto a la variable de consumo de tabaco, habiendo una mayor proporción de hombres expuestos fumadores además, estos fuman más que las mujeres expuestas. También se presentan diferencias en relación con el consumo de alcohol en que los hombres expuestos beben más que las mujeres expuestas. Si bien en estudios anteriores se ha concluido que el tabaco es un factor que provoca daño genotóxico (DeMarini, 2004; Wu *et al.*, 2004), al igual que el consumo de alcohol (Stich y Rosin, 1983, Xue *et al.*, 1992), y en la población expuesta los hombres consumen estos dos productos más que las mujeres. De los resultados obtenidos en nuestro trabajo no se puede concluir que el tabaco y el alcohol tengan un papel significativo en los niveles de daño citogenético medido como la frecuencia de BNMN en linfocitos.

Si bien no se han detectado diferencias en cuanto al daño genético entre los hombres y las mujeres controles, el análisis de los dos biomarcadores de exposición interna ha revelado que hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En el caso de la población control, los hombres presentan mayores niveles de As en orina que las mujeres, al igual que al analizar el As en uñas. Si bien la zona control presenta niveles traza de As en el agua de consumo, las diferencias de exposición entre hombres y mujeres de esta población podrían deberse a las diferencias encontradas en cuanto al hábito de consumir pescado que, de ser el caso, esta diferencia no se presente al medir el daño genético debido a que el As en el pescado esta mayoritariamente en forma de arsenobetaína, la cual se elimina con mayor facilidad en comparación con las fuentes de As(i) y que no se ha encontrado que posea potencialidad genotóxica (Jorgen *et al.*, 1985; Guillamet *et al.*, 2004; Sakuray *et al.*, 2004).

En estudios anteriores se ha determinado que las arsenozúcares se encuentran comúnmente en diferentes peces, mariscos y algas marinas comestibles (Francesconi *et al.*, 2002). En 1998, Ma y Le estudiaron el efecto de la ingestión de arsenozúcares en la especiación del As en orina y observaron un aumento sustancial de las concentraciones de DMA en la orina de los voluntarios después de consumir algas marinas. Asimismo, determinaron que los biomarcadores de exposición basados en la medición de As<sup>+3</sup>, As<sup>+5</sup> MMA y DMA no eran fiables cuando ha ocurrido la ingestión de arsenozúcares a través de la dieta (Ma y Le, 1998).

En cuanto a la exposición a As a través de los alimentos se ha encontrado que, en ausencia de otras vías de exposición, los alimentos pueden representar una ruta de exposición importante. Las diferencias en los hábitos alimenticios entre hombres y mujeres pueden ser responsables de las diferencias de exposición encontradas entre los hombres y las mujeres controles. Si bien en la zona control no hay abundantes fuentes naturales de As, como es el caso de la zona expuesta, hay que considerar que hay cultivos de hortalizas y otros alimentos vegetales que podrían estar fumigados con productos fitosanitarios que contengan As o que la actividad industrial como es el caso de la industria maderera, entre otras, contamine el ambiente. Así, se podría explicar la presencia de niveles elevados de As en productos alimentarios.

Las mujeres control presentan una menor frecuencia de BNMN que las mujeres expuestas. Al separar la población expuesta por etnias y compararlas con las mujeres del grupo control, vemos que estas diferencias se presentan sólo con el grupo de mujeres no atacameñas. El análisis de la concentración de As en uñas ha determinado que las mujeres control presentan significativamente menos As en uñas que las mujeres expuestas de ambas etnias (tabla 4.4). Esto podría indicar una cierta resistencia al daño citogenético inducido por el As en las mujeres atacameñas.

Al hacer el análisis de las variables de la encuesta en la población de mujeres se han detectado diferencias significativas en cuanto al consumo de tabaco, debido a que las mujeres atacameñas casi no lo consumen. Al comparar la población de mujeres control con las no atacameñas estas diferencias no existen. También se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al analizar el consumo de café. Las mujeres del grupo control consumen más café que las del grupo expuesto y las atacameñas casi no lo consumen.

El grupo de mujeres atacameñas, presenta un menor consumo de pescado que los otros grupos de mujeres (controles y no atacameñas). Este hecho es debido principalmente, a la ubicación geográfica de los pueblos atacameños que determina la escasez del pescado. En ciudades más grandes como es el caso de Calama, hay un mejor abastecimiento de pescado, por lo que la población de estos lugares puede consumirlo en forma habitual, al igual que en la ciudad de Concepción ubicada en el sector costero. Para la población de mujeres, las diferencias en la frecuencia de BNMN parecen estar dadas por las diferencias en la

exposición a As y no por la diferencia en los hábitos de consumo de tabaco, café o pescado.

Al analizar los niveles de daño genético por medio de la variable BNMN en la población separada por lugar de residencia (tabla 4.10), sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar el pueblo de Toconao, que presenta valores más altos de BNMN, comparado con el control. Sin embargo, el alto nivel de daño detectado en Toconao es difícil de explicar ya que los niveles de As en agua y uñas de esta población no son especialmente altos. Una posible explicación podría venir dada por la edad de la población que presenta la media más alta de todos los grupos analizados, superando la media de la población control en 10 años. Se sabe que la edad es una variable que influye directamente en la frecuencia de MN en distintos tipos celulares (Fenech y Morley 1986). De hecho, en el modelo estadístico aplicado en este estudio (Tabla 4.11), la edad también fue detectada como factor de confusión y, además, se comprobó que al aumentar la edad aumenta la frecuencia de MN.

En cuanto a las demás variables consideradas en la encuesta (tabla 4.5), la población de Toconao es una población que no presenta hábitos que supongan riesgos genotóxicos. De hecho, es una población en la que no hay fumadores y que sólo presenta un ex fumador, tampoco presenta un consumo especialmente alto de alcohol, y el consumo de pescado es bastante bajo. En la población estudiada de Toconao, sólo una persona refiere un caso de cáncer entre sus familiares directos, lo que representa el 6,3%, éste valor es bastante bajo en comparación con la población control en la que el 44,1% presenta casos.

Si bien el consumo de alcohol en Toconao no es particularmente alto, es significativamente mayor más que en la población control. Se podría pensar que el consumo de alcohol podría ser un factor adicional de exposición al As, en el caso de que el alcohol fuera destilado en la zona pero, al no haber analizado muestras de bebidas alcohólicas de la zona, no podemos verificar este supuesto. Sin embargo, los bajos niveles de As en uñas encontrados en Toconao indican un bajo nivel de exposición, de lo que se deduce que si la causa de mayor daño genético estuviera dada por el alcohol, no sería porque aumente los niveles de exposición al As, sino por el propio consumo. El atribuir al alcohol la elevada frecuencia de BNMN no se sustenta por los resultados del análisis global sobre los efectos del alcohol ni por los resultados observados en San Pedro de Atacama, donde se

consume casi el doble de alcohol que en Toconao (tabla 4.5), y la frecuencia de BNMN es casi la mitad (figura 4.9).

En 1997 Biggs y colaboradores estudiaron una población de 108 personas de Toconao como grupo control y la compararon con una población de 124 personas de San Pedro de Atacama (ambas localidades consideradas en nuestro trabajo como población expuesta). La población de Toconao presentó una media de edad similar a la de nuestro estudio, aunque un poco menor. Sin embargo, al calcular la frecuencia de BNMN el valor obtenido fue mucho más bajo, no llegando a 5 BNMN, en 1000 células. Esto podría explicarse debido a que la población muestreada en Toconao para nuestro estudio tiene un tamaño muy pequeño (16 individuos) lo que, unido a una diferencia significativa de edad, puede llevar a una interpretación incorrecta de los resultados. Estas diferencias también podrían deberse a las diferencias propias de los distintos laboratorios en los que se realiza el estudio. Finalmente, es importante destacar que con la información que tenemos no hemos encontrado una causa exógena que justifique el nivel de daño encontrado en la muestra de Toconao. La explicación más plausible para los resultados observados es el pequeño tamaño de la muestra.

Como conclusión de este apartado, los resultados de este estudio indican la existencia de un riesgo genotóxico asociado a la exposición a As por medio del agua de consumo. Sin embargo, el aumento del daño citogenético medido por el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica es menor que el encontrado en estudios previos realizados en otras poblaciones. Dado el tamaño muestral de este estudio (217 individuos) y los niveles de exposición, se podría pensar que quizás la genotoxicidad no es la vía más importante por la cual actúa el As en poblaciones humanas expuestas a través del agua de consumo. Tomando esto en consideración, está claro que se necesitan más estudios para llegar a comprender en profundidad los factores fundamentales que modulan la genotoxicidad del As.

#### **5.4.1.2 Daño genotóxico medido por el ensayo de MN en mucosa bucal**

Debido a que más del 90% de los tumores sólidos se originan en células epiteliales (Cairns, 1975), y a que las mutaciones juegan un papel fundamental en el desarrollo tumoral (Weinstein, 1988), el uso de los tejidos epiteliales es de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico. Últimamente, el uso del ensayo de MN en células epiteliales de mucosa bucal ha sido ampliamente

utilizado para detectar el efecto genotóxico de diversos compuestos incluido el arsénico (Warner *et al.*, 1994; Gonsebatt *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2002 y 2004; Martínez *et al.*, 2005). Esto se debe a que los tejidos epiteliales proliferan muy rápidamente y están en contacto con diversos agentes potencialmente genotóxicos; por ello, las células de exfoliación de las capas superficiales del epitelio pueden reflejar el daño genotóxico inducido. Además, son de fácil obtención y el método de extracción no es invasivo.

En cuanto al daño citogenético medido en células de mucosa bucal (CBMN), en nuestro trabajo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ningún grupo de análisis al separar la población por exposición, etnia y sexo. De los datos obtenidos de las encuestas, no se han detectado posibles factores de confusión que pudieran estar afectando la frecuencia de CBMN. Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos anteriormente por Warner y colaboradores (1994), en un grupo de 18 personas expuestas. Esto podría significar que quizás las células de la mucosa bucal no constituyen la diana más relevante para los efectos del As.

Al analizar los grupos poblacionales según el lugar de residencia, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los pueblos de Socaire y el control, presentando Socaire un mayor nivel de daño (tabla 4.14). Esto se corrobora con una mayor concentración de As en uñas del grupo de Socaire, lo que indicaría una mayor exposición. Al analizar las variables de la encuesta (tabla 4.5), vemos que este grupo no presenta fumadores y no consume alcohol ni pescado, por lo que no se han encontrado factores que puedan dar una posible explicación a la mayor frecuencia de CBMN. Sin embargo, hay que recordar que la muestra de Socaire es muy pequeña (4 personas), por lo que los resultados son poco representativos.

Dada la variación en la concentración de As en agua de consumo en los diferentes pueblos analizados, se estudió la asociación entre la concentración de As ambiental y el daño genotóxico medido mediante el ensayo de MN en células de la mucosa bucal. Los resultados indican que no existe correlación entre los niveles ambientales de As medidos en el agua de consumo y la frecuencia de CBMN. Tampoco se detectó correlación entre la concentración de As en uñas y la frecuencia de CBMN. Esta falta de correlación apoyaría la hipótesis de que las células de la mucosa bucal no son el blanco de la acción genotóxica del As.

Con la excepción del trabajo ya comentado de Warner y colaboradores (1994), los demás estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas a As por medio del agua de consumo han presentado resultados estadísticamente significativos en cuanto al aumento de CBMN en las poblaciones expuestas (tabla 1.8). Estas diferencias podrían deberse al tamaño de la población estudiada. De los trabajos analizados, sólo el estudio realizado en la India en 2004 por Basu y colaboradores analiza una muestra de mayor tamaño a la del presente trabajo y el aumento de la frecuencia de daño en la población india podría deberse a otros factores como la etnia o la mala nutrición detectada en las poblaciones de la zona estudiada.

Los valores de la frecuencia basal de MN en células de la mucosa bucal varían entre los diferentes estudios y poblaciones. En nuestro trabajo, la población control presentó una media de 2,7 células bucales con MN en 1.000 células. Este valor coincide con el obtenido previamente por Livingston y colaboradores (1990). Otros estudios reflejan valores más altos como en el trabajo de Stich y Rosin (1983), que encontraron una media de 4,7‰, y de Ozkul y colaboradores (1997), con una media de 8,4‰. Por otro lado, también se han encontrado frecuencias de BNMN bajas, con valores comprendidos entre 0,3 y 0,4‰ (Sarto *et al.*, 1987, 1990; Tolbert *et al.*, 1992; Rosin *et al.*, 1994; Karahalil *et al.*, 1999). Estas variaciones pueden deberse tanto a un efecto real de daño genético, como a variaciones debidas al procedimiento experimental y a la evaluación de los resultados (protocolo o criterios de recuento). Es importante destacar que en esta Tesis Doctoral la evaluación del daño genotóxico en células bucales se realizó usando DAPI, un agente con afinidad específica por el DNA, lo que disminuye considerablemente los artefactos obtenidos cuando se utiliza la tinción Giemsa, menos específica y que puede llevar a un mayor error.

Es interesante resaltar el hecho de que los valores de daño genético en células de la mucosa bucal obtenidos en la población objeto de estudio son mayores que los obtenidos en nuestro laboratorio en un estudio previo realizado por Pastor y colaboradores (2003), en el que se encontró una media de 1‰ CBMN. Dicho estudio se realizó en una población europea de 470 individuos, siguiendo el mismo protocolo y con el mismo criterio de recuento. Esto podría indicar que la población chilena presenta una frecuencia mayor de CBMN en comparación a las distintas poblaciones europeas estudiadas y que diversas características, étnicas, ambientales y de estilo de vida, podrían modular las frecuencias basales de CBMN de las distintas poblaciones.

En este trabajo se ha considerado la hipótesis de que los atacameños sean más resistentes a los efectos del As que los no atacameños, debido a los más de 11.000 años de exposición continuada al As, que podrían haber resultado en la selección de individuos resistentes a las altas concentraciones de As ambiental en la zona. Sin embargo, nuestros resultados no indican un menor daño genotóxico en las células bucales de la población atacameña comparada con la no atacameña. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, la población atacameña presenta mayores niveles de As en uñas que los demás grupos poblacionales estudiados (tabla 4.10).

## 5.5 BIOMARCADORES DE SENSIBILIDAD INDIVIDUAL

Como se ha comentado anteriormente, las diferencias en la susceptibilidad individual frente a los distintos compuestos xenobióticos está determinada por la existencia de polimorfismos genéticos involucrados en su metabolismo. Su análisis permite determinar los individuos que, debido a sus características genéticas, son más susceptibles a los daños causados por diversos agentes. Se ha demostrado que los genes polimórficos que codifican las *GSTs* participan en el metabolismo del As (Chiou *et al.*, 1997; Taningher *et al.*, 1999; Chouchane y Snow, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Maiti y Chatterjee, 2002), por lo que hemos determinado el genotipo para los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* de cada una de las personas incluidas en este estudio.

Los genes *GSTT1*, *GSM1* y *GSTP1* se han estudiado en relación con la sensibilidad individual frente a diversos efectos citogenéticos. Se ha determinado que los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* están significativamente asociados con la capacidad metiladora del As. Los individuos con genotipo nulo para *GSTM1* (*GSTM1*) presentan un porcentaje elevado de arsénico inorgánico en la orina. Asimismo, los individuos que presentan el genotipo nulo para *GSTT1* presentan altos niveles de DMA (Chiou *et al.*, 1997). En relación al genotipo *GSTP1*, se ha sugerido que puede estar relacionado con la susceptibilidad al cáncer, presentándose el polimorfismo val/val como factor de riesgo (Kote-Jarai *et al.*, 2001).

Hay que señalar que, al analizar el daño genético de los distintos grupos, ya sea mediante el ensayo de MN en linfocitos como en células de la mucosa bucal, se introdujo el genotipo GST como una covariable y mediante los modelos

estadísticos utilizados se determinó que no constituye un factor de confusión. El estudio de la distribución de frecuencias genotípicas de los genes polimórficos *GSTT1*, *GSTM1* y *GSTP1* se realizó para la población total como conjunto (215 personas), y separando la población total por grupos de exposición, por etnias y por niveles de daño citogenético, tanto en linfocitos como en mucosa bucal.

En la tabla 4.15 podemos ver la frecuencia de los genotipos para *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* en la población total. Estos valores concuerdan con los obtenidos en estudios previos, tanto para el gen *GSTM1* (Abdel-Rahman *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, comunicación personal), como para el gen *GSTT1* (C.L. Chen *et al.*, 1996; Garte *et al.*, 2001), y el *GSTP1* (Hernández *et al.*, comunicación personal).

En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, calculado para la distribución de frecuencias de *GSTP1* en los distintos grupos de análisis, podemos concluir que la población control está en perfecto equilibrio, pero que la población expuesta no lo está, presentando una mayor frecuencia de genotipos homocigotos, tanto salvajes como mutantes. Esto podría explicarse por ser una población étnicamente heterogénea.

Al analizar los grupos étnicos es importante tener en cuenta que los no atacameños incluyen tanto población expuesta no atacameña como población control. En este caso podemos ver que ambas poblaciones están desequilibradas. En la población de etnia atacameña, esta se encuentra desplazada hacia los valores de homocigosis para el gen mutado; en cambio, en la población no atacameña, los valores se encuentran desplazados hacia los homocigotos salvajes.

Al analizar la frecuencia de los polimorfismos según el nivel de daño genético evaluado tanto en linfocitos como en células de la mucosa bucal, los distintos grupos se encuentran en desequilibrio presentándose una mayor frecuencia de homocigotos (tanto salvajes como mutantes) de lo esperado. Esto refuerza el papel asignado a algunos genotipos como factores moduladores de los niveles de daño genético.

En cuanto a los genotipos *GSTM1* y *GSTT1*, no se han encontrado diferencias significativas en ninguno de los casos estudiados (exposición, etnia, BNMN y CBMN). Sin embargo, al analizar el genotipo para *GSTP1* se han encontrado

diferencias significativas al comparar distintos grupos. Así, el genotipo ile/ile (homocigoto para el alelo salvaje) se encuentra más representado en la población no atacameña que en la población atacameña con un valor de OR de 3,365. Al analizar el efecto genotóxico en linfocitos, el genotipo ile/ile se encontró más representado en el grupo que presenta menor daño citogenético (BNMN<5‰). En cambio, no se encontraron diferencias al agrupar la población según el nivel de daño en las células de la mucosa bucal.

El genotipo *val/val* (homocigoto para el alelo mutante de *GSTP1*) se encuentra significativamente más representado en los expuestos que en los controles. Al comparar los grupos étnicos, se presenta con más frecuencia en el grupo de atacameños. Al analizar la población según el nivel de daño genético, se determinó que el genotipo *val/val* está más representado en la población con mayor daño genético tanto en linfocitos (tabla 4.18) como en mucosa bucal (tabla 2.20).

La evaluación de genotipos combinados, en la que se analiza la presencia de más de un genotipo de riesgo ha revelado que, tanto el genotipo M-,*val/val* (*GSTM1* nulo, *GSTP1 val/val*) como M-,*val* (*GSTM1* nulo y al menos un alelo *GSTP1 val*) se encuentran más representados en la población atacameña, coincidiendo con la distribución del genotipo *val/val* en esta población.

El genotipo M-,ile/ile (*GSTM1* nulo, *GSTP1 ile/ile*) está más representado en el grupo con menor daño citogenético en linfocitos y en mucosa bucal, coincidiendo también con la distribución del genotipo ile/ile.

En cuanto al análisis de la población de etnia atacameña, en algunos trabajos se ha propuesto como resistente a los efectos adversos del As en el agua de consumo (Dulout *et al.*, 1996; Seoane *et al.*, 1998), y se ha determinado que presenta un metabolismo particular (Vahter *et al.*, 1995), supuestamente protector del daño causado por la exposición al As. En el presente trabajo el Dr. Alex Arroyo, dermatólogo especialista de la zona, determinó que no se presentaban signos cutáneos de arsenicismo en ninguna de las personas atacameñas muestreadas, lo que se podría interpretar como una indicación de mayor resistencia a los efectos del As.

Sin embargo, los niveles de daño citogenético medidos con el ensayo de MN en linfocitos revelan que la población atacameña no presenta un mayor nivel de

daño. Como ya se ha comentado, el análisis de genotipos indica que los atacameños tienen una mayor frecuencia del genotipo *val/val* (mutante en homocigosis para *GSTP1*). Este genotipo también se ha encontrado más representado en la población con un mayor daño genético, medido en ambos tipos celulares. Estos resultados se contraponen a la idea de la posible resistencia de los atacameños frente a los efectos genotóxicos del As. Sin embargo, la frecuencia de casos de cáncer entre familiares directos en la población atacameña estudiada es significativamente menor que en la población control y que en la población expuesta no atacameña.

Como ya se ha indicado, si bien se consideraba que la población atacameña podía presentar algún factor de resistencia frente a los efectos genotóxicos del As, esto no parece ser cierto. Esta población presenta una mayor frecuencia de daño genotóxico en comparación con la población no atacameña y, a la vez, una mayor frecuencia del genotipo mutante para *GSTP1*. Sin embargo, la población atacameña se presenta como una población en la que no se detectan desórdenes o incidencias importantes de enfermedades asociadas al arsenicismo crónico, como es el caso de otras poblaciones estudiadas (Brown y Fan, 1994; Santolata *et al.*, 1995; Jager y Ostrosky- Wegman 1997; Wildfang *et al.*, 2000; Morgan 2001). Hay que señalar que la población atacameña no presenta problemas graves de desnutrición, como ocurre en poblaciones ampliamente estudiadas como es el caso de la India. Sin duda, un hecho interesante que requiere una continuidad de las investigaciones en este campo.

En resumen, este estudio revela que la población expuesta al As a través del agua de consumo presenta un aumento en la frecuencia de daño citogenético medido por el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica. Sin embargo, no se ha detectado un aumento de la frecuencia de daño citogenético al estudiar las células de la mucosa bucal. En cuanto a la población atacameña, no se ha detectado un menor nivel de daño citogenético que apoye la hipótesis de que los atacameños tengan algún tipo de resistencia a los efectos causados por las altas concentraciones a As en las que se encuentran.

## 6 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, así como del análisis y discusión de los mismos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Como se esperaba, los niveles de arsénico en el agua de consumo humano presentan valores significativamente mayores en la zona expuesta que en la zona control. Además, estos niveles presentan variaciones dentro de la zona expuesta dependiendo del sitio de muestreo.
2. La población expuesta presenta una mayor concentración de As total en orina y en uñas. Esto sugiere que ambos parámetros son buenos indicadores de la exposición interna al As a través del agua de consumo.
3. Se ha evidenciado que la exposición al As a través del agua de consumo supone un riesgo genotóxico, induciendo aumentos significativos en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica en la población expuesta. Estos resultados concuerdan con los descritos anteriormente en otros estudios similares de biomonitorización humana.
4. Al evaluar los efectos genotóxicos del As aplicando el ensayo de MN en células de la mucosa bucal, no encontramos un aumento significativo de los niveles de daño en la población expuesta, a pesar de que estas células han estado en contacto con el As a través del agua de consumo. Esto no concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios similares.
5. En relación con la supuesta resistencia de la etnia atacameña a las altas concentraciones de As ambiental, no se han detectado diferencias significativas entre atacameños y no atacameños en cuanto al daño citogenético evaluado mediante el ensayo de MN, tanto en linfocitos como en células de la mucosa bucal. Sin embargo, la población atacameña presenta una concentración significativamente mayor de As en uñas.

6. No se ha encontrado una relación entre los polimorfismos genéticos de *GSTM1* y *GSTT1* y el daño genotóxico medido mediante el ensayo de MN en linfocitos y en células de la mucosa bucal. Tampoco se ha encontrado una distribución alélica ni genotípica particular en la población de etnia atacameña para estos genes.

7. En cuanto al polimorfismo genético para *GSTP1*, se ha determinado que el genotipo *val/val* (homocigoto mutante), es más frecuente en la población que presenta un mayor nivel de daño citogenético, tanto en linfocitos como en células de la mucosa bucal. Este genotipo está más representado en la población expuesta que en la población control. También se encuentra con mayor frecuencia en la población de etnia atacameña.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett.*, 107: 229-233, 1996.
- Abraham SK. Inhibition of in vivo genotoxicity by coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 27 :787-792, 1989.
- Abraham SK. Inhibitory effects of coffee on the genotoxicity of carcinogens in mice. *Mutat. Res.*, 262 :109-114, 1991.
- Abraham SK. Inhibitory effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice. *Mutat. Res.*, 347 :45-52, 1995.
- Abraham SK, Singh SP. Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 733-739, 1999.
- Abraham SK, Stopper H. Anti-genotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 561: 23-33, 2004.
- Aeschbacher HU, Meier H, Ruch E, Wurzner HP. Investigation of coffee in sister chromatid exchange and micronucleus tests in vivo. *Food Chem. Toxicol.*, 22: 803-807, 1984.
- Ahmad S, Kitchin KT, Cullen WR. Plasmid DNA damage caused by methylated arsenicals, ascorbic acid and human liver ferritin. *Toxicol. Lett.*, 133: 47-57, 2002.
- Aidoo A, Lyn-Cook LE, Lensing S, Wamer W. Ascorbic acid (vitamin C) modulates the mutagenic effects produced by an alkylating agent in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24: 220-228, 1994.
- Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 104 Supl. 3: 503-510, 1996.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 10004-10012, 1997.

- Ames BN, Gold LS. Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7772-7776, 1990.
- Andersen ME, Clewell HJ, Snow ET, Yager JW. Mode of action studies for assessing carcinogenic risks posed by inorganic arsenic. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 397-406. 1999.
- 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.
- Antocchia A, Tanzarella C, Modesti D, Degrassi F. Citokinesis Block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 287: 93-99, 1993.
- 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.
- Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 37: 397-419, 1997.
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Wildfang EK, Healy SM, Gailer J, Radabaugh TR, Bogdan GM, Powell TA Aposhian MM. How is inorganic arsenic detoxified? In W.R Chapell, CO Abernathy y RL Calderón (Eds.). *Arsenic exposure and health effects*. Elsevier Science, USA, pp. 289-297, 1999.
- Aposhian HV, Gurzau ES, Le XC, Gurzau A, Healy SM, Lu X, Ma M, Yip L, Zakharyan RA, Maiorino RM, Dart RC, Ticus MG, González-Ramírez D, Morgan DL, Avram D, Aposhian MM. Occurrence of monomethylarsinous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 693-697, 2000a.
- Aposhian HV, Zheng B, Aposhian MM, Le XC, Cebrian ME, Cullen W, Zakharyan RA, Ma M, Dart RC, Cheng Z, Andrewes P, Yip L, O'Malley GF, Maiorino RM, van Voorhies W, Healy SM Titcomb A. DMPS-arsenic challenge test. II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMAIII), excreted in human urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165: 74-83, 2000b.

- Aso T, Abiko Y. Tissue distribution of arsenic after subcutaneous implantation of arsenic trioxide pellet in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 3: 109-115, 1978.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology. Toxicological profile for arsenic. USA, 1989.
- Basu A, Ghosh P, Das JK, Banerjee A, Ray K, Giri AK. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cáncer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13: 820-827, 2004.
- Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.*, 488: 171-194, 2001.
- 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.
- Beckman G, Beckman L, Nordenson I. Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ. Health. Perspect.*, 19: 145-146, 1977.
- Benko V, Rames J, Götzl M. Preliminary incidence analysis in skin basalioma patients exposed to arsenic in environmental and occupational settings. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 201-205, 1999.
- Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW, Mannervik B. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 1480-1484, 1994.
- Bettley FR, O'Shea JA. The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 92: 563-568, 1975.
- Biggs ML, Kalman DA, Moore LE, Hopenhayn-Rich C, Smith MT, Smith AH. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat. Res.*, 386: 185-195, 1997.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 275: 24798-24806, 2000.
- Board PG, Webb GC, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13

- and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.*, 53 :205-213, 1989.
- Boonchai W, Walsh M, Cummings M, Chenevix-Trench G. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, 136: 195-198, 2000.
- Borgoño JM, Greiber R. Epidemiological study of arsenicum in the city of Antofagasta. En: *Trace substances in Environmental Health*, DD Hamphill (Ed.), Columbia: University of Missouri, 1972.
- Braman RS, Foreback CC. Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, 182: 1247-1249, 1973.
- Brown KG. Observations on arsenic exposure and Hhealth effects. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 407-413, 1999.
- Brown ME, Fan AM. Arsenic: Risk assessment for California drinking water standards. *J. Hazardous Mater.*, 39: 149-159, 1994.
- Buchet JP, Lauwerys R. Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. of Toxicol.*, 57: 125-129, 1985.
- Buchet JP, Lauwerys R. Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 91: 65-74, 1987.
- Buchet JP, Lauwerys R. Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 3149-3153, 1988.
- Buchet JP, Lison D. Mortality by cancer in groups of the Belgian population with a moderately increased intake of arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 71: 125-130, 1998.
- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. Comparison of several methods for the determination of arsenic compounds in water and in urine. Their application for the study of arsenic metabolism and for the monitoring of workers exposed to arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 46: 11-29, 1980.
- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48: 71-79, 1981a.
- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 48: 111-118, 1981b.

- Buchet JP, Pauwels J, Lauwerys R. Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environ. Res.*, 66: 44-51, 1994.
- Byron WR, Bierbower GW, Brouwer JB, Hansen WH. Pathologic changes in rats and dogs from two-year feeding of sodium arsenite or sodium arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 10: 132-147, 1967.
- Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255: 197-200, 1975.
- Calderón 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.
- Castren K, Ranki A, Welsh JA, Vahakangas KH. Infrequent p53 mutations in arsenic-related skin lesions. *Oncol. Res.*, 10: 475-482, 1998.
- Crecelius EA. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health Pespect.*, 19: 147-150, 1977.
- Charbonneau SM, Hollins JG, Tam GK, Bryce F, Ridgeway JM, Willes RF. Whole-body retention, excretion and metabolism of [<sup>74</sup>As]arsenic acid in the hamster. *Toxicol. Lett.*, 5: 175-182, 1980.
- Charbonneau SM, Spencer K, Bryce F, Sandi E. Arsenic excretion by monkeys dosed with arsenic-containing fish or with inorganic arsenic. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 470-477, 1978.
- 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 CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, 6: 187-191, 1996.
- Chen H, Yoshida K, Wanibuchi H, Fukushima S, Inoue I, Endo G. Methylation and demethylation of dimethylarsinic acid in rats following chronic oral exposure. *Applied. Organometalic Chemistry*, 10: 741-745, 1996.
- Chen Y, Megosh LC, Gilmour SK, Sawicki JA, O'Brien TG. K6/ODC transgenic mice as a sensitive model for carcinogen identification. *Toxicol. Lett.*, 116: 27-35, 2000.
- Chien CJ, Hsu LI, Tseng CH, Hsueh YM, Ciou HI. Emerging epidemics of arseniasis in Asia. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 113-121, 1999.

- Chiou HY, Hsueh YM, Hsieh LL, Hsu LI, Hsu YH, Hsieh FI, Wei ML, Chen HC, Yang HT, Leu LC, Chu TH, Wu CC, Yang MH y Chen CJ. Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat. Res.*, 386: 197-207, 1997.
- Chouchane S, Snow ET. In vitro effect of arsenical compounds on glutathione-related enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 517-522, 2001.
- Chung JS, Kalman DA, Moore LE, Kosnett MJ, Arroyo AP, Beeris M, Mazumder DN, Hernández AL, Smith AH. Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health. Perspect.*, 110: 729-733, 2002.
- Cikrt, M, Bencko,V, Tich, M, Benes, B. Biliary excretion of 74As and its distribution in the golden hamster after administration of 74As(III) and 74As (V). *J. Hyg.Epidemiol. Microbiol. Inmunol.*, 24: 384-388, 1980.
- Concha G. Metabolism of inorganic arsenic and biomarkers of exposure. Tesis Doctoral, Karolinska Institutet, Suecia, 2001.
- Concha G, Nermell B, Vahter MV. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ. Health Perspect.*, 106: 355-359, 1998a.
- Concha G, Vogler G, Lezcano D, Nermell B, Vahter M. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol. Sci.*, 44: 185-190, 1998b.
- 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.
- Das T, Roychoudhury A, Sharma A, Talukder G. Modification of clastogenicity of three known clastogens by garlic extract in mice in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 383-388, 1993.
- Deknudt G. Chemical induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated in G0 prior to stimulation by different mitogens and revealed 72 h later in second division cells. *Mutat. Res.*, 174: 67-70, 1986.
- Del Razo LM, García-Vargas GG, Hernández MC, Gomez-Muñoz A, Cebrián ME. Profile of urinary arsenic metabolites in children chronically Exposed to Inorganic arsenic in Mexico. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 281-287, 1999.

- DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.*, 567: 447-474, 2004.
- Dong JT, Luo XM. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat. Res.*, 302: 97-102, 1993.
- Ducoff, HS, Neal, WB, Straube RL, Jacobson LO, Brues AM. Biological studies with arsenic<sup>76</sup>. II. Excretion and tissue localization. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 69: 548-554, 1948.
- Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.*, 370: 151-158, 1996.
- Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 34-43, 1989.
- Eguchi N, Kuroda K, Okamoto A, Horiguchi S. Metabolites of arsenic induce tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 141-145, 1997.
- Elhajouji A, Santos AP, van Hummelen PY, Kirsch-Volders M. Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo[*a*]pyrene. *Mutagenesis*, 9: 307-313, 1994.
- Endo G, Kuroda K, Okamoto A, Horiguchi S. Dimethylarsenic acid induces tetraploids in Chinese hamster cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 131-137, 1992.
- EPA. <http://www.epa.gov/safewater/ars/implement.html>, 2002
- Evans HJ. Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutat. Res.*, 204: 355-363, 1988.
- Falck G, Catalán J, Norppa H. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutat. Res.*, 392: 71-79, 1997.
- Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut. Res.*, 285: 35-44, 1993.
- Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-radiation. *Mutat. Res.*, 161: 193-198, 1986.

- Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29-36, 1985.
- Fenech M, Neville S. Conversion of excision repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Molec. Mutagen.*, 19: 27-36, 1992.
- Fischer AB, Buchet JP, Lauwerys RR. Arsenic uptake, cytotoxicity and detoxification studied in mammalian cells in culture. *Arch. Toxicol.*, 57: 168-172, 1985.
- Fontham E, Correa P, Rodriguez E, Lyn Y. Validation of smoking history with the micronuclei test. En: *Mechanisms in tobacco carcinogenesis*. Banbury report, Hoffman D y Harris C (Eds.). 23, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 113-119, 1986.
- Francesconi KA, Tanggaar R, McKenzie CJ, Goessler W. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin. Chem.*, 48: 92-101, 2002.
- Freeman HC, Uthe JF, Fleming RB, Odense PH, Ackman RG, Landry G, Musial C. Clearance of arsenic ingested by man from arsenic contaminated fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 224-229, 1979.
- Frenz PY, Sancha AM. Determinación de los niveles de exposición a As en la población chilena. En: "Protección de la competitividad de los productos mineros de Chile: antecedentes y criterios para la regulación ambiental del As" Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile y Centro de Investigación Minero Metalúrgica- CIMM, Chile. FONDEF 2-24, 1997.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10: 1239-1248, 2001.

- Gebel T. Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203: 249-262, 2001.
- Gebel T. Suppression of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. *Mutat. Res.*, 412: 213-218, 1998.
- Gebel T, Christensen S, Dunkelberg H. Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. *Anticancer Res.*, 17: 2603-2607, 1997.
- Georis B, Cardenas A, Buchet JP, Lauwerys R. Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicology*, 63: 73-84, 1990.
- Gerhardsson L, Nordberg GF. Lung cancer in smelter workers--interactions of metals as indicated by tissue levels. *Scand J Work Environ. Health*, 19: 90-94, 1993.
- Germolec DR, Spalding J, Yu HS, Chen GS, Simeonova PP, Humble MC, Bruccoleri A, Boorman GA, Foley JF, Yoshida T, Luster MI. Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth factors. *Am. J. Pathol.*, 153: 1775-1785, 1998.
- Ginsburg JM. Renal mechanism for excretion and transformation of arsenic in the dog. *Am. J. Physiol.*, 208: 832-840, 1965.
- Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrian M, Beck BD, Waalkes MP. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.*, 49: 5-14, 1999.
- 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.
- Guillamet E, Creus A, Ponti J, Sabbioni E, Fortaner S, Marcos R. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19: 129-135, 2004.
- Gurr JR, Lin YC, Ho IC, Jan KY, Lee TC. Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. *Mutat. Res.*, 319: 135-142, 1993.
- Gyurasics A, Varga F, Gregus Z. Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous glutathione and xenobiotics with glutathione-dependent hepatobiliary transport. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 937-944, 1991a.
- Gyurasics A, Varga F, Gregus Z. Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 465-468, 1991b.

- Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.*, 58: 4117-4121, 1998.
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18: 641-644, 1997.
- Harrington-Brock K, Cabrera M, Collard DD, Doerr CL, McConnell R, Moore MM, Sandoval H, Fuscoe JC. Effects of arsenic exposure on the frequency of HPRT-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study. *Mutat. Res.*, 431:247-257, 1999.
- Hartmann A, Speit G. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27: 98-104, 1996.
- Hartwig A, Groblinghoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH. Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18: 399-405, 1997.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Mille E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28: 167-175, 1996.
- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.*, [Epub ahead of print] 2005.
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30: 445-600, 1995.
- Healy SM, Zakharyan RA, Aposhian HV Enzymatic methylation of arsenic compounds: IV. In vitro and in vivo deficiency of the methylation of arsenite and monomethylarsonic acid in guinea pig. *Mutat. Res.*, 386: 229-239, 1997. (Erratum in: *Mutat. Res.*, 387(3): 173, 1997).
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, McGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291, 1991.
- Heddle JA. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. En: *Mutation-induced chromosome damage in man*. Evans HJ, Lloyd DC (Eds.), University press, Edimburg, pp. 191-200,

1976.

- Hernández A, Céspedes W, Xamena N, Surrallés J, Creus A, Galofré P, Marcos R. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett.*, 190: 37-44, 2003.
- Hessl SM, Berman E. Severe peripheral neuropathy after exposure to monosodium methyl arsonate. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 19: 281-287, 1982.
- Hinwood AL, Sim MR, Jolley D, de Klerk N, Bastone EB, Gerostamoulos J, Drummer OH. Hair and toenail arsenic concentrations of residents living in areas with high environmental arsenic concentrations. *Environ. Health. Perspect.*, 111: 187-193, 2003.
- Hollins, JG, Charbonneau SM, Bryce F, Ridgeway JM, Tam. GKH, Willes RF. Whole body retention and excretion of (<sup>74</sup>As)arsenic in the adult beagle dog. *Toxicol. Lett.*, 4: 7-13, 1979.
- Hopenhayn-Rich C, Smith AH, Goeden HM. Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. *Environ. Res.*, 60: 161-177, 1993.
- Hsu YH, Li SY, Chiou HY, Yeh PM, Liou JC, Hsueh YM, Chang SH, Chen CJ. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Mutat. Res.*, 386: 241-251, 1997.
- Hu Y, Su Y, Snow ET. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat. Res.*, 408: 203-218, 1998.
- Hughes MF, Menache M, Thompson DJ. Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 22: 80-89, 1994.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco smoking, Vol. 38, Lyon, 1986.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants including arsenic. Lyon, France. International Agency for Research of Cancer, 2003.
- Jager JW, Ostrosky-Wegman P. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat. Res.*, 386: 181-184, 1997.
- Jha AN, Noditi M, Nilsson R, Natarajan AT. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat. Res.*, 284: 215-221, 1992.

- Jongen WM, Cardinaals JM, Bos PM, Hagel P. Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products. *Food. Chem. Toxicol.*, 23: 669-673, 1985.
- Karagas MR, Morris JS, Weiss JE, Spate V, Baskett C, Greenberg ER. Toenail samples as an indicator of drinking water arsenic exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5: 849-852, 1996.
- Kashiwada E, Kuroda K, Endo G. Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 413: 33-38, 1998.
- Katsnel'son BA, Neizvestnova YM, Blokhin VA. Induction of cancer by the chronic action of arsenic. *Vopr. Onkol.* 32: 68-73, 1986.
- Kenyon EM, Hughes MF. A concise review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsinic acid. *Toxicology*, 160: 227-236, 2001.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, Lang NP, Kadlubar FF. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ. Health Perspect.*, 98: 87-94, 1992.
- Kitchin KT, Ahmad S. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 137: 3-13, 2003.
- Kitchin KT. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172: 249-261, 2001.
- Klaassen CD. Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29: 458-468, 1974.
- 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.
- Kochhar TS, Howard W, Hoffman S, Brammer-Carleton L. Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Lett.*, 84: 37-42, 1996.
- Kote-Jarai Z, Easton D, Edwards S, Jefferies S, Durcocher F, Jackson R, Singh R, Ardern-Jones A, Murkin A, Dearnaley D, Shearer R, Kirby R, and the CRC/BPG UK familial prostate cancer study collaborators, Houlston R, Eeles R. Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics*, 11: 325-330, 2001.

- Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, *GSTM1*, and *GSTT1* genetic polymorphisms. *Blood*, 93: 1496-1501, 1999.
- Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D. Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 12: 655-658, 2002.
- Kurtio P, Komulainen H, Hakala E, Kahelin H, Pekkanen J. Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 297-305, 1998.
- Larramendy ML, Popescu NC, Dipaolo JA. Induction by inorganic metal salts of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human and Syrian hamster cells. *Environ. Mutagen.*, 3: 597-606, 1981.
- Lee TC, Huang RY, Jan KY. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 148: 83-89, 1985b.
- Lee TC, Oshimura M, Barrett JC. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis*, 6: 1421-1426, 1985a.
- Lee-Chen SF, Yu CT, Jan KY. Effect of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis*, 7: 51-55, 1992.
- Léonard A, Lauwerys RR. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutat. Res.*, 75: 49-62, 1980.
- Lerda D. Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.*, 312: 111-120, 1994.
- Lewis RL, Sweet DV. Registry of toxic effects of Chemical Substances. 1983-1984 Supplement, U.S. Department of Health and Human Services, Lewis RL, Sweet DV (Eds.). Cincinnati, 1985.
- Li JH, Rossman TG. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol. Met.*, 4: 197-200, 1991.
- Li W, Wanibuchi H, Salim EI, Yamamoto S, Yoshida K, Endo G, Fukushima S. Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett.*, 134: 29-36, 1998.
- Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, Hsiao W, Lin BK, Hardy S. Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (*GSTM1*) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 15: 1077-1081, 1994.

- Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, Hsieh LL, Chen CJ, Wu TN. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res.*, 59: 1481-1484, 1999.
- Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 1643-1648, 2001.
- Loffredo CA, Aposhian HV, Cebrian ME, Yamauchi H, Silbergeld EK. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ. Res.*, 92: 85-91, 2003.
- Lubin JH, Pottern LM, Stone BJ, Fraumeni JF Jr. Respiratory cancer in a cohort of copper smelter workers: results from more than 50 years of follow-up. *Am. J. Epidemiol.*, 151: 554-565, 2000.
- Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Creus A, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.*, 464: 255-262, 2000.
- Ma M, Le C. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clinical Chemistry*, 44: 539-550, 1998.
- Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.*, 534: 133-143, 2003.
- Mahata J, Chaki M, Ghosh P, Das LK, Baidya K, Ray K, Natarajan AT, Giri AK. Chromosomal aberrations in arsenic-exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India. *Cytogenet. Genome Res.*, 104: 359-364, 2004.
- Maiti S, Chatterjee AK. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Arch. Toxicol.*, 75: 531-537, 2001.
- Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.*, 489: 147-172, 2001.
- Mäki-Paakkanen J, Kurttio P, Paldy A, Pekkanen J. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32: 301-313, 1998.

- Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189: 73-83, 2003.
- Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods. Enzymol.*, 113: 490-495, 1985.
- Mannervik B. Novel polymorphisms in the glutathione transferase superfamily. *Pharmacogenetics*, 13: 127-128, 2003.
- Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, 23: 283-337, 1988.
- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282: 305-306, 1992.
- Marafante E, Vahter M, Norin H, Envall J, Sandstrom M, Christakopoulos A, Ryhage R. Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *J. Appl. Toxicol.*, 7: 111-117, 1987.
- Marnell LL, Garcia-Vargas GG, Chowdhury UK, Zakharyan RA, Walsh B, Avram MD, Kopplin MJ, Cebrián ME, Silbergeld EK, Aposhian HV. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem. Res. Toxicol.*, 16: 1507-1513, 2003.
- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat. Res.*, 564: 65-74, 2004.
- Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol. Lett.*, 155: 319-327, 2005.
- Mass MJ, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 386: 263-277, 1997.
- 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.
- Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA, Smith MT. Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 1051-1056, 1997a.

- Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA, Smith MT. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 31-36, 1997b.
- Morgan A. Arsenic exposure and health effects. Office of water, office of science and technology. Health and Ecological Criteria Division. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, Chapter 3, 2001.
- Morikawa T, Wanibuchi H, Morimura K, Ogawa M, Fukushima S. Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in keratin (K6)/ODC transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 579-581, 2000.
- Muñoz O, Diaz OP, Leyton I, Nunez N, Devesa V, Suner MA, Velez D, Montoro R. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 642-647, 2002.
- Nakadaira H, Endoh K, Katagiri M, Yamamoto M. Elevated mortality from lung cancer associated with arsenic exposure for a limited duration. *J. Occup. Environ. Med.*, 44: 291-299, 2002.
- Nakamuro K, Sayato Y. Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutat. Res.*, 88: 73-80, 1981.
- Nedelcheva Kristensen V, Andersen TI, Erikstein B, Geitvik G, Skovlund E, Nesland JM, Borresen-Dale AL. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics*, 8: 441-447, 1998.
- Nesnow S, Roop BC, Lambert G, Kadiiska M, Mason RP, Cullen WR, Mass MJ. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1627-1634, 2002.
- Ng JC, Seawright AA, Qi L, Garnet CM, Moore MM, Chriswell B. Tumors in mice induced by chronic exposure of high arsenic concentration in drinking water. En: *Book of Abstracts of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects*, San Diego, CA, USA, pp. 28, 1998.
- Nilsson R, Jha AN, Zaprianov Z, Natarajan AT. Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in Sredongorie area, Bulgaria. *Fresenius Environ. Bull.*, 2: 59-64, 1993.
- Noda Y, Suzuki T, Kohara A, Hasegawa A, Yotsuyanagi T, Hayashi M, Sofuni T, Yamanaka K, Okada S. In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic

- acid in MutaMouse. *Mutat Res.*, 513: 205-212, 2002
- Nordenson I, Sweins A, Beckman L. Chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to trivalent and pentavalent arsenic. *Scand. J. Work Environ. Health*, 7: 277-281, 1981.
- Nordenson I, Beckman G, Beckman L, Nordstrom S. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead. *Hereditas*, 88: 263-267, 1978.
- Nordenson I, Beckman L. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VII. Reanalysis and follow-up of chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas*, 96: 175-181, 1982.
- Norppa H, Renzi L, Lindholm C. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis*, 8: 519-525, 1993.
- Okui T, Fujiwara Y. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 172: 69-76, 1986.
- Ostrosky-Wegman P, Gonsbatt ME, Montero R, Vega L, Barba H, Espinosa J, Palao A, Cortinas C, Garcia-Vargas G, del Razo LM. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.*, 250: 477-482, 1991.
- Oya-Ohta Y, Kaise T, Ochi T. Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutat. Res.*, 357: 123-129, 1996.
- Ozkul Y, Donmez H, Erenmemisoglu A, Demirtas H, Imamoglu N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis*, 12: 285-287, 1997.
- Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, 18: 249-258, 2003.
- Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C, Marcos R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40: 101-109, 2002.

- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.*, 495: 147-156, 2001b.
- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 16: 539-545, 2001a.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, 300: 271-276, 1994.
- Pershagen G. Lung cancer mortality among men living near an arsenic-emitting smelter. *Am. J. Epidemiol.*, 122: 684-694, 1985.
- Pershagen G, Nordberg G, Bjorklund NE. Carcinomas of the respiratory tract in hamsters given arsenic trioxide and/or benzo[a]pyrene by the pulmonary route. *Environ. Res.*, 34: 227-241, 1984.
- Petrick JS, Ayala-Fierro F., Cullen WR, Carter DE, Aposhian VH. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163: 203-207, 2000.
- Petrick JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 651-656, 2001.
- Pi J, Yamauchi H, Kumagai Y, Sun G, Yoshida T, Aikawa H, Hopenhayn-Rich C, Shimojo N. Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, 110: 331-336, 2002.
- Picker JD, Fox DP. Do curried foods produce micronuclei in buccal epithelial cells? *Mutat. Res.*, 171: 185-188, 1986.
- Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 743-764, 1989.
- Radack KL, Pinney SM, Livingston GK. Sources of variability in the human lymphocytes micronucleous assay: a population-based study. *Environ. Molec. Mutagen.*, 26: 26-36, 1995.
- 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, Chacrabarti D. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India - a review and commentary. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 39: 683-700, 2001.

- Ramírez MJ, Surrallés J, Puerto S, Creus A, Marcos R. Aneugenic activity in human cultured lymphocytes. An overall study with colchicine using the micronucleus assay and fluorescence in situ hybridization techniques. *Mutagenesis*, 12: 405-410, 1997.
- Ramírez MJ, Surrallés J, Puerto S, Creus A, Marcos R. Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells. *Mutat. Res.*, 440: 163-169, 1999.
- Ramírez P, Eastmond DA, Lalette JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.*, 386: 291-298, 1997.
- Rasmussen RE, Menzel DB. Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.*, 386: 299-306, 1997.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 733-743, 1997.
- Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of berillium disease. *Science*, 262: 242-244, 1993.
- Rojewski MT, Baldus C, Knauf W, Thiel E, Schrezenmeier H. Dual effects of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br. J. Haematol.*, 116: 555-563, 2002.
- Rossmann TG, Stone D, Molina M, Troll W. Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.*, 2: 371-379, 1980.
- Rossmann TG, Uddin AN, Burns FJ, Bosland MC. Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 176: 64-71, 2001.
- Rouimi P, Anglade P, Benzekri A, Costet P, Debrauwer L, Pineau T, Tulliez J. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.*, 358: 257-262, 2001.
- RoyChoudhury A, Das T, Sharma A, Talukder G. Dietary garlic extract in modifying clastogenic effects of inorganic arsenic in mice: two-generation studies. *Mutat. Res.*, 359: 165-170, 1996.
- Rudell R, Slayton TM, Beck B. Implications of As genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 23: 87-105, 1996.

- Rudnay P, Borzsonyi M. The tumorigenic effect of treatment with arsenic trioxide Magyar Onkol., 25: 73-77, 1981.
- Rushmore TH, Pickett CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. J. Biol. Chem., 268: 11475-11478, 1993.
- Sakurai T, Kojima C, Ochiai M, Ohta T, Fujiwara K. Evaluation of in vivo acute immunotoxicity of a major organic arsenic compound arsenobetaine in seafood. Int. Immunopharmacol. 4: 179-184, 2004.
- Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Fukushima, S., 1999. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid (DDMA) in p53 knockout and wild type C57BL/6T mice. Nutr. Cancer, 34: 220-228, 1999.
- Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Healy SM, Aposhian HV. Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. Chem. Res. Toxicol., 13: 1181-1186, 2000.
- Sancha AM, Vega F, Fuentes S, Venturino H, Baron AM, Moreno V, Salazar AM. Exposición al arsénico de la población atacameña. Departamento de Ingeniería Civil, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 1993.
- Santolaya Biondi R, Salazar L, Santolaya Cohen R. Arsénico: impacto sobre el hombre y su entorno, II Región de Chile (Antofagasta). Programa Ambiente 02. Centro de Investigaciones Biológicas y Médicas de Altura-CIEMA, División Chuquicamata- CODELCO, Chile, 1995.
- Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the buccal mucosa. Mutagenesis, 2: 11-17, 1987.
- Sarto F, Tomarin R, Giacomelli L, Canova A, Raimondi F, Ghiotto C, Fiorentino MV. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antineoplastic therapy. Mutat. Res., 288: 157-169, 1990.
- Schaumloffel N, Gebel T. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. Mutagenesis, 13: 281-286, 1998.
- Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A. Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. Carcinogenesis, 24: 967-974, 2003.
- Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc Natl Acad Sci USA., 85: 7293-7297,

1988.

- Seoane AI, Grillo CA, Nilsson R, Darroudi F, Nataranjan AT, Dulout FN. Alteraciones cromosómicas y metabolismo del arsénico en poblaciones humanas expuestas en forma crónica en Argentina. En: Evaluación Mutagénica y Genotóxica. E. de la Peña, CSIC, I. Burguete, y A. Guadaño (Eds.). Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental SEMA, Star Ibérica, Madrid., pp. 239-248, 1998.
- Shimizu M, Yano E. Mutagenicity of instant coffee and its interaction with dimethylnitrosamine in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 189 :307-311, 1987.
- Simeonova PP, Luster MI. Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19: 281-286, 2000.
- Smith AH, Arroyo AP, Mazumder DN, Kosnett MJ, Hernandez AL, Beeris M, Smith MM, Moore LE. Arsenic-induced skin lesions among Atacameño people in Northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ. Health. Perspect.*, 108: 617-620, 2000.
- Smith G, Smith CAD, Wolf CR. Pharmacogenetic polymorphisms En: Environmental Mutagenesis. Phillips DH, Venitt S (Eds.) BIOS Scientific Publishers Ltda., UK, chapter 5, 1995.
- Snow ET, Hu Y, Yan CC, Chouchane S. Modulation of DNA repair and glutathione levels in human keratocytes by micromolar arsenite. En: Arsenic Exposure and Health Effects. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 243-251, 1999.
- Stich HF, Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as an internal dosimeter for exposures to carcinogens. En: Carcinogens and mutagens in the environment, H.F. Stich (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 17-25, 1983a.
- Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. *Int. J. Cancer*, 31: 305-308, 1983b.
- Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int. J. Cáncer*, 50 :172-176, 1992.
- Stich HF, Stich W, Rosin MP. The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci.*, 34: 337-342, 1985.

- Stocker R, Ames BN. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8130-8134, 1987.
- 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, Drobna Z, Jaspers I, Lin S, Thomas DJ. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ. Health Perspect.*, 110: 767-771, 2002.
- Surrallés J, Natarajan AT. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.*, 392: 165-174, 1997.
- Surrallés J, Antoccia A, Creus A, Degraffi F, Tanzarella C. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. *Mutagenesis*, 9: 347-353, 1994.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 341: 169-184, 1995a.
- Surrallés J, Catalán J, Creus A, Norppa H, Xamena N, Marcos R. Micronuclei induced by alachlor, mitomycin-C and vinblastine in human lymphocytes: presence of centromeres and kinetochores and influence of staining technique. *Mutagenesis*, 10: 417-423, 1995b.
- Suzuki KT, Tomita T, Ogra Y, Ohmichi M. Glutathione-conjugated arsenics in the potential hepato-enteric circulation in rats. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 1604-1611, 2001.
- Takagi Y, Matsuda S, Imai S, Ohmori Y, Masuda T, Vinson JA, Mehra MC, Puri BK, Kaniewski A. Survey of trace elements in human nails: an international comparison. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 690-695, 1988.
- Tam GK, Charbonneau SM, Lacroix G, Bryce F. In vitro methylation of 74As in urine, plasma and red blood cells of human and dog. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 69-71, 1979.
- Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Hasegawa T, Makino Y, Seko Y, Hanioka N, Ando M. Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301: 516-520, 2003.

- Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.*, 436: 227-261, 1999.
- Thorgeirsson UP, Dalgard DW, Reeves J, Adamson RH. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 19: 130-151, 1994.
- Tian D, Ma H, Feng Z, Xia Y, Le XC, Ni Z, Allen J, Collins B, Shreinemachers D, Mumford JL. Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *J. Toxicol. Environ. Health*, 64: 473-484, 2001.
- Tice RR, Yager JW, Andrews P, Crecelius E. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutat. Res.*, 386: 315-334, 1997.
- Tinwell H, Stephens SC, Ashby J. Arsenite as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: mouse micronucleus assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's solution. *Environ. Health. Perspect.*, 95: 205-210, 1991.
- Titenko-Holland N, Jacob RA, Shang N, Balaraman A, Smith MT. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat. Res.*, 417: 101-114, 1998.
- Titenko-Holland N, Moore LE, Smith MT. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.*, 312: 39-50, 1994.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271:69-77, 1992.
- Tong Q, Zeng F, Zheng L, Zhao J, Lu G. Apoptosis inducing effects of arsenic trioxide on human bladder cancer cell line BIU-87. *Chin Med J (Engl)*. 114: 402-406, 2001.
- Tseng WP, Chu HM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J. Nat. Cancer Inst.*, 40: 453-463, 1968.
- Tsuchida S. Glutathione Transferases En: *Encyclopedia of Cancer*, Vol. 1. Academic Press, Inc., pp. 733-743, 1997.
- Vahter M. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8: 157-182, 1994.
- Vahter M. Variation in human metabolism of arsenic En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier

- Science, USA, pp. 267-280, 1999.
- Vahter M. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.*, 112-113: 209-217, 2000.
- Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182: 211-217, 2002.
- Vahter M, Concha G. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, 98: 1-5, 2001.
- Vahter M, Marafante E, Lindgren A, Dencker L. Reduction and subcellular binding of arsenate in marmoset monkeys after injection of <sup>74</sup>As-arsenite. *Arch. Toxicol.*, 51: 65-77, 1982.
- Vahter M, Marafante E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interact.*, 47: 29-44, 1983.
- Vahter M, Couch R, Nermell B, Nilsson R. Lack of methylation of inorganic arsenic in the chimpanzee. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133: 262-268, 1995.
- Van Pelt FN, Haring RM, Overkamp MJ, Weterings PJ. Micronucleus formation in cultured human keratinocytes following exposure to mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, 252: 45-50, 1991.
- Venegas W, Zapata I, Carbonell E, Marcos R. Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción, Chile. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 18: 123-129, 1998.
- Vig BK, Figueroa ML, Cornforth MN, Jenkins SH. Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am. J. Ind. Med.*, 6: 325-338, 1984.
- Wang TS, Shu YF, Liu YC, Jan KY, Huang H. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology*, 121: 229-237, 1997.
- Wang JP, Qi L, Moore MR, Ng JC. A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 133: 17-31, 2002.
- Wang TS, Chung CH, Wang AS, Bau DT, Samikkannu T, Jan KY, Cheng YM, Lee TC. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1254-1258, 2002.
- Warner ML, Moore LE, Smith MT, Kalman DA, Fanning E, Smith AH. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3: 583-590, 1994.

- Watanabe C, Inaoka T, Kadono T, Nagano M, Nakamura S, Ushijima K, Murayama N, Miyazaki K, Ohtsuka R. Males in rural Bangladeshi communities are more susceptible to chronic arsenic poisoning than females: analyses based on urinary arsenic. *Environ. Health Perspect.*, 109: 1265-1270, 2001.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19: 275-280, 1998.
- Wei M, Wanibuchi H, Yamamoto S, Li W, Fukushima S. Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 20: 1873-1876, 1999.
- Weinstein IB. The origins of human cancer: molecular mechanisms and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.*, 48: 4135-4143, 1988.
- Welch K, Higgins I, Oh M, Burchfiel C. Arsenic exposure, smoking, and respiratory cancer in copper smelter workers. *Arch. Environ. Health.*, 37: 325-335, 1982.
- Wester RC, Maibach HI, Sedik L, Melendres J, Wade M. In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin decontamination of arsenic from water and soil. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 20: 336-340, 1993.
- Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 13: 131-144, 2003.
- WHO, World Health Organization Water-related diseases. Arsenicosis. 2004. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/arsenicosis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/arsenicosis/en/)
- Wiencke JK, Yager JW. Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 195-200, 1992.
- Wildfang E, Healy S, Aposhian HV. Arsenic. En: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Rudolph Zalupsand. Merces (Eds.) University School of Medicine- Macon, GA, USA. and Janes Koopatonick, London Cancer Center. London, Ontario, Canada, 2000.
- Wildfang E, Radabaugh TR, Aposhian HV. Enzymatic methylation of As compounds. IX. Liver arsenite methyltransferase and arsenate reductase activities in primates. *Toxicology*, 168: 213-221, 2001.
- Wildfang E, Zakharyan RA, Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VI. Characterization of hamster liver arsenite and

- methylarsonic acid methyltransferase activities in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152: 366-375, 1998.
- Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, Liou SH. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat. Res.*, 562: 27-38, 2004.
- Xue KX, Wang S, Ma GJ, Zhou P, Wu PQ, Zhang RF, Xu Z, Chen WS, Wang YQ. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int. J. Cancer*, 50: 702-705, 1992.
- Yager JW, Wiencke JK. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat. Res.*, 386: 345-351, 1997.
- 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.
- Yamamoto S, Wanibuchi H, Hori T, Yano Y, Matsui-Yuasa I, Otani S, Chen H, Yoshida K, Kuroda K, Endo G, Fukushima S. Possible carcinogenic potential of dimethylarsinic acid as assessed in rat in vivo models: a review. *Mutat. Res.*, 386: 353-361, 1997.
- Yamanaka K, Okada S. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health. Perspect.*, 102: 37-40, 1994.
- Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 43-50, 1989a.
- Yamanaka K, Ohba H, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37: 2753-2756, 1989b.
- Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A, Okada S. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168: 58-64, 1990.
- Yamanaka K, Hayashi H, Tachikawa M, Kato K, Hasegawa A, Oku N, Okada S. Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat. Res.*, 394: 95-101, 1997.

- 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, Mizol M, Kato K, Hasegawa A, Nakano M, Okada S. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol. Pharm. Bull.*, 24: 510-514, 2001.
- Yamanaka K, Mizoi M, Tachikawa M, Hasegawa A, Hoshino M, Okada S. Oxidative DNA damage following exposure to dimethylarsinous iodide: the formation of cis-thymine glycol. *Toxicol. Lett.*, 143: 145-153, 2003.
- 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.
- Yamanaka K, Tezuka M, Kato K, Hasegawa A, Okada S. Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by in vivo and in vitro exposure of cells to dimethylarsinic acid. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 191: 1184-1191, 1993.
- Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 74:134-140. 1984a
- Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally ingested trimethylarsenic in man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 682-687, 1984b.
- Yih LH, Ho IC, Lee TC. Sodium arsenite disturbs mitosis and induces chromosome loss in human fibroblasts. *Cancer Res.*, 57: 5051-5059, 1997.
- Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG. Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 983-987, 2001.
- Yu L, Kalla K, Guthrie E, Vidrine A, Klimecki WT. Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione S-transferase omega 1-1 and purine nucleoside phosphorylase polymorphisms in European and indigenous Americans. *Environ. Health Perspect.*, 111: 1421-1427, 2003.
- Zakharyan RA, Aposhian HV. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic

- biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 1278-1283, 1999.
- Zakharyan R, Wu Y, Bogdan GM, Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.*, 8: 1029-1038, 1995.
- Zakharyan RA, Wildfang E, Aposhian HV. Enzymatic methylation of arsenic compounds. III. The marmoset and tamarin, but not the rhesus, monkeys are deficient in methyltransferases that methylate inorganic arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140: 77-84, 1996.
- Zakarayan RA, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DM, Aposhian V. Enzymatic methylation of arsenic compounds: VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158: 9-15, 1999.
- Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 1051-1057, 2001.
- Zhang TC, Cao EH, Qin JF. Opposite biological effects of arsenic trioxide and arsenacetin involve a different regulation of signaling in human gastric cancer MGC-803 cells. *Pharmacology*, 64: 160-168, 2002.
- Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10907-10912, 1997.
- Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC. Naturally occurring human glutathione S-transferase *GSTP1*-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur. J. Biochem.*, 224: 893-899, 1994.

## **8 ANEXOS**

### **8.1 ANEXO 1: ENCUESTA**

HOJA DE CONSENTIMIENTO DEL DONANTE

Este cuestionario se realiza para facilitar la selección de muestras en la investigación del eventual efecto genotóxico del arsénico en poblaciones humanas bajo condiciones ambientales de exposición. Las muestras biológicas serán analizadas mediante distintas técnicas para evaluar posibles cambios a escala celular originados por la exposición. Este cuestionario está clasificado como confidencial y las muestras obtenidas serán utilizadas exclusivamente para este estudio.

1. *DATOS PERSONALES*

Nombre.....  
Apellidos..... Sexo: Varón ( ) Mujer ( )  
Fecha de nacimiento ..... Edad (.....)  
Lugar de nacimiento ..... C.I. ....  
Dirección.....  
Población .....Teléfono .....

2. *A RELLENAR POR EL INVESTIGADOR*

Muestra recogida por .....  
Fecha ..... Hora .....

Sangre heparinizada .....mL (aprox.)  
 Sangre EDTA .....mL (aprox.)  
 Orina .....mL (aprox.)  
 Células mucosa bucal .....mL (aprox.)

Código del donante ..... Expuesto  Control

Firma del donante

Firma del investigador

## I. EXPOSICIÓN LABORAL

### I.1. OCUPACIÓN ACTUAL

1.1.1. ¿Trabaja ahora?

Si  
No

1
2

1.1.2. ¿En qué? (empresa)

.....

.....

1.1.3. ¿Hace cuantos años?

\_\_\_\_\_

1.1.4. Donde trabaja, considera que hay algún tipo de contaminación como:

Tiempo/años

Sin contaminación	0	0	_____
Ruido	0	1	_____
Disolventes u otros prod. químicos	0	2	_____
Metales	0	3	_____
Pinturas	0	4	_____
Tintes	0	5	_____
Asbesto	0	6	_____
Radiaciones (Ravos X, etc.)	0	7	_____
Polvo (.....)	0	8	_____
Pesticidas	0	9	_____
Derivados del carbón	1	0	_____
Derivados del petróleo	1	1	_____
Otros (.....)	1	2	_____
NS/NC	1	3	_____

### I.2. OCUPACIÓN PREVIA

1.2.1. ¿Ha realizado algún otro trabajo antes?

Si  
No

1
2

1.2.2. ¿En qué? (empresa)

\_\_\_\_\_

Fecha

Alguno de los anteriores suponía exposición a:

Tiempo/años

Sin exposición	0	0	_____
Ruido	0	1	_____
Disolventes u otros prod. químicos	0	2	_____
Metales	0	3	_____
Pinturas	0	4	_____
Tintes	0	5	_____
Asbesto	0	6	_____
Radiaciones (Ravos X, etc.)	0	7	_____
Polvo (.....)	0	8	_____
Pesticidas	0	9	_____
Derivados del carbón	1	0	_____
Derivados del petróleo	1	1	_____
Otros (.....)	1	2	_____
NS/NC	1	3	_____

2. TIEMPO LIBRE															
<p>En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">Jardinería u horticultura</td> <td style="width: 5%; text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td>Bricolaje</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td>Carpintería</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td>Mecánica de automóviles/motos</td> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td>Maquetas y modelismo</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td>Otros (.....)</td> <td style="text-align: center;">6</td> </tr> <tr> <td>Ninguna</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> </table> <p><i>En caso de respuesta afirmativa, dar detalles de posible exposición a disolventes, pinturas, colas u otras sustancias tóxicas</i></p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	Jardinería u horticultura	1	Bricolaje	2	Carpintería	3	Mecánica de automóviles/motos	4	Maquetas y modelismo	5	Otros (.....)	6	Ninguna	0	<input type="checkbox"/>
Jardinería u horticultura	1														
Bricolaje	2														
Carpintería	3														
Mecánica de automóviles/motos	4														
Maquetas y modelismo	5														
Otros (.....)	6														
Ninguna	0														

3. DIETA	
<p>¿Cuántas veces a la semana suele comer pescado y/o marisco?</p> <p>Número de veces a la semana _____</p>	<input type="checkbox"/>
<p>¿Cuándo fue la última vez que comió pescado y/o marisco?</p> <p>Hace _____ días</p>	<input type="checkbox"/>
<p>¿Cuántas veces en la última semana?</p> <p>Número de veces en la última semana _____</p>	<input type="checkbox"/>

#### 4. HÁBITOS

<b>4.1. TABACO (5 cigarrillos = 1 puro = 1 pipa)</b>																					
<p style="text-align: right;">                 No fumador <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>                  Fumador <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>                  Ex-fumador <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">3</span>                  Fumador pasivo <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">4</span> </p> <p><i>Si es fumador:</i>                  ¿Cuántos años hace que fuma? ..... años                  ¿Cuántos cigarrillos fuma diariamente? ..... cig/día                  Marca que consume ..... mg nicotina                  Nivel de nicotina/cigarrillo: ..... mg alquitrán</p> <p><i>Si es ex-fumador (más de un año):</i>                  ¿Cuántos años hace que lo dejó? ..... años                  ¿Cuántos cigarrillos fumaba ..... cig/día                  ¿Durante cuántos años fumó? ..... años</p>		<input type="checkbox"/>  <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td></tr> </table>  <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td></tr> </table>																			
<b>4.2. CONSUMO DE ALCOHOL</b>																					
4.2.1. ¿Consume algún tipo de alcohol durante las comidas o en su tiempo libre?		<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td style="padding: 0 10px;">Si</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 0 10px;">No</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</td></tr> </table>	Si	1	No	2															
Si	1																				
No	2																				
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;"></td> <td style="text-align: center;"><i>Fin de semana</i></td> <td style="text-align: center;"><i>g</i></td> </tr> <tr> <td>Vino</td> <td>Vasos semanales</td> <td>.....</td> </tr> <tr> <td>Cerveza</td> <td>Botellas chicas</td> <td>.....</td> </tr> <tr> <td>Licores</td> <td>Copas semanales</td> <td>.....</td> </tr> <tr> <td>¿Otras bebidas?</td> <td>Vasos semanales</td> <td>.....</td> </tr> </table> <p style="text-align: right;">gramos totales: .....</p>		<i>Fin de semana</i>	<i>g</i>	Vino	Vasos semanales	.....	Cerveza	Botellas chicas	.....	Licores	Copas semanales	.....	¿Otras bebidas?	Vasos semanales	.....		<input type="checkbox"/>          <table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td><td style="width: 25%;"></td></tr> </table> g				
	<i>Fin de semana</i>	<i>g</i>																			
Vino	Vasos semanales	.....																			
Cerveza	Botellas chicas	.....																			
Licores	Copas semanales	.....																			
¿Otras bebidas?	Vasos semanales	.....																			
4.2.2. ¿Ha tenido alguna vez problemas de alcoholismo?		<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td style="padding: 0 10px;">No</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">0</td></tr> <tr><td style="padding: 0 10px;">Sí</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 0 10px;">NS/NC</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">9</td></tr> </table>	No	0	Sí	1	NS/NC	9													
No	0																				
Sí	1																				
NS/NC	9																				
<b>4.3. TÉ O CAFÉ</b>																					
¿Consume té o café?		<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td style="padding: 0 10px;">Si</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 0 10px;">No</td><td style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</td></tr> </table>	Si	1	No	2															
Si	1																				
No	2																				
Indique el número de tazas al día:		<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td style="padding: 0 10px;">Té</td><td>..... t/día</td></tr> <tr><td style="padding: 0 10px;">Café</td><td>..... t/día</td></tr> </table>	Té	..... t/día	Café	..... t/día															
Té	..... t/día																				
Café	..... t/día																				

**5. HISTORIA MÉDICA**

**5.1. ANTECEDENTES FAMILIARES**

¿Existe algún miembro de su familia que presente o haya presentado cáncer? Indicar el tipo de cáncer y parentesco

.....  
 .....  
 .....

**5.2. ANTECEDENTES PERSONALES**

5.2.1. ¿Tiene o ha tenido algún problema de salud relacionado con:

	No		Tiempo/años
Corazón, arterias, venas (circulatorios)		<input type="text" value="0"/>	_____
Riñón (renales)		<input type="text" value="1"/>	_____
Pulmón (respiratorios)		<input type="text" value="2"/>	_____
Nervios, cerebral (neurológicos)		<input type="text" value="3"/>	_____
Digestivos		<input type="text" value="4"/>	_____
Piel (dérmicos)		<input type="text" value="5"/>	_____
Infecciosos (hepatitis, mononucleosis, SIDA)		<input type="text" value="6"/>	_____
Cáncer		<input type="text" value="7"/>	_____
NS/NC		<input type="text" value="8"/>	_____
		<input type="text" value="9"/>	_____

Especificar enfermedades y edad de padecimiento

.....  
 .....

5.2.2. ¿Toma algún tipo de medicamento habitualmente?

	No		Tiempo/años
Insulina/Tratam. diabetes		<input type="text" value="0 0"/>	_____
Antibióticos		<input type="text" value="0 1"/>	_____
Tranquilizantes y psicofármacos		<input type="text" value="0 2"/>	_____
Diuréticos		<input type="text" value="0 3"/>	_____
Antiácidos		<input type="text" value="0 4"/>	_____
Antihistamínicos		<input type="text" value="0 5"/>	_____
Vitaminas y minerales		<input type="text" value="0 6"/>	_____
Analgésicos, antipiréticos		<input type="text" value="0 7"/>	_____
Anticonceptivos/hormonas		<input type="text" value="0 8"/>	_____
Otros(.....)		<input type="text" value="0 9"/>	_____
NS/NC		<input type="text" value="1 0"/>	_____
		<input type="text" value="1 1"/>	_____

5.2.3. ¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X (incluso en la niñez) ?

No   
 Sí   
 NS/NC

5.2.4. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre en el último año?

No   
 Sí   
 NS/NC

## **8.2 ANEXO 2: PUBLICACIONES**

### **8.2.1 Artículo 1**

Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic

Mutation Research, 564: 65–74, 2004.



## Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic

V. Martínez<sup>a</sup>, A. Creus<sup>a</sup>, W. Venegas<sup>b</sup>, A. Arroyo<sup>c</sup>, J.P. Beck<sup>d</sup>, T.W. Gebel<sup>e</sup>,  
J. Surrallés<sup>a</sup>, R. Marcos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutàgenes, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, Cerdanyola del Vallès, Bellaterra 08193, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Biología Celular, Universidad de Concepción, Chile*

<sup>c</sup> *Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Antofagasta, Chile*

<sup>d</sup> *Medical Institute of General Hygiene and Environmental Health, University of Goettingen, Germany*

<sup>e</sup> *Federal Institute for Occupational Safety and Health, Dortmund, Germany*

Received 19 April 2004; received in revised form 19 July 2004; accepted 22 July 2004

### Abstract

In the present study we have evaluated whether or not environmental exposure to arsenic in ground drinking-water results in a significant increase in the frequency of micronuclei (MN) in peripheral blood lymphocytes. Thus, 106 individuals from the Antofagasta region (North Chile), together with 111 individuals from the area of Concepción, were used in this investigation. In the Antofagasta area, arsenic levels in drinking-water as high as 0.750 mg/L were measured. In Concepción, located about 2500 km towards the south and used as reference area, arsenic levels in tap water were as low as 0.002 mg/L. The total content of arsenic in fingernails was determined as a biomarker of individual exposure. The cytogenetic results obtained in this study indicate that in the exposed group the overall frequency of binucleated micronucleated cells (BNMN) is higher than in the reference group, the difference being statistically significant. In addition, no differences were found between the exposed and the reference groups, regarding the cytokinesis-block proliferation index (CBPI). No association was observed between BNMN and arsenic content in water or arsenic in fingernails. On the other hand, when the exposed group was divided according to their Atacameño or Caucasian ethnicity, no significant differences were observed between them. In addition, as usually found in other human biomonitoring studies, sex and age are factors that modulate the frequency of MN in both exposed and reference populations. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Biomonitoring; Micronucleus test; Human lymphocytes; Arsenic; Drinking-water; Fingernails

### 1. Introduction

Arsenic has been classified as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2052;

fax: +34 93 581 2387.

E-mail address: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es) (R. Marcos).

[1], based on strong epidemiological evidence. The compound naturally occurs in the drinking-water of millions of people, at concentrations much higher than considered safe, which represents an important health concern in several areas around the world. Chronic exposure to arsenic has been associated with different types of cancer in skin, lung, bladder and liver [2]. Nevertheless, until now it remains unclear how arsenic causes cancer and how it exerts its potential genotoxic action.

Many studies have been carried out to determine the genotoxic potential of arsenic compounds (reviewed by Basu et al. [3]), but no general agreement has been reached about its mechanism of action. Thus, although arsenic generally does not show mutagenic effects in bacteria, and the results on point mutations in mammalian cells are contradictory, the results obtained in cytogenetic studies show that arsenic is a clastogenic agent. On the other hand, *in vitro* and *in vivo* studies on DNA damage induction seem to indicate that arsenic acts indirectly by inhibiting DNA repair.

Several biomonitoring studies have been carried out in human populations environmentally exposed to arsenic due to its presence in drinking-water, by looking for cytogenetic damage in lymphocytes. Cytogenetic biomonitoring studies carried out by use of somatic cells are considered as pertinent tools to evaluate the possible genotoxic effects of a defined exposure. For instance, chromosomal damage has shown to be a relevant biomarker for cancer predisposition [4]. Although the levels of arsenic exposure and the periods of exposure vary between studies, they usually report positive cytogenetic effects. However, a study carried out in the US evaluating chromosomal aberration (CA) levels did not show CA increases associated to arsenic exposure [5]; negative results were also obtained [6] in a pilot study on individuals chronically exposed in Mexico. In contrast, in a further study conducted by the same group, significant increases in CA levels were detected in the arsenic-exposed population when compared to a referent population [7]. In addition, in Finland, CA increases were also observed in direct association with arsenic exposure [8] and, in an area endemic for black-foot disease in Taiwan increases in CA were observed in individuals developing cancer, compared with those who did not develop the illness [9].

Sister chromatid exchange (SCE) has also been used to determine the effects of arsenic in ground water.

Thus, Lerda [10] showed significant increases in SCE frequencies associated with the As levels of ingested water, and significant increases were also observed among blackfoot patients in Taiwan [11]. Nevertheless, studies carried out in the US [5] and Argentina [12] were unable to show increases in SCE related to arsenic exposure.

Finally, micronucleus (MN) formation is another cytogenetic biomarker used to assess the genotoxic risk associated to arsenic exposure in drinking-water. With this biomarker, clastogenic/aneugenic effects have been observed in exposed people from Argentina [12], Bulgaria [13] and India [14].

Taking into account the information detailed above, and the wide range of exposure conditions that human populations can encounter when environmentally exposed to arsenic in ground water, the present work pursues to add more information about the possible genotoxic risk associated to arsenic exposure in drinking-water. Thus, a large population from northern Chile with high levels of arsenic in drinking-water has been evaluated and compared with a reference group from the city of Concepción, located about 2500 km to the south in the same country, with very low levels of arsenic in drinking-water. The micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes was selected because of its advantages in the screening of cytogenetic damage caused by potential environmental mutagens [15,16], its reliable sensitivity [17,18], and its advantages in human biomonitoring [19,20], being an adequate alternative to the *in vitro* CA test [20].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Studied populations

The study was carried out in a group of 217 individuals, 106 of whom were from the area of Antofagasta (Chile), living in the villages of Calama, San Pedro de Atacama, Toconao, Socaire, and Peine. Levels of arsenic in the tap water of this area vary and can reach concentrations as high as 0.750 mg/L. Table 1 gives the levels of arsenic in the different villages of the area where samples were taken. The reference group consisted of 111 healthy persons from the city of Concepción, in the south of Chile, where arsenic levels in drinking-water are very low (see Table 1). People living

Table 1  
Arsenic levels in water from the sampled areas

Sampling place	mg As/L
Concepción (sample 1)	0.00019
Concepción (sample 2)	0.00019
Peine	0.00334
Toconao (sample 1)	0.01988
Toconao (sample 2)	0.01994
Calama	0.02084
Chuquicamata	0.02620
Antofagasta	0.03062
Lasana – Pukara (river)	0.13060
Lasana – Lou (river)	0.14640
Socaire – Community Hospital	0.25220
Socaire (river)	0.25960
San Pedro de Atacama (morning sample)	0.55000
San Pedro de Atacama (afternoon sample)	0.61900
San Pedro de Atacama (river)	1.08700

in San Pedro, Toconao, Peine and Socaire are assumed to be exposed mainly via drinking-water, directly or indirectly. Calama is close to the open field copper mine of Chuquicamata; in this case, it cannot be excluded that in addition to exposure via drinking-water there is also an exposure via air pollution.

Table 2 shows the main characteristics (age, smoking and drinking habits, and cancer incidence in relatives) of both groups. Taking into account the population structure of the Antofagasta area, exposed people were classified according to their ethnicity (Atacameño Indian versus non-Atacameño). Medical examination in the exposed group did not detect skin lesions. Table 3 gives the description considering the place of the sampling.

Prior to the study, all individuals gave informed consent and blood samples were collected and further

Table 2  
Population description

	R	E	EA	ENA
Population				
No. of individuals	111 (100%)	106 (100%)	50 (47%)	56 (53%)
Age				
Years $\pm$ S.E.	37.68 $\pm$ 1.08	39.5 $\pm$ 1.31	40.2 $\pm$ 2.22	38.87 $\pm$ 1.51
Sex				
No. of men	42 (37.8%)	24 (22.6%)	8 (16%)	16 (28.6%)
No. of women	69 (62.2%)	82 (77.4%)	42 (84%)	40 (71.4%)
Alcohol consumption				
g/week $\pm$ S.E.	29.86 $\pm$ 4.12	17.1 $\pm$ 4.5	25.8 $\pm$ 8.9	9.18 $\pm$ 2.62
Coffee and tea consumption				
Tea (cups/day $\pm$ S.E.)	1.47 $\pm$ 0.12	1.63 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.13	1.71 $\pm$ 0.2
Coffee (cups/day $\pm$ S.E.)	2.05 $\pm$ 0.18	0.73 $\pm$ 0.14	0.32 $\pm$ 0.08	1.11 $\pm$ 0.24
Smoking habit				
Non-smokers	64 (57.7%)	78 (74.3%)	43 (86%)	35 (63.6%)
Ex-smokers	11 (9.9%)	7 (6.7%)	3 (6%)	4 (7.3%)
Smokers	36 (32.4%)	20 (19%)	4 (8%)	16 (29.1%)
Data not available	0	1	0	1
Cigarettes/day				
Overall population	2.4 $\pm$ 0.45	1.83 $\pm$ 0.41	0.92 $\pm$ 0.48	2.65 $\pm$ 0.64
Only smokers	4.81 $\pm$ 0.5	7.65 $\pm$ 1.3	8.75 $\pm$ 3.9	7.38 $\pm$ 1.57
Fish consumption habit				
Times/week	1.01 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.04
Relatives with cancer				
Without cases	62 (55.9%)	77 (73.3%)	41 (82%)	36 (65.5%)
With cases	49 (44.1%)	28 (26.7%)	9 (18%)	19 (34.5%)
Data not available	0	1	0	1

R, referents; E, exposed; EA, exposed belonging to Atacameño ethnicity; ENA, exposed not belonging to Atacameño ethnicity.

Table 3  
Description of the study population by residence town

	SAN PEDRO	TOCONAO	PEINE	SOCALRE	CALAMA	CONCEPCIÓN
<b>Population</b>						
No. of individuals	25 (23158%)	16 (15109%)	8 (7154%)	4 (3177%)	53 (50%)	111 (100%)
<b>Age</b>						
Years $\pm$ S.E.	39.8 $\pm$ 2.48	47.63 $\pm$ 4.21	36.13 $\pm$ 6.81	41.75 $\pm$ 9.45	37.25 $\pm$ 1.48	37.68 $\pm$ 1.08
<b>Sex</b>						
No. of men	8 (32%)	3 (1818%)	1 (1215%)	0 (0%)	12 (2216%)	42 (3718%)
No. of women	17 (68%)	13 (8113%)	7 (8715%)	4 (100%)	41 (7714%)	69 (6212%)
<b>Alcohol consumption</b>						
g/week $\pm$ S.E.	37.8 $\pm$ 16.23	19 $\pm$ 10.4	6.38 $\pm$ 4.47	0	9.52 $\pm$ 2.77	29.86 $\pm$ 4.12
<b>Coffee and tea consumption</b>						
Tea (cups/day)	1.88 $\pm$ 0.32	1.63 $\pm$ 0.15	1.25 $\pm$ 0.37	1.25 $\pm$ 0.48	1.6 $\pm$ 0.17	1.47 $\pm$ 0.12
Coffee (cups/day)	0.4 $\pm$ 0.13	0.06 $\pm$ 0.06	0.5 $\pm$ 0.33	0.75 $\pm$ 0.48	1.13 $\pm$ 0.26	2.05 $\pm$ 0.18
<b>Smoking habit</b>						
Non-smokers	18 (72%)	15 (93.8%)	7 (87.5%)	4 (100%)	34 (65.4%)	64 (57.7%)
Ex-smokers	2 (8%)	1 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7.7%)	11 (9.9%)
Smokers	5 (20%)	0 (0%)	1 (12.5%)	0 (0%)	14 (26.9%)	36 (32.4%)
<b>Cigarettes/day</b>						
Overall population	1.72 $\pm$ 0.51	0	2.5 $\pm$ 2.5	0	22.2 $\pm$ 0.58	2.46 $\pm$ 0.45
Only smokers	9 $\pm$ 2.59	0	20 $\pm$ 0	0	6.29 $\pm$ 1.32	8.75 $\pm$ 3.9
<b>Fish consumption habit</b>						
Times per week	0.08 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.1	0	0	1 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.08
<b>Relatives with cancer</b>						
Without cases	21 (84%)	15 (93.8%)	5 (62.5%)	4 (100%)	32 (61.5%)	62 (55.9%)
With cases	4 (16%)	1 (6.3%)	3 (37.5%)	0 (0%)	20 (38.5%)	49 (44.1%)
Data not available	0	0	0	0	1	0

manipulated in accordance with ethical standards. All participants completed a detailed questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, seafood consumption, medical, and family history. This questionnaire is similar to that published by the International Commission for the Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens [21].

## 2.2. Lymphocyte cultures and MN analysis

Blood samples were obtained from each subject by venipuncture, collected in heparinized vacutainers and sent directly to the laboratory in Concepción, where they were further manipulated with the help of one technician from Spain. Lymphocyte cultures were set up by adding 0.5 mL of whole blood to 4.5 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum, 1% antibiotics (penicillin and strep-

tomyacin) and 1% L-glutamine (all provided by Gibco Life Technologies, Paisley, UK). Lymphocytes were stimulated by incubation with 1% phytohaemagglutinin (Gibco) for 72 h at 37 °C.

A cytochalasin B (Cyt-B, Sigma, St. Louis, MO, USA) solution was prepared in dimethyl sulfoxide at a concentration of 6  $\mu$ g/mL and stored at -20 °C [22]. This solution was thawed and added to the cultures 44 h later to arrest cytokinesis. At 72 h of incubation, the cultures were harvested by centrifugation at 120  $\times$  g for 8 min. Next, to eliminate red cells and to preserve the cytoplasm, blood cultures were washed once in RPMI 1640 medium followed by a mild hypotonic treatment (2–3 min in 0.075 M KCl at 4 °C). Cells were centrifuged and a methanol-acetic acid (3:1 v/v) solution was gently added. This fixation step was repeated twice and the resulting cells were resuspended in a small volume of fixative solution and dropped onto clean slides. Finally the cells were stained with 10%

Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 10 min.

The scoring was carried out in the UAB by a well-trained technician in a blind study. To determine the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) and the total number of MN, a total of 1000 binucleated cells with well-preserved cytoplasm (500 per replicate) were scored for each subject. In addition, 500 lymphocytes were scored to evaluate the percentage of cells with one to four nuclei and the cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was calculated [23].

### 2.3. Sample preparation of fingernails and water; analysis by atomic absorption spectrometry

Samples of fingernails were sent to the University of Goettingen for the evaluation of the arsenic content. Chemicals used for the cleaning and digestion of the fingernails and the analysis with atomic absorption spectroscopy (AAS) were 60% nitric acid (ultrapur), 30% hydrogen peroxide (p.a.), acetone (p.a.), and a magnesium-matrix modifier, all purchased from Merck, Germany. Water was of high purity grade ( $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) made by a type HP-4 purification system (TKA-Lab, Germany). Standards for calibrating the AAS were prepared from an arsenic acid stock solution (Certipur, Merck, Germany).

Coarse dirt was removed from fingernails by scraping. Nail paint was removed with acetone. Then the fingernails were cleaned according to a method described by Karagas et al. [24,25] by ultrasonication in high purity grade water for 10 min. Afterwards, nails were washed three times with high purity grade water. Fingernails were then checked with a magnifying glass and any remaining dirt was removed by additional ultrasonication or by cutting off. The nails were dried in an oven at  $65^\circ\text{C}$  overnight, weighed and digested in a microwave digestion system (mjs 1200 mega, Microwave Laboratory Systems, USA). Therefore, 1 mL 60% nitric acid (ultrapur, Merck, Germany), 0.5 mL hydrogen peroxide (p.a., Merck, Germany), and 0.75 mL high purity grade water were added to the nail sample. The program for the microwave digestion consisted of six steps: 3 min at 250 W, 1 min at 0 W, 4 min at 250 W, 5 min at 500 W, 3 min at 400 W, and 4 min at 300 W. After cooling, the sample was diluted 1:5 with high purity grade water and analyzed by graphite furnace

AAS (SIMAA 6000, Perkin-Elmer, USA). The detection limit was  $1 \mu\text{g arsenic/L}$ .

Water samples (45 mL) were treated with  $\text{HNO}_3$  (65%) and sent to Goettingen where they were analysed by HPLC-AAS. An HPLC system (520 Bio-Tec Kontrol) was connected to a system of hydruire generation (FIAS 400) and to an atomic fluorescence spectrometer (AFS, Excalibur, PS Analytical).

### 2.4. Statistical methods

The comparison between groups for the cytogenetic variable was done by means of the one-way analysis of covariance (ANCOVA) including the confounding variables as covariates. A multiple regression analysis was used to determine any relationship between ethnicity and the cytogenetic variables for both study groups. The statistical computations were performed using the SPSS, version 11.5 (SPSS, Chicago, IL) run on a Pentium PC.

## 3. Results

The present study was carried out in Chile to assess the level of cytogenetic damage in two populations, one environmentally exposed to arsenic in the area of Antofagasta and the other, a reference group from Concepción, where no significant levels of arsenic were reported. The levels of arsenic in water were determined at the University of Goettingen (Germany) and the results are indicated in Table 1. The concentrations found in the tap water of the sampled places Concepción, Calama, Toconao, San Pedro de Atacama, Peine, Socaire are also indicated. In addition, the arsenic levels in water were also evaluated in three other places from the same area: Antofagasta city, Lasana (Loa river) and Chuquicamata. It must be noted that the highest concentration, found in San Pedro (1.087 mg/L), was obtained in the water just before the treatment plant, while the other two samples are from tap water. As observed, both San Pedro and Socaire have much higher levels than the standard drinking-water (0.05 mg/L) and, although Toconao, Peine and Calama are below of this level, they are still above the level of 0.01 mg/L recommended by the WHO [26].

Table 2 shows the main characteristics of the sampled populations, indicating the average values of age,

alcohol consumption and tobacco use. In addition, the percentage of individuals who reported cancer incidence among their close relatives is also indicated. Taking into account the population characteristics of the sampled area, individuals were divided according their ethnicity as Atacameño Indian and non-Atacameño (apparently Caucasian). Individuals from Calama were mainly Caucasians, whereas those from San Pedro, Tocoñao, Socaire and Peine were mostly Atacameño. The main differences observed between group characteristics were that the number of Atacameño men was lower than the non-Atacameño men; the alcohol consumption was lower in the exposed group and mostly in the non-Atacameño group; there was a lower incidence of cancer among relatives reported in the exposed group, especially in the Atacameño donors. Taking into account the differences in the environmental levels of As between sampling places, in Table 3 the descriptive was divided according to the different sampling places.

Table 4 indicates the cytogenetic damage observed in the sampled population. In addition to the frequency of binucleated cells carrying micronuclei (BNMN), the cytokinesis-block proliferative index (CBPI) was also calculated. Data are divided according to the exposure level (exposed versus referents), ethnicity (Atacameño versus non-Atacameño) and sex (men versus women). This Table also shows the average content of As in fingernails as a biomarker of individual exposure. This

analysis has been carried out in a total of 193 individuals since, unfortunately, samples from 24 referents were lost. The overall exposed group shows a higher incidence of micronuclei than the reference group ( $P = 0.048$ ) and this difference is only significant between women ( $P = 0.015$ ) since the frequency of BNMN is not statistically different between exposed and reference men. Although for the overall exposed population there are no differences according ethnicity, non-Atacameño men present a lower frequency of BNMN than Atacameño men ( $P = 0.010$ ) and non-Atacameño women ( $P = 0.002$ ). These differences may be explained by the sample size, due to a low number of males compared to females and possibly to different life-style habits. With respect to the CBPI, significant differences were observed between exposed and reference groups ( $P < 0.001$ ).

Table 4 also shows the average As content in fingernails. As indicated, this value is significantly higher in the exposed group ( $10.15 \mu\text{g/g}$ ) in comparison with referents ( $3.57 \mu\text{g/g}$ ). Strong correlations were found between As levels in water and in fingernails ( $R^2 = 0.5852$ ), although the correlation between As in fingernails and BNMN was weak ( $R^2 = 0.0024$ ).

To evaluate possible associations between the environmental level of arsenic and the incidence of cytogenetic damage, the data were classified according to the sampling place (Table 5). In this case, no dose-response

Table 4  
Genetic damage observed in the study populations

	R	E	AE	NAE
<b>Total</b>				
No. of individuals	111(100%)	106(100%)	50(47%)	56(53%)
BNMN (average $\pm$ S.E.)	$11.96 \pm 1.02$	$14.44 \pm 0.99$	$14.83 \pm 1.43$	$14.11 \pm 1.39$
CBPI (average $\pm$ S.E.)	$1.53 \pm 0.018$	$1.42 \pm 0.011$	$1.39 \pm 0.02$	$1.44 \pm 0.013$
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ ( $\bar{x} \pm$ S.E.)	$3.57 \pm 0.65$	$10.15 \pm 1.56$	$13.04 \pm 2.72$	$7.69 \pm 1.70$
<b>Men</b>				
No. of individuals	40(36%)	23(22%)	8(8%)	15(14%)
BNMN (average $\pm$ S.E.)	$12.65 \pm 1.9$	$10.27 \pm 1.58$	$16.57 \pm 3.41$	$7.33 \pm 1.1$
CBPI (average $\pm$ S.E.)	$1.49 \pm 0.032$	$1.39 \pm 0.027$	$1.31 \pm 0.05$	$1.45 \pm 0.015$
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ ( $\bar{x} \pm$ S.E.)	$4.73 \pm 0.93$	$11.12 \pm 4.25$	$17.50 \pm 9.63$	$7.72 \pm 4.06$
<b>Women</b>				
No. of individuals	71(64%)	83(78%)	42(40%)	41(39%)
BNMN (average $\pm$ S.E.)	$11.57 \pm 1.9$	$15.56 \pm 1.58$	$14.54 \pm 1.58$	$16.59 \pm 1.7$
CBPI (average $\pm$ S.E.)	$1.55 \pm 0.021$	$1.43 \pm 0.013$	$1.41 \pm 0.021$	$1.45 \pm 0.015$
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ ( $\bar{x} \pm$ S.E.)	$2.85 \pm 0.87$	$9.86 \pm 1.60$	$12.10 \pm 2.65$	$7.67 \pm 1.80$

R, referents; E, exposed; AE, exposed belonging to Atacameño ethnicity; NAE, exposed belonging to Caucasian ethnicity. Content of As in fingernails is also indicated

Table 5  
Genetic damage observed according to the sampling place

Population	mg As/L	No.	µg As/g fingernail	BNMN	CBPI
San Pedro A.	0.75	25	18.33 ± 4.88	11.77 ± 1.88	1.38 ± 0.03
Socaire	0.26	4	19.80 ± 16.08	12.50 ± 0.35	1.48 ± 0.06
Toconao	0.02	16	8.79 ± 2.50	21.81 ± 2.14	1.37 ± 0.02
Calama	0.021	53	7.36 ± 1.59	13.94 ± 1.45	1.45 ± 0.01
Peine	0.003	8	2.58 ± 1.11	11.88 ± 3.47	1.46 ± 0.06
Total	–	106	10.15 ± 1.56	14.44 ± 0.99	1.42 ± 0.01
Concepción (reference)	0.0002	102	3.57 ± 0.65	11.96 ± 1.02	1.53 ± 0.02

was observed at all, with data from San Pedro showing BNMN values equivalent to those obtained in Concepción. The only surprising data from this Table is the high level of BNMN observed in the sample obtained in Toconao, where with 16 individuals sampled, the BNMN frequency attains a value as high as 21.81. Apparently, from the information obtained from the questionnaires, and the exposure levels indicated by the content of As in the fingernails, there is no explanation for this high value among the Toconao inhabitants.

Finally, when the role of the different confounding factors is evaluated for the overall population, only age, sex and coffee consumption appear to affect the BNMN frequency. On the other hand, tea consumption, sex and the variable exposure-ethnicity are factors that appear to affect the content of As in fingernails, considered as a biomarker of individual exposure to As. This is observed in Table 6, which presents the data obtained in the statistical model used. Our results agree with

previous studies showing that age and sex are factors that affect the MN incidence [15,27,28].

#### 4. Discussion

The presence of high levels of arsenic in drinking-water has been associated to several effects on health, including cancer. Thus, although the most common symptoms related to such exposure are skin lesions, melanosis, conjunctivitis, keratosis and hyperkeratosis, other more extreme health effects have also been reported [2,29].

In relation to the carcinogenic potential of arsenic, although it has been suggested that a genotoxic mechanism might be involved, the results obtained in human biomonitoring studies are not conclusive enough. Thus, when several early biomarkers of genotoxic effects have been used on people environmentally exposed to arsenic to demonstrate a possible genetic damage related to exposure, only a few positive dose-effect responses have been found, and mainly when cytogenetic damage was measured as genetic endpoint.

Among the different cytogenetic biomarkers, the scoring of micronuclei in peripheral blood lymphocytes has been proposed as a useful tool to assess cytogenetic damage. Thus, we have used this test system to evaluate the possible genotoxic effects associated to environmental exposure to arsenic, ingested via drinking-water. It must be emphasized that one of the main advantages of the micronucleus assay is that, besides measuring clastogenic effects easily, the aneugenic effects can also be detected. Furthermore, the MN assay, when complemented with the fluorescent *in vitro* hybridization (FISH) technique with centromeric probes [30,31], is the only procedure that permits unambiguous detection of aneuploidy in mammalian cells. In this context,

Table 6  
Summary of the statistical data according to the model

	B	F	P
<b>BNMN<sup>a</sup></b>			
Corrected model	148.369	22.887	0.000
Intersection	10.913	8.417	0.004
Exposure – ethnicity	4.314	1.664	0.192
Sex	5.852	4.492	0.035
Age	125.394	96.714	0.000
Coffee consumption	5.127	3.954	0.048
<b>As in fingernails<sup>b</sup></b>			
Corrected model	84.881	11.973	0.000
Intersection	2277.414	1285.022	0.000
Exposure – ethnicity	73.857	20.837	0.000
Sex	11.784	6.649	0.011
Tea consumption	7.151	4.035	0.046

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> corrected = 0.342.

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> corrected = 0.194.

it must be noted that *in vitro* studies carried out with mammalian cells have reported positive induction of MN after arsenic treatment [32,33]. A study using human skin fibroblasts shows that the increase in MN after low-dose exposure to arsenic is due to the induction of kinetochore-positive MN, whereas high-dose exposure mainly induced kinetochore-negative MN [34]. In addition, aneuploidy induction has been also reported in *in vivo* experiments, by scoring the number of chromosomes in metaphase spreads from bone marrow cells [35].

Our results showing a significant increase in the frequency of MN among the exposed group agree with similar biomonitoring studies carried out by other authors on people environmentally exposed to arsenic via drinking-water, with MN as the genetic endpoint. Nevertheless, the statistical significance of our data is lower than those reported by the other authors. It is necessary to emphasize that our results have been obtained in a group living in an area with high levels of arsenic in drinking-water, and after the sampling of a large number of individuals. In this context, it must be recalled that the first reported study on the frequency of MN in people exposed to As [13] used a very low sample size (four individuals) and that the other two studies [12,14] analyzed only 22 and 45 individuals, respectively.

Small sample sizes may lead to misinterpretations about the significance of the obtained results. In our study, in the population from Toconao where 16 individuals were examined, the frequency of MN was significantly higher compared to the corresponding reference population. Nevertheless, this result is difficult to explain since, in this location, the levels of arsenic in drinking-water were not particularly high and the levels of arsenic in the fingernails also did not seem to indicate a very high past exposure. Similarly, the frequency of MN in the 15 non-Atacameño exposed men is very low without any apparent cause. This would indicate that differences between groups or between studies could be strongly influenced by the sample size or by other unknown factors, independent of the supposed exposure factor.

Intrinsic differences between populations and between scorers are another important aspect when comparing literature data. The MN average obtained in an international survey carried out in Europe gives a value of 7.8 MN/1000 cells (S.D. = 5.2) in different *in vitro* studies by using human lymphocytes from peripheral

blood [36]. This value is lower than the value of 11.96 found by us in the Chilean reference population and that of 14.6 reported in Bulgaria, but is similar to the average of 6.9 reported in Argentina. Nevertheless, it is much higher than the value of 0.53 (S.D. = 0.34) reported in the study carried out in India. In this last case the frequency of MN in the exposed group was higher when compared with the referents, but the reported value of 6.39 (S.D. = 1.65) was still clearly lower than those reported by us and other authors, although the exposed people already showed cutaneous signs of arsenicism. It must be noted that the MN frequency of 11.96 found in the current study is practically the same as obtained in a large study carried out in four European countries (12.10) after monitoring 457 individuals [28], and in an earlier study carried out in Chile, where the MN frequency in the referents was 11.69 [37].

When the correlation between the level of arsenic in water and the MN frequency is calculated for the different places, the correlation coefficient is very low ( $R^2 = 0.108$ ) and the same is seen when this correlation is calculated for the BNMN and the content of arsenic in fingernails ( $R^2 = 0.0024$ ). Analysis of nails is considered to provide a good measure of long-term exposure, because nails grow rapidly and then remain isolated from other metabolic activities in the body [38]. In fact, the observed levels of As in fingernails agree with the expected levels of environmental contamination, and reached values similar to those observed in highly exposed populations [39,40].

Our results also add information to the conflicting issue about the supposedly higher resistance to the effects of arsenic among the Atacameño people compared to non-Atacameño, which may be a result of a long-time selection due to the continuous presence of high levels of arsenic in the environment. This hypothesis is supported by the low incidence of skin alterations among the Atacameño with respect to Caucasians, and by the different metabolism of arsenic in the Atacameño group [41]. Nevertheless our results do not indicate lower genotoxic damage between the exposed Atacameño when compared with non-Atacameño, which does not support the view that Atacameño show higher resistance to the genotoxic effects of arsenic.

In summary, our data support the existence of a genotoxic risk associated with arsenic exposure. Nevertheless, the increases in the cytogenetic (MN) effects found in the exposed population in this study are lower

han those reported in the literature for smaller groups of exposed people. In view of the large sample size and the exposure levels, it seems that perhaps the genotoxic pathway is not the most important when assessing the adverse effects of arsenic exposure. Taking this into account, more studies are required to clarify the underlying factors modulating the genotoxic manifestation of exposure to arsenic.

### Acknowledgements

We wish to thank all the volunteers who unselfishly participated in the study, particularly the collaboration of Dr. J. Yutronic and I. Honorato from the Community Hospital in San Pedro de Atacama, as well as the personnel from Calama Hospital, who helped us to obtain the blood samples. This investigation was supported by a grant from the European Union (UE, QLK4-1999-01142), by a Concerted Action between the CONICYT (Chile) and DURSI (Catalonia, Spain) and by the Generalitat de Catalunya (2002SGR-00197). We would like to thank G. Umbert, E. Spano, T. Amador and A. Corral for their expert technical assistance in the preparation and scoring of samples. V. Martínez is supported by a postgraduate fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

### References

- [1] IARC, Arsenic and arsenic compounds, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum., Suppl. 7 (1987) 100–103 (see <http://monographs.iarc.fr/htdocs/announcements/vol84.htm> for a Summary of IARC Monograph, vol. 84 (in press) on 'Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic').
- [2] C.O. Abernathy, Y.P. Liu, D. Longfellow, H.V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, M. Waalkes, Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 593–597.
- [3] A. Basu, J. Mahata, S. Gupta, A.K. Giri, Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review, *Mutat. Res.* 488 (2001) 171–194.
- [4] L. Hagmar, A. Brøgger, I.-L. Hansteen, S. Heim, B. Högstedt, L. Knudsen, B. Lambert, K. Linnainmaa, F. Mittleman, I. Nordenson, et al., Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage, *Cancer Res.* 54 (1994) 2919–2922.
- [5] B.K. Vig, M.L. Figueroa, M.N. Comforth, S.H. Jenkins, Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water, *Am. J. Ind. Med.* 6 (1984) 325–338.
- [6] P. Ostrosky-Wegman, M.E. Gonsébat, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García-Vargas, L.M. del Razo, et al., Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico, *Mutat. Res.* 250 (1991) 477–482.
- [7] M.E. Gonsébat, L. Vega, A.M. Salazar, R. Montero, P. Guzman, J. Blas, L.M. del Razo, G. García-Vargas, A. Albores, M.E. Cebrian, et al., Cytogenetic effects in human exposure to arsenic, *Mutat. Res.* 386 (1997) 219–228.
- [8] J. Maki-Puukkanen, P. Kurttio, A. Paldy, J. Pekkanen, Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water, *Environ. Mol. Mutag.* 32 (1994) 301–313.
- [9] S.H. Liou, J.C. Lung, Y.H. Chen, T. Yang, L.L. Hsieh, C.J. Chen, T.N. Wu, Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area, *Cancer Res.* 59 (1999) 1481–1484.
- [10] D. Lerda, Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* 312 (1994) 111–120.
- [11] Y.H. Hsu, S.Y. Li, H.Y. Chion, P.M. Yeh, J.C. Liou, Y.M. Hsieh, S.H. Chang, C.J. Chen, Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan, *Mutat. Res.* 386 (1997) 241–251.
- [12] F.N. Dulout, C.A. Grillo, A.I. Seoane, C.R. Maderna, R. Nilsson, M. Vahter, F. Darroudi, A.T. Natarajan, Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from north-western Argentina exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* 370 (1996) 151–158.
- [13] R. Nilsson, A.N. Jha, Z. Zaprianov, A.T. Natarajan, Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in the Srednagorie area, Bulgaria, *Fresenius Environ. Bull.* 2 (1993) 59–64.
- [14] A. Basu, J. Mahata, A.K. Roy, J.N. Sarkar, G. Poddar, A.K. Nandy, P.K. Sarkar, P.K. Dutta, A. Banerjee, M. Das, et al., Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India, *Mutat. Res.* 516 (2002) 29–40.
- [15] M. Fenech, A.A. Morley, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutat. Res.* 161 (1986) 193–198.
- [16] S. Viaggi, S. Bonatti, A. Abbondandolo, New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells, *Mutagenesis* 2 (1987) 367–370.
- [17] J. Surrallés, E. Carbonell, R. Marcos, F. Degraffi, A. Antocchia, C. Tanzarella, A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 7 (1992) 407–410.
- [18] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen, The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* 392 (1997) 19–30.

- [19] M. Fenech, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* 285 (1993) 35–44.
- [20] S. Gutiérrez, E. Carbonell, P. Galofré, A. Creus, R. Marcos, Micronuclei induction by  $^{131}\text{I}$  exposure: Study in hyperthyroidism patients, *Mutat. Res.* 373 (1997) 39–45.
- [21] A.V. Carrano, A.T. Natarajan, Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, ICPEMC Publication No. 14, *Mutat. Res.* 204 (1988) 379–406.
- [22] J. Surrallés, A. Antoccia, A. Creus, F. Degrassi, F. Peris, C. Tuszarella, N. Xamena, R. Marcos, The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories, *Mutagenesis* 9 (1994) 347–353.
- [23] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norrpo, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 341 (1995) 169–184.
- [24] M.R. Karagas, J.S. Morris, J.E. Weiss, V. Spate, C. Baskett, E.R. Greenberg, Toenail samples as an indicator of drinking water arsenic exposure, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5 (1996) 849–852.
- [25] M.R. Karagas, T.D. Tosteson, J. Blum, B. Klau, J.E. Weiss, V. Stannard, V. Spate, J.S. Morris, Measurement of low levels of arsenic exposure: a comparison of water and toenail concentration, *J. Epidemiol.* 152 (2000) 84–90.
- [26] World Health Organization (WHO), Recommended Guidelines for Drinking Water, 1993.
- [27] R. Barale, L. Chelotti, T. Davini, S. Del Ry, M.G. Andreassi, M. Bollardin, M. Bulleri, J. He, D. Baladurcci, F. Di Pede, et al., Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in a Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle, *Environ. Mol. Mutag.* 31 (1998) 228–242.
- [28] S. Pastor, A. Creus, T. Parrón, A. Cebulska-Wasilewska, C. Siffler, S. Piperakis, R. Marcos, Use of micronuclei as biomarkers in the biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides, *Mutagenesis* 18 (2003) 249–258.
- [29] A.H. Hall, Chronic arsenic poisoning, *Toxicol. Lett.* 128 (2002) 69–72.
- [30] M.J. Ramírez, J. Surrallés, S. Puerto, A. Creus, R. Marcos, Aneugenic activity in human cultured lymphocytes. An over-
- all study with colchicine by using the micronucleus assay and fluorescence in situ hybridization techniques, *Mutagenesis* 12 (1997) 405–410.
- [31] M.J. Ramírez, J. Surrallés, S. Puerto, A. Creus, R. Marcos, Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells, *Mutat. Res.* 440 (1999) 163–169.
- [32] J.R. Gurr, F. Liu, S. Lynn, K.Y. Jan, Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei, *Mutat. Res.* 416 (1998) 137–148.
- [33] T.W. Gebel, M. Leister, W. Schumann, K. Hirsch-Ernst, Low-effect self-tolerance to arsenite in human HepG2 cells is associated with a depressed induction of micronuclei, *Mutat. Res.* 514 (2002) 244–255.
- [34] I.C. Ho, L.H. Yih, C.Y. Kao, T.C. Lee, Tin-protoporphyrin potentiates arsenite-induced DNA strand breaks, chromatid breaks and kinetochore-negative micronuclei in human fibroblasts, *Mutat. Res.* 452 (2000) 41–50.
- [35] E. Kashiwada, K. Kuroda, G. Endo, Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells, *Mutat. Res.* 413 (1998) 33–38.
- [36] J. Surrallés, A.T. Natarajan, Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey, *Mutat. Res.* 392 (1997) 174–185.
- [37] W. Venegas, I. Zapata, E. Carbonell, R. Marcos, Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción, Chile, *Teratogen. Carcinogen. Mutag.* 18 (1998) 123–129.
- [38] Y. Tagaki, S. Matsuda, S. Imai, Y. Ohmori, J.A. Vinson, M.C. Mehra, Survey of trace elements in human nails: an international comparison, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41 (1988) 690–695.
- [39] A.L. Hinwood, M.R. Sim, D. Jolley, N. de Klerk, E.B. Bastone, J. Gerostamoulos, O.H. Drummer, Hair and toenail arsenic concentrations of residents living areas with high environmental arsenic concentrations, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 187–193.
- [40] B.K. Mandal, Y. Ogra, K.T. Suzuki, Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 (2003) 73–83.
- [41] M. Valtter, G. Concha, B. Nermell, R. Nilsson, F. Dulout, A.T. Natarajan, A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women, *Eur. J. Pharmacol.* 293 (1995) 455–462.

### **8.2.2 Artículo 2**

Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile

Toxicology Letters, 155: 319–327, 2005.



## Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile

V. Martínez<sup>a</sup>, A. Creus<sup>a</sup>, W. Venegas<sup>b</sup>, A. Arroyo<sup>c</sup>, J.P. Beck<sup>d</sup>, T.W. Gebel<sup>e</sup>,  
J. Surrallés<sup>a</sup>, R. Marcos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cx, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalunya del Vallès, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Biología Celular, Universidad de Concepción, Chile

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Antofagasta, Chile

<sup>d</sup> Medical Institute of General Hygiene and Environmental Health, University of Goettingen, Goettingen, Germany

<sup>e</sup> Federal Institute for Occupational Safety and Health, Dortmund, Germany

Received 25 June 2004; received in revised form 15 October 2004; accepted 21 October 2004

Available online 24 November 2004

### Abstract

To determine the genotoxic risk associated to environmental arsenic exposure, the frequency of micronuclei in buccal cells (BCMNs) of people drinking arsenic-contaminated water has been evaluated. A group of 105 individuals from the Antofagasta region (north Chile), and 102 individuals from the area of Concepción, used as reference group, were included in the study. Arsenic concentration in drinking water was high (0.75 mg/L) in the Antofagasta area, 75-fold the maximum recommended level by WHO (0.01 mg/L), while the values obtained in Concepción were significantly lower (0.002 mg/L). Individual measures of arsenic exposure were also determined in fingernails, which clearly confirm the existence of chronic exposure in the sampled populations from the Antofagasta region (10.15  $\mu\text{g/g}$  versus 3.57  $\mu\text{g/g}$ ). The cytogenetic results indicate that, although the BCMN frequency is higher in exposed than in controls, this increase does not attain statistical significance. When the exposure biomarkers were related with the cytogenetic values, no correlations were observed between BCMN and arsenic content in water or in fingernails. In addition, the genotoxicity values do not seem to be related to the ethnic origin from people belonging to the exposed group. As a conclusion it appears that, in the studied population, the chronic ingestion of arsenic-contaminated water does not induce cytogenetic damage, measured as micronuclei, in the cells of the oral mucous in a significant extent.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Biomonitoring; Micronucleus test; Buccal cells; Arsenic; Genotoxicity

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 20 52; fax: +34 93 581 23 87.  
E-mail address: [ricard.marcos@uab.es](mailto:ricard.marcos@uab.es) (R. Marcos).

## 1. Introduction

Environmental exposure to arsenic, mainly via drinking water, is considered as a cancer risk factor since arsenic has been classified as carcinogenic to humans (group 1) (IARC, 1987, 2004). Therefore, chronic exposure to arsenic has been associated to cancer in skin, lung, bladder and liver (Abernathy et al., 1999).

With respect to the genotoxic potential of arsenic, many studies have been carried out (reviewed by Basu et al., 2001), but no general agreement has been reached about its mechanism of action. Thus, although in bacteria arsenic generally does not induce mutagenic effects, and the results on point mutations in mammalian cells are contradictory, the results obtained using cytogenetic markers show that arsenic is able to exert clastogenic effects (Basu et al., 2001). On the other hand, *in vitro* and *in vivo* studies on DNA damage induction seem to indicate that arsenic acts indirectly by inhibiting DNA repair (Gebel, 2001; Kitchin, 2001), and that its genotoxic potential depends on its chemical formula (Guillamet et al., 2004).

Biomonitoring studies carried out by using somatic cells are considered as pertinent tools to evaluate the potential genotoxic effects of a defined exposure and to predict carcinogenic risk (Hagmar et al., 1987). Although peripheral blood lymphocytes are classical routine targets in such studies, the advantages of the use of the micronuclei as a biomarker of genotoxic effects have promoted the use of epithelial cells from those tissues where such cells are easily obtained (oral and nasal mucosa, as well as bladder epithelia).

Micronuclei (MN) are small chromatin bodies that appear in the cytoplasm by the condensation of acentric chromosome fragments or by whole chromosomes, lagging behind the cell division. Thus, it is the only biomarker that allows the simultaneous evaluation of both clastogenic and aneugenic effects in a wide range of cells, since they are easily detected in interphase cells. In this way, the analysis of MN in epithelial cells has shown to be a sensitive method for monitoring genetic damage in human populations (Sarto et al., 1990; Karahalil et al., 1999; Majer et al., 2001).

Micronuclei in epithelial cells from bladder have been used to assess the genotoxic risk associated to

arsenic exposure in drinking water. Thus, positive increases have been reported in the cells of chronically exposed people (Warner et al., 1994; Biggs et al., 1997; Gonsebatt et al., 1997; Moore et al., 1997a) that are reduced when technical interventions to lower the levels of arsenic in the drinking water were applied (Moore et al., 1997b). With respect to the use of buccal cells to measure the genotoxic effects of chronic exposure to arsenic in drinking water, four studies have been found in a survey of scientific literature. Three of them reporting a positive response (Gonsebatt et al., 1997; Tian et al., 2001; Basu et al., 2002), but the other one reporting a lack of genotoxic effect (Warner et al., 1994). These contradictory findings require new data about the sensitivity of buccal cells to arsenic exposure.

In this work we present data obtained in a large population from northern Chile, by measuring the sensitivity of buccal cells to chronic exposure, to arsenic-contaminated water.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects studied

The frequency of micronuclei in buccal cells has been determined in a group of 207 individuals, 105 of them living in the villages of Calama, San Pedro de Atacama, Toconao, Socaire and Peine, placed in the area of Antofagasta (Chile). Arsenic values in the tap water of this area reached values as high as 0.75 mg/L. Fig. 1 presents the arsenic values obtained in the different sampled points. The control group consisted of 102 healthy persons from the city of Concepción, in the south of Chile, where arsenic level in drinking water was as low as 0.0002 mg/L.

Table 1 reports the main characteristics of both groups. According to the population structure of the Antofagasta area, exposed people was classified taking into account their ethnicity (Atacameño versus non-Atacameño).

Previous to the study, all individuals gave informed consent and buccal cell samples were collected and further manipulated in accordance with ethical standards. All participants completed a detailed questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, medical, and family history.

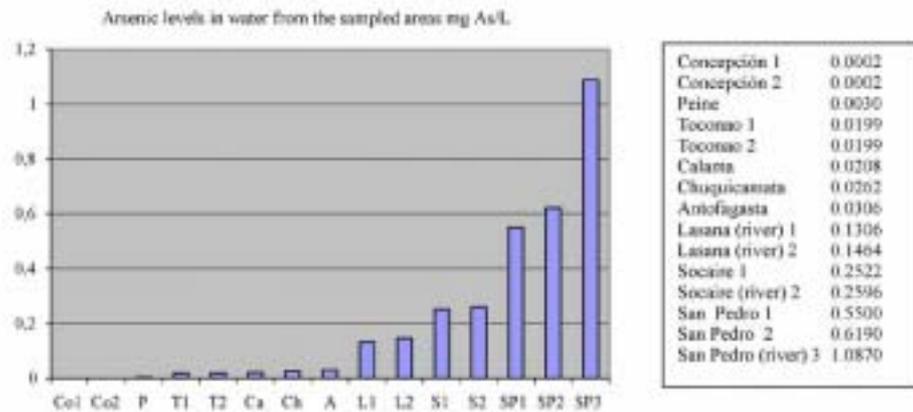


Fig. 1. Distribution of the levels of arsenic in water according to the different sampling points.

Table 1  
Population description

	C	E	EA	ENA
Population				
No. of individuals	102	105	50	55
Age				
Years $\pm$ S.E.	37.28 $\pm$ 1.09	39.62 $\pm$ 1.32	40.20 $\pm$ 2.22	39.09 $\pm$ 1.52
Sex				
No. of men	40	24	8	16
No. of women	62	81	42	39
Alcohol consumption				
g/week $\pm$ S.E.	30.39 $\pm$ 4.36	17.26 $\pm$ 4.54	25.80 $\pm$ 8.90	9.35 $\pm$ 2.66
Coffee and tea consumption				
Tea (cups/day $\pm$ S.E.)	1.42 $\pm$ 0.13	1.63 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.13	1.72 $\pm$ 0.20
Coffee (cups/day $\pm$ S.E.)	2.12 $\pm$ 0.19	0.73 $\pm$ 0.14	0.32 $\pm$ 0.08	1.11 $\pm$ 0.25
Smoking habit				
Non-smokers	60	77	43	34
Ex-smokers	10	7	3	4
Smokers	32	20	4	16
Data not available	0	1	0	1
Cigarettes/day				
Overall population	2.33 $\pm$ 0.47	1.84 $\pm$ 0.42	0.92 $\pm$ 0.48	2.70 $\pm$ 0.65
Only smokers	4.47 $\pm$ 0.43	7.65 $\pm$ 1.30	8.75 $\pm$ 3.90	7.38 $\pm$ 1.37
Fish consumption habit				
Times/week	1.01 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.12
Relatives with cancer				
Without cases	57	76	41	35
With cases	45	28	9	19
Data not available	0	1	0	1

C, control; E, exposed; EA, exposed belonging to Atacameño ethnicity; ENA, exposed not belonging to Atacameño ethnicity.

## 2.2. Buccal cells procedure, staining and MN scoring

Buccal cell samples were obtained by rubbing the inside of the cheeks with a toothbrush. The cells were collected in a conical tube containing 20 mL of buffer solution (0.1 M EDTA, 0.01 Tris-HCl and 0.02 M NaCl, pH 7). After three washes in the buffer solution, followed by centrifugation at 1500 rpm during 10 min, 50  $\mu$ L of an adequate cell suspension density was dropped onto preheated (55 °C) slides and allowed to air-dry for 15 min on a slide-warmer. The slides were fixed in 80% cold methanol for 30 min and air-dried overnight at room temperature. Next, the slides were stored at -20 °C until use, and stained with a DNA specific stain, namely 1  $\mu$ g/mL of 4',6-di-amidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) that avoids possible scoring artifacts. A total of 2000 cells/donor were scored, on coded slides, by two scorers under an Olympus BX50 fluorescent microscope. The criteria for MN evaluation were those suggested by Titenko-Holland et al. (1998). The frequency of mononucleated buccal cells with micronuclei (BCMNs) was determined for each studied subject.

## 2.3. Sample preparation of fingernails and analysis by atomic absorption spectroscopy

Nail samples were sent to the University of Goettingen to evaluate its arsenic content. Chemicals used for the cleaning and digestion of the fingernails and the analysis with atomic absorption spectroscopy (AAS) were 60% nitric acid (ultrapur, Merck, Germany), 30% hydrogen peroxide (p.a.), acetone (p.a.), and a magnesium-matrix modifier; all purchased from Merck, Germany. Water was of high purity grade (0.055  $\mu$ S/cm) made by a type HP-4 purification system (TKA-Lab., Germany). Standards for calibrating the AAS were prepared from an arsenic acid stock solution (Certipur, Merck, Germany).

Coarse dirt was removed from fingernails by scraping. Nail paint was removed with acetone. Then the fingernails were cleaned according to a method by Karagas et al. (1996, 2000) by ultrasonication in high purity grade water for 10 min. Afterwards nails were washed three times with high purity grade water. Fingernails were controlled for remaining dirt with a magnifying glass, which was removed by additional ultrasonication or by cutting off. The nails were dried in an

oven at 65 °C over night. Then, they were weighed and digested in a microwave digestion system (mls 1200 mega, Microwave Laboratory Systems, USA). Therefore, 1 mL 60% nitric acid (ultrapur, Merck, Germany), 0.5 mL hydrogen peroxide (p.a., Merck, Germany), and 0.75 mL high purity grade water were added to the nail sample. The program for the microwave digestion consisted of six steps: 3 min at 250 W, 1 min at 0 W, 4 min at 250 W, 5 min at 500 W, 3 min at 400 W, and 4 min at 300 W. After cooling, the sample was diluted 1:5 with high purity grade water and analysed by graphite furnace AAS (SIMAA 6000, Perkin-Elmer, USA). The detection limit was 1  $\mu$ g/L arsenic.

## 2.4. Statistical methods

The comparison between groups for the cytogenetic variable was done by means of the one-way analysis of covariance (ANCOVA) including the confounding variables as covariates. A multiple regression analysis was used to determine any relationship between ethnicity and the cytogenetic variables for both studied groups. The statistical computations were performed using the SPSS, Version 11.5 (SPSS, Chicago, IL). It was run on a Pentium PC-compatible.

## 3. Results

Table 1 shows a description of the sampled populations, where the average values corresponding to age, alcohol and tobacco consumption are indicated. In addition, the percentage of individuals who reported cancer incidence among the closer relatives is also included. According to the ethnic characteristics of the sampled area, individuals were classified as Atacameño Indian and non-Atacameño. Individuals from Calama were mainly Caucasians (non-Atacameño), whereas those from San Pedro, Toconao, Socaire and Peine were mostly Atacameños.

As a measure of environmental contamination, the arsenic content in the water of the different sampled points (Concepción, Calama, Toconao, San Pedro de Atacama, Peine and Socaire) were determined (Fig. 1). In addition, the arsenic water content in three more places from the same area: Antofagasta city, Lasana (Loa river) and Chuquicamata, were also evaluated. As supposed, high levels were observed, the highest

Table 2  
Levels of As obtained in the analysis of fingernails

	C	E	AE	NAE
<b>Total</b>				
No. of individuals	93	100	46	54
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ (average $\pm$ S.E.)	3.57 $\pm$ 0.65	10.15 $\pm$ 1.56	13.04 $\pm$ 2.72	7.68 $\pm$ 1.70
<b>Men</b>				
No. individuals	36	23	8	15
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ (average $\pm$ S.E.)	4.73 $\pm$ 0.93	11.12 $\pm$ 4.25	17.50 $\pm$ 9.63	8.14 $\pm$ 4.33
<b>Women</b>				
No. of individuals	57	77	38	39
As in fingernails $\mu\text{g/g}$ (average $\pm$ S.E.)	2.85 $\pm$ 0.87	9.86 $\pm$ 1.60	12.10 $\pm$ 2.65	7.67 $\pm$ 1.80

C, control; E, exposed; AE, exposed belonging to Atacameño ethnicity; NAE, exposed belonging to Caucasian ethnicity.

concentrations being found in San Pedro de Atacama. It must be indicated that the value of 1.087 mg/L reported for San Pedro was obtained in water sampled just before the treatment plant, although the other two samples (0.550 and 0.619 mg/L) are from the tap water, obtained in the morning and in the afternoon, respectively. As observed, both San Pedro and Socaire have much higher levels than the standard drinking water (0.05 mg/L) and, although Toconao, Lasana and Calama are below this level, they are still above the 0.01 mg/L recommended (WHO, 1993).

To have more accurate information on the exposure of each donor, individual levels of arsenic in the fingernails were evaluated. Table 2 shows the As average in fingernails, indicating that this value is significantly higher in exposed individuals (10.15  $\mu\text{g/g}$ ) when compared with controls (3.57  $\mu\text{g/g}$ ). It must be indicated that this analysis has been carried out in a total of 193 individuals since 14 samples (nine controls and five exposed) were not available for the study.

The frequency of micronuclei in the buccal cells from people chronically exposed to arsenic, and from those living in Concepción is indicated in Table 3. Data are divided according to the exposure level (exposed versus control), ethnicity (Atacameño versus non-Atacameño) and sex (men versus women). The overall exposed group shows a higher incidence of micronuclei than the control group, although this difference does not attain statistical significance ( $P=0.313$ ). When exposed women are compared with control women, the difference is nearly significant ( $P=0.069$ ). No differences were observed according to ethnicity neither for the overall exposed population ( $P=0.562$ ), nor for men ( $P=0.252$ ), nor for women ( $P=0.874$ ).

To evaluate possible associations between the environmental level of arsenic and the incidence of genetic damage in buccal cells, the BCMN data were classified according to the sampled place (Table 4). In this case, near significant differences were observed when Toconao people was compared with control ( $P=0.076$ )

Table 3  
Genetic damage (MN) observed in the buccal cells of the studied populations

	C	E	AE	NAE
<b>Total</b>				
No. of individuals	102	105	50	55
CBMN/1000 (average $\pm$ S.E.)	2.74 $\pm$ 0.26	3.14 $\pm$ 0.32	3.02 $\pm$ 0.34	3.24 $\pm$ 0.54
<b>Men</b>				
No. of individuals	40	24	8	16
CBMN/1000 (average $\pm$ S.E.)	3.21 $\pm$ 0.45	2.83 $\pm$ 0.73	3.56 $\pm$ 1.28	2.47 $\pm$ 0.91
<b>Women</b>				
No. of individuals	62	81	42	39
CBMN/1000 (average $\pm$ S.E.)	2.44 $\pm$ 0.30	3.23 $\pm$ 0.36	2.91 $\pm$ 0.33	3.56 $\pm$ 0.66

C, control; E, exposed; AE, exposed belonging to Atacameño ethnicity; NAE, exposed belonging to Caucasian ethnicity.

Table 4  
Genetic damage (MN) observed in the buccal cells of the studied populations, clustered by residence town

Group	<i>n</i>	mg As/L water	CBMN/1000
Exposed			
San Pedro	25	0.75	2.16 ± 0.26
Socaire	4	0.26	4.00 ± 0.35
Toconao	16	0.02	4.18 ± 0.91
Calama	52	0.021	3.45 ± 0.56
Peine	8	0.003	1.63 ± 0.47
Total	105		3.14 ± 0.32
Control			
Concepción	102	0.0002	2.74 ± 0.26

and clear differences for the Socaire group ( $P=0.001$ ). Nevertheless, it must be emphasized the small sample size in the case of Socaire (four individuals). No associations were found between the BCMN and the environmental levels of arsenic ( $r^2=0.0041$ ) or the arsenic levels in the fingernails ( $r^2=0.0024$ ).

#### 4. Discussion

Micronuclei have been proposed as a good biomarker to assess cytogenetic damage in biomonitoring studies, both using peripheral lymphocytes and epithelial cells. It must be recalled that, although the micronuclei assay can easily measure clastogenicity, aneugenic effects can also be detected. Thus, when the MN assay is complemented with the fluorescent in vitro hybridization (FISH) technique using centromeric probes (Ramírez et al., 1999), it permits to detect aneuploidy unambiguously.

Different in vitro studies carried out with mammalian cells have reported positive induction of MN after arsenic treatment (Gurr et al., 1998; Gebel et al., 2002), confirming its sensitivity to such exposure. Nevertheless, the role of arsenic as an aneugenic agent is rather conflictive since, although kinetochore-positive MN were induced after treatment with low doses, exposure to high doses mainly induced kinetochore-negative MN (Ho et al., 2000).

In biomonitoring studies carried out with people environmentally exposed to arsenic via drinking water, the scoring of MN in peripheral blood lymphocytes have reported positive induction in a preliminary study

with a very low (four individuals) sample size (Nilsson et al., 1993), as well in two further studies (Dulout et al., 1996; Basu et al., 2002) from Argentina and India, respectively. A recent work of our group also reports positive results in a large group from the north of Chile (Martínez et al., 2004). The genotoxic potential of arsenic exposure has also been reported when the micronuclei in epithelial cells from the bladder have been used as a biomarker. Thus, positive increases were firstly observed in the cells of people chronically exposed in Nevada (Warner et al., 1994), as well as in northern Chile (Biggs et al., 1997; Moore et al., 1997a) and Mexico (Gonsebatt et al., 1997); these effects decreased when technical intervention to reduce the levels of arsenic in the drinking water was applied (Moore et al., 1997b). The positive effects observed in bladder cells have been linked to the ability of arsenic to induce bladder cancer (Smith et al., 1993; IARC, 2004).

Since chronic arsenic exposure is generally associated to contaminated drinking water, buccal cells are certainly exposed and, as a consequence, they should be considered as an appropriate target to detect the genotoxic potential of arsenic. The first study using buccal cells, as target cells for arsenic effects, reported no induction of MN in people from Nevada (Warner et al., 1994), although other studies observed significant increases in Mexico (Gonsebatt et al., 1997) and in inner Mongolia (Tian et al., 2001).

Our results, showing no increases in the frequency of MN in buccal cells among the exposed group, agree with the biomonitoring study of Warner et al. (1994) previously reported in the literature, which would indicate that buccal cells perhaps are not the most relevant target for arsenic effects or, that other confounding factors can interfere with the potential genotoxicity of arsenic, modulating the frequency of observed MN frequency. Nevertheless, neither of the factors included in our questionnaire have a detectable effect on the frequency of BCMN. When our results are compared with the other studies, it is necessary to emphasize that our data have been obtained in a large, but heterogeneous group. Thus, the environmental levels of arsenic obtained in the different sampled villages are highly variable, with values ranging from 0.0030 mg/L in Peine to 0.6190 mg/L in San Pedro de Atacama. Nevertheless, when the individual frequency of MN was associated with the environmental levels of As found in the places where individuals were sampled, no correlation

was observed. Taking into account that arsenic content in drinking water may be not a good marker of internal exposure, levels of total arsenic in fingernails were used as an individual biomarker of past and accumulated exposures. In this case, although the fingernail content of arsenic correlates with the environmental levels of arsenic in water ( $r^2 = 0.585$ ), no correlation at all was observed with the MN values. It must be pointed out that the analysis of fingernails is considered to be a good reflection of long-term exposure because nails, after a rapid growth, remains isolated from other metabolic activities in the body (Tagaki et al., 1988). The observed levels of As in fingernails agree with the expected levels of environmental contamination, and our data show levels similar to those detected in highly exposed populations (Hinwood et al., 2003). To determine the significance of exposure levels it is important to have reference values for the general population, as it has been recently reported in around 4700 urine samples from Germany, where 15  $\mu\text{g/L}$  of total arsenic in urine (95%) is considered the reference value for the general German population (Wilhelm et al., 2004).

When comparing published studies, variations in the reported frequencies of MN should be taken into account. Such variations can be due to real variations or to variations resulting from the experimental procedures used (i.e. protocol or scoring criteria). Thus, the basal frequency of MN in buccal cells differs between studies/populations, with values ranging from 0.3 to 0.4% cells with MN (Sarto et al., 1987, 1990; Tolbert et al., 1992; Rosin et al., 1994; Karahalil et al., 1999) to 2.7% (Livingston et al., 1990), 4.7% (Stich and Rosin, 1983), and 8.4% (Özkul et al., 1997). In our case, the value of around 3 CBMN found per 1000 cells is higher than the value of about 1 CBMN/1000 previously obtained by our group in a large (470 individual) European population and following the same procedure (Pastor et al., 2003). In addition, it must be recalled that our protocol uses DNA specific staining (DAPI) to avoid the artifacts usually obtained when less specific staining (Giemsa) are applied.

Since both Atacameño and non-Atacameño individuals were included in our exposed group, we tried to test the hypothesis that Atacameño are more resistant to arsenic effects than the non-Atacameño due to a long-time selection resulting from the continuous presence of high levels of arsenic in the environment (Vahter et al., 1995). Nevertheless, our results do not indicate

lower genotoxic damage in the buccal cells for the exposed Atacameño group when compared with the non-Atacameño group. In addition, it must be stressed that the total amount of arsenic in the fingernails of the Atacameño group is higher than in the non-Atacameño group, which supports the existence of a high internal exposure in the Atacameño group.

In summary, our data do not support the view that buccal cells are a good target to measure the potential genotoxic effects related to arsenic exposure. This conclusion is obtained after the scoring of a large number of individuals, the sampling size being much larger than in the other studies reported in literature.

### Acknowledgements

We wish to thank all the volunteers who unselfishly participated in the study, particularly Dr. J. Yutronic and L. Honorato from the Community Hospital in San Pedro de Atacama, as well as the personnel from Calama Hospital who helped us to obtain the blood samples. We are grateful to Laboratories Lácer S.A. (Barcelona) for kindly giving us the toothbrushes. This investigation was supported by a grant of the European Union (UE, QLK4-1999-01142), a grant of the Spanish Ministry of Health and Consumption (FIS, G03/174) by a Concerted Action between the CONICYT (Chile) and DURSI (Catalonia, Spain) and by the Generalitat de Catalunya (2002SGR-00197). We would like to thank G. Umbert, E. Spano, T. Amador and A. Corral for their expert technical assistance in the preparation and scoring of samples. V. Martínez is supported by a postgraduate fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

### References

- Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M., 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* 107, 593–597.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K., 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488, 171–194.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K., Sarkar, J.N., Poddar, G., Nandy, A.K., Sarkar, P.K., Dutta, P.K., Banerjee, A., Das, M., Ray, K.,

- Roychoudhury, S., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K., 2002. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.* 516, 29–40.
- Biggs, M.L., Kalman, D.A., Moore, L.E., Hopenhayn-Rich, C., Smith, M.T., Smith, A.H., 1997. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and as a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat. Res.* 386, 185–195.
- Dulout, F.N., Grillo, C.A., Seoane, A.J., Maderna, C.R., Nilsson, R., Vahter, M., Durroudi, F., Natarajan, A.T., 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.* 370, 151–158.
- Gebel, T.W., 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 249–262.
- Gebel, T.W., Leister, M., Schumann, W., Hirsch-Ernst, K., 2002. Low-level self-tolerance to arsenite in human HepG2 cells is associated with a depressed induction of micronuclei. *Mutat. Res.* 514, 245–255.
- Gonsebat, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P., 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* 386, 219–228.
- Guillamet, E., Cress, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S., Marcos, R., 2004. *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19, 129–135.
- Gurr, J.R., Liu, F., Lynn, S., Jan, K.Y., 1998. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei. *Mutat. Res.* 416, 137–148.
- Hagmar, L., Brøgger, A., Hanstam, I-L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., et al., 1987. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54, 2919–2922.
- Hinwood, A.L., Sim, M.R., Jolley, D., de Klerk, N., Bastone, E.B., Gerostamoulos, J., Drummer, O.H., 2003. Hair and toenail arsenic concentrations of residents living in areas with high environmental arsenic concentrations. *Environ. Health Perspect.* 111, 187–193.
- Ho, I.C., Yih, L.H., Kao, C.Y., Lee, T.C., 2000. Tin-protoporphyrin potentiates arsenite-induced DNA strand breaks, chromatid breaks and kinetochore-negative micronuclei in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 452, 41–50.
- IARC, 1987. Arsenic and Arsenic Compounds. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, Suppl. 7. IARC, Scientific Publications, Lyon.
- IARC, 2004. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans, vol. 84. IARC, Scientific Publications, Lyon.
- Karagas, M.R., Morris, J.S., Weiss, J.E., Spate, V., Baskett, C., Greenberg, E.R., 1996. Toenail samples as an indicator of drinking water arsenic exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 5, 849–852.
- Karagas, M.R., Tosteson, T.D., Blum, J., Klauz, B., Weiss, J.E., Stannard, V., Spate, V., Morris, J.S., 2000. Measurement of low levels of arsenic exposure: a comparison of water and toenail concentration. *J. Epidemiol.* 152, 84–90.
- Karahalil, B., Karakaya, A.E., Burgaz, S., 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 442, 29–35.
- Kitchin, K.T., 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 249–261.
- Livingston, G.K., Reed, R.N., Olson, B.L., Lockey, J.E., 1990. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 136–144.
- Majer, B.J., Laky, B., Knasmüller, S., Kassie, F., 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage in chemopreventive trials. *Mutat. Res.* 489, 147–172.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J., Marcos, R., 2004. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat. Res.* 564, 65–74.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T., 1997a. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 6, 31–36.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T., 1997b. Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 6, 1051–1056.
- Nilsson, R., Jha, A.N., Zaprianov, Z., Natarajan, A.T., 1993. Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in the Srednogie area, Bulgaria. *Fresenius Environ. Bull.* 2, 59–64.
- Özkul, Y., Donmez, H., Erenmemisoglu, A., Demirtas, H., Imamoglu, N., 1997. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis* 12, 285–287.
- Pastor, S., Creus, A., Parrón, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, Marcos, R., 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18, 249–258.
- Ramírez, M.J., Surrallés, J., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R., 1999. Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells. *Mutat. Res.* 440, 163–169.
- Rosin, M.P., Ragab, N.F., Anwar, W., Salama, S.I., 1994. Localized induction of micronuclei in the oral mucosa of xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Lett.* 81, 39–44.
- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R., Levis, A.G., 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2, 11–17.
- Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Canova, A., Raimondi, F., Ghiotto, C., Fiorentino, M.V., 1990. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitubercular therapy. *Mutat. Res.* 228, 157–169.

- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Warner, M., Biggs, M.L., Moore, L., Smith, M.T., 1993. Rationale for selecting exfoliated bladder cell micronuclei as potential biomarkers for arsenic genotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 223–234.
- Stich, H.F., Resin, M.P., 1983. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int. J. Cancer* 31, 305–308.
- Tagaki, Y., Matsuda, S., Imai, S., Ohmori, Y., Matsuda, T., Vinson, J.A., Mehra, M.C., Puri, B.K., Kamienski, A., 1988. Survey of trace elements in human nails: an international comparison. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 690–695.
- Tian, D., Ma, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X.C., Ni, Z., Allen, J., Collins, B., Schreinemachers, D., Mumford, J.L., 2001. Analysis of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia. *Chin. J. Toxicol. Environ. Health* 64, 473–484.
- Titenko-Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M.T., 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat. Res.* 417, 101–104.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271, 69–77.
- Vahter, M., Concha, G., Nermell, B., Nilsson, R., Dulout, F., Natarajan, A.T., 1995. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. *Eur. J. Pharmacol.* 293, 455–462.
- Warner, M.L., Moore, L.E., Smith, M.T., Kalman, D.A., Fanning, E., Smith, A.H., 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 3, 583–590.
- Wilhelm, M., Ewers, U., Schulz, C., 2004. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 69–73.
- World Health Organization (WHO), 1993. Recommended Guidelines for Drinking Water, Geneva.