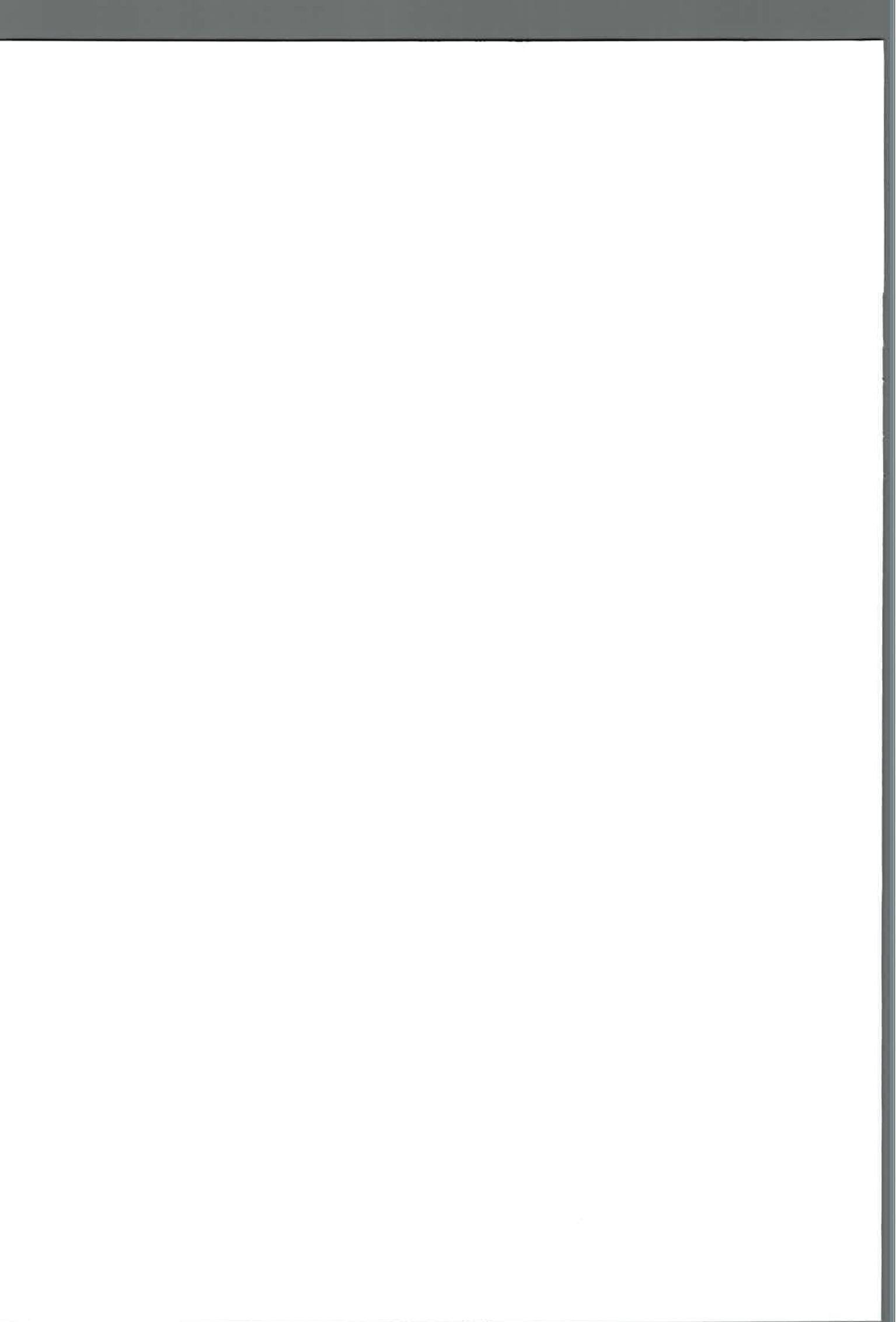


75704

VAREA, MARIA CRISTINA

Alguno available - no listado por la presencia de errores en algún artículo...

2016 75704





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de
Magíster en Inocuidad y Calidad de Alimentos

RIESGO SANITARIO-AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSENICO EN
AGUA DE CONSUMO

Bioquímica **MARÍA CRISTINA VAREA**

AÑO 2016

70704

MFN:
Clasif:
T- 1093



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de
Magíster en Inocuidad y Calidad de Alimentos

RIESGO SANITARIO-AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSENICO EN
AGUA DE CONSUMO

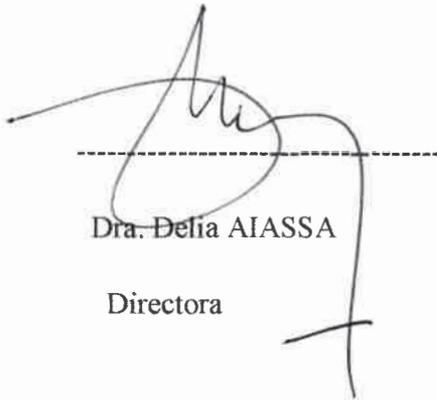
Bioquímica **MARÍA CRISTINA VAREA**

AÑO 2016

**RIESGO SANITARIO-AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSENICO
EN AGUA DE CONSUMO**

POR

MARIA CRISTINA VAREA

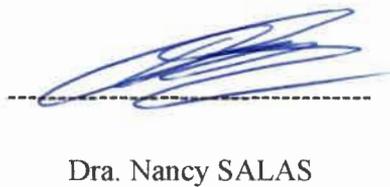


Dra. Delia AIASSA
Directora



Dr. Fernando MAÑAS TORRES
Co-Director

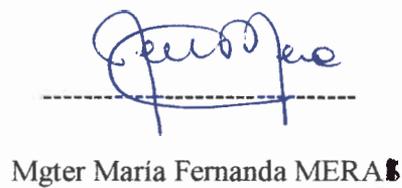
JURADO EVALUADOR



Dra. Nancy SALAS



Dra. Claudia DELLAFIORE



Mgter María Fernanda MERA

*Por el amor incondicional de todos mis afectos,
puntal indiscutible de mi vida,
por " tu abrazo inmenso que será infinito mientras dure "
y por lo mucho que los quiero
siempre estarán conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Delia Aiassa , directora de este trabajo, por la calidad profesional con que me forma y por sus valores humanos los que siempre han de acompañarme.

Al Dr Fernando MañasTorres, responsable de mi llegada a GeMA , por su inteligencia y “coherencia de pensamiento”.

A Naty por las horas de microscopio compartidas.

A Cecilia y Gabriela porque sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

A Virginia por su paciencia sostenida.

A los responsables de la Maestría en Inocuidad y Calidad de Alimentos por la aptitud de los docentes que me formaron durante este trayecto.

Y a vos Carlos Pereyra porque me enviaste la luz necesaria para concretar este milagro.

INDICE

Indice	iii
Indice de Tablas	v
Indice de Figuras	vi
Resumen	vii
Summary	viii

CAPITULO 1- INTRODUCCION	18
1.1 Propiedades del Arsénico	23
1.2 Grupos arsenicales	25
1.3 Arsénico en el ambiente	25
1.4 Mecanismo de acción	27
1.5 Cinética del Arsénico. Absorción – Distribución – Metabolismo - Eliminación	29
1.6 Toxicidad	
1.6.1 Aguda	34
1.6.2 Crónica	35
1.7 Efectos de la exposición	36
1.7.1 Gastrointestinales	37
1.7.2 Hepáticos	38
1.7.3 Renales	38
1.7.4 Cardiovasculares	39

1.7.5 Neurológicos	39
1.7.6 Dérmicos	40

1.7.7 Respiratorios	41
1.7.8 Hematológicos	42
1.7.9 Endócrinos	42
1.7.10 Inmunológicos	43
1.7.11 Genotóxicos	43
1.7.12 Cancerígenos	44
1.8 Biomarcadores	45
1.8.1 Biomarcadores de Exposición	46
1.8.1.1 As en orina	47
1.8.1.2 As en pelo y uñas	48
1.8.1.3 As en sangre	54
1.8.2 Biomarcadores de efecto	55
1.8.3 Biomarcadores de susceptibilidad	50
1.9 Ensayos de Genotoxicidad	51
1.9.1 Micronúcleos en sangre	51
1.9.2 Micronúcleos en mucosa bucal	55
CAPITULO 2 – HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
2 Hipótesis	58
2.1 Objetivos Generales	58

2.2 Objetivos Específicos	58
----------------------------------	-----------

CAPITULO 3 - MATERIALES Y METODOS	
3.1 Materiales	60
3.2 Métodos	62
3.2.1. Determinación de as en agua	62
3.2.2. Población	63
3.2.2.1 Obtención de la muestra de sangre	70
3.2.2.2 Obtención de muestra de mucosa bucal	64
3.2.2.3 Obtención de muestra de orina	64
3.2.3 Marcadores bioquímicos de exposición al As	64
3.2.4 Marcadores de genotoxicidad	67
3.2.4.1. Ensayo de Micronúcleos en sangre periférica	67
3.2.4.2 Ensayo de Micronúcleos en mucosa bucal	69
3.2.4.3 Tratamiento estadístico de los datos	70
CAPITULO 4 – RESULTADOS	72
CAPITULO 5 - DISCUSIÓN	85
BIBLIOGRAFIA	100
ANEXOS	
Anexo I	92
Anexo II	94

Anexo III	96
------------------	-----------

INDICE DE FIGURAS	
1- Ubicación de los Países con problema de As en el ambiente	19
2- As en el agua en Argentina	20
3- Tabla Periódica indicando posición del As.	23
4- Ciclo del As en el ambiente	27
5- Biotransformación del As Inorgánico	33
6- Efectos de la exposición al As a través del agua de bebida	37
7- Células binucleadas con presencia de micronucleos	53
8- Formación de micronucleos	54
9- Zonas donde viven participantes del estudio	75
10- Actividades de los participantes del estudio	76
11- Contaminantes considerados por los participantes del estudio	76
12- Agentes que los participantes consideran causa de contaminación	77
13- Micronucleos en mucosa bucal en diferentes concentraciones de As	82
14- Concentración de As en agua y MN en mucosa bucal.	83

INDICE DE TABLAS	
1- Concentración de As en muestra de agua de distintas localidades de La Pcia de Córdoba	72
2- Sexo, edad, tiempo de permanencia en el domicilio y afecciones relatadas por los participantes	73
3- Valores de los marcadores bioquímicos en los participantes por grupo establecido	79
4- Valores de MN en sangre y mucosa bucal de los individuos analizados	80
5- Valores de MN en sangre y mucosa bucal de los individuos analizados agrupados según la concentración de As en agua	82

RESUMEN

Se considera al As como un problema de Salud Pública debido a la gran población expuesta en distintas partes del mundo y al impacto que este tóxico tiene como inductor de distintas patologías. El arsénico fue clasificado por la International Agency for Research on Cancer (IARC), como un agente carcinogénico para humanos en base a estudios epidemiológicos que relacionan la ingesta de arsénico en el agua de bebida con cáncer en la piel y estudios ocupacionales que relacionan la exposición al arsénico con cáncer de pulmón. Se estima que en Argentina más de 5 millones de personas consumen agua con niveles superior al límite propuesto por la OMS.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el impacto que la exposición crónica al arsénico tiene, sobre el material genético y las potenciales alteraciones bioquímicas en sangre y orina, de personas que consumen agua de bebida con presencia de este metaloide mediante biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad.

Se tomaron muestras de veinte individuo ($n=20$) las cuales fueron divididas en dos grupos de acuerdo a la concentración de As en el agua de consumo. Un grupo correspondió a personas expuestas a la ingesta de agua con una concentración de As entre 0,010 y 0,025 mg/l, otro grupo incluye los individuos que tuvieron una exposición al As mayor a 0,025 mg/l. El agua de consumo de ambos grupos superan el límite establecido por la OMS (0,010 mg/l).

La evaluación se llevo a cabo mediante biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad (recuento de plaquetas, transaminasas glutámico pirúvica, transaminasa glutámico oxalacética, fosfatasa alcalina, bilirrubina, ensayo de Micronúcleos en sangre, Micronúcleos en mucosa bucal, y As en orina).

Los resultados obtenidos para los parámetros bioquímicos mostraron que no hubo diferencias significativas respecto a los valores tenidos como referencia.

Para micronúcleos en sangre la frecuencia en el primer grupo fue de 6.00 ± 0.29 (M \pm D.E) cada mil células observadas y para el segundo grupo de 6.90 ± 0.44 sin diferencias significativas respecto al grupo de referencia. Si se halló diferencia significativa en la frecuencia de MN en mucosa bucal donde para el primer grupo arrojó 7.00 ± 0.58 y para el segundo 7.73 ± 0.41 respecto a un valor de referencia de 3.72 ± 0.85 y en concordancia con otros autores.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la exposición al As en forma sostenida en el tiempo no resulta inocua frente a una evaluación toxicogenética. Por lo tanto es necesario advertir a la población sobre este riesgo a la vez que se planteen medidas preventivas para proteger a la salud humana y ambiental de esta exposición.

SUMMARY

Arsenic is considered as a public health problem due to the huge population exposed in different parts of the world and the impact that this toxic has as instigator of different pathologies. Arsenic is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a carcinogenic agent for humans based on epidemiological studies that relate arsenic intake in drinking water to skin cancer, and occupational studies that relate exposure of arsenic with lung cancer. It is estimated that in Argentina more than 5 million people consume water with levels above the limit proposed by the WHO.

The aim of this work has been to determine the impact of chronic exposure to arsenic on genetic material and potential biochemical alterations in blood and urine of people who consume drinking water with the presence of this metalloid through biochemical biomarkers and genotoxicity.

Twenty individuals ($n = 20$) were sampled, which were divided into two groups according to the concentration of As in drinking water. One group consisted of people exposed to water intake with an As concentration of between 0.010 and 0.025 mg / l. Another group included people who had exposure to As greater than 0.025 mg / l. The drinking water of both groups exceeds the WHO limit (0.010 mg / l).

The evaluation was carried out using biochemical and genotoxicity biomarkers (platelet count, glutamic pyruvic transaminase, glutamic oxalacetic transaminase, alkaline phosphatase, bilirubin, micronucleus in blood assay, micronucleus in buccal mucosa, and As in urine).

The results obtained for the biochemical parameters showed that there were no significant differences with respect to the values taken as reference.

For micronucleus in blood, the frequency in the first group was 6.00 ± 0.29 (M \pm ES) per thousand cells observed, and for the second group of 6.90 ± 0.44 without significant differences with respect to the reference group. There was a significant difference in the MN frequency in the buccal mucosa where, for the first group, it was 7.00 ± 0.58 and for

the second group 7.73 ± 0.41 compared to a reference value of 3.72 ± 0.85 and in agreement with other authors.

The results obtained in this study suggest that the exposure to Arsenic is not innocuous against toxicogenetics evaluation. Therefore it is necessary to warn the population about this risk while also considering preventative measures to protect the human and environmental health of this exposure.

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

CPITULO I - INTRODUCCIÓN

La exposición ambiental a los compuestos del Arsénico (As) es un evento de alta frecuencia y peligrosidad en todo el mundo y dado que la salud pública tiene como propósito prevenir enfermedades, prolongar la vida y fomentar la salud (Testa, 1992) es posible considerar esa exposición como un problema necesario de atender para proteger y mejorar la salud de la población humana de las zonas más comprometidas por esta situación.

La exposición más frecuente a este tóxico es a través del agua de bebida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha fijado como límite máximo para el agua de consumo 0,01mg/l (WHO 2001) y este valor ha sido adoptado por el Código Alimentario Argentino en el año 2007 (CAA, 2007). Las normas de tolerancia al As varían según los países. En Argentina, las provincias de Bs As y Córdoba han fijado como límite máximo 0.05 mg/l.

La contaminación con As en aguas superficiales es un problema en distintas partes del mundo: India, Bangladesh, China, Taiwan, EE.UU, Polonia y Rumania, alcanzan niveles mayores a lo permitido por la OMS constituyéndose en una alarma para la salud de la población (Martinez Gonzalez 2005) (Fig.1).

En América Latina la presencia natural del As en aguas subterráneas y superficiales se debe a factores de tipo geológicos y antropogénicos. En Argentina, Chile, México y Perú, el As está asociado al volcanismo terciario y cuaternario desarrollado en la Cordillera de los Andes (Sancha *et al.*, 1998). En nuestro país, alrededor de cinco millones de personas consumen agua con concentraciones de arsénico superiores a 10 µg/l y se considera, desde los años 80, zonas endémicas las provincias de Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fe, Chaco, La Pampa, Córdoba, San Luis, Buenos Aires, y Río Negro (Astolfi, 1982; Tello, 1981).

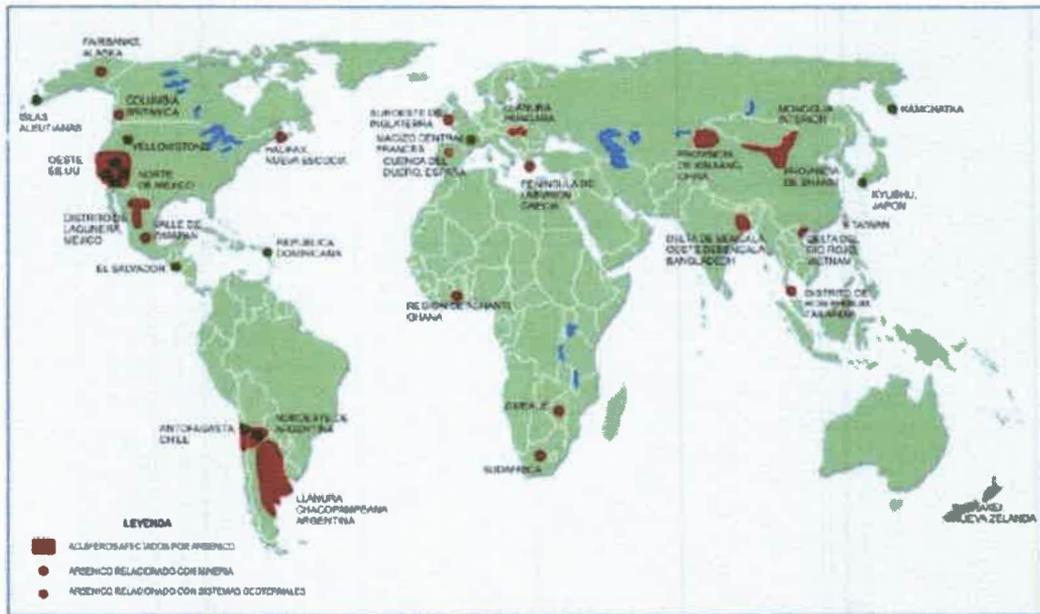


Fig. 1. Ubicación de los países con problemas de arsénico en el ambiente.
Tomada y modificada de BGS y DPHE, 2001; Smedley y Kiniburg, 2002

En América del Sur, Chile posee una zona afectada que abarca las regiones de Antofagasta y Coquimbo con una concentración de As en agua que va de 0,100-1 mg/l (Sancha y Castro, 2001).

En nuestro país la zona chaco-pampeana con una extensión aproximada de 100.000 km² posee una presencia de As en agua que llega hasta los 0,530 mg/l (Smedley y Kinninburgh 2002) (Fig.2).



**Fig. 2. As en agua en Argentina.
CONICET 2009.**

Una vez incorporado al organismo, los compuestos del As se distribuyen por los distintos sistemas orgánicos acumulándose en hígado, pulmones, piel, riñones, pelo, uñas y dientes y en menor grado en bazo, corazón, cerebro, músculos y huesos. Su excreción se realiza por vía renal, encontrándose en orina como As inorgánico (en baja proporción) así también puede encontrarse compuestos químicos como MonoMetil Arsénico (MMA) y DiMetil Arsénico (DMA). También se excreta por las heces, la saliva, las uñas y los pelos (Goyer, 1996). Los efectos adversos de la exposición del organismo a As se manifiesta en diferentes órganos, sobre la piel incluyen engrosamientos de la capa externa de la piel (hiperqueratosis palmoplantar), excesiva producción de sudor (hiperhidrosis), coloración oscura (melanodermia) y cáncer de piel (Bertolero *et al.*, 1981).

El consumo de agua de bebida con un contenido de arsénico, superior al máximo señalado por los criterios de potabilidad, pueden dar lugar a una afección llamada Hidroarsenicismo

Crónico Regional Endémico (HACRE) o enfermedad de Bell Ville, caracterizada por trastornos en la piel progresivos que pueden coexistir con otras lesiones (Astolfi *et al.*, 1981; Castro, 1985). Esta patología pone a nuestro país en segundo lugar después de EEUU respecto al orden de países afectados (Bundschuh, *et al.*, 2009).

También se ha demostrado actividad clastogénica (capacidad de inducir roturas en el material genético) y teratogénica (capacidad de inducir anormalidades en el organismo en gestación) del As. En este sentido, el mecanismo de acción es la inhibición de la reparación del ADN y por consecuencia la producción del aumento de las mutaciones (Rossman *et al.*, 1980).

El As es uno de los primeros agentes químicos con evidencia de su capacidad carcinogénica en humanos. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1980; 1987; 2002), lo clasificó en el Grupo I, agente cancerígeno comprobado. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos lo clasificó en el GRUPO A, carcinógenos humanos (EPA 1993).

En Argentina, como en muchos países, no ha sido posible suministrar a la totalidad de la población agua de bebida con concentraciones de As menores a 0,050 mg/l debido a los altos costos que implica la remoción de este elemento.

Existen alrededor de catorce técnicas diferentes para la remoción del As. Las condiciones socio-económicas de un país limitan el accionar y modifican las tendencias en el uso de algunas tecnologías. Esto es lo que ocurrió en Argentina en el caso del tratamiento de remoción de As para el agua de consumo. En la década del 90' principalmente, se importaron plantas compactas de tratamiento por ósmosis inversa, que tenían gran eficiencia y que daban solución al problema del contenido de As en agua. Los inconvenientes comenzaron a notarse, luego de la crisis socio-económica del año 2001, ya que el proceso requería del cambio periódico de las membranas semipermeables (cada 4 o 5 años) y sus precios en dólares se hacían muy elevados. Fue por esto que comenzaron a utilizarse otros métodos, como el de coagulación-sedimentación-filtración, que proporcionan similares resultados en términos de eficiencia operativa y que, a su vez, resultan económicamente sustentables. (UTN-FRBB 2010)

En líneas generales, la coagulación consiste en el agregado de productos químicos al agua para desestabilizar los coloides en suspensión, reduciendo las fuerzas que tienden a mantener separadas las partículas en suspensión.

Esta ruptura de cargas se hace mediante una agitación violenta, con altas velocidades de mezclado y los coagulantes más utilizados son: • sulfato de aluminio: $Al_2(SO_4)_3$ • cloruro férrico: $FeCl_3$ • cloruro de polialuminio (PAC): $Al_n(OH)_mCl_{(3n-m)}$. H_2O ; donde $0 < m < 3n$.

Tan es el caso de la utilización del sulfato de aluminio como método de coagulación química en San Antonio de los Cobres, Departamento de Los Andes (Salta) y coagulación directa en Santa Fe y en la Provincia de Buenos Aires, desde el año 2002. Esta última técnica se comenzó a utilizar a través de una experiencia piloto donde el agua de consumo se trató mediante un proceso de oxidación y coagulación con cloruro férrico (Castro de Esparza, 2006).

En la localidad de Coronel Moldes, Provincia de Córdoba, se ha implementado un proceso basado en el tratamiento del agua de consumo mediante una técnica de coagulación-floculación seguida de un doble filtrado que ha permitido disminuir la concentración de As a valores óptimos (Comunicación personal Ing. Gastón Domínguez, 2008).

El estudio del riesgo a la exposición del As sigue siendo de interés si se tiene en cuenta la gran cantidad de población expuesta a altas concentraciones y a la complejidad de los procesos involucrados.

El presente trabajo está dirigido a determinar mediante biomarcadores bioquímicos y de genotoxicidad el nivel de daño presente en individuos expuestos al As en el agua de bebida en localidades de Sampacho, Las Vertientes y Río Cuarto de la provincia de Córdoba.

Antes de lo indicado, se describen las características de este tóxico, el estado de situación del As en Argentina, condición en que se encuentra en el agua y las enfermedades que produce, sobre todo considerando que la tendencia mundial es a reducir cada vez más su contenido para el agua de consumo.

1. 1 PROPIEDADES DEL ARSÉNICO.

El Arsénico (As) es un elemento perteneciente al grupo V-A de la tabla periódica (Fig. 3), de número atómico 33 y peso atómico 74,92. Se presenta en estado sólido principalmente en forma de sulfuros. Muestra propiedades intermedias entre los metales y los no metales lo que lo definiría como un metaloide, aunque por su electronegatividad y energía de ionización predominan las características de no metal y forma más fácilmente aniones que cationes. Por su posición en la tabla periódica, este elemento presenta un comportamiento químico similar al del fósforo, hecho que conlleva a múltiples implicancias de toxicidad (R-Lenntech, 2007).



Fig. 3. Tabla periódica indicando la posición del As

El As se suele unir covalentemente con la mayoría de metales y no metales y puede formar parte de moléculas orgánicas estables (Barán, 1995). Los estados de oxidación de este elemento químico más comunes son -3, 0, +3 y +5.

La escala de toxicidad del arsénico decrece en el siguiente orden: Arsina (H_3As) > As^{+3} inorgánico (arsenito) > As^{+3} orgánico > As^{+5} inorgánico (arsenato) > As^{+5} orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental. (Repetto 1997)

El trihidruro de arsénico o arsina se trata de un hidruro volátil en forma de gas incoloro altamente tóxico. Tanto las arsinas como las metil-arsinas se corresponden con el estado de oxidación -3 y son inestables en condiciones oxidantes. Entre las arsinas se encuentra la arsenamina que se presenta como un gas incoloro de olor desagradable, venenoso, poco soluble en agua y que por efecto del calor se descompone en As e hidrógeno produciendo una intensa desintegración de los glóbulos rojos de la sangre (hemólisis) (Suarez *et al.*, 2004).

En las aguas naturales el As se encuentra en forma inorgánica. Se presenta en su estado trivalente As^{+3} (arsenitos) y pentavalente As^{+5} (arsenatos). En aguas superficiales, con oxígeno, es más frecuente encontrar el arsénico en estado pentavalente As^{+5} , mientras que en aguas profundas o de pozo, en condición de ausencia de oxígeno es más común encontrarlo en estado trivalente As^{+3} . En pH de 4 a 10 el As^{+5} se encuentra cargado negativamente, lo que explica su mayor eficiencia en los sistemas de remoción, comparándolo con el As^{+3} que, a esos valores de pH, no posee carga.

El arsénico elemental se forma por la reducción de los óxidos de arsénico y se presenta como un material sólido de color gris acero. El arsénico con número de oxidación +3, que se produce en las actividades de fundición, puede ser oxidado catalíticamente o por bacterias a pentaóxido de arsénico, As^{+5} o a ácido ortoarsénico, H_3AsO_4 .

1. 2 GRUPOS ARSENICALES

A modo de síntesis los compuestos que contienen As pueden agruparse en:

a) Compuestos Arsenicales Inorgánicos:

- Trióxido de arsénico As_2O_3
- Arsenitos. $NaAsO_2$
- Pentaóxido de arsénico As_2O_5
- Acido arsénico. AsO_4H_3
- Acido arsenioso. H_3AsO_3
- Arseniato H_3AsO_4 .

b) Compuestos Arsenicales Orgánicos.

- Acido Arsanílico $NH_2C_6H_4AsO(OH)_2$
- Arsfenamina

c) Arsénico Gaseoso

- Gas Arsina AsH_3
- Arsinas sustituidas

1. 3 Arsénico en el ambiente

El As se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los ambientes naturales y su exposición a concentraciones elevadas provoca alteraciones biológicas de gran importancia para la salud pública.

Este elemento es el vigésimo elemento con mayor presencia en la corteza terrestre. Se lo encuentra en forma natural como rocas ígneas y sedimentarias.

Por lo tanto, el As ocurre naturalmente en el suelo y en minerales, aunque puede ingresar al aire, al agua y al suelo en polvo que levanta el viento. También puede unirse al agua: en agua de escorrentía o en agua que se filtra a través del suelo. Las erupciones volcánicas constituyen otra fuente de As. El As está asociado con minerales que se minan para extraer metales, como por ejemplo cobre y plomo, y puede incorporarse al ambiente cuando se extraen o funden estos minerales. También se liberan a la atmósfera cantidades pequeñas de As desde plantas de carbón y desde incineradores porque a menudo el carbón y los productos de desecho contienen este elemento.

En el ambiente el As, generalmente se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, cloro y azufre. El As combinado con estos elementos se conoce como As inorgánico. El As combinado con carbono e hidrógeno se conoce como As orgánico. En su forma inorgánica, el As predomina en suelos y en el agua, mientras que la forma orgánica se la encuentra preferentemente en alimentos. En peces y moluscos se lo encuentra abundantemente en formas tri-metiladas como arseno-betaína y arseno-colina. (WHO, 2001).

Diversas actividades humanas como la minería, agricultura y procesos industriales como los del vidrio, contribuyen a aumentar la contaminación ambiental con este metaloide (Leonard y Lauwerys, 1980). De igual manera la extracción y fundición de minerales con su correspondiente emanación de gases y polvos siguen contaminando suelos y vegetales en diverso grado. La emisión en plantas carboníferas y el uso de As en la actualidad como coadyuvante de diversos plaguicidas constituye otro factor importante de exposición.

A continuación se resume el ciclo del As en el ambiente (Fig.4).

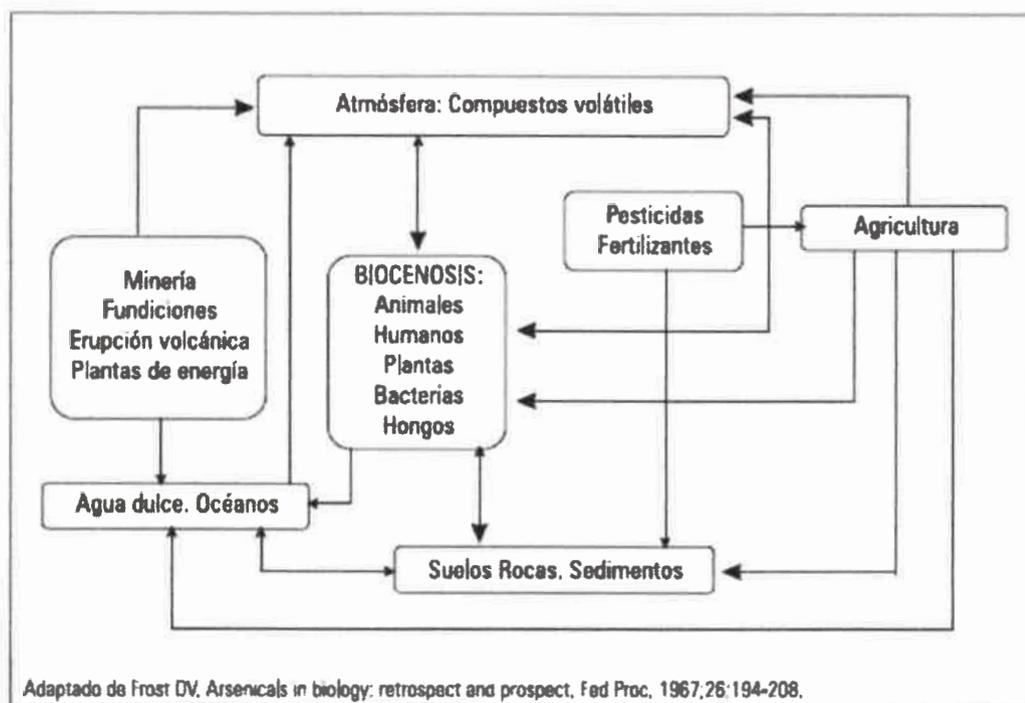


Fig 4 – Ciclo del As en el ambiente

A partir del año 1942 comienzan a regularse los niveles ambientales de As. Es así como la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (EPA) fija como límite permitido 0,050 mg/l en agua de consumo.

En el caso de la exposición por razones laborales a As, la Administración de Seguridad y Salud Laboral (OSHA) recomienda 0,010 mg/l de aire por cada 8 hs de trabajo en jornadas de 40 hs semanales (ATSR, 2005).

1. 4 MECANISMO DE ACCION

La toxicidad del As es compleja porque depende de la vía de exposición, del estado de oxidación y de la forma química (inorgánica u orgánica) del compuesto. El As inorgánico es el responsable de la mayoría de los casos de intoxicación en humanos. El gas arsina es considerado como la forma más tóxica del As, lo que se debe a su actividad como potente

agente para romper los glóbulos rojos de la sangre, sin embargo, este gas difícilmente alcanza niveles tóxicos en el ambiente.

El Arsénico produce sus efectos tóxicos en el hombre interaccionando con los grupos sulfhidrilos (SH⁻) de las proteínas y alterando varias rutas enzimáticas.

El mecanismo más utilizado que se ha postulado para el As⁺³ es a través de su afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas. En ese sentido las enzimas son particularmente afectadas si el grupo SH⁻ está ubicado en un sitio crítico para su actividad.

El As⁺⁵ puede substituir al grupo fosfato en las reacciones que son catalizadas por enzimas, afectando procesos como la producción de energía (ATP) y la síntesis de ADN; sin embargo, su contribución tóxica es difícil de evaluar porque el As⁺⁵ se reduce a As⁺³ en el organismo.

El As⁺³ inhibe el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, con disminución de la producción de acetil coenzima A y de la síntesis de ATP en el ciclo de Krebs (Ford, 1998). El As⁺⁵ es capaz de sustituir al fósforo en varias reacciones bioquímicas, de esta manera compete con el fosfato en los sistemas de transporte intracelular y desacopla la fosforilación oxidativa llegando a formar ADP-arsenato en lugar de ATP (Gresser, 1981).

Cuando el As⁺⁵ menos estable reemplaza al anión de fósforo en los fosfatos, ocurre una rápida hidrólisis de los enlaces de alta energía de compuestos como el ATP. Este proceso implica la pérdida de enlaces de fosfato de alta energía que "trastocan" la respiración mitocondrial (Rossman 2007).

Otras enzimas, con menor importancia clínica, tales como monoamino-oxidasas, lipasas, fosfatasa ácida, arginasa hepática, colinesterasa y adenilciclase también son inhibidas por el As. Asimismo es capaz de producir activación de quinasas relacionadas con el estrés oxidativo y alteraciones morfológicas con cambios en los patrones de crecimiento y diferenciación celular (Lantz, 2006).

Igualmente, la afinidad que muestra el As por los grupos de tioles, ha hecho posible la utilización de sustancias que forman complejos con iones de metales pesados (quelantes) que contienen estos grupos para tratar la intoxicación aguda con este compuesto.

El arsenito se adhiere específicamente a los receptores hormonales que contienen grupos de tioles. De esta manera, previene que los esteroides se puedan unir eficientemente a sus receptores (Lopez *et al.* 1990; Kaltreider *et al.* 2001).

Por otro lado, se estima que el efecto diabetogénico del As puede estar relacionado con su habilidad a unirse e inhibir la acción del receptor de la insulina (Rossman 2007).

1. 5 CINETICA- ABSORCIÓN- DISTRIBUCIÓN- METABOLISMO- ELIMINACION

Las principales vías de entrada del As al organismo humano son el tracto gastrointestinal (95%) y el respiratorio. La absorción por vía dérmica es baja y alcanza solamente el 2%.

La absorción se define como el mecanismo por el cual un xenobiótico (compuesto ajeno al organismo) atraviesa membranas y capas celulares hasta llegar al torrente sanguíneo. La vía de absorción más común del As es la vía oral sin embargo la inhalación y la absorción a través de la piel forman parte importante de otras rutas de exposición.

El As ingresa al organismo por vía oral a través de la exposición al agua con elevadas concentraciones de este elemento y de alimentos que contengan este metaloide. Los compuestos inorgánicos As^{+3} presentes en el agua son absorbidos con mayor dificultad debido a su baja liposolubilidad. Esto explicaría las manifestaciones clínicas a la exposición crónica.

Los compuestos orgánicos As^{+5} presentes en los alimentos principalmente mariscos son absorbidos rápidamente en un 75-85% de su ingesta (Buchet, 1981).

La absorción por vía respiratoria se lleva a cabo por medio de dos procesos: el depósito de partículas en la superficie del epitelio pulmonar y la absorción del material depositado. En esta ruta hay un predominio de As trivalente As^{+3} . Entre los factores que influyen en el grado de absorción a nivel pulmonar es posible considerar la forma química, el tamaño y la solubilidad de las partículas.

En esta ruta hay un predominio de As^{+3} . Las partículas de más de 10 μm de diámetro son en su mayoría depositadas en las vías respiratorias altas (nasofaringe), las que tienen un tamaño entre 5 y 10 μm se depositan en la tráquea, y las de un diámetro menor de 2 μm penetran significativamente en los alvéolos (Pinto, 1976).

Los arsenicales orgánicos se absorben por vía respiratoria, debido que un factor determinante de la absorción es la liposolubilidad, lo que le permite al As atravesar las distintas membranas. Por ejemplo, varios compuestos orgánicos arsénico-metilados, naturalmente presentes en el ambiente como consecuencia de la actividad biológica, forman sales de metales alcalinos muy solubles. Estudios realizados en pulmones de ratas expuestas a dimetilarsenato reportaron una rápida absorción (Stevens *et al.*, 1977).

La absorción a través de la piel en humanos es limitada (Wester *et al.*, 1993), en el caso de su ocurrencia puede ser de características severas por ejemplo la manipulación de plaguicidas sin la debida protección (Hessi y Berman, 1982).

También se ha encontrado valores significativos en niños expuestos a suelos contaminados después de tomar contacto a través de sus manos (Wildfand *et al.*, 2000).

Una vez que se absorbe el compuesto se distribuye en los tejidos del organismo. Se denomina distribución a la localización y concentración del As en los diferentes tejidos. Este proceso es altamente dependiente de las características químicas del compuesto, tamaño molecular, permeabilidad de las membranas que contacte, dosis de administración y especie en que se estudie la exposición (Wildfand *et al.*, 2000).

Luego de absorbido, el As llega a la sangre y se une a proteínas tales como albumina y globulinas presentes en la sangre. Dentro de las primeras 24 horas se distribuye a través de las proteínas de la sangre, principalmente al hígado, pulmón, riñón y bazo. En huesos, compite con el fósforo del tejido óseo, lo desplaza y puede permanecer allí durante años. También, el As^{+3} se acopla a los grupos sulfhidrilo de las proteínas por ejemplo la queratina presente en pelos y uñas (Liu *et al* 2008), depositándose en los mismos dentro de las 30 horas. Los niveles de As en secciones de pelo indican el tiempo transcurrido desde el inicio de la exposición (Offergelt *et al.*, 1992).

Igualmente el As inorgánico atraviesa la barrera placentaria y puede conducir a concentraciones importantes en el feto. Se han encontrado niveles de As de consideración en hígado, riñón y cerebro en autopsias de niños nacidos prematuramente de madres expuestas a As. (WHO 2001)

La placenta, parece ser fácilmente atravesada por el As (Who, 2001; Fowler *et al.*, 2007), ya que la concentración de As registrada en sangre materna son muy similares a las encontradas en el cordón umbilical del individuo en desarrollo (Concha *et al.*, 1998). Otros autores aseguran que las cantidades de As acumuladas por la placenta son muy superiores a las encontradas en cualquiera de los órganos del feto, por lo que podría tener un leve efecto barrera (Devesa *et al.*, 2006). En cualquier caso, este es el momento de su desarrollo en el que más expuesto se encuentra el individuo, pudiendo llegar a producirse graves malformaciones en el feto o incluso abortos (Raqib *et al.*, 2009).

Algunos estudios epidemiológicos, concluyen que en el caso de la leche materna, la cantidad de As excretada supone apenas un 20% del As transportado en sangre (Concha *et al.*, 1998; Xi *et al.*, 2010); por lo que la exposición al tóxico que sufre el lactante en este momento crucial de su desarrollo, es mínima. Por esta razón, la OMS recomienda a las mujeres residentes en las zonas más afectadas por la contaminación, amamantar a sus hijos durante el mayor tiempo posible (Concha *et al.*, 1998), a fin de proporcionarles un alimento seguro durante las primeras etapas de su desarrollo cognitivo, disminuyendo así la incidencia del retraso en el aprendizaje y otras disfunciones asociadas a la exposición directa al As en niños de muy corta edad (Akhtar *et al.*, 2007).

Dos estudios reportan datos sobre As en leche materna. En uno realizado por la OMS se hallaron concentraciones que van desde 0.00013 a 0.00082 ppm y en el otro realizado en mujeres andinas (San Antonio de los Cobres, Argentina) expuestas a altas concentraciones en agua de consumo se encontró concentraciones de 0.0008 a 0.008 ppm de As (Concha *et al.*, 1998).

Seguida a la distribución del As, el metabolismo de este compuesto se realiza principalmente en hígado a través de reacciones de reducción y metilación oxidativa.

El mecanismo por el cual el organismo elimina los tóxicos ambientales es la biotransformación, convirtiendo los compuestos no polares en metabolitos solubles en agua, en algunos casos este paso genera compuestos más tóxicos que el de origen y su acumulación puede desencadenar efectos adversos para el organismo.

La biotransformación se da mediante dos rutas metabólicas, la Fase I de funcionalización y la Fase II de conjugación. La primera está compuesta por una serie de reacciones de oxidoreducción que se dan a nivel microsomal, que produciendo compuestos más hidrófilos, luego pueden ser transformados en la Fase II. En la segunda se produce una glucurono-conjugación en la que participan un conjunto de enzimas que agregando grupos polares dan como resultado compuestos solubles que facilitan su eliminación (Repetto, 2009).

La biotransformación del As y su capacidad de metilación varía y depende de su forma química, de la dosis, del tiempo de exposición, de una dieta rica en metionina y proteínas y de la especie expuesta. Aún no está bien establecida toda la vía metabólica, pero se considera que su metabolismo en el hígado tiene procesos secuenciales de metilación oxidativa.

Para que ocurra la metilación es necesario que primero se dé una reacción de oxidoreducción que convierta el arsenato As^{+5} en arsenito As^{+3} para luego ser metilado a monometilarsenato (MMA) y dimetilarsenato (DMA). Esta reacción requiere del glutatión (Miller *et al.*, 2002). Una parte del As^{+3} es metilada en el hígado por la transferencia enzimática del grupo metilo de la S-adenosilmetionina que forman el arsenato de metilo (MMA) y el arsenato de dimetilo (DMA) (Aposhian *et al.*, 2004). De esta forma se convierte el arsénico inorgánico a formas orgánicas menos tóxicas (MMA y DMA) y estas son excretadas más rápidamente en la orina que las formas inorgánicas. La S-adenosilmetionina actúa como donador de grupos metilos y el glutatión, un tripéptido no proteico, como principal agente reductor y detoxificador al donar electrones.

Este mecanismo es enzimático y se satura con elevadas dosis de As teniendo como resultado una mayor acumulación de la forma inorgánica de este metaloide en los tejidos blandos.

El metabolismo de arsénico en niños es menos eficiente que en los adultos.

Se considera que la metilación es la principal vía de desintoxicación de arsénico, aunque estudios recientes proponen otros mecanismos alternos de desintoxicación ya que varias especies animales carecen de mecanismos de metilación del arsénico pero son capaces de excretar arsénico inorgánico (Vahter 2002) (Fig. 5).

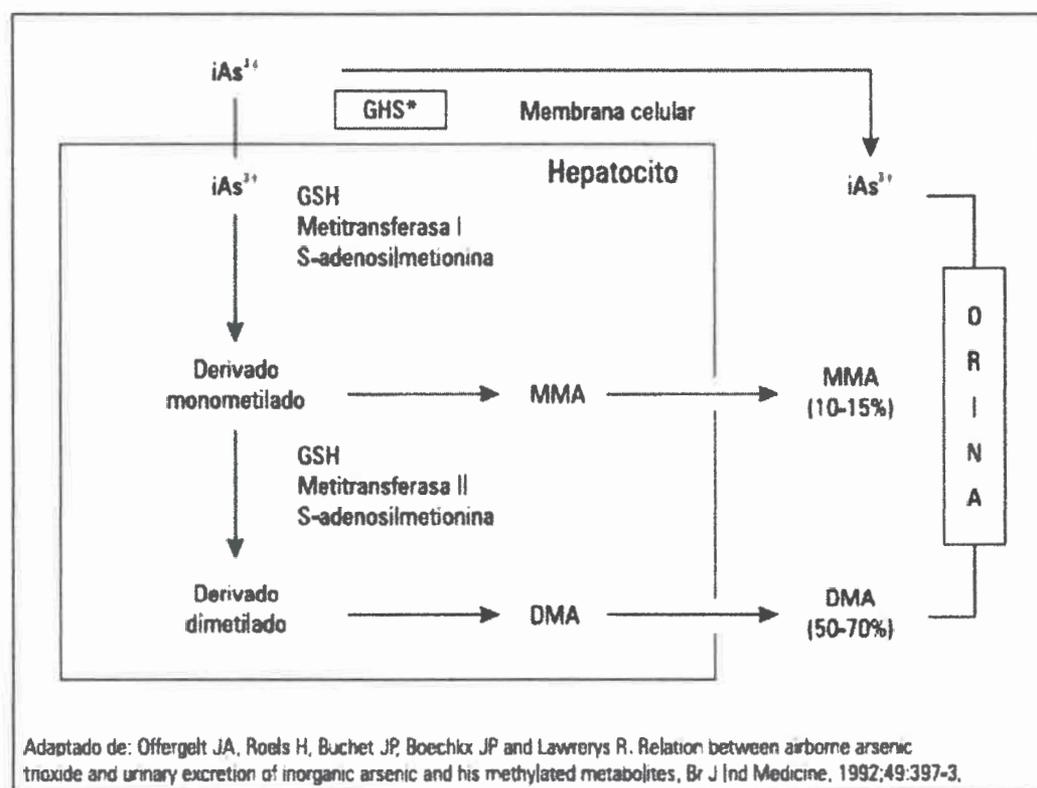


Fig. 5. Biotransformación del arsénico inorgánico. GHS* = Glutacion Sulfhidrilotiol

El arsénico es eliminado por vía urinaria en un 90-95% y en menor cantidad 5-10% por saliva, heces y leche (García, 2006).

Otras vías menos importantes son la descamación de la piel, el sudor y la incorporación a cabellos y uñas.

El 50% del arsénico excretado en la orina es arsénico dimetilado, el 25% es arsénico monometilado, y el resto es arsénico inorgánico (Buchet *et al.*, 1981).

La vida media del arsénico es de 20 hs y su eliminación total del organismo se cumple alrededor de las 48 hs. Dado que es un elemento que permanece muy poco tiempo en sangre, los valores en esta pueden ser normales aunque los niveles en orina se encuentren elevados (ATSDR, 2007).

1.6 TOXICIDAD

Se denomina toxicidad a la capacidad que tiene una sustancia de producir daño en un ser vivo. Este evento está relacionado con la dosis administrada o absorbida de dicha sustancia, la vía de administración, el tiempo de exposición y la naturaleza del organismo afectado.

La acción de un agente tóxico sobre un individuo determina una alteración del estado fisiológico que puede clasificarse estimando su curso o evolución en función del tiempo. De esta manera se puede hablar de intoxicaciones agudas, sub-agudas y crónicas.

En la primera, el fenómeno tóxico se presenta dentro de las 24 hs seguidas a la ingesta única del tóxico. La intoxicación sub aguda esta dada por la absorción de una sustancia tóxica durante un corto período de tiempo y la intoxicación crónica es la consecuencia de la repetida exposición a un agente durante un largo tiempo.

1.6.1 Intoxicación Aguda

En la intoxicación aguda por exposición a As el cuadro clínico es gastrointestinal severo con diarrea, vómitos y dolor abdominal intenso. Luego se presenta fiebre, insomnio, hepatomegalia y alteraciones cardíacas. Se considera que esta sintomatología corresponde a la ingesta de 100-300 mg de As o bien por inhalación o exposición dérmica intensa.

Los signos neurológicos que corresponden a una pérdida de la sensibilidad periférica se manifiestan unos días después y se deben a una degeneración de los axones que suele ser reversible si se revierte el cuadro tóxico (Beltran 2012).

En la intoxicación sub-aguda los signos clínicos no son claros aunque siguen produciéndose trastornos en distintos niveles biológicos. Si bien este término es usado para intoxicaciones de corta duración hoy es reemplazado por el de intoxicación subcrónica (Repetto, 1997).

1.6.2 Intoxicación Crónica

En el caso del As, la intoxicación crónica es determinante de una patología denominada Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE) como consecuencia de la exposición prolongada a este metaloide presente en el agua de consumo con concentraciones mayores a 0,010 mg/l.

Un gran número de casos de HACRE ocurridos en la ciudad de Bell Ville determinó que la patología se conociera en un principio como “enfermedad de Bell Ville”. En el año 1913, Goyenechea relacionó las manifestaciones clínicas de gran número de pacientes con el consumo de agua con arsénico. (Goyenechea, 1917).

Luego Ayerza describió en detalle las alteraciones cardiovasculares y cutáneas y la denominó “arsenicismo crónico regional endémico” (Ayerza, 1917; Ayerza, 1918) pero es en 1951 cuando Tello introduce el nombre HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico) para la enfermedad, relacionándola con su exposición al agua (Tello, 1951).

La aparición de los síntomas puede ocurrir recién entre los 5 y 10 años de exposición, y las lesiones malignas décadas después. Este tiempo es variable y depende de la salud de la persona, sensibilidad individual, estado nutricional, concentración de As en el agua ingerida y el tiempo de exposición (Trelles, *et al.*, 1970).

Si bien el HACRE tiene ocurrencia en todas las edades, se han identificado como grupos susceptibles a niños, mujeres embarazadas y en lactancia, individuos con estado nutricional deficitario e individuos con enfermedades preexistentes (sobre todo renales y hepáticas) (Gaioli *et al.*, 2009)

Durante la exposición crónica se presentan cuatro etapas:

1. Preclínica: La persona no presenta síntomas pero el As puede ser detectado en muestras de pelo, uñas y orina
2. Hiperqueratósico: las lesiones son difusas o localizadas y pueden presentarse en forma simétrica en manos y pies, también en el dorso de estas extremidades.
3. Melanodermia: El período melanodérmico se presenta con manchas en el tronco y se extienden por todo el cuerpo sin afectar mucosas (Salazar, 2010; Cornejo, 2007).
4. Período final y complicaciones: Aquí aparecen ulceraciones en piel que pueden terminar en lesiones de tipo canceroso. Dentro de las manifestaciones no cutáneas del hidroarsenicismo afecta distintos sistemas: nervioso, hematopoyético y respiratorio.

Cuando la exposición es a bajas dosis (0,005-0,006 mg/kg/día) no existen signos claros de arsenicismo, como los mencionados con anterioridad, sin embargo se han reportado efectos neurológicos, de memoria y aprendizaje en la población infantil (Calderon *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2003).

1.7 EFECTOS DE LA EXPOSICION

Los determinantes de los efectos en la salud derivados de la presencia de arsénico en el agua de bebida son la concentración del elemento, la ingesta diaria y el tiempo de exposición como se muestra en la siguiente figura (Fig. 6).

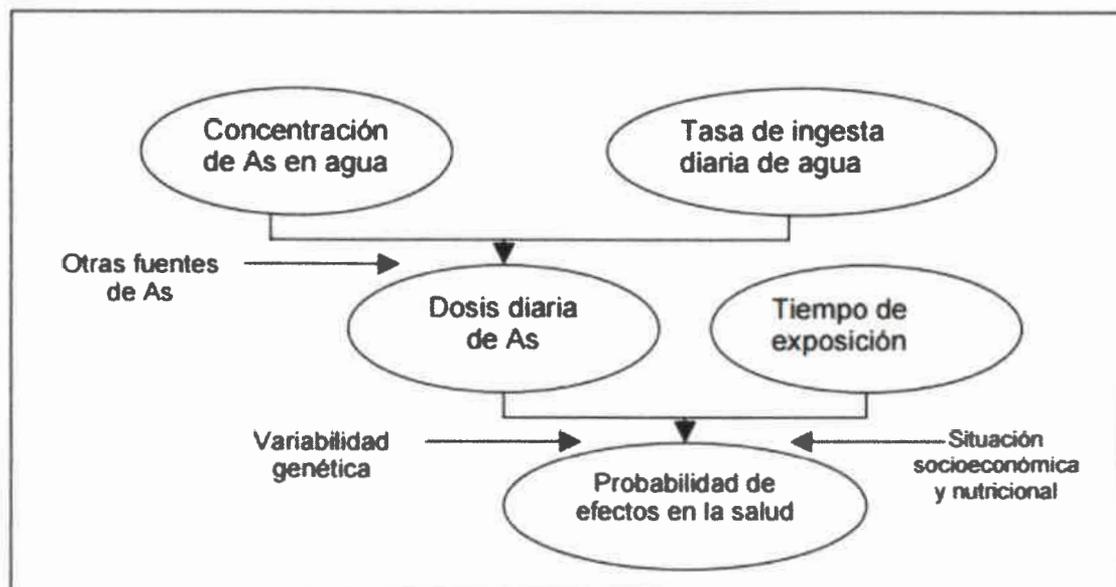


Fig. 6. Determinantes de los efectos de la exposición a As a través del agua de bebida. Tóxicos Metálicos. Mera M., 2013.

1.7.1 Efectos Gastrointestinales

Los efectos del As en el sistema gastrointestinal son producidos por la ingesta de sus compuestos y en particular por el consumo de agua con alto contenido en este metaloide. Otras vías de exposición pueden afectar de igual manera el sistema gastrointestinal.

La presencia de As provoca un aumento de la permeabilidad de pequeños vasos que llevan a una pérdida importante de fluidos que luego derivan en un cuadro de hipotensión importante. También puede ocurrir un proceso de inflamación severa que lleva a la necrosis de mucosa intestinal produciendo diarreas de tipo hemorrágico (OPS-OMS, 2006).

En 1900 un lote de cerveza contaminada con arsénico causó 6.000 intoxicaciones y aproximadamente 71 muertes en el norte de Inglaterra. La fuente de la contaminación que afectó a 100 cervecerías, fue un lote de ácido sulfúrico contaminado con As. Este ácido es utilizado en el proceso de elaboración de la cerveza. Las manifestaciones clínicas presentes fueron: anorexia, pigmentación café, neuritis periférica (debilidad muscular, dolor y

parestesias en las extremidades), lesiones hepáticas, edema localizado, y degeneración grasa del corazón. La concentración de arsénico en la cerveza osciló de 2-4 ppm (Reynolds, 1901; Aposhian, 1989; Engel *et al.*, 1994; Rosenman 2007).

1.7.2 Efectos Hepáticos

Los signos de exposición al As a nivel hepático se presentan como una hepatitis tóxica con niveles elevados de enzimas hepáticas.

También la ingesta crónica de As puede derivar en hipertensión portal no cirrótica. La hipertensión portal de origen no cirrótico (HPNC) es un grupo heterogéneo de patologías con etiología intra y extrahepáticas. En la mayoría de los casos existe una lesión de tipo vascular. Esta es una manifestación rara pero relativamente específica de la ingesta crónica de arsénico inorgánico. Cuando la función hepática permanece inalterada, este cuadro puede hacerse evidente en estadios avanzados a través de hemorragias digestivas secundarias a la ruptura de várices esofágicas.

Existen reportes de casos que relacionan la exposición crónica al angiosarcoma hepático (Popper *et al.*, 1978; Zaldivar *et al.*, 1981; ATSDR 2007). El angiosarcoma hepático es una neoplasia (cáncer) que representa 2% de todas las neoplasias primarias del hígado (Ishak, Goodman y Stocker, 1999).

No obstante lo antes señalado, según el IARC esta fuerza de asociación entre exposición crónica a As y cáncer hepático sería limitada (IARC, 2004; NCR, 2000).

1.7.3 Efectos Renales

Los signos de daño renal son generalmente leves o están ausentes en la exposición crónica. Esta situación sugiere que el riñón es relativamente menos sensible al arsénico inorgánico que otros tejidos y que los efectos renales no tienen repercusión seria en el organismo. No obstante en la intoxicación severa puede ocurrir necrosis tubular aguda y falla renal aguda también se han reportado casos de insuficiencia renal crónica por necrosis cortical. El daño

en este sistema está dado por caída de la presión arterial bruscamente hasta niveles que impiden el riego sanguíneo de los órganos vitales (shock hipotensivo), daño tubular hemoglobinúrico (presencia de hemoglobina en orina) o por los efectos directos del As sobre las células epiteliales tubulares del riñón (Gonzales *et al.*, 2011).

Existe una fuerza de asociación limitada entre la exposición crónica al As y el cáncer renal (NCR, 2000; IARC, 2004). El gas arsina presenta mayor efecto nefrotóxico que el As inorgánico.

1.7.4 Efectos Cardiovasculares

La exposición al arsénico ha sido relacionada con varias patologías vasculares que afectan grandes y pequeños vasos. Las investigaciones iniciales sobre el arsénico y la enfermedad vascular se centraban en los pequeños vasos (Enfermedad del pie negro - EPN), mientras que las investigaciones recientes han sido dirigidas principalmente a los efectos sobre los vasos de gran calibre, reportando aumento en el riesgo de accidentes cerebrovasculares (ACV), hipertensión arterial (HTA) arterioesclerosis carotídea (States *et al.*, 2009; Navas *et al.*, 2005).

La amplitud del daño cardiovascular depende de la edad, dosis de As y susceptibilidad individual. También se han reportado datos de aumento de las enfermedades cardiovasculares en población pediátrica (Navas *et al.*, 2005)

La gangrena en extremidades y la enfermedad vasoespástica o de Reynaud son otras de las patologías asociadas al As. Se presenta en personas expuestas a alto contenido de este metaloide y revierten cuando cesa (Garabantes *et al.*, 2003).

1.7.5 Efectos Neurológicos

En el sistema nervioso periférico, la exposición crónica lleva a la neuropatía periférica. Los signos neurológicos son de manifestación sensitiva y no motora siguiendo una distribución simétrica en manos y pies. Los signos neurológicos de la exposición crónica al As muestran

neuropatía periférica simétrica con entumecimiento y parestesia de extremidades distales, siendo las piernas más afectadas que los brazos, la neuropatía puede ser progresiva y dependiente de la dosis. Reportes histopatológicos de biopsias mostraron que la axonopatía y desmielinización son los principales cambios en nervios periféricos (Goebal, 1990).

La neuropatía periférica con pérdida sensitivo-motora de tipo axonal, característica de personas con el síndrome de Guillán-Barré (síndrome donde el sistema inmunitario del organismo ataca parte del sistema nervioso periférico) también ha sido reportada para personas expuestas a altas concentraciones de arsénico (Greenberg, 1996).

En niños crónicamente expuestos al arsénico, los niveles urinarios del arsénico fueron inversamente correlacionados con la comprensión verbal y la memoria a largo plazo (Calderon *et al.*, 2001). Recientemente se han reportado alteraciones en la memoria y en la atención de adolescentes expuestos a altas concentraciones de arsénico (200–300 ppb) en el agua de consumo durante 11 años.

1.7.6 Efectos Dérmicos

Las lesiones dérmicas más comunes en la exposición al As son la hiperqueratosis (engrosamiento de la capa externa de la piel) palmo-plantar y los cambios en la pigmentación de la piel.

La hiperqueratosis arsenical aparece predominantemente en las palmas y plantas, aunque puede ocurrir en el dorso de las extremidades y en el tronco. Forma pápulas puntiformes de 2-4 mm que son fácilmente visibles. Tienden a volverse dolorosas con sangrado, fisuras e inclusive ulceración. En todos los casos las lesiones queratósicas se asocian a hiperhidrosis. Las células epiteliales no muestran atipia celular de hecho pueden conservarse morfológicamente benigna durante mucho tiempo.- En ocasiones se producen cambios en la estructura celular y pueden convertirse en pre cancerosas (ATSDR, 2007).

La alteración de la pigmentación se manifiesta en forma de máculas dispuestas como “gotas de lluvia” alternando áreas de pigmentación o despigmentación que es más pronunciado en el tronco y extremidades y que tiene una distribución bilateral y simétrica. La pigmentación

puede a veces ser puntiforme e involucrar la mucosa del piso de la boca o la mucosa yugal. Se presenta en forma de “gotas de lluvia” formando máculas redondeadas hiper o hipopigmentadas de 2 a 4 mm de diámetro sobre un fondo hiperpigmentado (como bronceado). Aunque menos comunes, otros patrones incluyen la hiperpigmentación difusa o melanosis y la pigmentación localizada o en parche, particularmente en los pliegues cutáneos. La leucodermia o leucomelanosis, dada por zonas hipopigmentadas se manifiesta en los estadios tempranos de la enfermedad.

La hiperpigmentación ocurre principamnte en axilas, cuello, ingle, párpados, pezones y sienes. En casos severos puede extenderse a cuello, espalda y abdomen (ATSDR, 2007).

Yeh (1973) clasificó las queratosis arsenicales en 2 tipos: Tipo A benigno (sin atipia o con atipia leve) Tipo B maligno: Enfermedad de Bowen, carcinoma basocelular y carcinoma espinocelular. El carcinoma espinocelular puede aparecer en las áreas de hiperqueratosis o en las áreas no queratóticas del tronco, las extremidades o la cabeza. En la exposición crónica a este compuesto, el cáncer de piel puede aparecer simultáneamente en distintos sitios, preferentemente en zonas no expuestas a la radiación solar. Las uñas presentan estrías longitudinales blanquecinas donde se encuentra el arsénico.

La duración de la exposición al arsénico y la fecha de inicio de los signos y síntomas no siguen un patrón de tiempo definido aunque un antecedente de por lo menos seis meses es esencial para el diagnóstico.

1.7.7 Efectos Respiratorios

Existen pocos reportes que asocien la ingesta crónica de arsénico a las patologías pulmonares.

Investigaciones realizadas en Antofagasta (Chile), relacionaron la función pulmonar con la exposición al As a través del agua de bebida, concluyendo que las dificultades respiratorias estudiadas estaban relacionadas con este metaloide (Ruiz-Ramos R et al , 2014). Asimismo, se acepta hoy que las poblaciones expuestas a aguas con As tienen mayor prevalencia de bronquitis crónica.

Estudios epidemiológicos han confirmado que la exposición a As se asocia con daño en las funciones pulmonares. En un estudio de 650 niños de entre siete y diecisiete años, expuestos y no expuestos a As, in útero y en sus primeras etapas de vida, se mostró la relación entre la presencia de síntomas crónicos respiratorios y niveles de arsénico (Smith *et al.*, 2013).

El cáncer de pulmón es asociado también a exposición laboral en la industria de fundiciones y en la fabricación de pesticidas (ATSDR, 2007).

1.7.8 Efectos Hematológicos

Se ha encontrado que la exposición al As, en dosis altas, altera el sistema hematopoyético. No obstante, se ha demostrado que la exposición crónica, a dosis bajas, también altera dicho sistema.

Se han reportado índices de correlación entre arsénico urinario y parámetros hematológicos como glóbulos rojos, leucocitos, plaquetas, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), reticulocitos y fórmula leucocitaria (porcentaje de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos). Según estos resultados, la exposición crónica a dosis bajas de As provoca la disminución de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina dependiendo de la dosis absorbida. Con respecto a la serie blanca, al parecer la exposición a As provoca respuestas inflamatorias. Sin embargo, no se caracterizó el daño del As en dicha serie (Caciari *et al.*, 2012).

1.7.9 Efectos Endocrinológicos

Existe una relación entre la exposición crónica a altos niveles de As y el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. (Navas-Acien *et al.*, 2008). Estudios adicionales realizados en Bangladesh (Nabi *et al.*, 2005), Taiwán (Chiu *et al.*, 2006), México (Coronado-Gonzalez *et al.*, 2007) y USA (Meliker *et al.*, 2007) apoyan la hipótesis de la relevancia de la exposición a As y el desarrollo de diabetes melitus. A pesar que, desde principios de 1930,

Krebs describió la interferencia que produce el As con el metabolismo del ácido pirúvico por inhibición de las enzimas piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa, esenciales para la gluconeogénesis y la glucólisis, los mecanismos precisos de los efectos diabetogénicos del arsénico permanecen aún desconocidos (Tseng *et al.*, 2004).

Lai *et al.* (2003) evaluaron la relación entre el arsénico inorgánico ingerido y la prevalencia de diabetes mellitus en 891 adultos que residían en el Sur de Taiwán. El estudio encontró que los residentes de esta área tenían una prevalencia del doble de diabetes mellitus cuando se compararon con los residentes de otras áreas y la población entera de Taiwán. Los autores también describieron una relación dosis - respuesta entre los niveles de arsénico en el agua y la prevalencia de diabetes luego del ajuste por edad, por sexo, por índice de masa corporal y por nivel de actividad. Otros dos estudios demostraron las mismas asociaciones positivas en Taiwán.

1.7.10 Efectos Inmunológicos

Los efectos inmunomoduladores e inmunotóxicos del arsénico han sido demostrados en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. Se ha observado linfocitosis leve, alteración de la capacidad macrofágica de los leucocitos e inmunodepresión. Se carece de suficiente evidencia de estos efectos en humanos (Loyo, 2009).

1.7.11 Efectos Genotóxicos

La genotoxicidad de los agentes químicos es una característica química intrínseca, basada en el potencial electrofílico del agente químico (como es el caso del arsénico) para unirse con puntos nucleofílicos de macromoléculas como enzimas, proteínas y ADN (Yager *et al.*, 1997; Decordier *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2004).

El arsénico no interactúa directamente con el ADN. Sus efectos genotóxicos ocurren a través de la alteración indirecta de la expresión de genes, por medio de la metilación del ADN, de la inhibición de la reparación del ADN, del stress oxidativo y de la modulación

alterada de las vías de señales de transducción; todo esto fuertemente influenciado por el medio ambiente celular.

Por ejemplo, el arsénico promovería el stress oxidativo alterando la reparación del ADN, y estos efectos tienden a amplificar las tasas de mutación incrementando el riesgo de cáncer (Carabantes *et al.*, 2003).

1.7.12 Efectos Cancerígenos

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al Arsénico en el grupo I. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte América, USEPA, clasifica al As como cancerígeno en el grupo A debido a la evidencia de sus efectos adversos sobre la salud. Se ha estimado el riesgo de cáncer en 31,33 casos de cáncer de piel por cada 1000 habitantes expuestos a 0,050mg/l As en el agua de bebida a lo largo de toda la vida. El carcinoma de piel de células escamosas y el carcinoma basocelular se asocian con la exposición a arsénico en el agua de bebida, no así el melanoma. Estos tumores aparecen principalmente en áreas no expuestas del cuerpo, incluyendo palmas y plantas y son generalmente múltiples (Scotto *et al.*, 1996).

Yeh (1973) halló que el riesgo de cáncer de piel está incrementado en los individuos con manifestaciones dérmicas de HACRE. El riesgo relativo de cáncer de piel fue de 4,79 para los individuos con hiperpigmentación; 10,18 para los individuos con hiperqueratosis y 51,07 para los individuos con ambos tipos de lesiones. Para Tsuda (1995) la población con lesiones dérmicas también tuvo riesgo aumentado de cánceres internos. Ya en 1948, se observó un marcado aumento de la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón y piel entre trabajadores de una fábrica de producción de arsenito de sodio.

Estudios realizados en la provincia de Córdoba (Argentina) indican que el 35% de todas las muertes por cáncer en los pacientes que tenían antecedentes de provenir de áreas endémicas para HACRE, se relacionaron a órganos respiratorios (Bergoglio, 1964).

Luego, varios estudios en Taiwán han mostrado elevado riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón, vejiga y riñón en la población expuesta. Se vio también que el riesgo de cáncer

para estos órganos aumenta con exposiciones mayores. Varios estudios en Taiwán han sugerido que el As podría estar relacionado con cáncer de esófago, estómago, intestino delgado, colon, nariz, laringe, hueso y próstata; linfoma y leucemia. En varios estudios se asoció elevada mortalidad por cáncer de hígado (angiosarcoma entre otros tumores) y exposiciones importantes a As en agua de bebida (Chen *et al.*, 1986; Chen y Wang, 1990). También se vio tasas aumentadas de cáncer de próstata con aumentos en la exposición a arsénico (Chen *et al.*, 1985). En 2004, la IARC realizó una revisión de los datos disponibles en humanos y animales y concluyó que había evidencia suficiente en humanos para afirmar que la exposición al arsénico en el agua de bebida causa cáncer de piel, pulmón y vejiga.

1.8 BIOMARCADORES

Se denomina biomarcadores a las sustancias usadas como indicadores de un estado biológico ellos pueden ser medidos y nos aportan datos sobre los cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que se presentan ante la presencia de un tóxico.

En sentido amplio, es posible definir un biomarcador como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (ENTOX/TIWET, 1996).

Los biomarcadores son una herramienta útil para medir por ejemplo la exposición ambiental a sustancias tóxicas. Se los utiliza para detectar exposición, consecuencias biológicas, estados iniciales e intermedio en enfermedades, identificar individuos sensibles de una población y encontrar asociaciones entre causa y efecto (Martínez Valenzuela y Gómez Arroyo, 2007).

Esta forma de evaluar el riesgo para personas expuestas tiene la desventaja de no considerar la variabilidad individual frente al agente tóxico, la existencia de períodos largos de latencia entre exposición y desarrollo de la enfermedad y la incapacidad de determinar la presencia del xenobiótico en forma instantánea. Es decir expresarían las alteraciones biológicas de procesos crónicos (Lauwerys, 1991).

La utilización de biomarcadores aporta datos significativos para evaluar los riesgos ambientales ya que permite detectar efectos tempranos en poblaciones expuestas y de esa manera actuar antes de que un efecto tóxico se manifieste. De esta forma la prevención se convierte en uno de sus principales objetivos.

Una de las limitaciones más importantes de los biomarcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña (Lauwerys, 1991).

Los biomarcadores pueden clasificarse en: de exposición, efecto y susceptibilidad (Silbergeld, 1998).

1.8.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Los biomarcadores de exposición evalúan la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre un xenobióticos y una molécula o célula diana en un determinado organismo.

Son guía para la biomonitorización en estudios ambientales y de salud ocupacional. Proporcionan datos sobre la concentración del tóxico en el medio biológico (Peña *et al.*, 2001)).

La matriz de detección de compuestos estables como por ejemplo metales puede ser, sangre, suero u orina. En el caso de las sustancias volátiles puede evaluarse su concentración en el aire espirado. Si el compuesto se metaboliza en el cuerpo, pueden elegirse uno o varios metabolitos como biomarcadores y suelen determinarse en muestras de orina. En caso de mutágenos o carcinógenos, se pueden detectar por la aparición de aductos con macromoléculas, como proteínas o ADN, reflejando una exposición primaria (Silbergeld, 1998).

Cuando el biomarcador es orina, la determinación de As total en esta matriz proporciona la mejor estimación de la dosis reciente de As ingerido. (Villaamil Lepori E. 2006)

Los biomarcadores de exposición indican presencia del tóxico o sus metabolitos pero no dan información del daño ocurrido.

En el caso del As, los biomarcadores de exposición actualmente disponibles son: la excreción urinaria de arsénico y la concentración en pelo y uñas, las concentraciones en sangre son generalmente transitorias.

La determinación de As total en pelo y uñas es indicador de una exposición anterior (Borgoño *et al.*, 1980) y está condicionado por la contaminación externa de las muestras.

1.8.1.1- Arsénico en orina

La concentración de arsénico total en orina ha sido utilizada como un indicador de la exposición reciente a Arsénico debido a que la orina es la principal vía de excreción para la mayoría de los compuestos arsenicales. La determinación de As inorgánico, ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsínico (DMA) proporcionan la mejor estimación de la dosis reciente de As ingerido.

La vida media del Arsénico inorgánico en humanos es de alrededor cuatro días. Las concentraciones de As urinario se correlacionan con la ingesta de As en el agua de bebida aunque estos valores pueden verse incrementados si se ha consumido alimentos marinos en los últimos tres días (Vahter, 2002; Ramírez, 2006). Debido a lo señalado es importante no ingerir este tipo de alimentos por lo menos 48 hs antes de su determinación.

El tipo de muestra requerida para la determinación de As es la primera orina de la mañana o una muestra ocasional en el caso de exposición por motivo laboral y se valorara As inorgánico ya que el As total daría una sobre estimación por la elevada presencia de compuestos organoarsenicales. El valor hallado en orina se expresa en relación a la concentración creatinina como manera de compensar el efecto de dilución.

El índice biológico de exposición al As inorgánico en el trabajador expuesto es <35 ug/g creatinina en muestra de orina de 24 horas, tomada al finalizar la semana laboral. En no expuestos, su valor varía alrededor de 5 ug/g creatinina (ACGIH, 2012).

En sujetos normales con dieta baja en productos marinos, el valor del As orgánico es <5 ug/24 h, pero luego de ingerir productos marinos puede llegar a 2 mg/24 hs (WHO, 2012).

1.8.1.2 Arsénico en pelo y uña

La exposición al As también puede ser medida por la presencia de este metaloide en pelo y uñas debido a la afinidad que el As posee con los grupos sulfhidrilos de la queratina que los tejidos del pelo y uñas poseen.

Los niveles de As en pelo pueden proveer información útil en el HACRE pero los resultados deben interpretarse con cuidado. Las muestras deben ser de al menos un gramo de pelo cortado cerca del cuero cabelludo y de varios sitios de la cabeza. La contaminación externa del pelo debe excluirse para poder utilizar las concentraciones de arsénico en pelo en el diagnóstico. El As ingerido y el procedente de la contaminación externa se unen fuertemente a la superficie externa del pelo y se requiere de técnicas muy complejas para su detección (Vahter, 2002). Los valores de As en pelo deben ser menores a 0.1mg As/100g (Suarez Sola *et al.*, 2004).

Los valores de referencia para As en uñas están en el rango de 0,02 a 0,5 mg/kg. Una única dosis de As puede ser detectada en la parte distal de las uñas hasta 100 días después de la exposición. Se cree que el arsénico se deposita en la raíz de las uñas desde la sangre y luego migra distalmente a medida que la uña crece 0,12 mm por día. (Hindmarsh *et al.*, 2002).

1.8.1.3 Arsénico en sangre

El Arsénico en sangre refleja una exposición muy reciente a este metaloide debido a su corta vida media. Solo puede encontrarse su presencia en este biomarcador durante las primeras horas de su ingestión (2- 4 horas).

Si la exposición es continua y estable, como cuando la fuente es el agua de bebida con alto contenido de este xenobiótico, el Arsénico alcanzará cierta estabilidad en la sangre (WHO, 2012).

Niveles sanguíneos menores a 7 ug/dl se consideran normales. (Suarez Sola *et al.*, 2004).

1.8.2 BIOMARCADORES DE EFECTO

Evalúan la alteración bioquímica, fisiológica o morfológica que se producen en el organismo asociadas a un determinado xenobiótico. Incluyen modificación en la composición celular de la sangre, cambios enzimáticos y daño en el material hereditario. Para el caso particular de los cambios producidos en la información genética presente en el ADN, desde 1985 a la fecha, la mayoría de los trabajos científicos, centran sus estudios en técnicas citogenéticas que incluyen como biomarcadores a: aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN) e intercambio de cromátidas hermanas (Albertini *et al.*, 2000).

El ensayo de aberraciones cromosómicas (AC) en células sanguíneas (Infocitos) detecta cambios en el número o estructuras de los cromosomas que son observadas al microscópico óptico. Es una técnica que puede ser utilizada para estimar el riesgo carcinogénico (Lucero *et al.*, 2000; Mateuca *et al.*, 2006),

Los micronúcleos (MN) se originan a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que quedan fuera del núcleo de la célula. Esta técnica es usada frecuentemente para la evaluación de exposiciones ocupacionales.

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) también es utilizado en investigaciones sobre monitoreo biológico de individuos expuestos a agentes genotóxicos potenciales o conocidos e implica el intercambio de fragmentos de ADN durante la replicación entre las cromátidas hermanas de los cromosomas (Larripa *et al.*, 1983). Es de alta sensibilidad frente a agentes que inducen cambios en el ADN aún a bajas concentraciones.

A partir del año 1990 se implementa el ensayo cometa (también llamado electroforesis en gel de células individuales) para medir daño en el ADN en células sanguíneas. La capacidad de migración del ADN frente a una corriente eléctrica depende de la cantidad de rupturas cromosómicas inducidas por el agente de exposición, de esta manera la célula dañada se visualizará como un cometa con cabeza y cola brillante mientras que la célula no dañada aparece como un núcleo intacto sin cola (Kassie *et al.*, 2000). Esta técnica puede ser

efectuada también en células bucales, nasales y de epitelio de vejiga siendo para muchos de elección en el estudio de poblaciones expuestas a metales, plaguicidas y radiaciones.

Las técnicas citogenéticas antes descriptas pueden ser usadas también como medidas de exposición. (Souza, 2007).

A su vez, estudios recientes proponen que las pruebas neuro-conductuales servirían para valorar los efectos en el sistema nervioso central por la exposición a tóxicos ambientales y la presencia de factores socioculturales adversos. Una ventaja de estas pruebas es que los cambios neuro-conductuales sub-clínicos pueden ser definidos como indicadores tempranos de los efectos de contaminantes ambientales sobre la función nerviosa, pero aún no se utilizan para el diagnóstico de Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico HACRE.

1.8.3 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la sensibilidad individual frente a un xenobiótico. Algunos individuos tienen mayor probabilidad que otros de desarrollar patologías asociadas a determinados agentes (Albertini *et al.*, 2000).

La mayoría de las investigaciones que usan estos marcadores estudian la predisposición genética de determinados grupos poblacionales, sin embargo hay otros factores como los fisiológicos o ambientales que constituyen mecanismos de respuestas frente a la exposición a determinada sustancia.

Según las variantes génicas (polimorfismos) que un individuo posea, tendrá mayor o menor susceptibilidad frente a sustancias con potencial genotóxico. El genotipo es responsable de las diferencias interindividuales en la capacidad o habilidad de activar o desintoxicar sustancias genotóxicas. Se han sugerido muchas isoformas enzimáticas (diferentes formas de una misma proteína) que pueden contribuir en los individuos a modificar su susceptibilidad contra el riesgo de contraer cáncer después de la exposición a agentes genotóxicos (Bolognesi, 2003).

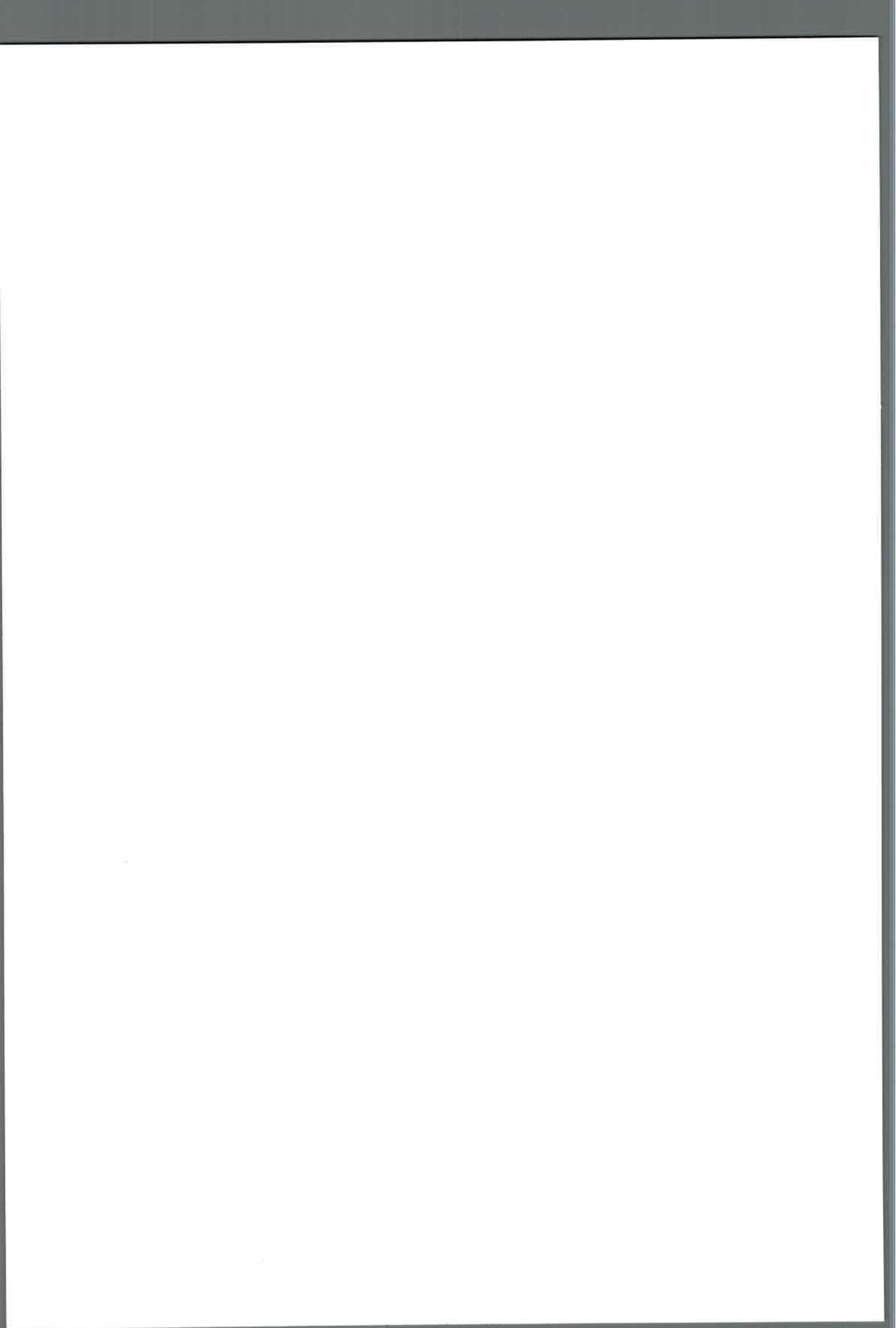
Los biomarcadores de susceptibilidad son usados fundamentalmente para determinar grupos de riesgo.

1.9 ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD

1.9.1 Ensayo de micronúcleos en sangre

El ensayo de micronúcleos en sangre es una técnica citogenética ampliamente utilizada para el monitoreo ambiental en estudios con plantas y animales sensibles a la exposición a distintos contaminantes. También es de gran aplicación en líneas de investigación sobre mutagénesis, para conocer *in vitro* el efecto genotóxico de nuevos agentes químicos a nivel ambiental y sanitario como lo indica la utilización de nuevas drogas citostáticas (inhibidores del desarrollo y división de las células) en los tratamientos antitumorales (Zalacain *et al.*, 2005). Por ejemplo se ha comprobado que la exposición reiterada a agentes citostáticos, como la Vincristine, puede inducir daños genéticos y alterar mecanismos de división, y por lo tanto incrementar de modo significativo el número de MN (Hongping *et al.*, 2006).

Este ensayo tiene la ventaja de poder realizarse por medio de un procedimiento de relativa rapidez, sencillez y bajo costo que permite trabajar con distintas líneas celulares, sanguíneas, epiteliales y otras, pudiendo detectarse así exposición tanto a agentes clastogénicos como aneugénicos (Neri *et al.*, 2003; OECD, 2004; Zalacain *et al.*, 2005). Tiene el inconveniente de presentar, elevada variabilidad intra e interindividual que puede crear problemas a la hora de interpretar resultados en estudios poblacionales, la persistencia relativamente baja de los MN en las células con alto índice de división, ya que los micronúcleos provienen de aberraciones cromosómicas inestables y por lo tanto tienden a perderse con el tiempo, y la existencia de diferentes factores de confusión (edad, sexo, estilo de vida, estado de salud, etc.) (Pastor, 2002). El sexo y la edad pueden claramente afectar la frecuencia basal de micronúcleos en cultivos de linfocitos. Estos efectos son principalmente debidos al contenido de cromosomas sexuales X e Y en los micronúcleos. Por ejemplo, se ha observado un mayor predominio de cromosoma X en micronúcleos en mujeres y un aumento del mismo en relación con la edad (edad-dependiente) (Norppa y Falck, 2003). El déficit de folato y vitamina B12, así como la presencia de homocisteína en



plasma, también están asociadas con un incremento en la frecuencia de micronúcleos (Albertini *et al.*, 2000).

La técnica de MN fue propuesta por primera vez por Heddle (1973) y fue desarrollado en medula ósea de ratones. Posteriormente fue adaptada para ensayos con linfocitos *in vitro* por Febech y Morley (1985) y optimizada por Fenech en el 2000. Ellos introducen una modificación a la técnica mediante la cual se frena la división celular en el momento en que la célula ha sufrido una sola división mitótica. Para ello desarrollaron el bloqueo de la citocinesis por medio de la citocalacina-B, aislada del hongo *Helminthosporium dematoidium*, que inhibe la polimerización de la actina y de esta manera la formación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en la telofase mitótica. No se ven afectadas las fibras del huso ni la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas que han sufrido una sola división nuclear (Zalacain *et al.*, 2005).

En este ensayo se utilizan tejidos en constante división, eritrocitos de la medula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación vaginal, como así también en tejidos como las células formadoras de polen y los meristemos apicales de raíz y tallo en el caso de plantas (Zúñiga Gonzales y Gómez Meda, 2006). En humanos, los tipos celulares utilizados son los linfocitos de sangre periférica y las células epiteliales de la mucosa bucal, nasal o urotelial (Norppa y Falck, 2003; Martínez *et al.*, 2005).

Los micronúcleos son cuerpos cromatínicos esféricos, detectados en interfase, más pequeños (0,4 a 1,6 micras) y morfológicamente idénticos al núcleo celular (Fig. 7).



Fig. 7 - Célula binucleada con presencia de micronúcleo
Fenech et al., 2003.

Se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que espontáneamente o por causas de diferentes agentes genotóxicos quedan retrasados en la anafase y por lo tanto fuera del núcleo durante la mitosis (Norppa y Falck, 2003). Después de la telofase, los cromosomas normales, dan origen a los núcleos de las células hijas, mientras que, los elementos rezagados, rodeados de membrana celular, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas transformándose en uno o varios núcleos secundarios (micronúcleos) (Zúñiga Gonzales y Gómez Meda, 2006). Es importante destacar que se requiere una división celular después del daño para que se formen y puedan ser visualizados (Fenech y Morley, 1985). Por lo tanto la utilización de la técnica de MN con bloqueo de citocinesis por el agregado de citocalasina-B garantiza el recuento de MN en células que se dividen y que han completado su primer ciclo de división celular, fácilmente reconocible por su aspecto binucleado (Di Giorgio et al., 1995) (Fig. 8).

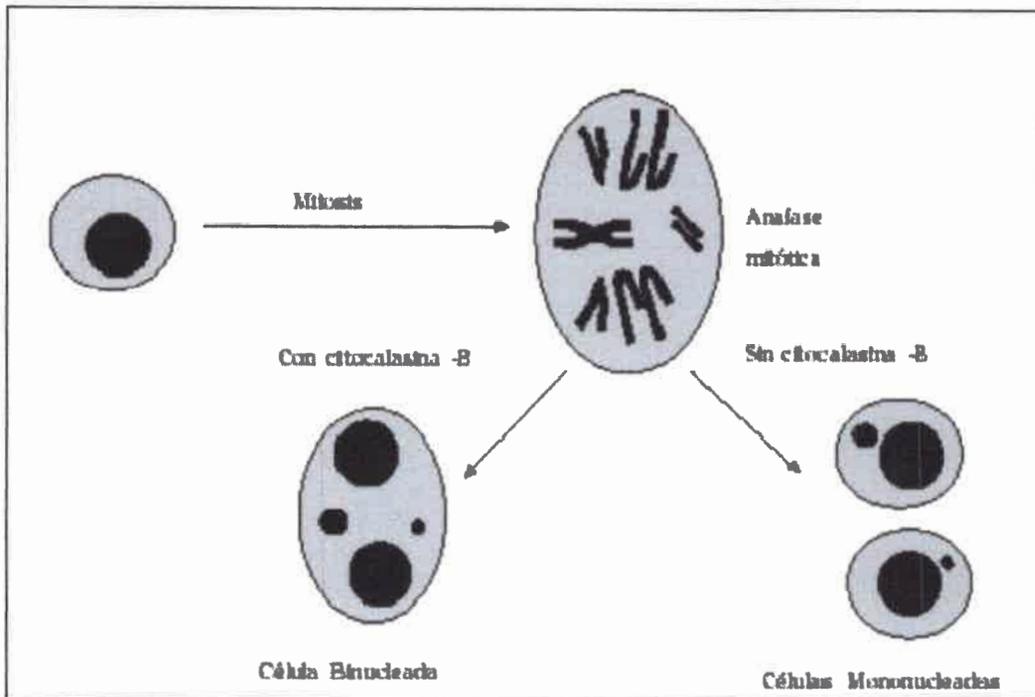


Fig. 8. Formación de micronúcleos debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntricos en anafase mitótica. El esquema muestra el bloqueo con citocalasina-B y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas con pérdida cromosómica, siendo imposible diferenciar si se trata de células madres o hijas.

Zalacain et al., 2005.

El ensayo de MN es una técnica que ha sido validada a nivel mundial y es considerada un biomarcador efectivo del daño al ADN. En el año 1999 se creó un proyecto internacional de MN humanos (HUMN: *HUMAN MicroNucleus Project*) diseñado por Michel Fenech y Stefano Bonassi con el objeto de recopilar frecuencias basales de MN en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo. El principal objetivo fue identificar las fuentes de variabilidad, las distintas técnicas utilizadas para definir protocolos estándares, realizar estudios prospectivos de los diferentes laboratorios e intentar una asociación con enfermedades por ejemplo cáncer. (Fenech M *et al* 1999) (Bonassi S *et al* 2001)

En nuestro país el biomonitoreo genotóxico de personas laboralmente expuestas a químicos se limitan a estudios efectuados en la provincia de Buenos Aires (Larripa et al., 1983; Dulout et al., 1985; Dulout et al., 1987), Capital Federal (Hagelstrom et al., 1995), Santiago del Estero (Gorla et al., 1988, 1989), y en Córdoba los primeros reportes de biomonitoreo genético por exposición a solventes son los realizados por Aiassa et al. (2005), y en plaguicidas por Peralta *et al.* (2007; 2011), Mañas *et al.*, (2009), López *et al.*, (2012) y Gentile *et al.*, (2012).

1.9.2 Ensayo de Micronúcleos en mucosa bucal

El estudio de las células epiteliales que se desprenden de la mucosa constituye un medio importante para el diagnóstico de diferentes patologías. Este procedimiento denominado citología exfoliativa es útil para el diagnóstico, la prevención y el monitoreo de distintos eventos. Una de las utilidades de la citología exfoliativa es el ensayo de MN.

Las células epiteliales de la mucosa bucal es el lugar donde se dan los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al organismo por vía inhalatoria y oral. Se sabe que el 90% de las patologías cancerígenas se manifiestan en células epiteliales (Rosin, 1992)

En este tejido se produce una renovación continua de células que provienen desde la capa basal. Estas células se reproducen por mitosis y migran a la superficie para reemplazar a las que se desprenden. En la capa basal se encuentran las células madre que pueden expresar el daño genético (rotura o pérdida cromosómica) como los MN durante la división nuclear. Las células hijas, que pueden o no contener MN, finalmente se diferencian en la capa espinosa y la capa superficial queratinizada. A continuación exfolian en la cavidad bucal. Algunas de estas células puede degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados (células con cariorrexis), núcleos picnóticos, o pueden perder por completo su material nuclear (cariolisis).

El ensayo de MN en mucosa bucal es un método poco invasivo, sencillo y rápido si se lo compara con aquel que usa muestras de sangre (linfocitos) para medir daño en el ADN por tanto lo ubica como un buen biomarcador.

El ensayo de MN en células bucales exfoliadas se propuso por primera vez en 1983 y sigue siendo usado como biomarcador de daño genético para el estudio de lesiones cancerosas y precancerosas y para monitorizar el efecto de numerosos agentes químicos (Stich *et al.*, 1984; 1989).

El ensayo de MN también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de MN (Lucero *et al.*, 2000; Aiassa *et al.*, 2012; Bernardi *et al.*, 2015

CAPITULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CAPITULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Las personas expuestas al Arsénico en agua de bebida de manera crónica, muestran mayores concentraciones de este elemento en orina y un mayor daño en su material genético.

2. 1 Objetivo General

Determinar la integridad del material genético y potenciales alteraciones bioquímicas en sangre y orina, en personas expuestas de manera crónica al Arsénico.

2. 2 Objetivos Específicos

1. Determinar la concentración de Arsénico total en muestras de agua de bebida en localidades de la Provincia de Córdoba (Sampacho, Las Vertientes, Río Cuarto)
2. Determinar la concentración de Arsénico total en orina de pobladores de las localidades donde se determine la concentración de As en agua de consumo
3. Evaluar el grado de genotoxicidad causado por el Arsénico en los pobladores a los cuales se les determinó la concentración de As en orina
4. Determinar parámetros bioquímicos en sangre de pobladores de las localidades donde se valore la concentración de As en agua de consumo

CAPITULO III – MATERIALES Y MÉTODOS

CAPITULO 3- MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

Equipos, instrumental

- Baño termostático modelo Masson (Vicking).
- Cámara de Neubauer (Biotraza)
- Cámara fotográfica digital Sony Cyber shot X
- Centrífuga (Arcano)
- Espectrofotómetro (Metrolab 1600)
- Estufa de cultivo (Gallenkamp) con temperatura regulable
- Estufa de secado de material de vidrio (Dalvo)
- Freezer con temperatura regulada (-20° C)
- Heladera
- Marcador de vidrios
- Microscopio óptico Zeiss, modelo Laboval X
- Micropipetas de volumen fijo y regulable
- Notebook Samsung

Insumos

- Agujas 0,8 por 25 mm (Terumo)
- Algodón hidrófilo
- Colectores estériles para orina
- Erlenmeyers de 250 y 500 ml
- Gradillas
- Guantes de latex (Coronet)
- Hisopos estériles
- Jarras Coplin
- Jeringas plásticas de 1 y 10 ml (Terumo)

- Matraces de 100 y 500 ml
- Papel aluminio y papel para enmascarar
- Pipetas Pasteur descartables
- Portaobjetos
- Probeta de 100 y 1000 ml
- Recipientes plásticos para coleccionar agua.
- Tips para micropipetas
- Tubos de polipropileno con tapa rosca de 15 ml
- Tubos de Khan de vidrio
- Tubos estériles de polipropileno de 15 ml con tapa a rosca.
- Vasos de precipitado de 100 y 500 ml

Reactivos, soluciones

- Acido Acético (Cicarelli)
- Acido Nítrico (Merck)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Agua destilada
- Bialcohol de uso medicinal (Porta)
- Citocalasina B (Sigma)
- CIK 0.075 M
- Diliyente para recuento de plaquetas- Biopur-Diagnostic
- Fitoheмоaglutinina M (GIBCO)
- Giemsa. Solución stock- Biopur
- Kit para bilirrubina-colorimétrica- Wiener-lab
- Kit para FAL –Fosfatasa Alcalina optimizada-Wiener-lab
- Kit para GPT (ALT) UV unitest- Wiener-lab
- Kit para GOT(AST) UV unites-Wiener-lab
- Heparina sódica (Abbott)
- Medio de Cultivo RPMI 1640 (GIBCO)
- Metanol, calidad p.a. (Merck)

- Solución fisiológica (CINa 0,9%) (Cicarelli)
- Suero Fetal Bovino- FBS (NATOCOR)

3.2 METODOS

Este trabajo es un estudio descriptivo de corte transversal de carácter exploratorio.

3.2.1 DETERMINACIÓN DE As EN AGUA

Para la determinación de As en agua de consumo se tomaron 20 muestras en domicilios de las localidades de Sampacho, Las Vertientes y Río Cuarto, en recipientes de polietileno estériles.

Las localidades se eligieron tomando como base aquellas donde existe por parte de sus pobladores, una percepción de daño sobre la salud humana causado por el agua de consumo.

Las muestras se tomaron en recipientes de plástico de 200 ml y se transportaron al laboratorio el mismo día de su recogida. Una vez en el laboratorio, se filtraron (MFS -13 0.45 μ m, Advantec MFS, Inc.), y se conservaron refrigeradas (5°C) hasta su análisis, antes de 48 h desde la fecha de recolección.

La determinación del elemento químico fue realizado por el método colorimétrico cuantitativo- Arsénico-AQAssay- GT lab.

Dicho método consiste en una reducción del As inorgánico a arsina y la reacción de la misma con una solución pirídica de dietilditiocarbamato de plata, generando un complejo rojizo, cuya intensidad de color fue medida espectrofotométricamente a 530 nm.

3.2.2 POBLACIÓN

La población seleccionada fue de 20 individuos en total con residencia en los lugares donde se tomaron muestras de agua de Sampacho, Las Vertientes y zona peri-urbana de la ciudad de Río Cuarto.

El tamaño de la muestra se eligió de acuerdo con Preston y Hoffmann (2008) que sugieren que “grupos de estudio de 20 o más individuos pueden ser un razonable sustituto de la concordancia exacta porque los factores de confusión tendrán menor influencia sobre la alteración cromosómica o la mutación”.

El análisis de los biomarcadores se realizó para la totalidad de la muestra (n=20) y también se dividió en dos grupos de acuerdo con la concentración de As en agua. El primer grupo correspondió a personas expuestas al consumo de agua con una concentración de As entre 0,010 y 0,025 mg/l, superando el límite establecido por la OMS de 0,010 mg/l. El segundo grupo incluye los individuos que tuvieron una exposición al As mayor a 0,025 mg/l.

El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética (CIEIS) de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba.

En todos los casos se realizó un cuestionario que comprendía preguntas sobre demografía (edad, sexo, lugar de residencia) otras relacionadas con el historial médico (enfermedades, síntomas que persisten, malformaciones, intoxicaciones). El objetivo de la encuesta fue detectar cualquier factor que pueda crear confusión en los resultados obtenidos (ver Anexo III). Los participantes también firmaron un consentimiento informado (ver Anexo II), donde manifestaban acceder voluntariamente a participar del proyecto bajo los procedimientos éticos estándares, y se les entregó una hoja de “información para participantes” (ver Anexo I) donde se detallan los objetivos, metodologías, beneficios, riesgos y tratamiento de confidencialidad de los datos.

La investigación fue socializada por el grupo de investigación a través de charlas informativas abiertas a la comunidad.

Quedaron excluidos todos los individuos que presentaron síntomas clínicos que pudieran estar relacionados con HACRE.

3.2.2.1 Obtención de la muestra de sangre

La toma de muestra se llevó a cabo en los domicilios particulares, por medio de la extracción de 10 ml de sangre periférica a individuos entre 20 y 65 años de edad. Se efectuó por medio de veno punción con jeringa y agujas estériles.

El material obtenido se distribuyó de la siguiente manera: 2 ml de sangre se anticoagularon con EDTA para el recuento de plaquetas, 3 ml fueron destinados a la obtención del suero correspondiente para las determinaciones enzimáticas y el resto se lo heparinizó para los respectivos cultivos celulares. Las muestras fueron llevadas a la Universidad Nacional de Río Cuarto inmediatamente para ser procesadas a la brevedad.

3.2.2.2 Obtención de la muestra de mucosa bucal

Las muestras de células epiteliales de la mucosa bucal se realizaron frotando el interior de ambas mejillas durante 30 segundos utilizando hisopos estériles. El material obtenido se colocó en un tubo cónico con 6 ml de solución fisiológica. Este procedimiento se llevó a cabo en la totalidad de los individuos participantes en este estudio.

3.2.2.2 Obtención de la muestra de orina

Las muestras de orina se solicitaron a cada participante recolectada en envase de plástico nuevo estéril tratado previamente con ácido nítrico al 25 % durante 10 hs y enjuagado con agua destilada. La orina se acidificó con 5 ml de ácido nítrico p.a. concentrado. Se analizó según la técnica indicada en el ítem biomarcadores.

3.2.3 MARCADORES BIOQUIMICOS DE EXPOSICIÓN A As

Se determinaron seis parámetros bioquímicos para monitorear la exposición al As.

a) **Recuento de plaquetas:** El método utilizado para esta determinación fue el recuento en cámara de Neubauer. Se procedió al llenado de la pipeta de Thoma hasta la marca de 1 con sangre anti coagulada y luego se llevó a 101 con el líquido diluyente (oxalato de amonio) obteniéndose una dilución 1:100.

Luego de mezclar debidamente la pipeta se procedió al llenado de la cámara de Neubauer desechando las primeras 2 gotas. Se dejó la cámara en reposo cubierta por una cápsula de Petri y en un medio húmedo durante 10-20 minutos para permitir que las plaquetas sedimenten. Pasado este tiempo y por medio del microscópico óptico se procedió al conteo de 25 cuadrados de la cuadrícula central de la cámara

El número de plaquetas/ μ l se obtuvo multiplicando el n° obtenido x el factor de dilución (100) x la corrección del volumen (10).

b) Determinación de Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT)

La determinación de la enzima GOT fue realizada por el método cinético.

El Kit comercial para esta determinación está provisto de dos reactivos:

- Reactivo A: Viales conteniendo 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH).
- Reactivo B: solución de buffer TRIS pH 7,8 (a 30° C) con L-aspartato.

Se reconstituyó el vial A con 2 ml del reactivo B hasta su total disolución

Luego se le agregó 100 μ l del suero problema a 1 ml del contenido del vial y se realizó la lectura en un autoanalizador Metrolab 1600.

c) Determinación de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT)

La determinación de la enzima GPT fue realizada por el método cinético.

El Kit para esta determinación está constituido por dos reactivos:

- Reactivo A: Viales conteniendo 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y lactato deshidrogenasa (LDH).
- Reactivo B: solución de buffer TRIS pH 7,5 (a 30°C) conteniendo L-alanina.

En primer lugar se reconstituyó el vial A con 2 ml de reactivo B hasta su total disolución.

Luego se le agregó 100 µl del suero problema a 1 ml del contenido del vial y se procedió a la lectura en un autoanalizador Metrolab 1600.

d) Fosfatasa Alcalina (FAL)

La FAL se determinó por método colorimétrico

Reactivos provistos por el Kit:

- Reactivo A: 4-aminoantipirina 29 mmol/l en solución de amino-metil-propanol 3 mol/l.
- Reactivo B: Fenilfosfato de sodio, 1,4 mmoles.
- Reactivo C: Ferricianuro de potasio, 10 mmol/l.
- Standard: Solución de fenol equivalente a 200 UI/l.

Se preparó el reactivo de trabajo A transfiriendo el contenido del frasco del Reactivo B directamente en el frasco de Reactivo A y mezclándolo hasta disolución completa. El reactivo C se preparó disolviendo el contenido del envase en 500 ml de agua destilada. El Standard se presentó listo para usar.

Se procedió de la siguiente manera: En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) se colocó 0,25 ml de reactivo de trabajo A se preincubó en baño de agua a 37° C unos minutos. Luego se agregaron 50 µl de Estándar en el tubo S y 50 µl de suero en el tubo D. Se incubó exactamente 10 minutos y se agregó 1,25 ml de reactivo C mezclando inmediatamente cada tubo. Se retiraron los tubos del baño y se leyeron en Metrolab 1600.

e) Bilirrubina total y directa

Las bilirrubinas total y directa fueron valoradas por método colorimétrico

Reactivos provistos por el Kit:

- Acelerador: Solución acuosa de cafeína: 257 mmol/l, benzoato de sodio: 510 mmol/l, acetato de sodio: 860 mmol/l.
- Sulfanílico: Acido sulfanílico: 13 mmol/l en HCl: 0,18 mmol/l. Nitrito: nitrito de sodio: 72 mmol/l en solución acuosa.
- Reactivo Diazo: Se prepara mezclando 20 partes del reactivo Sulfanílico y una parte del reactivo Nitrito. (Ej: 1 ml y una gota ó 50µ).
- Estándar: Vial conteniendo 500 µg de bilirrubina (provisto separadamente) y frasco con Solución Disolvente.

En tres tubos marcados como B (Blanco), D (Directa) y T (Total) se colocó 200 µl de suero problema, se agregaron 2,5 ml de agua destilada a los tubos A y D y 2,5 ml del acelerados al tubo T, 0,2 ml de Sulfanílico al tubo B Y 0,2 ml del reacticvo Diazo a los tubos D y T. Se mezcló por inversión y se dejo reposar a temperatura ambiente. A los 5 minutos se leyó el tubo D y a los 15 minutos el tubo T en Metrolab 1600.

Todos estos parámetros fueron considerados como asociados al daño hepático,

f) Determinación de As en orina

La determinación de As total en orina se realizó por absorción atómica, como medida de excreción renal, con un espectrofotómetro de absorción atómica, modelo AA 475, Varian.

3.2.4 MARCADORES DE GENOTOXICIDAD

3.2.4.1. Ensayo de micronúcleos en sangre periférica

El ensayo de Micronúcleos en sangre periférica se llevó a cabo de acuerdo a la técnica validada para este test *in vitro* (Fenech y Morley, 1985) optimizado por Fenech (2000).

Se efectuó un cultivo celular de linfocitos humanos durante 72 horas a 37°C de acuerdo a los métodos convencionales (Moorthead *et al.*, 1960) con modificaciones. Se trabajó en esterilidad, bajo campana previamente limpia con alcohol al 70%, lavandina 20% y una exposición a luz UV de 30 minutos. Ocho gotas de sangre heparinizada (aproximadamente 0,5 ml) fueron suspendidas en 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640 GIBCO, suplementado con 1 ml de suero bovino fetal NATOCOR, empleando frascos estériles. Las células fueron estimuladas a entrar en mitosis mediante el agregado de 0,15 ml de fitohemaglutinina M GIBCO. A las 44 horas de cultivo se le agregó a cada tubo, 0,15 ml de Citocalasina B (SIGMA) a una concentración de 5 µg/ml para evitar la citocinesis. A las 72 horas de incubación (28 horas después del agregado de citocalasina B) se transfirieron los cultivos a tubos cónicos de polipropileno para ser centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm. Una vez obtenida la separación de las células que quedaron retenidas en el pellet dentro del tubo de centrifuga, se descartó el sobrenadante, el cual fue sustituido por solución hipotónica de CLK 0,075M (5,592 gramos por litro), homogeneizando cuidadosamente el contenido a fin de provocar el shock osmótico celular y dejando incubar por 2-3 minutos a 4°C. Luego los tubos se centrifugaron nuevamente y esta vez el sobrenadante fue reemplazado por una solución de Metanol y Acido Acético en una proporción de 3:1, homogeneizando las células separadas por centrifugación con el fijador, con el cual permaneció en contacto al menos 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se renovó el fijador al menos 2 veces, repitiendo el procedimiento.

Finalmente, se procedió al preparado de los extendidos. Usando portaobjetos nuevos se procedió a gotear (aproximadamente tres gotas por extendido) sobre su superficie. Una vez secos los portaobjetos, se los identificó y se realizó la coloración con una solución de Giemsa al 10% durante 10 minutos.

3.2.4.2 Análisis de células al microscopio óptico

Se determinó la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (CBMN) y número total de micronúcleos en linfocitos (MNL), analizando 1000 células binucleadas por cada uno de los dadores. Para ello se aplicaron los criterios establecidos para la selección de

células binucleadas y de micronúcleos en cultivos celulares humanos (OECD, 2004) (Tabla 1).

Tabla 1.- Criterios para considerar una células binucleadas y micronúcleos

Células binucleadas

- El citoplasma debe distinguirse claramente
- La membrana citoplasmática y nuclear deben estar intactas
- Los núcleos deben tener similar grado de condensación de la cromatina
- Deben ser de igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de coloración
- Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos
- Pueden tocarse pero no solaparse
- Ninguno de los núcleos deben encontrarse en etapa de apoptosis.

Micronúcleos

- El diámetro debe oscilar entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
- No deben ser refractarios
- La intensidad de tinción debe ser similar a la de los núcleos principales
- La forma debe ser similar a los núcleos de la célula binucleada
- No pueden estar conectados con ninguno de los núcleos de la célula
- Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse

3.2.4.2 Ensayo de micronúcleos en mucosa bucal

El ensayo de micronúcleos en mucosa bucal se realizó según Tolbert *et al.* (1992) con modificaciones. El material obtenido del hisopado bucal que se encontraba en solución fisiológica se centrifugó durante 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 6 ml de Metanol-Ácido Acético 3:1. Después de mezclar el material fue centrifugado en las mismas condiciones por tres veces.

Resuspendido el sedimento se dejó gotear en un portaobjeto nuevo, limpio. El extendido se secó al aire libre y fue coloreado en vasos de Coplin con Giemsa diluido en agua 1:10 por espacio de 10 minutos. Luego de ser lavados con agua corriente los preparados se dejaron secar al aire libre y fueron observados en microscopio con un aumento de 40X. El recuento de micronúcleos se efectuó en 1000 células epiteliales por extendido.

3.2.4.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Análisis estadístico: los datos de la historia clínica-ambiental y los marcadores bioquímicos se analizaron usando estadísticas descriptivas (frecuencias y porcentajes). El test de Kolmogorov-Smirnov se realizó para determinar la distribución normal de los datos de los marcadores de genotoxicidad y, posteriormente, la prueba t-test de Student ($P < 0,05$), utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.02.

CAPITULO IV- RESULTADOS

CAPITULO 4 - RESULTADOS

La concentración de As total en las muestras de agua analizadas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de As en muestras de agua de diferentes localidades de la Provincia de Córdoba

Muestra n°	Código/procedencia	Concentración de As en agua (mg/l)
1	S 1/Sampacho	0,061
2	S 2/Sampacho	0,023
3	S 3/Sampacho	0,023
4	S 4/Sampacho	0,022
5	S 5/Sampacho	0,023
6	S 6 /Sampacho	0,023
7	S 7/Sampacho	0,022
8	S 8/Sampacho	0,022
9	LV 1/Las Vertientes	0,025
10	LV 2/Las Vertientes	0,025
11	LV 3/Las Vertientes	0,027
12	LV 4/Las Vertientes	0,027
13	LV 5/Las Vertientes	0,025
14	LV 6/Las Vertientes	0,025
15	LV 7/Las Vertientes	0,023
16	LV 8/Las Vertientes	0,023
17	LV 9/Las Vertientes	0,028
18	RC 1/Río Cuarto	0,250
19	RC 2/Río Cuarto	0,250
20	RC 3/Río Cuarto	0,250

El valor promedio encontrado en las muestras analizadas es de $0,060 \pm 0,018$ mg/l (Media \pm error estándar) variando entre 0,022 y 0,25mg/l estos valores superan el valor permitido por

la OMS para agua de bebida aunque 16 muestras están dentro del rango permitido para la Provincia de Córdoba 0,05mg/l, solo las muestras n° 1, 18,19 y 20 superan ese límite.

Las afecciones que relatan los participantes y el tiempo de exposición se muestran la tabla 2.

Tabla 2. Sexo, edad, tiempo de residencia en el domicilio y afecciones relatadas por los participantes

Participante n°	Sexo	Edad	Tiempo de residencia en el domicilio (años)	Afecciones relatadas por los participantes
1	F	28	4	Caída de Cabello
2	F	34	2	Problemas en la piel
3	F	36	20	Caída de Cabello
4	F	33	18	Ninguno
5	F	54	20	Problemas en cabello y piel
6	F	59	15	Caída de Cabello
7	F	64	39	Ninguno
8	F	32	3	Ninguno
9	F	40	8	Caída de Cabello
10	M	35	8	Ninguno
11	F	54	48	Ninguno
12	M	56	48	Ninguno
13	F	48	22	Caída de Cabello
14	M	27	22	Caída de Cabello
15	F	54	20	Problemas en la piel
16	F	23	21	Caída de Cabello
17	F	56	31	Caída de Cabello
18	F	34	6	Ninguno
19	F	64	15	Caída de Cabello
20	M	36	15	Caída de Cabello

La edad promedio de los participantes es 43,35 años (2,945= error estándar) con un tiempo de residencia en la localidad de $19,25 \pm 3,026$ años, entre 2 y 48 años.

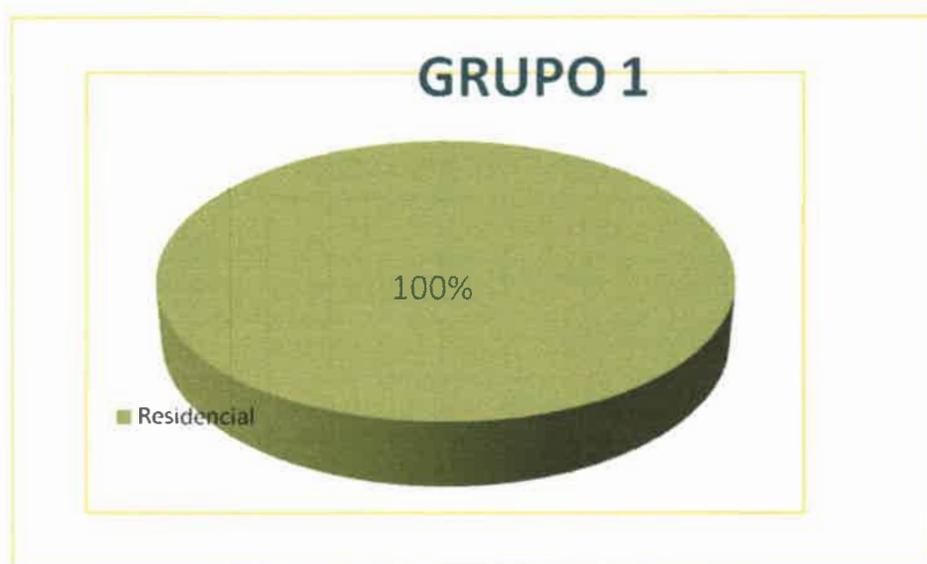
Los individuos estudiados (n= 20; 16 mujeres y 4 varones) utilizan el agua analizada para cocción de alimentos e higiene.

Los resultados obtenidos se organizaron en dos grupos de acuerdo con los valores de la concentración de As obtenidos, según superaran el nivel sugerido por la OMS y por el Código Alimentario Argentino (0,01 mg/l) hasta la media del valor permitido para la Provincia de Córdoba (0,050mg/l) y los demás que superan el último valor.

Si las muestras se dividen en los dos grupos antes mencionados, los valores encontrados son 0,023 y 0,090 mg/l respectivamente, no observando diferencias estadísticas significativas en ambos ($P < 0.05$).

El cuestionario socio-ambiental arrojó los siguientes datos:

- ✓ El 100 % de los individuos del Grupo 1 habitan en zonas residenciales y de los integrantes del Grupo 2, el 63.63 % lo hace en zona residencial mientras que el 36.36 % de los restantes habitan en zonas peri-urbanas (Fig. 9).



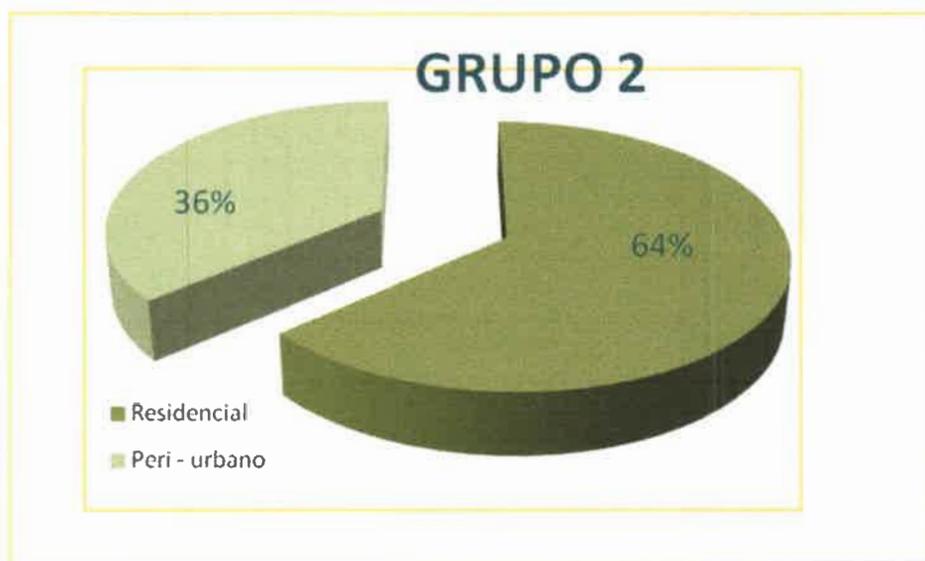


Fig. 9- Tipo de zonas donde viven los participantes del estudio

- ✓ En cuanto al tipo de actividades que se desarrollan en el lugar de residencia para el grupo 1 se encontró que un 88.88% correspondía a actividades comerciales y 11.11% a agropecuarias mientras que para el Grupo 2 el 63.63 son comerciales, el 18.18% agropecuarias y 18.18 % sin actividades (Fig. 10).





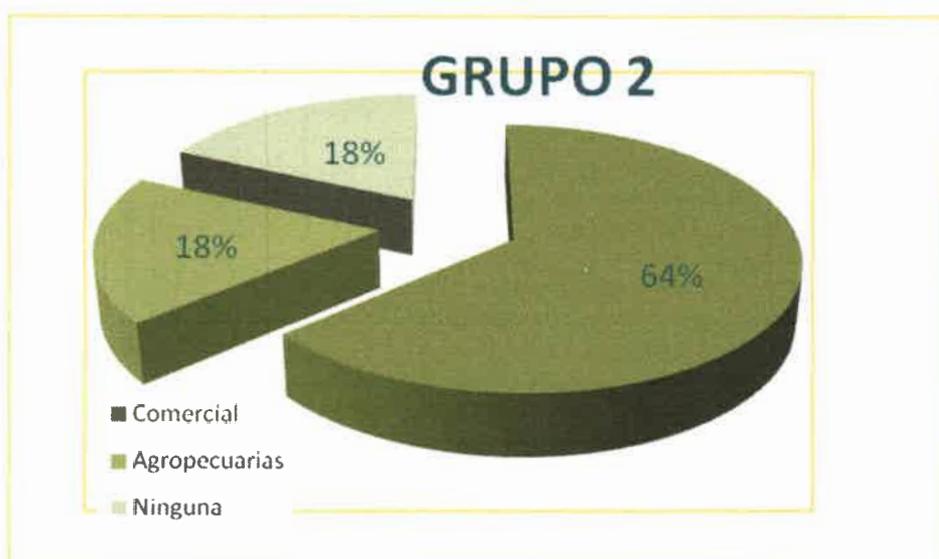
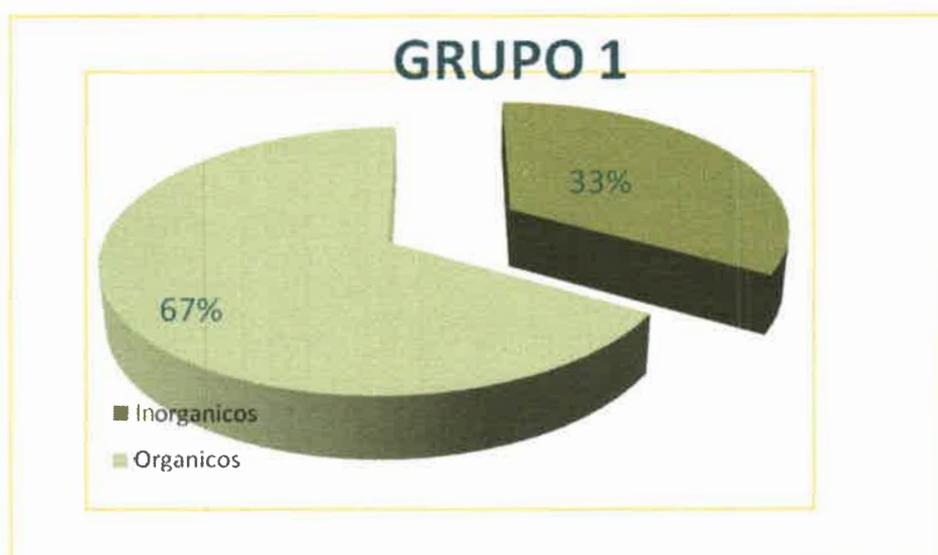


Fig. 10. Tipo de actividades que realizan los participantes del estudio

- ✓ En cuanto al tipo de tóxico, el cuestionario se limitó a los de tipo orgánicos e inorgánicos. En el Grupo 1: el 33.33% de los participantes consideran que son contaminantes de tipo inorgánicos y 66.66% contaminantes de tipo orgánicos, mientras que para el Grupo 2 el 55% considera contaminación inorgánica, el 27 % orgánica y el 18% no sabe identificarlos. (Fig. 11).





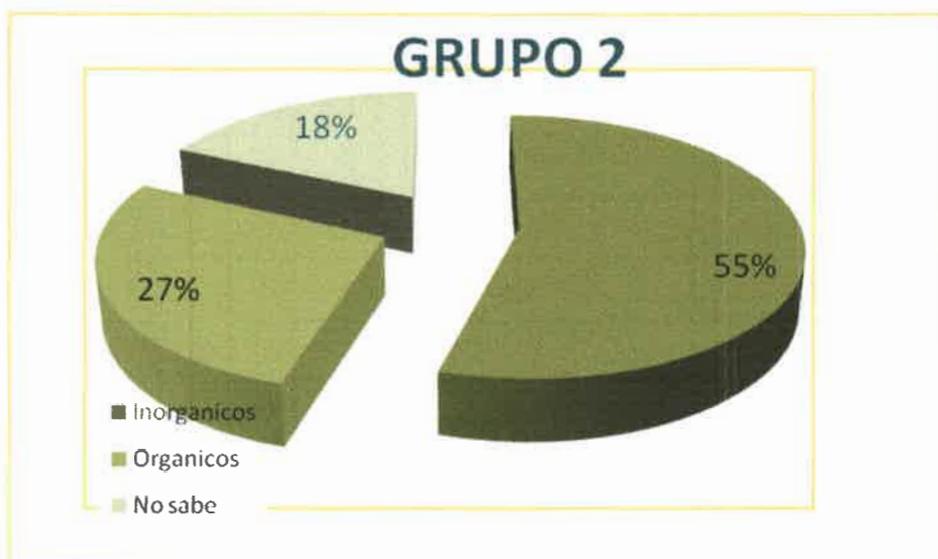


Fig. 11. Tipo de contaminación considerada por los participantes.

- ✓ Los individuos participantes fueron interrogados respecto al origen de la contaminación atribuyendo los del Grupo 1 en un 33% a agroquímicos el 11% a un criadero de cerdos cercano y en un 56% manifestaron no saber. Para el Grupo 2 el 45.45% lo atribuyo a agroquímicos un 27.27% al agua, el 9.09 % a un criadero de cerdos cercano y un 18.18% dijo no saber (Fig. 12).

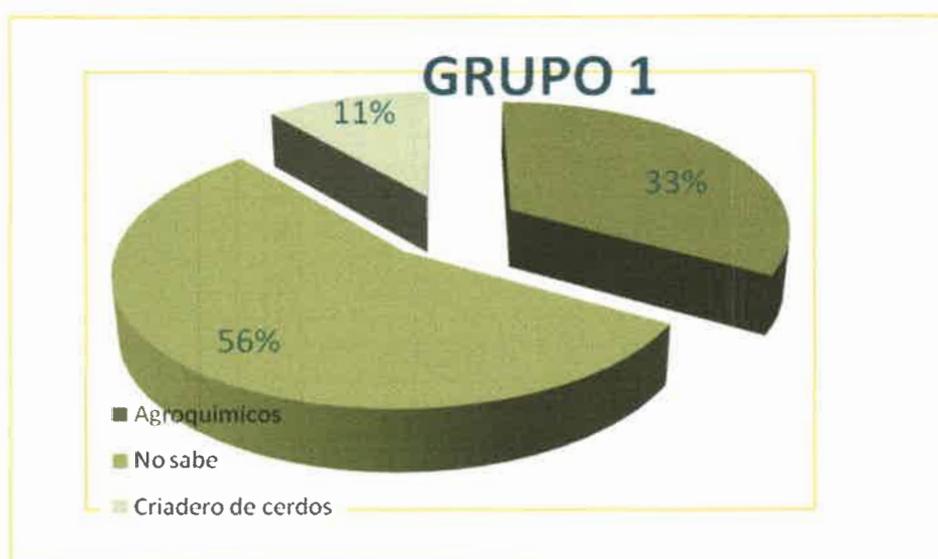




Fig. 12. Agentes que consideran los participantes como la causa de la contaminación.

- ✓ También los participantes se expresaron en cuanto a la forma en que les llega el contaminante. El Grupo 1 considera que el 55.55% lo hace por aire y los del Grupo 2 un 36.36% por aire y 36.36% a través del agua. Todos coinciden en que la contaminación ha sido siempre del mismo tipo, que el sitio ha tenido siempre el mismo uso y que no se han manifestado fugas de contaminantes.

En cuanto a los marcadores bioquímicos (Tabla 3) los resultados obtenidos no arrojaron diferencias significativas respecto a los valores de referencia para cada determinación. Los valores de referencia con los que se comparan los valores hallados son los estándares para los laboratorios de análisis clínicos.



Tabla 3. Valores de los Marcadores Bioquímicos en los participantes por grupo establecido.

Grupo expuesto a concentraciones de As hasta 0,025mg/l.

Muestra	Plaquetas /mm ³	GOT-U/l	GPT-U/l	FAL- mg%	Bilirrubina directa mg%	Bilirrubina total mg%
S 2	210.000	10.6	11.7	160.9	0.17	0.88
S 3	194.000	13.3	14.8	181.1	0.16	0.92
S 4	210.000	7.6	10.4	167.2	0.15	0.79
S 5	179.000	8.9	15.6	188.7	0.19	0.92
S 6	158.000	9.7	13.9	197.6	0.18	0.90
S 7	181.000	12.2	14.7	201.1	0.16	0.81
S 8	205.000	10.1	12.2	171.3	0.14	0.73
LV 7	192.000	7.2	8.8	170.6	0.15	0.71
LV 8	181.000	9.9	10.5	163.9	0.16	0.63
M _± SE	190.000 ± 5.715	9.94 ± 0.656	12.51 ± 0.786	178.0 ± 4.929	0.162 ± 0.005	0.810 ± 0.035
Valores de referencia	150.000 a 400.000	V: hasta 18 UI/l M: hasta 15 UI/l	V: hasta 22 UI/l M: hasta 17 UI/l	68 – 240 UI/l	Hasta 0,2 mg%	Hasta 1.0 mg%

Grupo expuesto a concentraciones de As mayores de 0,025mg/l.

Muestra	Plaquetas /mm ³	GOT-U/l	GPT-U/l	FAL- mg%	Bilirrubina directa mg%	Bilirrubina total mg%
LV 1	179.000	9.1	10.9	155.2	0.13	0.72
LV 2	288.000	12.6	11.7	197.3	0.18	0.90
LV 3	205.000	5.5	7.1	200.5	0.14	0.62
LV 4	270.000	8.3	9.3	188.4	0.16	0.89

Continuación Tabla 3

LV 5	161.000	14.2	15.6	237.5	0.19	0.88
LV 6	187.000	10.7	12.3	191.5	0.17	0.74
LV 9	210.000	5.9	7.7	190.8	0.14	0.77
S 1	170.000	9.10	12.7	174.2	0.14	0.90
RC 1	177.000	5.7	8.1	165.1	0.16	0.70
RC 2	189.000	11.5	13.9	207.8	0.19	0.86
RC 3	210.000	12.1	15.5	199.8	0.17	0.91
M _± SE	190.000± 5.715	9.944 ± 0.656	12.51 ± 0.786	178.0 ± 4.929	0.162 ± 0.005	0.810 ± 0.035
Valores de referencia	150.000 a 400.000	V: hasta 18 UI/l M: hasta 15 UI/l	V: hasta 22 UI/l M: hasta 17 UI/l	68 – 240 UI/l	Hasta 0,2 mg%	Hasta 1.0 mg%

M_±ES: media+error estándar; GOT: Transaminasa Glutámico Oxalacética; GPT: Transaminasa Glutámico Pirúvica; FAL: Fosfatasa Alcalina.

En cuanto a los valores As en orina hallados en todos los participantes (< a 0,10 mg/g creatinina; n=20) no presentan diferencias significativas respecto los valores de referencia de laboratorio (< a 0,10 mg/g creatinina).

Las variables citogenéticas, CBMN (células binucleadas con micronúcleos) y BMMN (células de la mucosa bucal con micronúcleos), analizadas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de micronúcleos en sangre y mucosa bucal de los individuos analizados

Muestra nº	CBMN	BMMN
1	6	7
2	6	5
3	5	8

Continuación Tabla 4		
4	5	7
5	6	10
6	7	7
7	7	5
8	5	6
9	6	7
10	8	9
11	6	6
12	8	8
13	7	9
14	5	7
15	6	9
16	7	6
17	7	6
18	5	7
19	9	10
20	9	9
M \pm ES	6.500 \pm 0.286	7.400 \pm 0.343*
Valores de referencia	6.500 \pm 0.235	3.727 \pm 0.854

M \pm ES: media \pm error estándar; CBMN: células binucleadas con micronúcleos; BMNN: células epiteliales de la mucosa bucal con micronúcleos. *diferencias estadísticas significativas

Los resultados hacen referencia solo a CBMN no indicando la cantidad de micronúcleos por célula (MNL), ya que las células CBMN representan un parámetro más apropiado para interpretar los resultados, al tener en cuenta las células que han sufrido daño, más que el número de MNL que se observan.

Los micronúcleos en mucosa bucal observados en los participantes presentaron diferencias significativas con personas que consumen agua dentro del rango permitido por la OMS (Fig. 13).

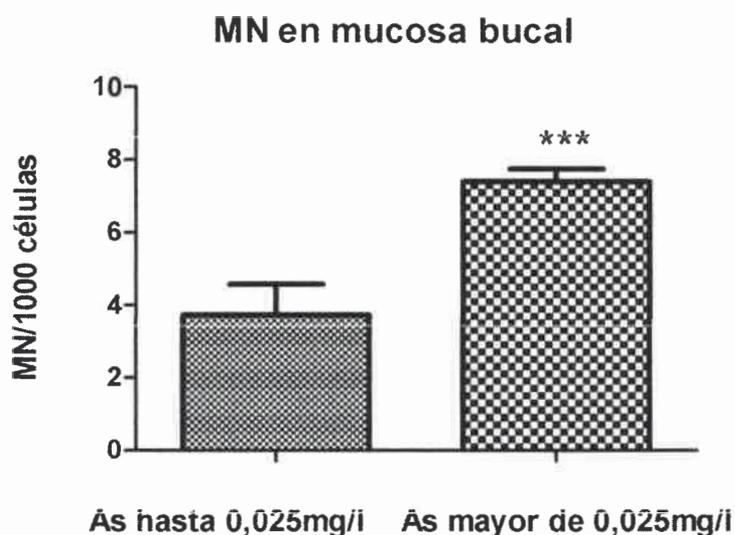


Fig. 13. MN en mucosa bucal según diferentes concentraciones de As

Si se analizan los resultados de acuerdo a la concentración de As, los parámetros analizados sólo muestran diferencias significativas en los micronúcleos de la mucosa bucal (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de micronúcleos en sangre y mucosa bucal de los individuos analizados agrupados según la concentración de As en agua.

Parámetros analizados	[As] hasta 0,025 mg/l (n=11)	[As] mayor a 0,025 mg/l (n=9)	Valores de referencia (n=20)
CBMN en linfocitos	6.00 ± 0.29	6.90 ± 0.44	6.50 ± 0.23
CMN en mucosa bucal	7.00 ± 0.58*	7.73 ± 0,41*	3.72 ± 0.85

CBMN: frecuencia de células binucleadas con micronúcleos; CMN: frecuencia de células con micronúcleos.

Los resultados de la correlación de Pearson no demuestran una asociación entre la frecuencia de MN en sangre y MN en mucosa bucal. La frecuencia de MN con respecto a la concentración de As en agua, tampoco mostró asociación estadísticamente significativa (correlación de Pearson, $P > 0,05$).

Con respecto a la correlación entre las variables MN en mucosa bucal y concentración de As en agua, se observó una asociación estadísticamente significativa $r= 0,8221$ ($P < 0,005$) (Fig. 14).

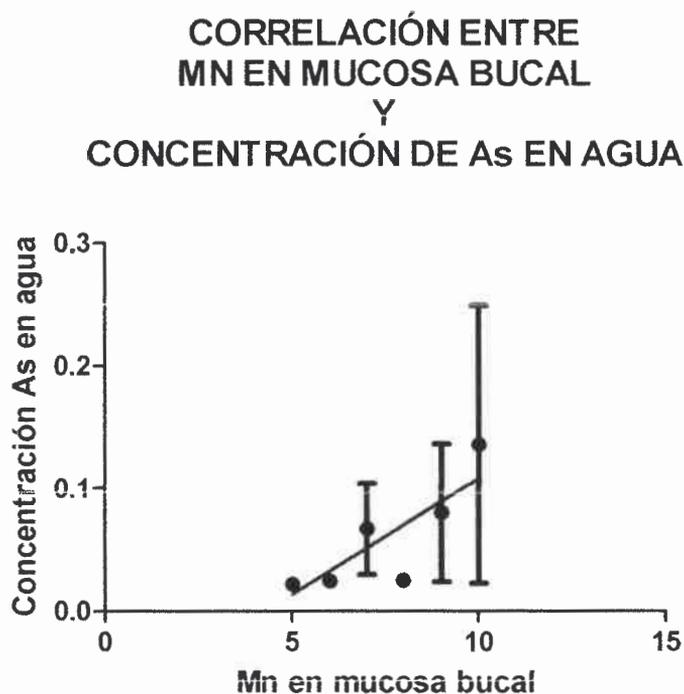


Fig. 14. Concentración de As en agua y MN en mucosa bucal



CAPITULO V - DISCUSIÓN

CAPITULO 5 - DISCUSIÓN

El análisis de la concentración de As en las muestras recolectadas confirmó que es un serio problema en esta zona ya que las muestras exceden los niveles permitidos de ese elemento por la OMS en 1993 y que no han disminuido su concentración en los últimos diez años según lo reportado por Castro Esparza (2006). A nivel nacional el Código Alimentario, estableció que en todo el país y a partir del año 2012, debería regir ese tope establecido por la OMS (0,01mg/l).

Sin embargo, los valores encontrados en diecisiete de las muestras de agua analizadas están dentro del nivel aceptado para la Provincia de Córdoba (DiPAS, 2006), coincidiendo con valores encontrados por Pérez-Carreras y Cirelli (2013) para otro Departamento de la Provincia (Departamento Unión).

La Dirección Provincial de Agua y Saneamiento de Córdoba (DiPAS) en 2006 fijó tres límites de concentración, en forma provisoria, hasta se cuente con información epidemiológica que sustente las modificaciones de los límites permisibles propuestos. En general se propone como meta a alcanzar o concentración ideal, valores menores o iguales a 0,01 mg/l. Un segundo límite establece como valor aceptable concentraciones entre 0,01 mg/l. y 0,05 mg/l. Por último se fija como rango tolerable condicional y en forma temporaria el de concentraciones que varíen entre 0,05 mg/l y 0,1 mg/l. Concentraciones mayores a este último valor son consideradas en todos los casos como no aceptables.

Los primeros estudios sobre los efectos adversos de la exposición crónica al As son conocidos desde 1888. En ese año Hutchington reporta los primeros antecedentes históricos que relacionan la presencia de As en agua con lesiones de piel (Stöhrer, 1991). Desde entonces a la fecha se registra una amplia literatura al respecto y el efecto adverso para la

salud debido a la presencia de As en agua de bebida sigue siendo objeto de estudio en la actualidad.

Las afecciones relatadas por los participantes de este estudio refieren a la caída de cabello y problemas en la piel, si bien podrían explicarse con la presencia de As en agua, dado el tamaño de la muestra, es necesario ampliar el número de datos para poder obtener resultados concluyentes sobre estos efectos del compuesto químico presente en las muestras de agua analizadas en los lugares de estudio.

Los valores de este metaloide que deberían permitirse en el agua de bebida son motivo de discusión. Los organismos internacionales han sugerido valores orientadores respecto a la concentración de As en el agua de consumo. Durante muchos años la Organización Mundial de la Salud sugirió un límite de 0,05mg/l, actualmente esta entidad establece un valor de hasta 0,01mg/l. En los Estados Unidos de América, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) revisó, por recomendación de la Academia Nacional de Ciencias de este país, el patrón para As en el agua de consumo, que estuvo vigente por más de 50 años. En el año 2001 definitivamente se consideró reducir de 0,05mg/l a 0,01mg/l la concentración de As en agua para bebida. Se estima que esto permitirá disminuir el número de varios tipos de cáncer y de otras enfermedades entre ellas diabetes e hipertensión (Bergeson, 2002).

Argentina ha fijado límites máximos de concentración de arsénico en las aguas por encima de otros países, y aún así, hay zonas endémicas que superan esos valores ampliamente.

En este trabajo los valores encontrados en agua de consumo fueron entre 0,010 y 0.25 mg/l, superando el límite establecido actualmente por la OMS. Esto se podría deber al riego y otras actividades humanas que han generado un ascenso de la capa freática, conduciendo a un aumento de la concentración de arsénico (Ng, Wang y Shraim, 2003).

La amplificación de la exposición debido a esas actividades antrópicas, en especial, con el uso de plaguicidas arsenicados, de alto impacto en la Provincia de Córdoba, supondría un aumento considerable de la población expuesta a altas concentraciones de As.

El contenido de As superior al que fija la OMS encontrado en las muestras analizadas indicaría la ausencia de control de la potabilidad para este elemento. Por consiguiente, las

poblaciones, independientemente del tipo de utilización del agua, están expuestas a este metaloide.

En cuanto a las expresiones clínicas asociadas con exposición a As, las manifestaciones cutáneas constituyen los primeros hallazgos clínicos del Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico.

La piel es el órgano más sensible a la intoxicación crónica por As. La sintomatología presente en los individuos estudiados es referida a las afecciones de piel y caída de cabello. En el primer grupo (hasta 0,025mg/ml) el 11.11 % reportaron afecciones de piel y el 33.33 % caída de cabello, en el segundo grupo el 36.36 % refirió caída de cabello. Los datos obtenidos son compatibles con exposición crónica a As y concuerdan con trabajos realizados por Kazi *et al.* (2009) quienes encontraron una relación entre la aparición de manifestaciones cutáneas (hiperqueratosis) y la exposición al As. De la misma manera Perez y Pelaez (1999), hallaron relación entre la caída de cabello y niveles de As elevado.

Se conoce que el uso de biomarcadores en la toxicología humana y ambiental tiene como principales objetivos medir la exposición a los agentes xenobióticos que producen enfermedades y predecir la respuesta tóxica que podría ocurrir. Entre los biomarcadores, los bioquímicos más usados para medir toxicidad y contaminantes se encuentran la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa, acetilcolinesterasa, GPT, GOT y Fosfatasa Alcalina como asociadas al daño hepático (Timbell, 1998; Swenberg, 2008).

En este sentido, los resultados obtenidos en la valoración de marcadores bioquímicos como GPT, GOT, FAL y Bilirrubina no arrojaron resultados significativos en relación a los valores de referencia validados en nuestro país. Soria de Gonzalez *et al.* 2009 hicieron la misma asociación en un trabajo que estudia el daño hepático producido en una población cuyo consumo de agua tiene niveles de As superiores a 0,010 mg/l y sus resultados indican que no hay aumento de estos marcadores ante la exposición a este metaloide. Estos hallazgos podrían explicarse si se considera a estos biomarcadores como inadecuados para asociarlos a la exposición del As.

Teniendo en cuenta que la vida media del As en sangre es de 6 horas y la de sus metabolitos metilados varía entre 5 y 20 horas, los niveles de estos compuestos en sangre

no son indicadores fiables de exposición a menos que esta haya sido aguda y en el mismo día (ACGIH, 2012). Sin embargo el As^{+3} , el As^{+5} y sus metabolitos MMA y DMA son detectados en orina durante las 24 horas post-exposición. Su concentración máxima se mantiene aproximadamente 15 horas y comienza a declinar a las 20 horas. Se ha fijado como índice biológico de exposición (BEI) del As en el trabajador expuesto valores $< 35 \mu\text{g/g}$ creatinina en muestra de orina de 24 horas, tomada al finalizar la semana laboral. En la persona no expuesta, el valor es de $5 \mu\text{g} /\text{g}$ creatinina en orina de 24 hs. El método analítico validado para cuantificar As es la espectroscopia de absorción atómica con atomizador de grafito método OSHA ID 105 (ACGIH, 2012).

Villaamil Lepori *et al.* 2006 encontraron que la determinación de As en orina es un buen biomarcador para la exposición reciente a As. Vazquez y Alfonso 2013, hallaron que la concentración promedio de As por gramo de creatinina excretada, en orina de pobladores adultos en un distrito al sur de Perú, excede el Límite de Tolerancia Biológica establecido para dicho elemento. En esta población estudiada la exposición al As en agua era superior al límite permitido.

En relación con los valores encontrados de As en orina en este trabajo para los grupos estudiados no se han encontrado diferencias significativas respecto a los límites permitidos. Lo que podría explicarse por el tamaño muestral.

Los efectos genotóxicos del As han sido descritos por distintos estudios que analizan este fenómeno a través de diferentes biomarcadores, intercambio de cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas e inducción de micronúcleos (Rossman *et al.*, 2004; Schoen *et al.*, 2004).

En los trabajos de Petres *et al.* (1977) y Vega *et al.* (1995) se observa que el As induce daño a nivel cromosómico, tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrándose aumento de aberraciones numéricas y estructurales, así como en la frecuencia de micronúcleos. También Ghosh *et al.* (2008) encontraron que la presencia de As puede considerarse un agente genotóxico y su daño ser medido por la aparición de micronúcleos.

Los resultados obtenidos en la frecuencia de micronúcleos en sangre en este estudio no arrojaron diferencias significativas respecto a los valores del grupo de referencia.

El tamaño de la muestra analizada podría inducir a resultados no concluyentes. Si bien la literatura reporta datos significativos en estudios con poblaciones mayores (Moore *et al.*, 1997; Basu 2002, 2004), hay antecedentes de ensayos realizados sobre grupos semejantes al estudiado (Tian *et al.*, 2001; Hick *et al.*, 2007) que muestran resultados con aumento de estos biomarcadores

También otros factores como la susceptibilidad individual, determinada por factores genéticos, hábitos de vida y edad son determinantes de una alta variabilidad inteindividual y podrían explicar los valores obtenidos con este biomarcador (Carballo *et al.*, 2007).

El ensayo de micronúcleos en epitelio de mucosa bucal ha sido ampliamente usado para detectar el efecto genotóxico de distintos compuestos entre ellos el As (Basu *et al.*, 2002, 2004; Martínez *et al.*, 2005). En células epiteliales de vejiga, un estudio realizado en individuos con exposición crónica al arsénico presente en el agua de bebida, se encontró un incremento en la frecuencia de micronúcleos (Moore *et al.*, 1997). Esto se debe a que los tejidos epiteliales proliferan rápidamente y están en contacto con compuestos potencialmente genotóxicos, de esta manera las células exfoliadas pueden reflejar el daño inducido.

En este trabajo se hallaron diferencias significativas respecto a los valores de referencia en concordancia con resultados obtenidos por Hick *et al.* (2007) y en contraposición de estudios realizados por Warner *et al.* (1994) quienes sugieren que la mucosa bucal podría no constituir la diana más relevante para los efectos del As.

Cabe destacar según lo expresado en el cuestionario de este estudio, los habitantes de las localidades estudiadas viven en zonas residenciales con tiempo de permanencia en estos lugares entre 15 y 20 años, han sido advertidos desde hace tiempo acerca de la contaminación de la napa freática por lo tanto, evitan el consumo de agua de sus viviendas usando agua embotellada. No obstante lo mencionado y teniendo en cuenta la relación de los resultados de la frecuencia de MN en la mucosa bucal con la concentración de As en el agua de los domicilios, es posible interpretar que el aporte de los alimentos preparados con aguas contaminadas de As hacen a la ingesta total.



Los hallazgos encontrados en este trabajo señalan la necesidad de conocer el grado de exposición a este metaloide no sólo en el agua, sino investigar que otros vehículos estén influyendo en la exposición apoyando lo referido por Gonseba *et al.* (1995), Alam y Rahman (2003) y Pérez-Carrera y Cirelli (2007).

Gonseba *et al.* (1995) y Alam y Rahman (2003) indican que en poblaciones expuestas a agua contaminada con As, las determinaciones de este metaloide en cereales como el arroz y vegetales como el tomate, regados con esta agua, fueron altas las concentraciones encontradas. Pérez-Carrera y Cirelli (2007) señalan que la transferencia de elementos tóxicos desde matrices ambientales a la cadena agroalimentaria está recibiendo cada vez mayor atención a nivel mundial debido a la presión ejercida por los consumidores que exigen mayor calidad de los productos.

De estas observaciones surge que la ruta de exposición de este tóxico en las zonas de las localidades de donde proceden los participantes, podría ser no solo la vía hídrica, sino también la vía alimenticia.

Los resultados de MN en mucosa bucal, si bien en una muestra que debería ampliarse para una afirmación concluyente, confirma que la exposición al agua contaminada con arsénico a concentraciones mayores de 0,01mg/l representa un riesgo evidente para la salud de los individuos.

La tendencia a nivel mundial sobre los valores de la concentración de As en agua de consumo ha bajando progresivamente en el tiempo. Teniendo en cuenta las recientes modificaciones en la legislación y su tendencia, se hace imperativo pensar en nuevas formas de remover el As del agua, pensando siempre en aumentar la eficiencia y sin dejar de lado las características regionales/locales y las condiciones coyunturales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la exposición al As en forma sostenida en el tiempo no resulta inocua frente a una evaluación toxicogenética. Por consiguiente, es necesaria la protección de la población expuesta y plantear medidas preventivas para evitar daño a la salud humana y ambiental.

En lo que respecta a la utilización de marcadores de genotoxicidad, los mismos permiten el desarrollo de la epidemiología molecular que promete ser una herramienta que ayudará a

detectar efectos tempranos en poblaciones expuestas, admitiendo la prevención de efectos nocivos considerando las características genéticas de las poblaciones.

Se necesita establecer un correcto suministro de agua potable libre de arsénico y accesible para toda la población, requerimiento mínimo e indispensable para asegurar un correcto desarrollo de las futuras generaciones.

En este sentido, se requiere continuar investigando los efectos del arsénico en la salud de las poblaciones expuestas a bajas concentraciones en agua y en especial en otras vías de exposición.

Por todo lo antes mencionado, es importante destacar la necesidad de generar información acerca de la distribución y movilidad del arsénico en aguas, transferencia a través de la cadena alimenticia, efectos sobre la salud, evaluación de impacto y riesgo ambiental y desarrollo de tecnologías económicas para la remoción del As del agua a escala doméstica.

ANEXO I

INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE (ADULTOS)

Proyecto RIESGO SANITARIO AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSÉNICO EN AGUA DE CONSUMO, EN LA LOCALIDAD DE RÍO CUARTO (ZONA URBANA Y PERIURBANA).

Estudios genéticos, bioquímicos y hematológicos

Los compuestos químicos –plaguicidas, metales como: cromo, arsénico- si son ingeridos a través del agua de bebida en pequeñas cantidades pueden dañar el cuerpo, alterar la función del hígado y riñones, los componentes de la sangre ya que dañan partes de las células (Ej: ADN) que forman esos órganos.

Por esta razón lo invitamos a participar en un proyecto de investigación que estudia situaciones peligrosas para la salud humana con la finalidad de proponer medidas de prevención de riesgos.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

✓ Relacionar las concentraciones de Arsénico en el agua potable y los niveles de Arsénico en orina y entre esas concentraciones y el daño al ADN, en personas en contacto con este compuesto a través del agua de bebida de manera prolongada en el tiempo.

METODOLOGÍA:

Existen métodos para determinar las concentraciones de determinadas sustancias en la sangre y la orina como así también el efecto de las mismas sobre el ADN. En estos estudios se toma una muestra de sangre de 5 ml, una muestra de saliva en la parte interna de boca (tomada con un hisopo) y/o una muestra de orina que se emplearán para analizar el ADN, las cantidad de sustancia presente en la persona y los componentes de la sangre para verificar si presentan algún tipo de alteración que pueda relacionarse con el compuesto químico que se quiere estudiar.

BENEFICIOS:

Los resultados de este estudio son de gran utilidad para el participante y la sociedad en su conjunto, porque ayudará a prevenir problemas de salud que puedan surgir por el consumo de Arsénico en el agua de bebida.

RIESGOS del ESTUDIO:

No es habitual tener incomodidades o problemas durante o después del procedimiento de sacar sangre, pueden aparecer pequeños moretones en el lugar de la extracción que no representan riesgo alguno para la salud del participante.

CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS:

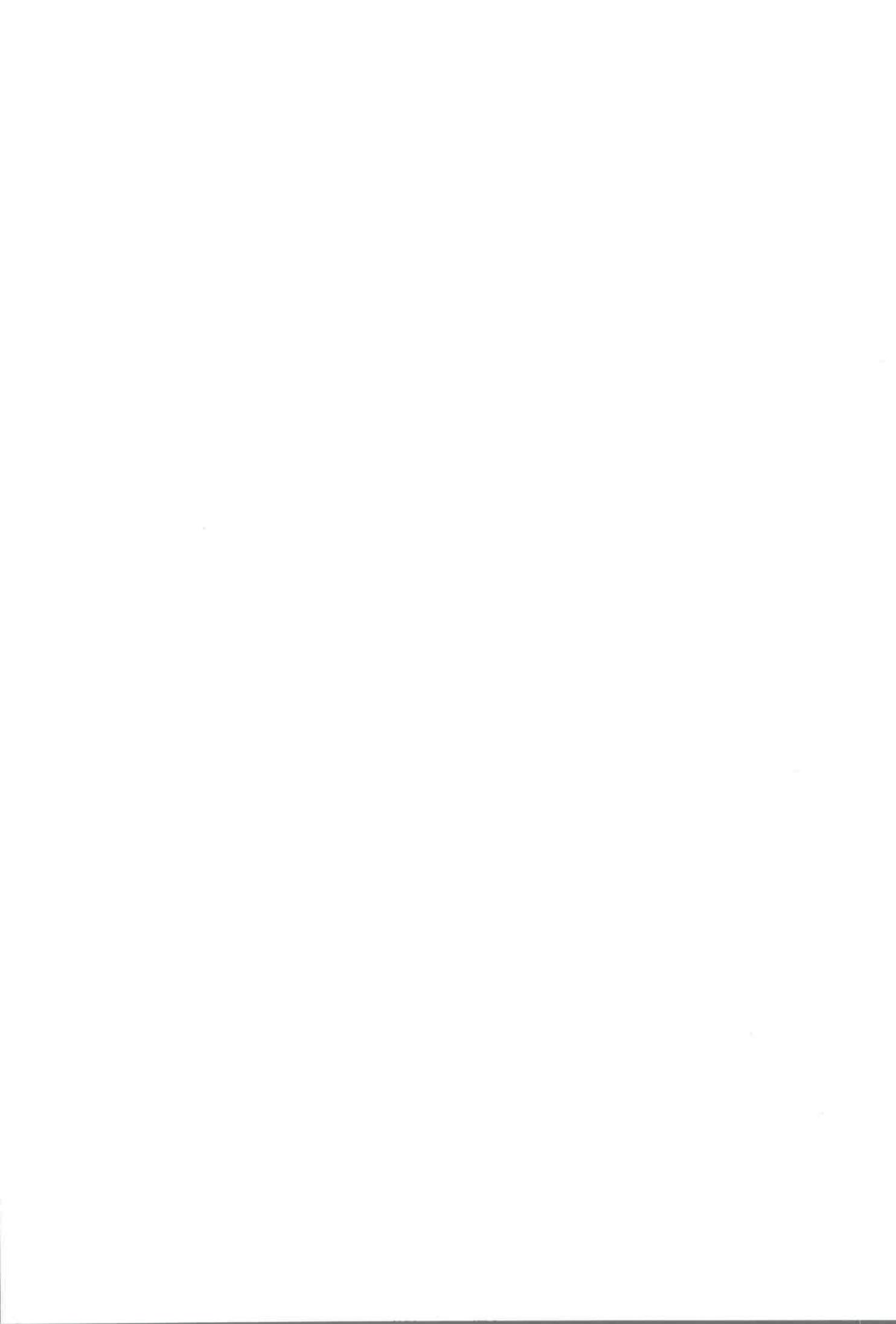
La información que se obtenga es confidencial, la identidad del participante se mantiene anónima a los fines de la presentación de los resultados y se lo individualizará a través de un número o código. A cada participante se le comunicarán los resultados del estudio a través de un informe escrito y se le brindará el correspondiente asesoramiento sobre las medidas de prevención y protección que se deben tener en cuenta al manipular los plaguicidas.

CALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN:

La participación es voluntaria, sin costo alguno ni pago por la participación. El participante, si lo desea, puede retirarse en cualquier momento y llevarse los resultados de su estudio. Asimismo, si surgieran dudas o necesitara aclaraciones adicionales podrá obtenerlas comunicándose con el investigador responsable

Luego de realizado el estudio, el remanente de la sangre, orina y los extendidos serán desechados. No serán utilizados para otro fin que el expresamente indicado en la presente.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Bqca. María Cristina VAREA, laboratorio GeMA (Genética y Mutagénesis Ambiental), Dpto. de Ciencias Naturales- Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto- TE: 0358-4676230- email: delia.aiassa@gmail.com



ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)

Proyecto RIESGO SANITARIO AMBIENTAL POR LA PRESENCIA DE ARSÉNICO EN AGUA DE CONSUMO, EN LA LOCALIDAD DE RÍO CUARTO (ZONA URBANA Y PERIURBANA).

Estudios genéticos, bioquímicos y hematológicos

CÓDIGO:

Nombre y Apellido:.....,
Documento Nacional de Identidad N°domicilio legal
en calleN°de la ciudad/localidad
de.....de la Provincia de declaro que
he sido informado sobre la realización de los estudios genéticos y bioquímicos en personas
expuestas a Arsénico a través del agua de bebida, de manera crónica.

Manifiesto acceder en forma voluntaria y gratuita, a participar en este proyecto del cual he
sido informado a través de una entrevista con los investigadores responsables del mismo
(abajo firmantes), quienes me comunicaron ampliamente sobre las características y
alcances del estudio y me entregaron una hoja de “Información para el Participante” donde
se detallan los objetivos, metodología, beneficios, riesgos, confidencialidad de los datos.
Luego de leer esta hoja de información he podido realizar libremente cualquier pregunta
relacionada con el proyecto.

Comprendo las características del trabajo y acepto libre y voluntariamente, entregar una
muestra de orina y que me sea tomada una muestra de sangre (5 ml) y saliva para ser
utilizada en el estudio indicado. Comprendo que la información obtenida de este análisis
sea utilizada en esta investigación y con la confidencialidad expresada en la “hoja de
información”. Asimismo he comprendido que si lo deseo puedo retirarme del estudio sin
tener que dar explicaciones, como también solicitar los datos obtenidos con mis muestras y
reclamar las muestras sobrantes del estudio.

La extracción de sangre y saliva fue realizada por.....DNI:.....

La muestra es recibida por el investigador responsable quien la codifica y archiva el consentimiento informado en el laboratorio GeMA Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. La toma de la muestra y su codificación se realizó ante la presencia del/los testigos abajo firmantes.

Dado a los _____ días del mes de _____ de 2014.

Firma del participante

Aclaración y DNI

Firma del/os entrevistadores

Aclaración y DNI

Firma del extraccionista

Aclaración y DNI

Firma del/os testigos

Aclaración y DNI

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Bqca. María Cristina VAREA, laboratorio GeMA (Genética y Mutagénesis Ambiental), Dpto. de Ciencias Naturales- Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto- TE: 0358-4676230- email: delia.aiassa@gmail.com

ANEXO III

CUESTIONARIO (modif de Diaz Barriga, 1999). La información aquí consignada es **confidencial**.

Este cuestionario queda archivado en el laboratorio GeMA, Dep. de Ciencias Naturales de la UNRC.

FECHA.....

Nombre de

barrio.....

Ubicación de la vivienda: En el plano del barrio corresponde a la Manzana

Nro......

N.....S.....E.....O.....

1. El barrio dónde usted vive es:

- A) Un área residencial
- B) Un área industrial
- C) Tiene depósitos (de residuos sólidos o líquidos, residuos industriales, urbanos, hospitalarios, etc.)
- D) Es un área impactada por contaminación natural (especificar).....
- E) otros (especificar).....
.....

2. ¿Qué tiempo tiene de residencia en ese barrio?

.....
.....

3. ¿Qué actividades se realizan en el barrio?

- A) Industriales

- B) Comerciales
- C) Agropecuarias
- D) Otras

4. **¿Cuáles son los tóxicos que Ud. considera presentes en su barrio?**

- A) **compuestos inorgánicos** (cromo, mercurio, manganeso, níquel, plomo, arsénico, flúor)
- B) **compuestos orgánicos**
- C) **microorganismos**

5. **¿A qué le atribuye el origen de la contaminación?**

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

6. **¿Cuándo se inició la fuente de contaminación?**

- A) Un año
- B) Entre dos y cinco años
- C) Entre cinco y diez años
- D) Más de diez años

7. **¿Ud. considera que el contaminante le llega por:**

- A) El aire
- B) El suelo
- C) El agua
- D) Otros
(especificar).....
.....

8. ¿Cuál es el lugar en que Ud. considera que la población entra en contacto con los contaminantes?

- A) En el interior de la vivienda
- B) Espacios de uso común en el barrio (plazas, veredas, jardines)

9. ¿Cuántas personas de su núcleo familiar están expuestas a los contaminantes que Ud. ha mencionado? Indique edades de cada uno de ellos

familiar	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Edad									
Sexo	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F	M F

- 10. ¿La contaminación ha sido siempre del mismo tipo? SI NO
- 11. ¿Han existido otras fuentes contaminantes, ahora clausuradas o abatidas? SI NO
- 12. ¿El sitio ha tenido siempre el mismo uso de suelo? SI NO
- 13. ¿Han existido fugas del contaminante? SI NO
- 14. ¿Cuáles son las preocupaciones que Ud. tiene en relación a la contaminación ambiental?.....
.....
.....
.....
.....

15. Complete la siguiente tabla

Familiar	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fumador?									
Medicación habitual? (últimos 6 meses)									
Consume alcohol									

todos los días? + de 1 vaso									
Enfermedades que relacione con los contaminantes									
Caída de cabello									
Problemas en la piel									
Abortos?									
Hijos con malformaciones?									

Observaciones:

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Bqca. María Cristina VAREA, laboratorio GeMA (Genética y Mutagénesis Ambiental), Dpto. de Ciencias Naturales- Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto- TE: 0358-4676230- email: delia.aiassa@gmail.com

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACGIH.** 2012 American Conference of Governmental Industrial Hygienists. A Documentation of TLV for Chemical Agents and Biological Exposure Indices. Signature Publications. Cincinnati. 63. World Health Organization.
2. **Aiassa, D., N. Gorla Y M. Mudry.** 2005. Exposición laboral a solventes químicos y roturas cromosómicas. Asociación Toxicológica Argentina 13 (suplemento): 64-65.
3. **Aiassa, D., F. MAÑAS, B. Bosch.** 2012. Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas - Acta Biológica Colombiana, 2012 - search.proquest.com
4. **Akhtar, N., Islam. M. Mannan, M.A. Misbahuddin, M. Khandker, S. & A. Ahmad,** . 2007. Evaluation of physical and mental development of children of arsenic exposed areas in Bangladesh. In: Misbahuddin, M. Ed. Applied research on arsenic in Bangladesh. Págs. 15-30. WHO. Dhaka
5. **Alam, Z., Rahman M.** 2003. Fate of arsenic in the environment: Accumulation of arsenic in rice plant from arsenic contaminated irrigation water and effect on nutrient content. ITN centre, BUET on behalf of the Bangladesh University of Engineering and Technology and the United Nations University. , p131-35.
6. **Albertini, R., D. Anderson, G. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A. Natarajan, H. Norppa, D. Shuker, R. Tice, M. Waters Y A. Aitio.** 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutation Research 463: 111–172.
7. **Aposhian , HV.** 2004. Metabolismo del arsénico y sus compuestos derivados.
8. **Aposhian, HV.** 1989. Biochemical toxicology of arsenic. Rev Biochem Toxicol. 10:265-299.
9. **Astolfi, E., S.C. Besuschio, J.C. García Fernández, C. Guerra & A. Maccagno** 1982. “*Hydroarsenicismo crónico regional endémico*”. Ed. Cooperativa General Belgrano. Buenos Aires.
10. **ATSR.** 2005. Agencia para sustancias toxicas y registro de enfermedades. Departamento de salud pública. EE.UU.

11. **ATSR.** 2007. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. Atlanta.
12. **Ayerza A.** 1917. Arsenicismo regional endémico (keratoderma y melanoderma combinadas). *Bol Acad Medicina* ; 2-3:11-24.
13. **Ayerza A.** 1918. Arsenicismo regional endémico (keratoderma y melanoderma combinadas) (continuación). *Bol Acad Medicina* ; 1-24.
14. **Barán, E.J.** 1995. Química Bioinorgánica. McGraw-Hill, Madrid.
15. **Basu, A., J.Mahata, A.K. Roy, J.N Sarkar, G. Poddar, A.K Nandy, P.K. Sarkar, P.K. Dutta, A. Banerjee, M. Das, K. Ray, S. Roychaudhury, A.T. Natarajan, R. Nilsson, A.K. Giri.** . 2002 . ; Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*: 516, 29-40.
16. **Beltrán, M.** 2012. Investigar las consecuencias del efecto acumulativo del Arsénico y Cadmio.
17. **Bergeson, L. L.** EPA delivers on arsenic rule. *Pollut. Eng.*, Troy, v. 34, n. 1, p. 32-34, 2002.
18. **Bernardi, N., N. Gentile, F. Mañas, Á. Méndez, N. Gorla y D. Aiassa.** 2015. Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Córdoba. *Archivos Argentinos de Pediatría* 113(1): 126-132.
19. **Bertorello HD.** 1981. Metal-Hydrogen Exchange-Reaction between 4, 4' – Difluorodiphenyl sulfone and normal –butyllithium. *Asociacion Quimica Argentina*.
20. **Bolognesi, C.** 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543: 251-272.
21. **Bonassi, S., M.Fenech , C. Lando , YP. Lin ,M. Ceppi , WP.Chang .** 2001 . . HUMAN MicroNucleus-
22. **Borgoño, JM., P.Vicens, H. Venturino.** 1980 . Estudio clinic epidemiologico del hidroarsenicismo en la II Región .*REV.Med. de Chile* 108
23. **Buchet, J., R. Lauwerys , H. Roels .** 1981. 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.

24. **Bundschuh, J., MA. Armienta , P.Bhattacharya , J.Matschullat , P. Birkle , AB. Mukherjee .** 2009. Natural Arsenic in Groundwater of Latin America - Occurrence, health impact and remediation. Lisse: Balkema Publisher.
25. **Caciari , T., A.Capozzella , F. Tomei , HA. Nieto , S. De Sio , L. Montuori , MP. Schifano .** 2012. Arsenic and peripheral blood count in workers exposed to urban stressors. *Clin Ter* 2012; 163(5): e293-302.
26. **Calderon, RL., R.Rench , D.Lewis .** 2001 . Arsénico en acuíferos: influencia sobre la salud de la población. Drinking water arsenic in Utha: a cohort mortality study. *Environmental Health Perspectiv*
27. **Carabantes, AG., M. Nagg de Fernicola .** 2003. Arsenico en el agua de bebida. *Revista Brasileira de Ciencias. SciELO Brasil.*
28. **Carballo, M. A.** 2000. "Importancia de la Evaluación genotóxica en el Monitoreo Ambiental". Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
29. **Carballo MA., AB. Gadano.** 2007 . Biomarcadores de genotoxicidad en individuos expuestos al arsénico. *American Journal – latamjpharm.org*
30. **Castro de Esparza, M.L.** 2006 . Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. *International Congress Mexico City.*
31. **Castro, A.J.** 1985 . *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.*
32. **Chen, C.M., T.Misra, S. Silver, B.P. Rosen .** 1986 . Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump: The plasmid encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261:15030-15038.
33. **Chen, C.J., YC Chuang, S.L.You, TM. Lin y H.Y Wu.** 1990. "A Retrospective Study on Malignant Neoplasms of Bladder, Lung and Liver in Blackfoot Disease Endemic Area in Taiwan", *Br. Journal Cancer*, num. 53, pp. 399-405.
34. **Chen, C., M. Mobley, H.L.T., y Rosen, B P.** 1985. Separate resistances to arsenate and arsenite (antimonate) encoded by the arsenical resistance operon of R-factor R773. *J. Bacteriol.* 161:758-763.
35. **Chiu, HF., CC. Chang, SS. Tsai , CY. Yang .** 2006. Does arsenic exposure increase the risk for diabetes mellitus? *J Occup Environ Med ;* 48(1): 63-7.

36. **CCA** . 2007 .Código Alimentario Argentino. Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículos 982 al 1079. Ley 18284. Decreto 2126/71
37. **Concha, G., G. Vogler, B. Nermell , M. Vahter**. 2002. Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *Int Arch Occup Environ Health*.;75:576-80.
38. **Concha, G., B. Nermell , M.Vahter**. 1998. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in Northern Argentina. *Environmental Health Perspectives*; 106 (6): 355- 359.
39. **Conicet**. 2009.Arsénico en agua en Argentina.
40. **Cooper, K., T. Myers, M. Rosenberg, M. Chavez, L.Hudson**. 2004. Roles of mitogen activated protein kinases and EGF receptor in arsenite stimulated matrix metalloproteinase-9 production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 200: 177 – 185.
41. **Cornejo, M**. 2007. Quito Ecuador. Evaluación del efecto del Arsénico y Cadmio. Tesis de Grado – USFQ.
42. **Coronado-Gonzalez JA**. 2007 . Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environ Res* 2007; 104(3): 383-9.
43. **Decordier, I., E. Cundari, M. Kirsch**. 2003. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase - 3 in micronucleation. *Mutagenesis*, 20: 173 - 179 .
44. **Devesa, V., BM. Adair, J. Liu, MP. Waalkes, A.A. Diwan, M. Styblo, & DJ.Thomas**. 2006. Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology*, 224 (1-2): 147-155.
45. **Di Giorgio, M., B. Y. Nasazzi, Y M. Heredia**. 1995. Influencia de la edad y habito de fumar sobre la frecuencia espontanea y radioinducida de micronúcleos en linfocitos humanos. Ente Nacional Regulador Nuclear ARGENTINA, 5º Congreso Argentino de Radioprotección, Santa Fe.
46. **DiPAS**. 2006. Resolución 074/2006, Dirección Provincial de Agua y Saneamiento. Córdoba.
47. **Dulut, F., M. Pastor, M. Gonzalez Cid, E. Matos, H. Von Guradze, C. Madrena, D. Loria, L. Sainz, N. Albiano Y N. Sobel**. 1987. Cytogenetic analysis in plant breeders, *Mutation Research* 189: 381-386.

48. **Engel , RR., C. Hopenhayn-Rich , O. Receveur .** 1994. Vascular effects of chronic arsenic exposure: a review. *Epidemiol Rev.* 16:184-209.
49. **ENTOX/TIWET.** 1996 . (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and The Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University) . Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. In: Klaassen CD (ed). Casarett and Doull's Toxicology. McGraw-Hill, USA, pp. 883-905.
50. **EPA.** 1993 . U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Arsenic. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati.
51. **Fenech, M.,** 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
52. **Fenech, 2003**
53. **Fenech, M., Y M. Morley.** 1985. Measurement of micronuclei in Lymphocytes, *Mutation Research* 147: 29-36.
54. **Fowler, B.A., S.J. Chow, R.L. Jones, & C.J. Chen.** 2007. Arsenic. In: Nordberg, G., Fowler, B.A., Nordberg, M. & Friberg, L. Eds. Handbook on the Toxicology of Metals. 3ª ed. Págs. 367-406. European Environment Agency. Copenhagen.
55. **Gaioli, M., D.E González , D. Amoedo .** 2009 . Hidroarsenicismo crónico regional endémico: un desafío diagnóstico y de prevención, *Arch Argent Pediatr* ; 107:467-47
56. **Garabantes, G., N. Fernicola.** 2003. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 39 (4): 365–372. .
57. **García,** (2006). Farmacocinética del Arsénico.
58. **Ghosh, P., C.Roy C, N.K Das , S.R Sengupta ,** 2008. Epidemiology and prevention of chronic arsenicosis: an Indian perspective. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 74(6):582-93.
59. **Goebel, HH., PF. Schmidt , J. Bohl , B. Tettenborn , G. Kramer , L.Gutman .** 1990. Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication; biopsy studies. *J Neuropathol*
60. **Gonzalez D., ME. Leal, SL .Garcia.** 2011 . *Ciência & Saúde- SciELO Brasil*
61. **Gonseba, ME., AM. Salazar , R. Montero, BF. Díaz BF .**1995. Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Environ Health Perspect* 1995;103 suppl 1:111-3.

62. **Gorla, N., O. Ledesma O, P. Barbieri y I. Larripa.** 1988. Assessment of cytogenetic damage in chagasic childrens treated with benznidazole. *Mutation Research* 206: 271-220.
63. **Gorla, N., O. Ledesma, P. Barbieri y I. Larripa.** 1989. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Research* 224: 263-267.
64. **Goyenechea M.** 1917 . Sobre la nueva enfermedad descubierta en Bell-Ville. *Rev Med de Rosario* ; 7:485.
65. **Goyer, RA., TW. Goyer, C. Clarkson.** 1996. *The Basic Science of Poisons*, Fifth. biologicaldiversity.org.
66. **Greenberg SA.** 1996 . Acute demyelinating polyneuropathy with arsenic ingestion. *Muscle Nerve* ;19:1611-3.
67. **Gresser, MJ.** 1981. ADP-arsenate, formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *J Biol Chem.*;256(12):5981-3.
68. **Hagelstrom, A., N. Gorla y I. Larripa.** 1995. Chromosomal damage in occupationally exposed workers to chronic low level ionizing radiation. *Toxicology Letters* 76: 113-117.
69. **Heddler, J.** 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research* 18: 187-192.
70. **Hessl, S.M., E. Berman.** 1982. Severe peripheral neuropathy after exposure to monosodium methyl arsonate. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 19: 281-287.
71. **Hindmarsh, JT.** 2002. Caveats in hair analysis in chronic arsenic poisoning. *Clin Biochem*; 35:1-11.
72. **Hongping, D., L. Jianlin, Z.Meibian, WJ. Lifen, C. Shiejie, Z. Wei, W. Baohaong, Y H. Jiliang.** 2006. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic tests. *Mutation Research* 599: 152-159.
73. **IARC .** 1980 . International Agency for Research on Cancer.1980. In *IARC Monograph on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* 50, Pharmaceutical Drugs, pag 47 – 63, IARC, Lyon.
74. **IARC .** 1987 . International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Vol 1-to 42-Suplement 7-*

75. **IARC.** 2002 International Agency for Research on Cancer. *Overall evaluations of carcinogenicity to humans.* 2002.
76. **IARC .** 2004. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic
77. **Ishak , KG., ZD. Goodman ZD, JT.Stocker JT.** 1999. Atlas of tumor pathology: tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. Third series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology;. Fascicle 31
78. **Kaltreider, RC., AM.Davis AM, JP.Lariviere JP.** 2001. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Perspect.* 109:245-251.
79. **Kassie, F., W. Parzefall Y S. Knasmuller.** 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 463: 13–31.
80. **Kazi , TG., MB. Arain , MK. Baig , HI. Afridi , N. Jalbani , RA.Sarfraz .** 2009 . The correlation of arsenic levels in drinking water with the biological samples of skin disorders. *Sci Total Environ.* 407:1019–26.
81. **Lai, CB., Wei YS.** Sub-acute clinical analysis of 193 cases of arsenic poisoning. *J Guangxi Med Univ* 2003; 20: 789-90.
82. **Larripa, I., E. Matos, M. Labal de Vinuesa y S. Brioux de Salud.** 1983. Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide. *Revista Brasileira de Genética* 4: 719-727.
83. **Lauwerys, RR .** 1991. Occupational Toxicology. In: Amdur M, Doull J, Klaassen C (eds). *Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons.* 40 ed. Pergamon, New York, pp. 920-916.
84. **Lantz, RC., AM. Hays.** 2006. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug metabolism reviews.* Taylor & Francis
85. **Lee, T. CH., N. Tanaka, P.W. Lamb, T.M. Gilmer & J.C. Barret .** 1988 *.Science* 241: 79-81.
86. **Lenntech, L .** 2007 . Arsenico, propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente. Holanda
87. **Leonard, A., RR. Lauwerys .** 1980. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic-*Mutation Research/Reviews in Genetic.* Elsevier.

88. **Liu, C.W.**, Huang Y.K., Hsueh K.H., Lin C.S. and Jang Huang L.P. (2008). Spatiotemporal distribution of arsenic species of oyster *Crassostrea gigas* in the coastal area of southwestern Taiwan. *Environ. Monit. Assess.* 138, 181–190.
89. **Liu, J.**, Zheng B, Aposhian HV, Zhou Y, Chen ML, Zhang A, et al. Chronic arsenic poisoning from burning high-arsenic-containing coal in Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 119-22.
90. **Lopez S, Miyashita Y, Simons SS.** 1990. Structurally based, selective interaction of arsenic with steroid receptors. *J Biol Chem.* 265:16039-16042.
91. **Lucero, L., S. Pastor, S. Suarez, R. Durban R, C. Gomez, T. Parron, A. Creus y R. Marcos .** 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255-262.
92. **Loyo, LV.** 2009 . - Mensaje Bioquímico. Mecanismos moleculares de los efectos biológicos del arsénico. - researchgate.net
93. **Testa, M .** 1992. Salud publica: acerca de su sentido y significado.
94. **Mañas, F., L. Peralta, N. Gorla, B. Bosch Y D. Aiassa .**2009. Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *Journal of Basic an Applied Genetics.* (en prensa).
95. **Martinez-Gonzalez V.** 2005. Biomonitorización genotóxica de Poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico. Tesis Doctoral. Barcelona. España.
96. **Martinez Valenzuela, C. Y S. Gomez Arroyo.** 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores Agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23: 185-200.
97. **Martinez, V., A. Creusa, W. Venegashb, A. Arroyoc, J. Beckd , T. Gebelc, J. Surralessa Y R. Marcosa.** 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicology Letters* 155: 319–327.
98. **Mateuca, R., A. Lombaert, I. Decordier Y M. Kirsch-Volders.** 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88: 1515-1531.
99. **Mera, M.** 2013. Tóxicos Metálicos: Aspectos toxicológicos.

100. **Meliker, JR., Wahl RL, Cameron LL, JO. Nriagu .** 2007 .Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis. *Environ Health* ; 6(4): 1-11.
101. **Miller, J.** 2002. *Metabolismo del Arsénico – Madrid .España.*
102. **Moore, L E., AH. Smith, C. Hopenhayn-Rich, ML. Biggs, DA. Kalman, MT Smith.** 1997. Micronuclei in Exfoliated Bladder Cells among Chronically Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Philadelphia, v. 6, p. 31-36
103. **Moorhed, R., P. Howell, W. Mellmann, W. Batteps Y D. Hundgerfosd** 1960. Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cells Research* 2: 613-616.
104. **Nabi , AH., MM. Rahman, LN. Islam LN.** 2005 . Evaluation of biochemical changes in chronic arsenic poisoning among Bangladeshi patients. *Int J Environ Res Public Health* 2005; 2(3-4): 385-93.
105. **Nava, A., AR. Sharrett, EK. Silbergeld, BS. Schwartz, KE. Nachman, TA. Burke, & E. Guallar .**2005. Arsenic Exposure and Cardiovascular Disease: A Systematic Review of the Epidemiologic Evidence. *American Journal of Epidemiology*, 162, 11, 1037–1049.
106. **Navas Acien , A., EK. Silbergeld, R. Pastor Barriuso, E. Guallar .** 2008. Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults. *JAMA* ; 300(7): 814-22
107. **Neri, M., A. Fucic, L. Knudsen, C. Lando, F. Merlo Y S. Bonassi. .** 2003. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research* 544: 243–254.
108. **Ng, J., J. Wang y A. Shraim.** 2003. *Chemosphere* **52**: 1353-9.
109. **Norppa, H. Y G. Falck.** 2003. REVIEW: What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18: 221–233.
110. **OECD.** 2004 . Test guideline 487. In Vitro Micronucleus test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

111. **Offergelt, JA., H. Roels, JP. Buchet, JP. Boeckx, R. Lawrerys**. Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites. *Br J Ind Med*. 1992;49:397-3.
112. **OMS**. 1987. Organización Mundial de la Salud. International Agency on Research in Cancer (IARC). Overall evaluations of carcinogenicity. An Updating of IARC monographs. Suppl. 7 p. 100. Ginebra, Suiza.
113. **OMS**. 2001. Organización Mundial de la Salud, International Programme on Chemical Safety Compounds (IPCS). Environmental Health Criteria N° 224. Arsenic. Ginebra, Suiza
114. **Pastor Benito, S.** 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de ciències. Departament de Genètica i de Microbiologia. Grup de mutagenei.
115. **Peña, C., D. Carter Y F. Ayala-Fierro.** 2001. Toxicología ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración ambiental. 1996-2001; The University of Arizona.
116. **Peralta, L., F. Mañas, N. Gorla, B. Bosch Y D. Aiassa.** 2007. Estudio de los cromosomas de trabajadores rurales del sur de la Provincia de Córdoba con exposición laboral a plaguicidas. Libro de Resúmenes de Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Pág. 119. Huerta Grande, Córdoba.
117. **Pérez Carrera, A., y A. Fernández Cirelli.** 2007. Problemática del arsénico en la llanura sudeste de la provincia de Córdoba: Biotransferencia a leche bovina. *In Vet*, 9(1), 123-135.
118. **Pérez Carrera, A., y A. Fernández Cirelli.** 2013. Niveles de arsénico y vanadio en aguas naturales en el Departamento de Unión, sudeste de la provincia de Córdoba, Argentina. *AUGMDOMUS*. 5 (Número Especial) I: Aguas.
119. **Pérez, RP., R. Peláez.** 1999. Intoxicación arsenical subaguda - Revista Archivo Médico. revistaamc.sld.cu
120. **Petres, J., D. Barron & M. Hagedorn**. 1977. *Environ. Health Persp.* 19: 223-7.
121. **Pinto, S., M. Varner, K. Nelson**. 1976. Arsenic trioxide absorption and excretion in industry. *J Occup Med* 18(10):677-680.
122. **Smedley, PL., DG. Kinniburgh.** 2002. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*. Elsevier.

123. **Popper, K.** (1978) La lógica de la investigación científica. Madrid: Editorial Tecnos
124. **Preston RJ y GR Hoffmann.** 2008 . Genetic toxicology. En Klaassen CD, ed. Cassaret & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7th ed. Nueva York: Mc Graw Hill; Págs. 381-413.
125. **Ramírez , AV.** Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados. An Fac med. 2006;67(1):49-55.
126. **Ramsey, K.** 2014 . - Handbook of Arsenic Toxicology, - books.google.com.
127. **Raqib, R., S. Ahmed, R. Sultana, Y. Wagatsuma, D. Mondal, AMW.Hoque, B. Nermell, M. Yunus , S. Ro, LA.Persson, SE. Arifeen, S.Moore, & M.Vahter.** 2009. Effects of in utero arsenic exposure on child immunity and morbidity in rural Bangladesh. Toxicology Letters, 185 (3): 197-202
128. **Repetto, M.** 2009. Toxicología Fundamental (4ta ed.). España: Edición Días de Santos.
129. **Reynolds, ES.** 1901. An account of the epidemic outbreak of arsenical poisoning occurring in beer drinkers in the north of England and midland countries in 1900. Lancet. 1:166-170.
130. **Rosenman, K.** 2007. Occupational Heart Disease. In : Rom W and Markowitz S eds. Environmental and Occupational Medicine, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, page 688.
131. **Rosin, MP.** 1992. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. Mutat Res.;267:265-76.
132. **Rossmann, T.** 2007. Arsenic. In : Rom W and Markowitz S eds. Environmental and Occupational Medicine, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, pp1006-1017.
133. **Rossmann T.G., D. Stone, M. Molina & W. Troll.** 1980 . *Environ. Mutagen.* **2**: 371-9.
134. **Rossmann, T, AN. Uddin & FJ. Burns .** 2004 . Tox. Appl. Pharmacol, 198: 394-404.
135. **Ruiz Ramos, R .** 2014 . Exposición al arsénico y patologías asociadas. Rev Mex Med For. researchgate.net

136. **Salazar, AL.** 2010. Toxicología del Arsénico.
137. **Salazar, AL.** 2012 . Sistematización de experiencias del “ Grupo Pro Agua sin Arsénico “ en la problemática de contaminación del agua con arsénico en la parroquia de Tumbaco, dspace.ups.edu.ec
138. **Sancha, A M., R. O`Ryan, C. Marchetti, C. Ferreccio.** 1998. Análisis de Riesgo en la Regulación Ambiental de Tóxicos: Caso del Arsénico en Chile. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Lima – Perú.
139. **Sancha, AM., ML. Castro.** 2001 . - Arsenic exposure and health effects IV.
140. **Schoën, A., B. Beck, R. Sharma & E. Dubé .** 2004 . *Tox. Appl. Pharmacol.* 198: 253-67.
141. **Scotto, J., TR. Fears , JF. Fraumeni . Solar radiation. En: D.Schottenfeld , J. Fraumeni .** 1996 . *Cancer Epidemiology and Prevention.* New York: Oxford University Press; p.355-72.
142. **Silbergend, E.K.** 1998. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Volumen 1, Parte IV: herramientas y enfoques. Toxicología. Capítulo 33.
143. **Smedley, PL., DG. Kinniburgh .** 2002 . A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. Elsevier
144. **Smith, AH., M.Yunus , AF.Khan , A. Ercumen , Y. Yuan , MH.Smith , J.Liaw .** 2013 . Chronic respiratory symptoms in children following in utero and early life exposure to arsenic in drinking water in Bangladesh. *Int J Epidemiol* 2013; 42(4): 1077-86.
145. **Soria de González, RS.** 2009 – Alteraciones bioquímicas en individuos expuestos al arsénico en el agua de bebida en Tucuman, Argentina- *Acta bioquím. clínica.*
146. **Sousa, LP.** 2007. Estudio de Biomonitorización citogenética de una población de trabajadores expuestos al arsénico y caracterización de los posibles factores moduladores del daño genotóxicos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de ciencias Biociències. Departament de Genètica i de Microbiologia. Grup de mutagenei,
147. **States, J. C., S. Srivastava, Y. Chen, & Barchowsky, A.** 2009 . Arsenic and cardiovascular disease, *Toxicological Sciences*, 107, 2, 312-323.

148. **Stevens, J., L. Hall , J. Farmer .** 1977. Disposition of ¹⁴C and/or ⁷⁴As cacodylic acid in rats after intravenous, intratracheal or peroral administration. *Environ Health Perspect* 19:151-157.
149. **Stich, HF., BP. Dunn.** 1988. DNA adducts, micronuclei and leukoplakias as intermediate endpoints in intervention trials. *IARC Sci Publ.* 1988:137-45.
150. **Stich, HF., MP. Rosin .** 1984 . Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett.* ;22:241-53.
151. **Stohrer, G.** Arsenic: opportunity for risk assessment. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v. 65, p. 525-531, 1991.
152. **Suárez, M., F. González-Delgado .** 2004 . Argentina.. Análisis, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones arsenicales.
153. **Swenberg, JA., E. Fryar , Y.Jeong , G. Boysen , T.Starr , VE. Walker, RJ. Albertini .** 2008. Biomarkers in Toxicology and Risk Assessment: Informing Critical Dose-Response Relationships. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(1): 253-265.
154. **Tello, EE.** 1951.Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), sus manifestaciones clínicas. Imprenta de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
155. **Tello, E.E.** 1981 . *Arch. Argent. Dermatol.* **31**: 27-40.
156. **Timbrell , JA.** 1998. Biomarker in toxicology. *Toxicology.* 1998; 129(1- 7): 1-12.
157. **Tolbert, PE., CM. Shy and JW. Allen .** 1992 . Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. *Mutat Res* 271:69-77.
158. **Trelles , R., A. Larghi , J. Páez .** 1970. El problema sanitario de las aguas destinadas a la bebida humana con contenidos elevados de arsénico, vanadio y flúor. Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Ingeniería Sanitaria; Pub N° 4
159. **Tseng, CH.** 2004 . The potential biological mechanisms of arsenicinduced diabetes mellitus. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 197(2): 67-83.
160. **Tsuda, T. , A. Babazono , E. Yamamoto , N. Kurumatani , Y. Mino , T. Ogawa .** 1995 . Ingested arsenic and internal cancer: a historical cohort study followed for 33 years. *Am J Epidemiol.* 141(3):198-20.
161. **Vahter, M.** 2002. *Toxicology .Elsevier. Mechanisms of arsenic biotransformation.*



162. **Vásquez, P- Alfonso P** - 2013 - Evaluación de Arsénico en orina de pobladores adultos del distrito de Ite. TACNA tesis.unjbg.edu.pe
163. **Vega, L., ME. Gonsebatt & P. Ostrosky-Wegman** . 1995 . *Mutat. Res.* **334**: 365-73.
164. **Warner, ML., LE. Moore, MT. Smith, DA. Kalman, E. Fanning, AH. Smith.** 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**: 583-590.
165. **Waters, S., V.Devesa, L. Del Razo, M. Styblo, D. Thomas.** 2004 . Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chemical Research in Toxicology*, **17**: 404 - 409
166. **Wester, RC., HI. Maibach, L.Sedik, J.Melendres, M.Wade,** In vivo and in vitro percutaneous absorption and skin decontamination of arsenic from water and soil. *Fundam . Appl Toxicol.*, **20**:336-340.1993
167. **WHO** . 2001 . World Health Organization. Arsenic and arsenic compounds. WHO. Geneva. 521 págs
168. **WHO** 2012. Arsenic in drinking water- World Health Organization
169. **Wildfang, E., S. Healy, HV. Aposhian.** 2000. Arsenic. In: *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, Canadá.
170. **Xi, S., Y. Jin, X. Lv, & G. Sun.** 2010. Distribution and speciation of arsenic by transplacental and early life exposure to inorganic arsenic in offspring rats. *Biological Trace Element Research*, **134**(1): 84-97.
171. **Yager, J., J. Wiencke.** 1997 . Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutation Research*, **386**: 345 – 351
172. **Yeh, S .,** 1973 . Skin cáncer chronic arsenicism. *Human Pathol.* **4**: 465-485.
173. **Zalacain, M., L. Sierrasesumaga Y A. Patiño.** 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales de Sistemas Sanitarios* **28**: 227-236.



174. **Zaldivar, R.** 1980 . A morbid condition involving cardiovascular, bronchopulmonary, digestive and neural lesions in children and young adults afer dietary arsenic exposure. Zentralbe Bakteriologie. Abt.I.Orig.B 170,44-56
175. **Zuñiga Gonzalez y Gomez Meda.** 2006. La prueba de micronúcleos. La ciencia y el hombre 19: 127-150.



7.704

(49)