

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA



**Influencia de los polimorfismos de la AS3MT y vitamina D en el
metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en
mujeres del Lago Poopó**

Tesis de Post Grado para optar el Título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y
Biomédicas, Mención de Genética toxicológica

Por: Dr. Josue Mamani Jarro

LA PAZ-BOLIVIA

2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA



**Influencia de los polimorfismos de la AS3MT y vitamina D en el
metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en
mujeres del Lago Poopó**

Tesis de Post Grado para optar el Título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y
Biomédicas, Mención de Genética toxicológica

Por: Dr. Josue Mamani Jarro

Tutor: Noemí Sandra Tirado Bustillos MSc

LA PAZ-BOLIVIA

2019

"El derecho humano al agua es indispensable para una vida humana digna y se define como el derecho de cada uno a disponer de agua suficiente, saludable, aceptable, físicamente accesible y asequible para su uso personal y doméstico."

Observación General No. 15. El derecho al agua. Comité de Naciones Unidas de Derechos Económicos, Sociales y Culturales. Noviembre de 2002.

DEDICATORIA

A mis queridos papás Ramón y Margarita quienes me enseñaron sobre el esfuerzo y la humildad.

A mis hermanos, hermanas y Gissela por sus consejos y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Noemí Tirado, mi tutora, por su amistad y la oportunidad de realizar la tesis de maestría bajo su dirección y apoyo.

A todas las mujeres de las comunidades de alrededor del Lago Poopó que participaron de este estudio, por su confianza y excelente disposición, sin las cuales este trabajo no sería posible en lo absoluto.

Al Personal del Instituto de Genética, en especial a Josue Barral, Marina Cuti y Pablo Almaraz por la enseñanza y colaboración en la realización de las distintas pruebas usadas en la presente tesis de forma desprendida y desinteresada.

A los amigos como Gina Torres, y los compañeros de la maestría, por su amistad, y su apoyo.

A Rolando Paz y Franz Ascui por su colaboración en la toma de muestras durante los viajes realizados a las comunidades.

A Profesora Karin Broberg del Instituto Karolinska por la motivación y apoyo científico.

A Jessica De Loma por su amistad, por su ayuda experta y su colaboración incondicional.

Al Departamento de Investigación, Postgrado e Interacción Social (DIPGIS) y a la Agencia de Sueca de Cooperación (ASDI) por la beca de estudios otorgada dentro de la maestría, sin cuyo financiamiento para la realización de la tesis.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN	XII
SUMMARY	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Características químicas del arsénico	3
2.2 Fuentes de exposición a arsénico	4
2.3 Distribución geográfica y ambiental del arsénico en agua subterránea.....	4
2.4 Distribución del arsénico en la cuenca del Lago Poopó.....	5
2.5 Antecedentes históricos de estudios poblaciones de exposición a arsénico en agua de beber en la Cuenca del Lago Poopó	6
2.6 Metabolismo de eliminación del arsénico	9
2.6.1 Influencia de la etnicidad en el metabolismo del arsénico	11
2.6.2 Polimorfismos de AS3MT y eficacia de biotransformación	12
2.6.3 Otros factores que afectan la eficacia biotransformadora del AS	16
2.7 Efectos en la salud humana por exposición a arsénico.....	17
2.7.1 Genotoxicidad del arsénico: Estrés oxidativo y implicaciones biológicas.....	18
2.7.2 Ensayo del cometa como Biomarcador de daño por exposición a arsénico.....	20
2.8 Vitamina D en el metabolismo de metales	22
2.8.1 Fisiología de la vitamina D.....	22
2.8.2 Influencia de la vitamina D en procesos de reparación de daño genético.....	24
2.8.3 Influencia de vitamina D en el metabolismo de metales pesados	26
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS.....	29
6.1 Objetivo general	29

6.2	Objetivos específicos.....	29
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	29
7.1	Diseño.....	29
7.2	Lugar de estudio	29
7.3	Población de estudio.....	30
7.4	Criterios de selección grupo de expuestos.....	31
7.5	Obtención de información poblacional.....	31
7.6	Evaluación médica.....	31
7.7	Toma de muestras biológicas	32
7.7.1	Sangre venosa periférica.....	32
7.7.2	Orina	32
7.7.3	Toma de muestras de agua de consumo	33
7.8	Procesamiento de muestras.....	33
7.8.1	Medición de exposición a arsénico.....	33
7.8.2	Genotipificación de polimorfismos de AS3MT	34
7.8.3	Ensayo del cometa.....	37
7.8.4	Cuantificación de concentración sérica de vitamina D 25 OH.....	37
7.9	Análisis estadístico	38
7.10	Consideraciones éticas.....	39
8.	RESULTADOS	39
8.1	Distribución geográfica de la muestra poblacional	39
8.2	Estado de salud de la población de estudio	41
8.3	Indicador de exposición ambiental.....	41
8.3.1	Arsénico en agua de beber.....	41
8.3.2	Arsénico en orina.....	43
8.4	Metabolismo de eliminación del arsénico inorgánico	45
8.4.1	Análisis de las especies producto del metabolismo del As inorgánico	45
8.4.2	Variabilidad en el perfil metabólico de Análisis de las especies producto del metabolismo del As inorgánico	46
8.4.3	Edad y perfil metabólico.....	47
8.4.4	Etnicidad y perfil metabólico	48
8.4.5	Polimorfismo genético y perfil metabólico	49
8.4.6	Equilibrio de Hardy-Weinberg	50

8.4.7 Perfil metabólico urinario del arsénico con relación a los polimorfismos rs3740393 y rs11191439 del AS3MT	51
8.4.8 Estatus de vitamina D y perfil metabólico.....	53
8.5 Genotoxicidad del arsénico	55
8.5.1 Daño genotóxico en las mujeres expuestas a arsénico en el agua de beber	55
8.5.2 Daño genotóxico según perfil metabólico de eliminación de As	56
8.5.3 Daño genotóxico según etnicidad.....	57
8.5.4 Daño genotóxico según lugar de residencia	57
8.5.5 Polimorfismo genéticos de AS3MT y daño genotóxico.....	58
8.5.6 Estatus de vitamina D y daño genotóxico	59
8.6 Exposición a arsénico y estatus de vitamina D en frecuencia de pterigion.....	60
9. DISCUSIÓN.....	63
10. CONCLUSIONES.....	70
12. REFERENCIAS	73
13. ANEXOS.....	86
13.1 Anexo 1. Hoja de información	86
13.2 Anexo 2. Consentimiento informado	87
13.3 Anexo 3. Cuestionario dirigido	88
13.4 Anexo 4. Cuestionario de exposición solar	92

ABREVIATURAS

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

IMC: Índice de masa corporal (kg/m²)

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

AsIII: Arsénico inorgánico trivalente

AsV: Arsénico inorgánico pentavalente

MMA: Monometil arsénico

DMA: Dimetil arsénico

HPLC-HG-ICPMS: Cromatografía líquida de alto rendimiento en línea con generación de hidruro y ICP-MS

U-As: Suma de las concentraciones de metabolitos de arsénico (iAs + MMA + DMA) en orina

iAs: suma de As (III) y As (V)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

Eh: Potencial de óxido reducción

HGDP: Human Genome Diversity Project

Tail Moment (TM): longitud de migración del ADN fuera del núcleo conformando la cola del cometa.

Olive Tail Moment (OTM): tamaño de la cola del cometa más la fracción de ADN total desde el centro de la cabeza hasta el final de la cola.

% ADN en cola: porcentaje de ADN en la cola del cometa que indica la cantidad de ADN fragmentado que migró en la electroforesis.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y nomenclatura de algunas especies de arsénico.....	3
Figura 2. Aparición mundial de arsénico en las aguas subterráneas y en las regiones/ países más vulnerables del mundo.....	5
Figura 3. Entorno geomorfológico del norte de Chile, sur de Perú y la parte andina de Bolivia.	8
Figura 4. Biotransformación del arsénico en humanos.....	9
Figura 5. Vías metabólicas de eliminación del arsénico inorgánico en seres humanos.....	11
Figura 6. Variabilidad del metabolismo del arsénico interpoblacional.....	12
Figura 7. Polimorfismos de un solo nucleótido de la AS3MT y sus efectos en el metabolismo del arsénico y la salud.....	13
Figura 8. Frecuencias alélicas en la AS3MT en diversas poblaciones.....	14
Figura 9. Genotoxicidad inducida por arsénico.....	20
Figura 10. Síntesis de vitamina D y sus metabolitos.....	23
Figura 11. Modelo funcional de la relación entre la vitamina D/VDR y la respuesta a daño genético.....	26
Figura 12. Comunidades de estudio en alrededor del lago Poopó.....	29
Figura 13. Pozo de agua en un domicilio de agua de la comunidad de Vila Ñeque.....	33
Figura 14. Fuentes de agua de consumo de las mujeres de las comunidades.....	43
Figura 15. Gráfico de dispersión de concentración de arsénico total en orina en relación con la concentración media de arsénico en agua de beber por comunidad.....	43
Figura 16. Diagrama de caja del nivel de U-As en relación a la etnicidad.....	44
Figura 17. Metabolismo de eliminación de arsénico en la población de estudio.....	45
Figura 18. Heatmap de correlaciones entre fracciones del metabolismo de eliminación de arsénico y factores de influencia.....	46
Figura 19. Porcentajes de iAs, MMA y DMA urinarios en función de la edad.....	47
Figura 20. Amplificación de rs111191439 y rs3740393 por RT-PCR y análisis de scatter- plot para discriminación genotípica.....	50
Figura 21. %MMA y cociente DMA/MMA para el SNP 3740393.....	54
Figura 22. Estatus de vitamina D2/D3 en las mujeres del estudio.....	54

Figura 23. Relación del estatus de vitamina D y los índices de metilación MMA/iAs y DMA/MMA.....	56
Figura 24. Daño genotóxico determinado mediante ensayo de cometa, evaluado a través del programa Comet Score.	57
Figura 25. Heatmap de correlaciones entre el %ADN en cola de linfocitos de sangre periférica por ensayo del cometa y factores de influencia.....	58
Figura 26. Relación del estatus de vitamina D y grupos étnicos.....	59
Figura 27. Relación del % de daño genético y comunidades de residencia de la población.....	60
Figura 28. Relación del % de daño genético y genotipos de SNP1191439 y SNP 3740393 de la AS3MT.....	61
Figura 29. Relación del % de daño genético y estatus de vitamina D.....	61
Figura 30. Pterigion en mujer expuesta a arsénico y alta radiación solar	62
Figura 31. Relación de la concentración plasmática de vitamina D y pterigion.....	64
Figura 32. Relación de la concentración de U-As y pterigion.....	64
Figura 33. Relación del porcentaje de daño genético y pterigion.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fototipos de piel.....	33
Tabla 2. Distribución geográfica de la población de estudio en las comunidades alrededor del Lago Poopó.....	40
Tabla 2. Características demográficas de la población.....	41
Tabla 3. Características clínicas de la población de estudio.....	42
Tabla 4. Concentración de arsénico ($\mu\text{g/L}$) en agua de consumo en cada comunidad.....	43
Tabla 5. Distribución de los valores de U-As ($\mu\text{g/L}$) en la población según lugar de residencia.....	44
Tabla 6. Regresión lineal de factores asociados a U-As.....	46
Tabla 7. Perfil metabólico de eliminación de arsénico en la población de estudio.....	47
Tabla 8. Comparación de metabolismo de eliminación del As según grupo étnico.....	50
Tabla 9. Distribución de los polimorfismos de rs3740393 y rs11191439 en la población total y por distinción de grupo étnico.....	51
Tabla 10. Frecuencia de alelo menor de SNP AS3MT en comparación con otras poblaciones.....	52
Tabla 11. Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	52
Tabla 12. Perfil metabólico urinario del arsénico en relación a los polimorfismos rs3740393.....	53
Tabla 13. Perfil metabólico urinario del arsénico en relación a los polimorfismos rs11191439.....	53
Tabla 14. Concentración de Vitamina D 25(OH) D2/D3 ajustada por otras variables.....	53
Tabla 15. Perfil metabólico urinario del arsénico en relación al estatus de vitamina D.....	53
Tabla 16. Daño genético por exposición a arsénico en la población de estudio.....	57
Tabla 17. Características de clínicas de las mujeres participantes de acuerdo a la presencia de pterigion.....	63

RESUMEN

Las comunidades altiplánicas Aymara-Quechua y Urus residentes alrededor del Lago Poopó en el departamento de Oruro-Bolivia, viven en una de las regiones de clima semiárido, de escasa pluviosidad anual, flujo hidrológico lento, por lo que se ven obligados a consumir agua de pozo contaminada con altas concentraciones de arsénico inorgánico. La variabilidad en la capacidad metabólica de eliminación de arsénico se ha asociado a factores tales como el género, la edad, el nivel de exposición, la etnia, dieta, estado nutricional y la presencia de polimorfismos en el gen de la enzima arsénico 3 metiltransferasa (AS3MT) relacionado con la metilación del arsénico inorgánico (iAs) a sus formas orgánicas monometilarsénico (MMA) y dimetilarsénico (DMA). El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de los polimorfismos de la AS3MT y vitamina D en el metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en mujeres del Lago Poopó. Se realizó un estudio de corte transversal, en el cual se aplicó una encuesta, examen clínico, los metabolitos de arsénico urinario fueron medidos mediante HPLC-HG-ICPMS, los genotipos rs11191439 y rs3740393 de la AS3MT fueron determinados por RT-PCR, la concentración plasmática de vitamina D₂/D₃ fue determinada por ensayo por ELISA y el daño genético fue evaluado mediante test de cometa en linfocitos de sangre periférica. Se incluyó 74 mujeres de 8 comunidades alrededor del Lago Poopó, cuya exposición a As fue medido como la sumatoria de metabolitos de arsénico en orina (U-As=iAs, MMA, DMA). La eficiencia metabólica fue evaluada mediante los porcentajes de las fracciones de metabolitos de As en orina. Las mujeres presentaron un amplio rango de exposición a As, U-As (mediana: 69,29 μ g/L; rango: 11,8 a 288,7 μ g/L), con una eficiente capacidad metabólica de eliminación de arsénico con un alto %DMA (mediana: 82,2%) y bajo %MMA (mediana: 6,4%). Los resultados mostraron mayor frecuencia de las variantes protectoras de los SNP de la AS3MT (rs11191439: T=0,91 y rs3740393: C=0,93) que están asociadas a una alta capacidad metiladora del As y menor % de daño genotóxico. Por otra parte, la mediana del nivel plasmático de Vitamina D fue 19,14 ng/mL, las mujeres con un estatus de suficiencia de vitamina D tienen un 2% menos de MMA, y menor % de daño genético en comparación con los estados deficitarios.

Palabras claves: Arsénico, agua, AS3MT, polimorfismos, vitamina D, metabolismo, daño genético

SUMMARY

The highland communities Aymara-Quechua and Urus residents around Lake Poopó in the department of Oruro-Bolivia, live in one of the regions of semi-arid climate, low annual rainfall, slow hydrological flow, so they are forced to consume water from well contaminated with high concentrations of inorganic arsenic. Variability in the metabolic capacity of arsenic elimination has been associated with a large number of factors, such as gender, age, exposure level, ethnicity, diet, nutritional status, the presence of polymorphisms in the arsenite methyltransferase (AS3MT), gene related to methylation of inorganic arsenic (iAs) to its organic forms monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsenic acid (DMA). This study aimed to assess the arsenic exposure in the communities around Lake Poopó, and to evaluate the influence of the polymorphisms rs11191439 and rs3740393 of the AS3MT and the status of vitamin D on the metabolism of arsenic and DNA damage. A cross-sectional study was carried out, in which a survey was applied, clinical examination, urinary arsenic metabolites were measured by HPLC-HG-ICP-MS, genotypes rs11191439 and rs3740393 of AS3MT were determined by RT-PCR, the plasma concentration of vitamin D2 / D3 was determined by ELISA and the genetic damage was evaluated by comet assay in peripheral blood lymphocytes. We included 74 women from 8 communities around Lake Poopó, whose exposure to As was measured as the sum of arsenic metabolites in urine (U-As = iAs, MMA, DMA). The metabolic efficiency was evaluated by the percentages of the fractions of As metabolites in urine. The women presented a wide range of exposure to As, U-As (median: 69.29 µg / L, range: 11.8 to 288.7 µg / L), with an efficient metabolic capacity of arsenic elimination with a high% DMA (median: 82.2%) and low% MMA (median: 6.4%). The results showed a higher frequency of the protective variants of the SNP of the AS3MT (rs11191439: T = 0.91 and rs3740393: C = 0.93) that are associated with a high methylation capacity of the As and lower % of DNA damage. On the other hand, the median level of plasma vitamin D was 19.14 ng/mL, women with a vitamin D sufficiency status have 2% less MMA, and lower% of genetic damage compared to deficit states.

Keywords: Arsenic, water, AS3MT, polymorphisms, vitamin D, metabolism, DNA damage

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de arsénico inorgánico (iAs) en el agua para beber constituye un problema de salud pública de orden global. Se estima que alrededor de 140 millones de personas están expuestas al iAs, a través del agua de consumo en todo el mundo (Pierce et al., 2013).

La preocupación de la exposición a arsénico se debe a que este está clasificado según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como un agente carcinogénico de grupo 1 para los humanos (Shankar et al., 2014). El arsénico es considerado un agente tóxico capaz de causar diversos tipos de cáncer como ser cáncer de piel, vejiga, hígado y/o pulmón (Khairul, Wang, Jiang, Wang, & Naranmandura, 2015). Por otro lado, es importante mencionar la acción co-carcinogénica del arsénico en relación al efecto genotóxico de la radiación ultravioleta (UV) en poblaciones expuestas a ambos factores, debido a su capacidad de alterar los mecanismos de reparación de daño al DNA inducido por la radiación UV (Salnikow & Room, 2009).

Las altas concentraciones de iAs en el agua se deben principalmente a procesos geogénicos como las erupciones volcánicas y los movimientos tectónicos que conforman el relieve terrestre. Por estos motivos, ríos y canales subterráneos que tienen un origen volcánico-cordillerano presentan altos niveles de arsénico, y no es de extrañar que las poblaciones más afectadas sean las que comparten el cinturón de fuego del Pacífico, es decir, las de países como India, Taiwán, Bangladesh y Vietnam para el sudeste asiático y América Latina (Bundschuh et al., 2012).

Las poblaciones ancestrales de los altiplanos de América del Sur, han estado expuestas en muchas generaciones a las altas concentraciones de arsénico en el agua, en este sentido, estudios genómicos llevados a cabo en el altiplano argentino, han puesto en evidencia posibles mecanismos de adaptación metabólica al arsénico atribuidos a los polimorfismo en la enzima arsénico 3 metiltransferasa (As3MT), enzima principal y específica del metabolismo del arsénico, cuyas mutaciones positivas facilitan la eliminación de arsénico inorgánico presente en el agua (Vahter et al., 1995). Esto ha promovido que recientes investigaciones consideren la etnicidad como un rasgo de variabilidad o bien de adaptación al hidroarsenismo (Schlebusch et al., 2015).

Aparte del estudio de la influencia de la etnicidad y genética, también se ha estudiado con énfasis la influencia del estilo de vida, dieta y el estado nutricional sobre el metabolismo de eliminación del arsénico (Hall & Gamble, 2012; Jansen et al., 2015). Por ejemplo, en una

investigación sobre la dieta y su efecto en el metabolismo del arsénico (López-Carrillo et al., 2016), se concluyó que el consumo de alimentos ricos en metionina, colina, folato, vitamina B12, zinc, selenio, y vitamina C favorece la eliminación de iAs principalmente por el aumento del porcentaje de las formas metiladas del arsénico.

Sin embargo, queda aún por investigar la importancia de otros nutrientes como la vitamina D sobre el metabolismo del iAs. Actualmente, se sabe que la vitamina D desempeña un papel importante no sólo en la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo, sino también con la capacidad de modular la función inmune innata y adaptativa, la función cardiovascular, la proliferación y diferenciación celular, y mecanismos de reparación de daño genético (Khammissa et al., 2018; Nair-Shalliker, Armstrong, & Fenech, 2012), también se ha estudiado el efecto de esta vitamina en la toxicidad por metales pesados, aunque sin reportes sobre la relación entre el estatus de vitamina D y el metabolismo del As (Schwalfenberg & Genuis, 2015).

Las comunidades Aymara-Quechua y Uru alrededor del lago Poopó del departamento de Oruro-Bolivia, presentan poblaciones humanas con exposición crónica a arsénico a través del agua bebibible hasta valores de 250ug/L (Muñoz & Aguirre, 2014; Ormachea Muñoz et al., 2013).

Estudios iniciales de biomonitorización de estas comunidades realizados por la Unidad de Genética Toxicológica del Instituto de Genética en cooperación con el IRD y el Instituto Karolinska, encontraron que las mujeres de estas poblaciones presentan un eficiente metabolismo del arsénico inorgánico presente en el agua de consumo (De Loma et al., 2019; Gardon, Tirado, Broberg, & Vahter, 2016)

El presente trabajo de investigación está enmarcado dentro del proyecto Toxicología Ambiental en Bolivia “Toxbol” que tiene dentro de sus objetivos llenar la enorme brecha de datos sobre la exposición a metales tóxicos y sus posibles efectos adversos para la salud humana en Bolivia. Por ello, este trabajo tiene como objetivo evaluar el papel de los polimorfismos de la As3MT y la influencia de la concentración de vitamina D sobre el metabolismo del iAs y daño genético producido por exposición crónica a agua contaminada con arsénico en mujeres de comunidades alrededor del Lago Poopó, y persigue el fin de aportar un poco más de conocimientos sobre la problemática de contaminación de metales pesados en el medio ambiente y su efecto en las poblaciones en

Bolivia, para plantear nuevas investigaciones y proyectos que busquen resolver esta problemática.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características químicas del arsénico

El arsénico es un metaloide que pertenece al grupo VA y periodo 4 de la tabla periódica. Su número atómico es 33 y su masa atómica es 74,92. El As, se encuentra en raras ocasiones en estado puro, es más frecuente encontrarlo combinado con metales y las sales de arsénico que exhiben un amplio rango de solubilidad en función del pH y la Eh. Se presenta como elemento inorgánico cuando está en combinación con otros metales como el plomo, cobre, zinc o el oro y, en forma de elemento orgánico, en combinación con carbono e hidrogeno. El As puro tiene un color gris metálico, mientras la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos tienen una coloración blanca o incolora. El As no tiene un olor ni sabor especial, por lo que su presencia en el agua, alimentos o aire pasa desapercibida.

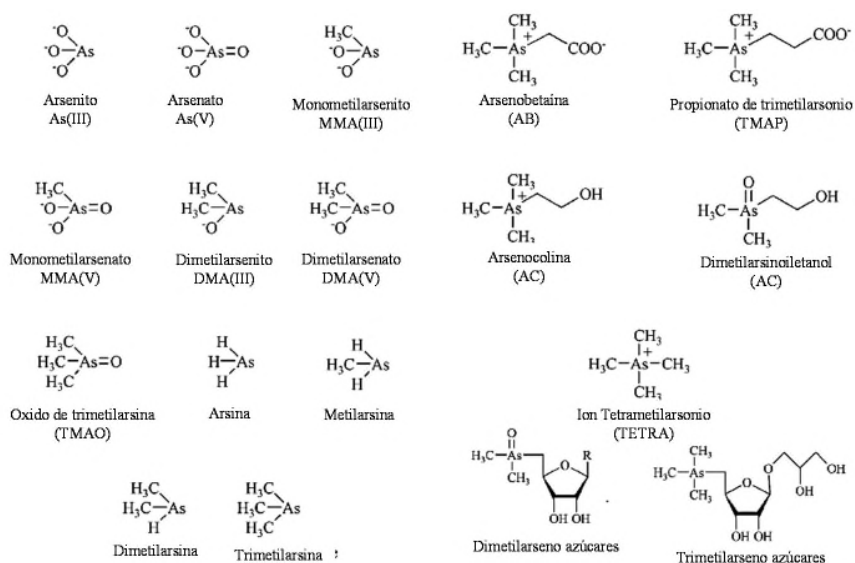


Figura 1. Estructura y nomenclatura de algunas especies de arsénico.

Fuente: Modificado de Francesconi and Kuehnelt, 2004.

La estructura química de algunos compuestos de As (Figura 1) y su estabilidad depende de su valencia y de la naturaleza del medio, por ejemplo, un ambiente oxigenado y básico favorece la formación de la forma pentavalente, mientras la forma trivalente es dominante en condiciones reductoras ácidas (WHO, 2001). Los compuestos de As se pueden

encontrar en roca, suelo, agua y aire, y tejidos de plantas y animales; las formas más frecuentes del iAs son el arsenito (As III) y el arsenato (As V), y las formas orgánicas más frecuentes son el ácido monometilarsónico (MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) (Francesconi & Kuehnelt, 2004).

2.2 Fuentes de exposición a arsénico

La exposición humana al arsénico puede ocurrir mediante tres vías principales: por inhalación de aire, por ingestión de alimentos y agua, y por absorción dérmica (Medina Pizzali, Robles, Mendoza, & Torres, 2018). La exposición al arsénico deriva de varias fuentes como el uso y manufactura de pesticidas y herbicidas, minería y metalurgia, fundición y refinación de metales, uso de combustibles fósiles, uso de medicamentos y remedios, contacto con maderas prensadas y tratadas con preservantes arsenicales, ingesta de agua contaminada, el uso de agua contaminada en la preparación de alimentos y el riego de cultivos alimentarios y el tabaco para fumar (Hughes, Beck, Chen, Lewis, & Thomas, 2011). La principal forma de exposición no ocupacional al arsénico en su forma inorgánica es a través de alimentos y agua (Hong, Song, & Chung, 2014).

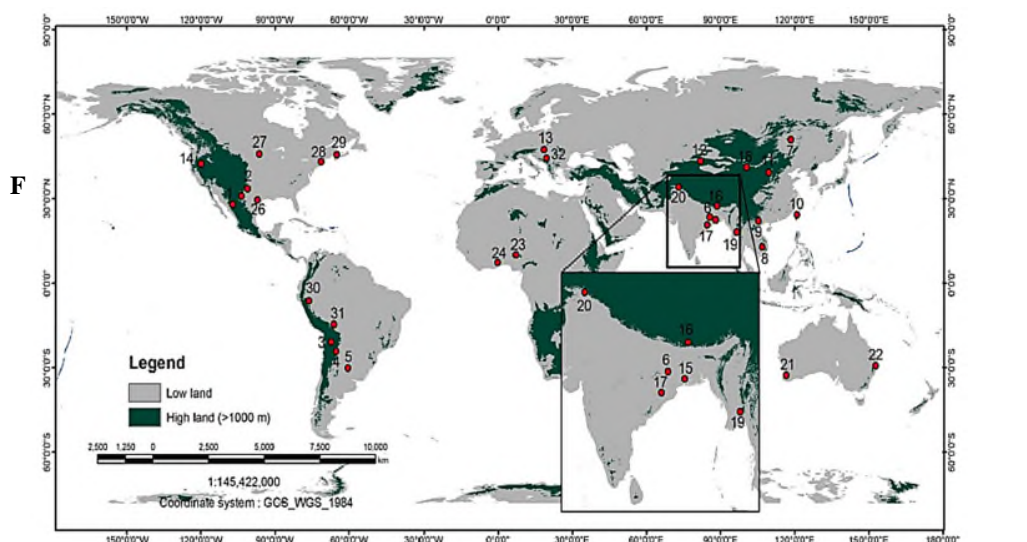
Las altas concentraciones de arsénico en su forma inorgánica en el agua se deben principalmente a procesos geogénicos como las erupciones volcánicas y los movimientos tectónicos que conforman el relieve terrestre. Por estos motivos, ríos y canales subterráneos que tienen un origen volcánico-cordillerano presentan altos niveles de arsénico. Por lo tanto, no es de extrañar que las poblaciones más afectadas sean las que comparten el cinturón de fuego del Pacífico, es decir, las de países como India, Taiwán, Bangladesh y Vietnam para el sudeste asiático y América Latina (Bundschuh et al., 2012).

2.3 Distribución geográfica y ambiental del arsénico en agua subterránea

La Organización Mundial de la Salud estimó en 2001 que 130 millones de personas en todo el mundo están expuestas a concentraciones de arsénico en agua de beber por encima de 50 µg/ L y que para 2012, la cifra de personas expuestas a agua contaminada con arsénico llegó a 200 millones distribuidas en 50 países (WHO, 2001). La distribución de aguas subterráneas contaminadas con arsénico se puede apreciar en la figura 2.

Las Naciones Unidas indican que el envenenamiento por arsénico es el segundo más importante peligro para la salud relacionado con el agua potable, superado solo por la contaminación de microorganismos patógenos (Johnston, Heijnen, & Wurzel, 2001).

La movilización del As desde sedimentos acuíferos dentro del agua como un proceso geoquímico natural, que ocurre en diferentes sistemas de agua subterránea a nivel global, principalmente en regiones de alta vulnerabilidad del Sudeste de Asia, Estados Unidos, América Latina y Europa (Herath, Vithanage, Bundschuh, Maity, & Bhattacharya, 2016).



Número	Ubicación	Número	Ubicación
1	Distrito Lancunaria, México	17	India central
2	Central Norte, México	18	Mongolia
3	Antofagasta, Chile	19	Miamar
4	Noreste, Argentina	20	Pakistan
5	Pampa Chaco, Argentina	21	Perth, Australia
6	Delta del Rio Rojo	22	New South Wales, Australia
7	China	23	Nigeria
8	Delta del rio Mckong, Lao-Mongolia	24	Ghana
9	Vietnam	25	Sur de Texas
10	Taiwan	26	Norte de Texas
11	Shanxi, China	27	Minesota
12	Llanura de Xianjiang, China	28	Nueva Inglaterra
13	Gran llanura Hungara, Hungaria-Romania	29	Canada
14	Este de los Estados Unidos	30	Perú
15	Cuenca Bengala	31	Bolivia
16	Nepal	32	Serbia

Figura 2. Aparición mundial de arsénico en las aguas subterráneas y en las regiones / países más vulnerables del mundo.

Fuente: Modificado de Herath I, et al. 2016.

2.4 Distribución del arsénico en la cuenca del Lago Poopó

Bolivia se encuentra en la zona central de América del Sur, entre los meridianos 57° 26' y 69° 38' de longitud occidental del meridiano de Greenwich y los paralelos 9° 38' y 22° 53' de latitud sur por lo tanto abarca más de 13° geográficos. Sus 1 098 581 km² de superficie se extienden desde los Andes Centrales, pasando por parte del Chaco hasta la Amazonía. Los andes bolivianos son habitados principalmente por las etnias Aymara, Quechua y en

menor proporción por otros pueblos como ser los Uros muratos, Uru chipayas (Lara Barrientos, 2012), esta región se caracteriza por ser una región con un sistema hídrico escaso, escasa época de lluvias y por lo tanto escaso acceso agua potable. Además, los andes bolivianos tienen una historia de producción minera debido a la característica geológica de su territorio, durante muchos años se realiza explotación de minerales como estaño, plata, entre otros sin la debida legislación ambiental, lo que ha causado la contaminación de suelos y recursos hídricos de metales pesados (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), 2011).

La región del lago Poopó / La subcuenca del Lago Poopó se encuentra en el departamento de Oruro, forma parte del sistema hídrico del altiplano boliviano conformado por el Lago Titicaca, Río Desaguadero, Lago Poopó y el Salar de Coipasa (Sistema TDPS), esta unidad geográfica se extiende entre los paralelos 14°03' y 20°00' de latitud Sur y los meridianos 66°21 y 71°01' de longitud Oeste, y está enmarcada en un paisaje dominado por picos nevados que superan los 6.500 msnm, la altiplanicie esteparia de los Andes centrales y los salares que parecen mostrar el destino inexorable de este sistema hídrico afectado por un proceso natural acelerado de salinización (Van Damme, 2002).

Estudios en Bolivia han demostrado la contaminación natural y antropogénica con arsénico de cuencas hídricas como la del lago Poopó (Ormachea Muñoz et al., 2016), subcuenca Huanuni del departamento de Oruro (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, 2012); del Río Pilcomayo (Stassen et al., 2012), Río Chilco, Río Tupiza, así como de fuentes de agua cercanas a campos petrolíferos en el Chaco Boliviano abarcando departamentos de Potosí, Tarija y Chuquisaca (Gonzalez Alonso, Esteban-Hernandez, Valcarcel Rivera, Hernandez-Barrera, & de Miguel, 2010).

2.5 Antecedentes históricos de estudios poblaciones de exposición a arsénico en agua de beber en la Cuenca del Lago Poopó

La problemática de contaminación de agua con arsénico en la cuenca del Poopó fue descrita desde 1996 en el trabajo "Proyecto Piloto de Oruro" (PPO) que fue llevado a cabo desde 1992 a 1996, en el cual se estudió las condiciones ambientales generales del noreste del departamento de Oruro, que incluía la región del lago Poopó (Molina, Ibañez, & Gibon, 2012). Las conclusiones del PPO fueron que la actividad minera y la industria metalúrgica junto con las fuentes naturales (agua geotérmica y lixiviación de rocas que contribuyen a la liberación de As en el medio ambiente) eran los responsables del proceso de contaminación

ambiental por arsénico, la estimación de As liberado dentro de la cuenca del Poopó fue de 66 toneladas por año de las cuales solo el 15% se debería a actividad antropogénica.

Posteriormente el Servicio Geológico Minero de Bolivia (SERGEOMIN) en su reporte sobre la inventariación de recursos naturales renovables (hídricos) y no renovables (minerales e hidrocarburos) del departamento de Oruro (1999), confirma que la contaminación de la cuenca TDSP es producida por fuentes naturales y antropogénicas. Las principales fuentes naturales se encuentran en el occidente en las Cordilleras Oriental y Occidental, y el Altiplano Andino, donde está As liberado de la lixiviación de rocas predominantemente volcánicas y sus productos de intemperie, y localmente por manifestación geotérmica (SERGEOMIN, 1999).

Las manifestaciones geotérmicas en la Cordillera Occidental son considerados como principales contribuyentes a las aguas superficiales en arroyos que alimentan los salares de Coipasa y Uyuni (Figura 3) alcanzando sus concentraciones de As hasta 4600 µg/L. El arsénico se libera en el Ambiente en la Cordillera Oriental, predominantemente en su forma sulfídica, depósitos de minerales, otras rocas y relaves principales. En la llanura hacia el oeste de La Cordillera Oriental, se ubican varias industrias metalúrgicas, que adicionalmente contribuyen a la liberación en la atmósfera, pedosfera e hidrosfera (Ormachea M, 2015; SERGEOMIN, 1999).

Desde 2009, Quintanilla y col., realizaron una evaluación preliminar acerca de la contaminación agua subterránea, agua superficial y de suelos en los departamentos de La Paz y Oruro, y su relación con la geología, la actividad minera y su impacto en la salud humana; estos autores reportan elevadas concentraciones de arsénico provenientes de fuentes geológicas y antropogénicas tanto en aguas subterráneas como superficiales (Quino & Quintanilla, 2013).

Un fenómeno interesante en la distribución del arsénico fue observado por Selander y Svan (2007), quienes observaron que las concentraciones de arsénico en el agua y sedimentos del lago Poopó tiene un flujo de norte a sur, para ello tomaron aguas dentro de los 15 cm de profundidad debajo de la superficie del lago en las regiones norte (El Choro), sureste (Llapallapani) y suroeste (Pampa Aullagas) durante dos excursiones en el otoño de 2006 (Selander L, 2017). Las concentraciones medias (\pm SD) fueron de 6.7 ± 4.3 µg / L en la parte norte del lago Poopó ($2.4\text{--}13.8$ µg / L, n = 7). Se incrementaron en un factor de 23.5 a

157.5 ± 27.7 µg/L hacia los sitios de muestreo en el SE y SO del lago (89.8–202.3 µg/L, n = 12). La misma tendencia se pudo observar para las muestras de sedimentos. El valor medio de As (± SD) en los sedimentos fue de 1187.8 ± 348.7 mg/kg en parte norte del lago (756.1–1673.3 mg/kg, n = 7) y mayor por factor 1.8 a 2167.1 ± 304.9 en los sitios de muestreo en el sur (1459.5–2662.2 mg/kg, n = 12). La relación entre la media como contenido en sedimento a As en agua es más alto en el norte (177.3) y más bajo (13.8) en el área SE y SO. Esto puede explicarse por una creciente movilización de As, de norte a sur, de los sedimentos al agua y al mismo tiempo la concentración en el agua se incrementa debido a la evaporación (Bundschuh et al., 2012; Ramos Ramos et al., 2012).

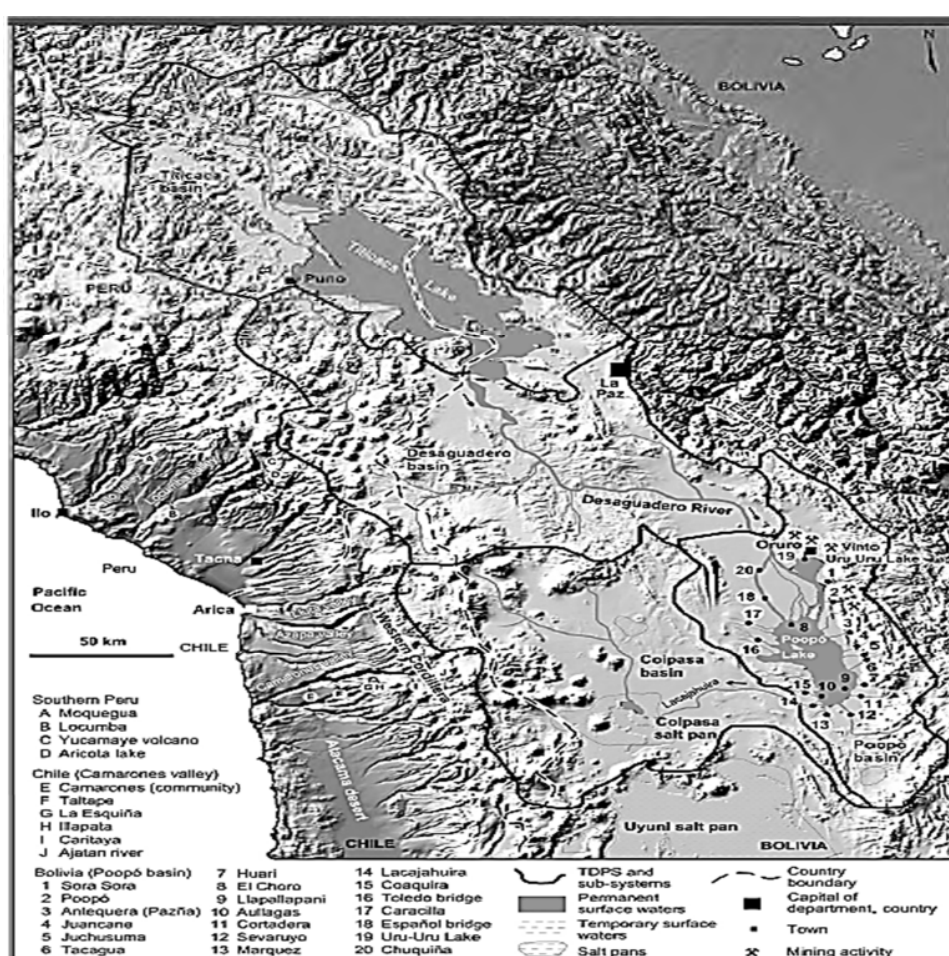


Figura 3. Entorno geomorfológico del norte de Chile, sur de Perú y la parte andina de Bolivia. El modelo digital de elevación digital del mundo PIA3388 (<http://photojournal.jpl.nasa.gov>) es cortesía de NASA / JPL-Caltech.

Fuente: Modificado de Bundschuh et al. 2012.

2.6 Metabolismo de eliminación del arsénico

El principal mecanismo de eliminación del arsénico inorgánico en el ser humano, es su metabolización o biotransformación en compuestos orgánicos, los son excretados por la vía urinaria (Ramírez, 2013). El proceso de metabolización se desarrolla principalmente en el sistema hepático, se caracteriza por reacciones de reducción y metilación del arsénico inorgánico (iAs), sin embargo, debe destacarse que en este proceso puede ocurrir una única metilación o bien una segunda metilación para un mismo compuesto. Se ha identificado a las enzimas Arsenato reductasa y Arsénico (+3) metiltransferasa o AS3MT, y los cofactores glutatión (GHS) y S-Adenosilmetionina (SAM) como los elementos que catalizan el proceso de metilación en los compuestos inorgánicos y del monometilarsénico (Minatel et al., 2018). De forma general, el proceso de metilación inicia con la acción de la enzima Arsenato Reductasa que produce la reducción de las formas pentavalentes del iAs (AsV) a las formas de arsenitos (AsIII) usando como cofactor al GSH, posteriormente las formas AsIII son metiladas por la AS3MT que transfiere el grupo metilo de la SAM al AsIII para formar MMA y DMA los que luego serán excretados en la orina como monometilarsénico (MMA) o dimetilarsénico (DMA), de acuerdo al número de metilaciones recibidas (Figura 4).

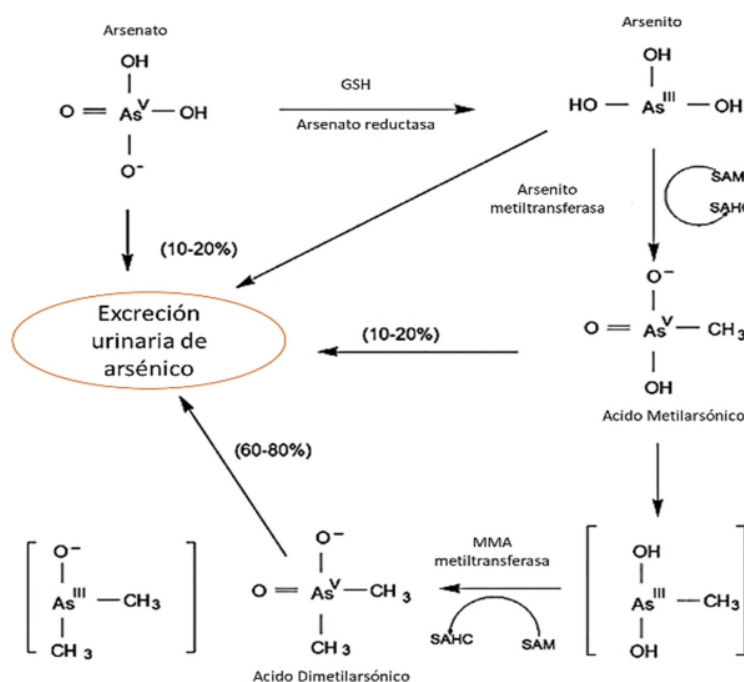


Figura 4. Biotransformación del arsénico en los seres humanos.

Abreviaturas: GSH: Glutathion, SAM: S-adenosilmetionina, SAHC: S-adenosilhomocisteína.

Fuente: Modificado de Tchounwou et al., 2018.

Actualmente, se acepta la existencia de dos hipótesis en torno a la vía de metabolización del As en relación al proceso de metilación, la primera se denomina oxidativa o clásica, y la segunda reductora (Figura 5).

La vía oxidativa o clásica se basa en reacciones de reducción y metilación oxidativa, donde los metabolitos que serán excretados en la orina son compuestos de monometilarsénico y dimetilarsénico trivalentes. En cambio, en la vía reductora suceden reacciones de reducción y metilación reductora, donde los compuestos inorgánicos previos a ser metilados conformaran complejos con glutatión, para finalmente ser eliminados como monometilarsénico y dimetilarsénico pentavalentes (M. A. Apata, 2015; Cullen, 2014; Sun et al., 2014).

Conforme a nuevas evidencias en torno a los niveles de toxicidad de los compuestos de arsénico, es que se ha podido concluir que los de tipo trivalente son más tóxicos, y específicamente que el monometilarsénico trivalente es el más citotóxico y genotóxico para los seres humanos, es decir, mucho más que los compuestos inorgánicos tri o pentavalentes, en tanto que, en la vía reductora los metabolitos excretados son de tipo pentavalentes, es decir, son compuestos de arsénico con la menor toxicidad. (Gamboa-Loira, Cebrián, Franco-Marina, & López-Carrillo, 2017).

Los porcentajes de productos metilados pentavalentes presentes en la orina permiten definir patrones de eficiente metabolización (% de iAs; % de MMAV; % de DMAV; así como proporciones de MMAV/iAs y DMAV/MMAV), siendo los valores de MMAV y DMAV los más importantes para el diagnóstico de una eficiente primera o segunda metilación, respectivamente (Agusa, Fujihara, Takeshita, & Iwata, 2011; Hughes et al., 2011).

Por otra parte, se ha establecido que la relación MMA/DMA en individuos expuestos a arsénico es predictiva del riesgo de cáncer y se ha utilizado para evaluar la influencia de los polimorfismos en la susceptibilidad a la toxicidad por arsénico (Xu et al., 2016). Varios estudios también han demostrado que las lesiones cutáneas precancerosas se asocian con una mayor proporción de MMA / DMA en la orina (Martinez, Becker-santos, Vucic, Lam, & Lam, 2011). Por lo tanto, la relación MMA / DMA se puede usar como un indicador del riesgo de enfermedad en poblaciones expuestas a arsénico (Minatel et al., 2018).

Se ha establecido de manera estándar para un individuo sano, que del total de arsénico excretado en la orina, el 10-30% corresponde a iAs, el 10%-20% a MMA

(MMA^{III}+MMA^V), y 60-80% a DMA (DMA^{III}+DMA^V) (Tchounwou et al., 2018; Thomas et al., 2007; Vahter, 2002).

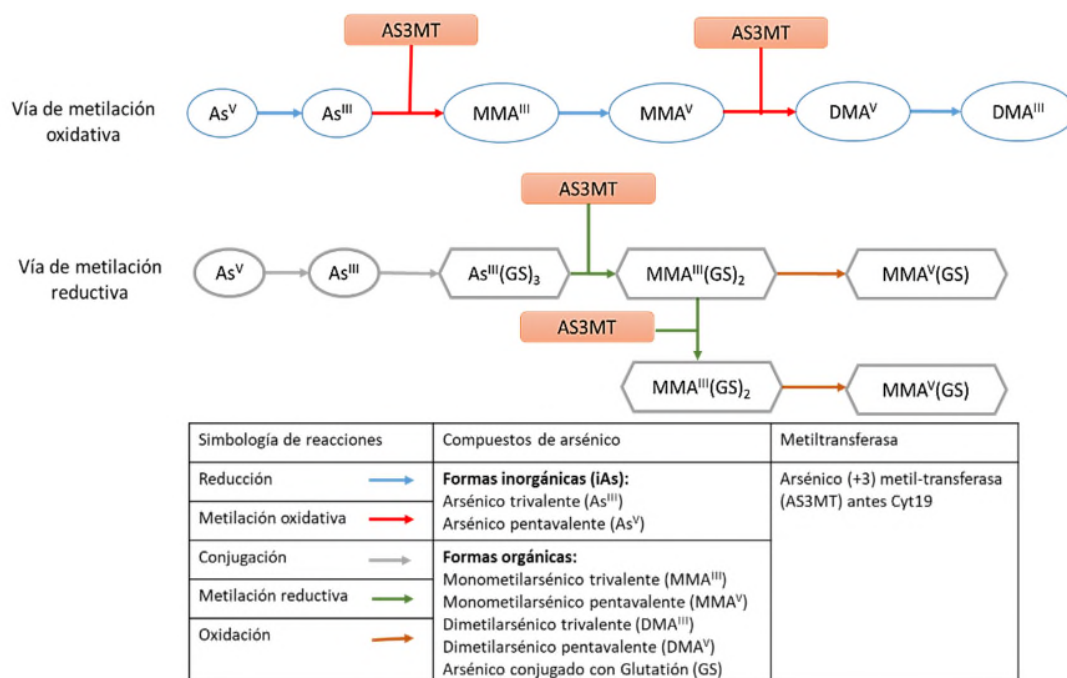


Figura 5. Vías metabólicas de eliminación del arsénico inorgánico en seres humanos.

Fuente: Modificado de M.A.Apata, 2015.

2.6.1 Influencia de la etnicidad en el metabolismo del arsénico

Se ha identificado diferencias en la capacidad de biotransformar el As entre diferentes poblaciones alrededor del mundo (Kuo, Moon, Wang, Silbergeld, & Navas-acien, 2013). Altos niveles de %MMA y bajos %DMA fueron reportados en poblaciones como los taiwaneses, Bangladesh expuestos a concentraciones de hasta 1300 $\mu\text{g/L}$ de iAs en el agua (Hernández & Marcos, 2008; C. Y. Huang et al., 2018; Steinmaus, Yuan, Kalman, Atallah, & Smith, 2005). Mientras, altos niveles del %DMA y bajos del %MMA, han sido observados en poblaciones de México, Nevada en Estados Unidos de América (USA), San Antonio de los Cobres en Argentina, Atacama en Chile (M. Apata, Arriaza, Llop, & Moraga, 2017; Gomez-Rubioa et al., 2012; Gribble et al., 2013; Vahter et al., 1995).

En un reciente meta-análisis sobre el metabolismo del arsénico reportado en diferentes poblaciones en relación a la asociación con enfermedades como diabetes, cáncer y enfermedad cardiovascular realizado por Kuo M y colaboradores, se observó un patrón de

mayor variación en el porcentaje entre iAs y DMA que en MMA, metabolito con márgenes más estrechos de variación interpoblaciones (Figura 6) (Kuo et al., 2013).

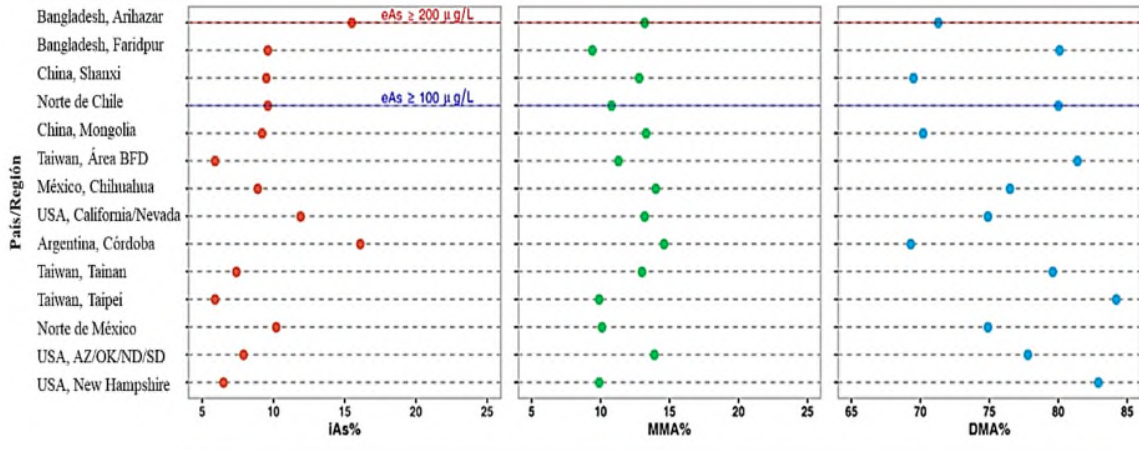


Figura 6. Variabilidad del metabolismo del arsénico interpoblacional.

Distribución de cada biomarcador del metabolismo del arsénico (iAs%, MMA%, DMA%) se representa para cada estudio enumerado en orden creciente (de abajo hacia arriba) de los niveles estimados de arsénico en la orina en (eAs, $\mu\text{g} = \text{L}$) en el área de estudio.

Fuente: Modificado de Kuo et al., 2013.

2.6.2 Polimorfismos de AS3MT y eficacia de biotransformación

La variabilidad en los patrones de eficacia metabolizadora del Arsénico en las diferentes poblaciones está relacionada con algunas variaciones genéticas de los genes involucrados en el metabolismo del As, la arsenato reductasa y metiltransferasa. Se conoce que la biotransformación de iAs a MMAV está delimitado por la acción enzimática de las proteínas de la familia glutatión S-transferasa (GST), dos miembros de esta familia de la clase Ω (GSTO1 y GSTO2) jugarían un importante rol en la homeostasis celular y en la vía reductiva del arsénico, mientras, la metilación del As es llevada a cabo por la AS3MT (Agusa et al., 2011; Fujihara et al., 2007; Hernández & Marcos, 2008). Se ha reportado la existencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) dentro del gen codificante de la AS3MT fuertemente asociados con patrones de eficiente metabolización en los individuos, y que esos patrones son diferentes entre diferentes grupos étnicos (Schlebusch et al., 2015) y con asociación de riesgo de efectos negativos o positivos en la salud (Antonelli, Shao, Thomas, Sams, & Cowden, 2014).

En el caso de la enzima AS3MT, se reportado que su capacidad de actividad enzimática está influenciada por SNP exónicos e intrónicos (Figura 7), entre ellos el

SNP ID 14458 (rs11191439), ID 12390 (rs3740393, C/G), 14215 (rs3740390, C/T) y 35991 (rs10748835, A/G) (Drobná et al., 2016).

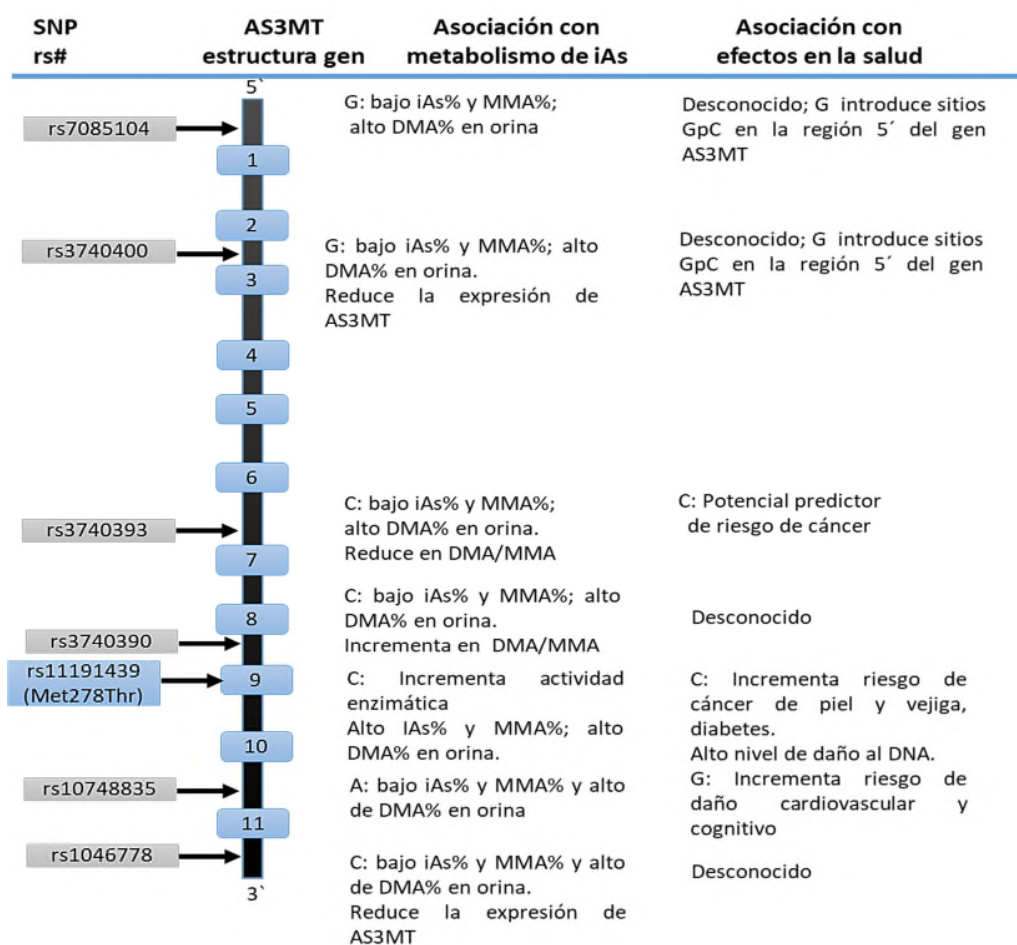


Figura 7. Polimorfismos de un solo nucleótido de la AS3MT y sus efectos en el metabolismo del arsénico y la salud.

Fuente: Modificado de Drobná et al., 2016.

El SNP rs11191439 (ID 14458), consiste en un polimorfismo de transición T→C y produce un cambio de aminoácidos desde una Metionina (Met) a una Treonina (Thr) en la posición 284 del exón 9, dada su ubicación en una región codificante de la proteína los cambios en éste pueden afectar directamente la función enzimática de la AS3MT y ha sido asociado con un patrón de primera metabolización, es decir, con mayores porcentajes de MMA (Fujihara et al., 2007).

Las frecuencias alélicas de los SNPs rs 3740393 y rs11191439 tiene una diferente distribución en las poblaciones de los diferentes continentes (Figura 8). En cuanto a la frecuencia alélica para el SNP 11191439, se ha visto que el alelo C mostró tener

importantes diferencias entre algunas poblaciones. Por ejemplo, en asiáticos (japoneses, mongoles, chinos, tibetanos, tamiles y singaleses) se obtuvo un rango de 1 a 2%, mientras que en las poblaciones americanas los valores fueron cercanos al 10% en americanos caucásicos y afroamericanos, y de un 14% en chilenos. Además, la frecuencia en africanos fue de un 16.5% en promedio (Ovambos y Xhosas), y de un 10% en europeos. En cuanto a las frecuencias del alelo T para este SNP, no se describieron importantes diferencias (Agusa et al., 2011; Fujihara et al., 2007).

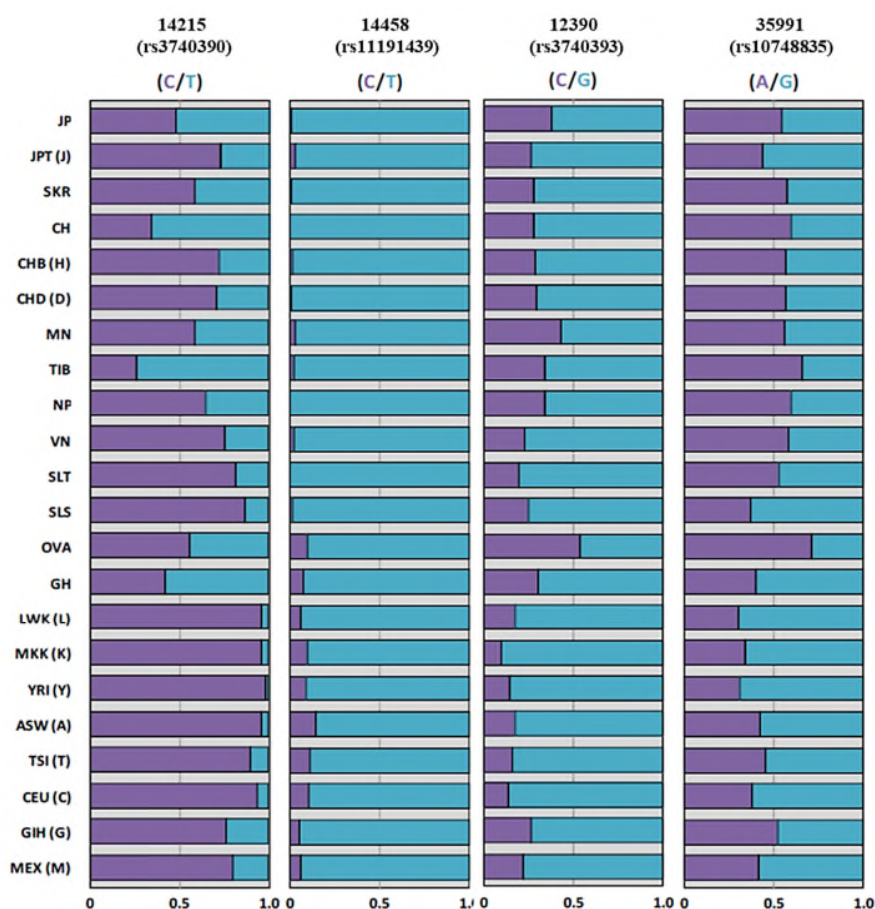


Figura 8. Frecuencias alélicas en la AS3MT en diversas poblaciones.

Abreviaturas: JP: Japoneses, JPT (J): Japoneses in Tokio, SKR: Sur coreanos, CH: Chinos, CHB (H): Chinos Han en Beijing, China, CHD (D): Chinos en Denver, Colorado, MN: Mongoles, TIB: Tibetanos, NP: Nepaleses, VN: Vietnamitas, SLT: Tamiles en Sri Lanka, SLS: Singaleses en Sri Lanka, OVA: Ovambos, GH: Ganeses, LWK (L): Luhya en Webuye, Kenia, MKK (K): Maasai en Kinyawa, Kenia, YRI (Y): Yorubas en Ibadan, Nigeria, ASW (A): Ascendencia africana en Suroeste USA, TSI (T): Toscana en Italia, CEU (C): Residentes de Utah con ascendencia en el norte y oeste de Europa, GIH (G): Indios Gujarati en Houston, Texas, MEX (M): Ascendencia mexicana en Los Ángeles, California.

Fuente: Modificado de Agusa, Fujihara, Takeshita, & Iwata, 2011.

En el estudio de la influencia del rs11191439 en una población masculina de 207 trabajadores chilenos expuestos a iAs en suspensión >50 ppm durante 15 años en una

planta de fundición en Chuquicamata, II región de Chile (Hernández et al., 2008), permitió demostrar que los portadores de la variante C del SNP 11191439 tuvieron una eficiente primera metilación, excretando 4,63% más de MMA en la orina ($p= 0,0007$), y presentando 2,98 veces más altos niveles de MMA, ajustado a la edad de exposición sobre el estándar ($p= 0,011$), que los participantes homocigotos TT. Por el contrario, se ha visto que, en poblaciones asiáticas, los portadores del alelo C para este SNP presentan patrones de metabolización muy cercano a los valores estándar de MMA, es decir, de 10 - 20% (Fujihara et al., 2007).

Por otra parte, existen tres SNPs identificados como ID 12390 (rs3740393, C/G), 14215 (rs3740390, C/T) y 35991 (rs10748835, A/G), ubicados en regiones intrónicas del gen AS3MT (Engström et al., 2007). Dichos SNPs fueron estudiados en una población local de la altiplanicie andina argentina (San Antonio de los Cobres), donde sus variantes C, T y A mostraron una fuerte asociación con patrones de segunda metabolización, es decir, con mayores porcentajes de DMA (Engström et al., 2011). Por otro lado, se estableció que dichas variantes poseían un fuerte ligamiento ($r^2 > 0.5$). Posteriormente, se estableció que también conformaban un haplotipo conocido como C-T-A, denominado así en referencia a los portadores de los alelos C, T y A, respectivamente para los SNPs antes mencionados. Además, este haplotipo tuvo una mayor frecuencia en dicha población andina (68.7%), disminuyendo progresivamente en las poblaciones que presentaban menor exposición a aguas contaminadas con arsénico, como por ejemplo poblaciones nativo americanas del proyecto Human Genome Diversity Project (HGDP) (14.3%), peruanos (50.5%) y argentinos mestizos de la localidad de Salta (36.7%) (Schlebusch et al., 2015, 2013).

Los SNPs que conforman el haplotipo C-T-A fueron analizados en poblaciones asiáticas, donde se encontró que las frecuencias alélicas de dichos polimorfismos eran muy diferentes en comparación a las presentes en la población andina de Argentina. Por ejemplo, las frecuencias alélicas del SNP rs3740393 en poblaciones asiáticas fueron mayores para los portadores del alelo G con 50 a 80%, mientras que para el alelo C del mismo SNP, fue tan solo del 20-40%. Dichas frecuencias se contrastan con las obtenidas para atacameños argentinos, que poseen mayor frecuencia alélica de C (72%) para ese SNP (Engström et al., 2007). Este patrón, de mayores frecuencias de alelos no asociados

con eficiente metabolización, se mantuvo entre los SNPs rs3740390 y rs10748835 para las poblaciones asiáticas (Agusa et al., 2011; Fujihara et al., 2009).

Por último, algunas revisiones de todos los polimorfismos del gen AS3MT asociados con patrones de eficiente metabolización, han mostrado tener similitudes en sus conclusiones respecto a los SNP rs11191439 (T/C) y 3740393 (G/C), en donde ambos revelan que sus variantes C poseen una fuerte relación con los patrones de primera y segunda metilación, respectivamente (Agusa et al., 2011; Sumi & Himeno, 2012).

En consecuencia, se puede concluir que los alelos “C-T-A” vistos en las poblaciones de SAC en argentina y la variante ancestral “T” del SNP rs11191439 como “variantes protectoras” del arsénico. Es decir, se considera los genotipos que contengan las variantes protectoras SNP rs3740393, rs3740390 y 10748835 como genotipos protectores, mientras que, en el SNP rs11191439, sólo podemos considerar al genotipo TT como protector, pues la presencia del alelo C favorece la primera metilación (un aumento de MMA) y con ello mayor riesgo de efectos tóxicos, a su vez conlleva un cambio de aminoácidos que ha sido fuertemente asociado con efectos tóxicos del arsénico, principalmente con rasgos de lesiones a la piel y efectos genotóxicos (Antonelli et al., 2014; Faita, Cori, Bianchi, & Andreassi, 2013; García-Alvarado, Neri-Meléndez, Pérez Armendáriz, & Rivera Guillen, 2018)

2.6.3 Otros factores que afectan la eficacia biotransformadora del As

La edad, el sexo, el origen étnico, los niveles y el tiempo de exposición de una población también han mostrado estar asociadas con cambios en la capacidad metabolizadora (Jansen et al., 2015).

La eficacia del metabolismo de eliminación de As parece estar influenciada por el sexo, diversos estudios han reportado que hombres y mujeres muestran diferentes capacidades de metilación, los hombres tienen mayores concentraciones de MMA y, en consecuencia, un mayor riesgo de desarrollar lesiones cutáneas por exposición crónica al arsénico (Kile et al., 2011).

Factores de estilo de vida, como la nutrición y el tabaquismo también se ha demostrado que influye en la susceptibilidad a la toxicidad del arsénico (Hong et al., 2014). La nutrición también ejerce influencia sobre la metabolización del As, la desnutrición produce un mayor riesgo de enfermedades relacionadas con el arsénico, en particular, los estudios in vivo han demostrado que las dietas deficientes en proteínas empeoran el

metabolismo del arsénico (Deb et al., 2013; Minatel et al., 2018). La deficiencia de nutrientes como el ácido fólico, metionina, colina, las vitaminas B6 y B12, metionina y la colina reducen la S-adenosilmetionina (SAM), lo que lleva a una metilación deteriorada y excreción disfuncional de arsénico (Hall & Gamble, 2012; Jansen et al., 2015). Asimismo, también se demostró que las dietas deficientes en minerales estaban asociadas con aumento de MMA y disminución de DMA en la orina de los expuestos individuos (Steinmaus et al., 2005). El mecanismo exacto por el cual la nutrición afecta los resultados de salud en poblaciones expuestas a arsénico no es completamente entendido, particularmente debido a la amplia variación en análisis métodos y recolección de muestras utilizados entre diferentes estudios. Sin embargo, cada vez es más evidente que los factores dietéticos pueden jugar un papel importante en el metabolismo del arsénico. Por otro lado, el tabaquismo ha sido demostrado que afecta la capacidad de metilación del arsénico y aumenta el riesgo de cánceres inducidos por arsénico, fortaleciendo la hipótesis de que el arsénico y otros químicos tienen efectos sinérgicos (Khairul et al., 2015; Wang et al., 2013).

Por lo tanto, una mejor comprensión de la asociación entre estos biológicos y los factores del estilo de vida con toxicidad por arsénico son extremadamente importantes al evaluar medidas públicas para mitigar los efectos de la exposición al arsénico.

2.7 Efectos en la salud humana por exposición a arsénico

La exposición crónica al As es un factor de riesgo de cáncer de pulmón, piel, vejiga, riñón, hígado y próstata y está categorizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) como carcinógeno del Grupo 1: “carcinógeno para los seres humanos” (IARC, 2012).

El arsénico también es responsable de los efectos no carcinogénicos, como las enfermedades cardiovasculares, complicaciones reproductivas, efectos neurológicos, diabetes mellitus y manifestaciones dérmicas que incluyen hiperpigmentación e hiperqueratosis (Hong et al., 2014; L. Huang, Wu, & Van Der Kuijp, 2015; Kapaj, Peterson, Liber, & Bhattacharya, 2006).

El modo de acción que vincula la exposición a los puntos finales de salud mencionados anteriormente es un tema de investigación bioquímica en curso. Como se ha mencionado, la especiación de As juega un papel importante en la toxicidad, a saber, la valencia de la especie o el estado de oxidación, con los arsenicales trivalentes son tóxicos más potentes

que los pentavalentes (Hughes et al., 2011). Generalmente se acepta que las formas inorgánicas, es decir, AsIII y AsV, los más comúnmente presentes en el agua y el suelo, son más tóxicos que las especies orgánicas (Matthews et al., 2019). La toxicología de As está determinada por su química, en particular (i) su afinidad para grupos sulfhidrilo que causan que inhiba numerosas enzimas y proteínas y (ii) su capacidad de emular fosfato causando la interrupción de los procesos celulares (por ejemplo, la sustitución de fosfato inorgánico (PO₄) por AsV (AsO₄) en glicolíticos y vías de respiración celular, formando difosfato de adenosina (ADP) –arsenato en lugar de trifosfato de adenosina (ATP) (Hughes, 2002; Sun et al., 2014).

Otros modos de acción de la toxicidad de As incluyen la formación de especies reactivas de oxígeno, genotoxicidad, reparación alterada del ácido desoxirribonucleico (ADN), alteración de la metilación del ADN y la proliferación celular (Jomova et al., 2011).

La mayoría de los datos epidemiológicos se relacionan con la exposición a efectos adversos para la salud proviene de poblaciones expuestas a altas concentraciones en agua potable, en particular una población aislada en la región endémica de Taiwán y Bangladesh (C. J. Chen, 2014; Y. C. Chen et al., 2003; Karagas, Gossai, Pierce, & Ahsan, 2015).

Los efectos en la salud de exposición crónica a altas concentraciones como la exposición a concentraciones <150 µg L⁻¹ están menos documentadas. Sin embargo, se ha observado un mayor riesgo de cáncer de piel en estudios epidemiológicos realizado, por ejemplo, en los EE. UU. (Mayer & Goldman, 2016), Finlandia (aunque limitado a los fumadores) y Hungría, Rumania y Eslovaquia (Matthews et al., 2019).

Se han observado asociaciones similares para el cáncer de vejiga en los EE. UU. (Karagas et al., 2015), pero el mayor riesgo se limitó a los fumadores, lo que indica que As puede actuar como un cocarcinógeno de otras sustancias.

2.7.1 Genotoxicidad del arsénico: Estrés oxidativo e implicaciones biológicas.

El papel cancerígeno del arsénico se ha estudiado ampliamente durante más de medio siglo. Sin embargo, la forma en que el arsénico causa cáncer humano sigue sin dilucidarse por completo (Li & Chen, 2016).

Uno de los efectos tóxicos más importante del As está referido a sus efectos genotóxicos relacionados con la inhibición de mecanismos de reparación de daño de ADN y a la generación de estrés oxidativo que conduce a la carcinogénesis. Sin embargo, el arsénico

no afecta directamente al ADN, sino que contribuye a la mutagenicidad de otros carcinógenos (Pierce et al., 2013).

La genotoxicidad de As se debe principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante su biotransformación (Jomova et al., 2011; Kessel, Liu, Xu, Santella, & Hei, 2002). Las EROS causan roturas de hebra de ADN, aductos de ADN, entrecruzamiento y abrasión cromosómica, además, el daño oxidativo causa modificaciones en las bases de ADN como la presencia de 8-oxoguanina que causa mutaciones de G:C a T:A. En su mayoría, la genotoxicidad está relacionada con la inhibición del proceso de reparación del ADN debido a la exposición de iAs (Sage et al., 2017).

Se considera que el estrés oxidativo es la principal amenaza para la genotoxicidad, afectando la metilación y la reparación enzimática del ADN (Figura 9). También se sabe que el arsénico causa alteraciones en el ADN incluida la formación de los micronúcleos, mutación por delección, intercambio de cromátides hermanas, anomalías cromosómicas y enlaces cruzados con diferentes proteínas (Annangi, Bonassi, Marcos, & Hernández, 2016; Hernández, Paiva, Creus, Quinteros, & Marcos, 2014; Rossman, 2003).

Los principales actores del estrés oxidativo y la señalización oxidativa son: anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y radical peroxilo ($LOO \bullet$). El anión superóxido se considera la especie principal en el estrés oxidativo inducido por As y su formación conduce a una cascada de EROs como H_2O_2 y $\bullet OH$ (Shi, Shi, & Liu, 2004). El arsénico induce una rápida disminución del potencial de membrana mitocondrial, alterando la actividad enzimática mitocondrial, promoviendo dramáticos cambios morfológicos y la pérdida de la organización interna mitocondrial, desviación de los electrones de la cadena respiratoria se ha sugerido como una posible causa de las alteraciones mitocondriales, con la consiguiente generación de EROs (Iqbal et al., 2016). Además, las EROs pueden generarse por enzimas citosólicas que tienen actividad peroxidasa, como el citocromo P-450, que secuencialmente transfiere dos electrones de NADPH a oxígeno molecular, otro mecanismo es la generación de H_2O_2 durante la oxidación de As (III) a As (V) en el curso de la formación de especies intermedias de arsina como el peroxilo dimetilarsénico $[(CH_3)_2AsOO \bullet]$ y radicales dimetilarsénico $[(CH_3)_2As\bullet]$ que implican ($O_2^{\bullet -}$) (Yamanaka & Okada, 1994).

Las alteraciones celulares implicadas en el estrés oxidativo inducido por As que están asociados con el cáncer incluyen: daño en el ADN, hipometilación del ADN e hipermetilación, y alteraciones en la regulación de los mecanismos de proliferación celular, apoptosis y necrosis. El daño en el ADN durante la exposición no se debe directamente al metaloide, ya que no se une covalentemente a las estructuras de ADN, pero resulta indirectamente de la inducción de EROs que generan aductos de ADN, roturas de la cadena de ADN, enlaces cruzados y aberraciones cromosómicas (De Vizcaya-Ruiz, Barbier, Ruiz-Ramos, & Cebrian, 2009).

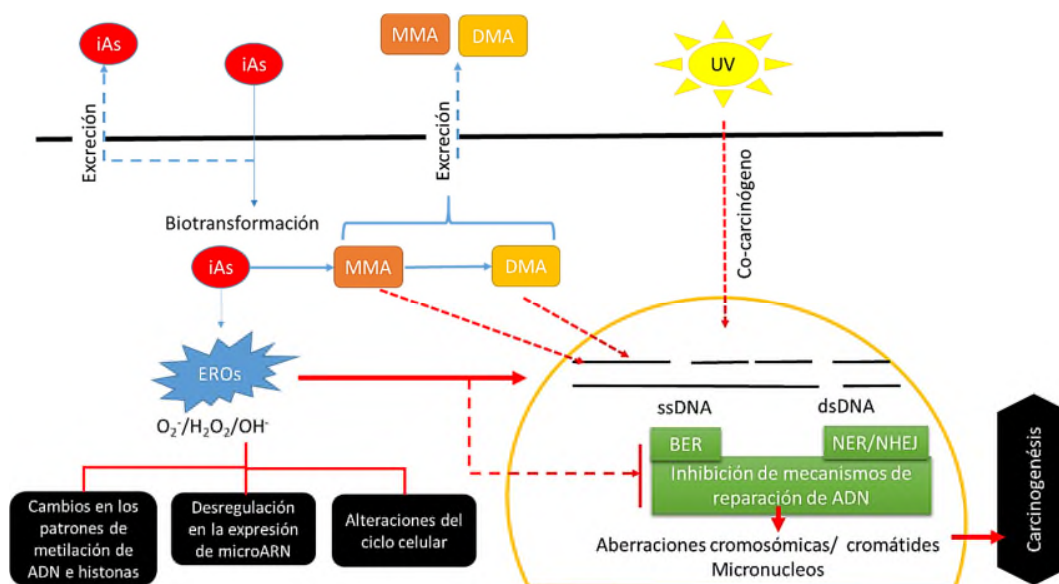


Figura 9.

Después de la ingestión, el proceso de biotransformación de iAs podría conducir a la excreción de iAs, principalmente conjugada con glutatión (GSH). El proceso de biotransformación puede generar especies reactivas de oxígeno (EROS), probablemente en una secuencia específica: aniones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$), que pueden inducir roturas de cadena sencilla (ssDNA) y de cadena doble (dsDNA) induciendo daño oxidativo e inhibir los mecanismos de reparación de roturas de ADN, tanto para las roturas de ssDNA (reparación de escisión de base [BER]) como para las roturas de dsDNA (recombinación homóloga [HR] y / o unión de extremo no homólogo [NHEJ]). Además, las EROS derivadas de la biotransformación iAs pueden actuar como cocarcinógenos, por ejemplo, aumentando el potencial de daño de la luz ultravioleta (UV).

Fuente: Adaptado de Martinez, Vucic, Adonis, Gil, & Lam, 2011; Sage et al., 2007.

2.7.2 Ensayo del cometa como Biomarcador de daño por exposición a arsénico

La electroforesis en gel de una sola célula o el ensayo del cometa se basa en la capacidad de los fragmentos de ADN con carga negativa para migrar en un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico, la migración de la extensión del ADN es directamente proporcional al daño del ADN presente en las células. El ensayo se usa ampliamente para medir el daño en el ADN y alteraciones en la reparación los linfocitos humanos inducidos

por estrés oxidativo mediante la medición de roturas de hebra y sitios apurínicos (Collins, 2004).

Diversos estudios han realizado la evaluación de daño genético por exposición a arsénico mediante el ensayo del cometa. En el estudio de Vuyyuri y cols (2007), los trabajadores del vidrio de Hyderabad, India expuestas crónicamente a As (12.3 ± 2.3 años) tuvieron concentraciones de As en sangre significativamente más altas ($56.7 \mu\text{g/L}$) en comparación con los controles ($11.7 \mu\text{g/L}$). Los trabajadores tuvieron un significativo mayor nivel de daño en el ADN basal, medido por la media longitud de la cola ($14,9 \mu\text{m}$) en el ensayo del cometa, en comparación con los controles ($8.2 \mu\text{m}$). Los trabajadores también tuvieron una frecuencia significativamente mayor de micronúcleos (1,5%) en comparación con los controles (0,2%). Este trabajo mostró una correlación positiva significativa de los niveles de As en sangre total con ambos parámetros de genotoxicidad de linfocitos (Vuyyuri, Ishaq, Kuppala, Grover, & Ahuja, 2007).

Otro estudio que compara trabajadores de tres fundiciones de cobre polacas que tienen media urinaria de arsénico total de $57.0 \pm 50.3 \mu\text{g/L}$, mientras los controles presentaron $12.6 \pm 20.0 \mu\text{g/L}$, encontraron aumentos significativos en el daño del ADN, medido como el momento mediano de la cola, y en daño oxidativo en el ADN mediante la formamido pirimidina glicosilasa por método de digestión en leucocitos. Aunque el arsénico inorgánico como estaba presente en muestras de aire y orina de trabajadores, no hay asociación clara con el daño genético, por lo que los autores sugirieron que el daño al ADN fue causado no solo por la exposición a As, sino también a otros agentes presentes en el medio ambiente de las fundiciones de cobre (Palus et al., 2005).

En otro estudio realizado en Lagunera, México sobre la exposición de niños expuestos simultáneamente arsénico y plomo el daño genético y la capacidad de reparación de ADN fueron evaluados en los linfocitos mediante el ensayo del cometa y la exposición al peróxido de hidrógeno. La mayoría de niños (93%) tenían concentraciones de arsénico en orina por encima de $50 \mu\text{g/L}$ y 65% tenían niveles de plomo en la sangre por encima de $10 \mu\text{g/L}$. El daño del ADN y disminución de la capacidad de reparación fue mayor en todos los niños expuestos en comparación con los niños mexicanos sanos no expuestos. Sin embargo, el análisis multivariado no mostró asociaciones significativas entre el daño basal de ADN y los niveles de plomo, o evidencia de interacciones Pb y As.

Por otro lado, la capacidad de reparación de ADN de los linfocitos posterior a la exposición al peróxido se asoció negativamente a la concentración de As, sin asociación significativa con Pb o evidencia de interacciones entre As y Pb (Méndez-Gómez et al., 2008).

Resumiendo, los estudios anteriores demuestran que el estrés oxidativo inducido por el As causa daño en el ADN, que puede ser medido por el ensayo del cometa.

2.8 Vitamina D en el metabolismo de metales

La vitamina D es un nutriente importante para mantener un esqueleto saludable, ya que forma parte integral del metabolismo óseo, la homeostasis del calcio y el fósforo, la evidencia actual de estudios epidemiológicos muestran que la vitamina D puede tener otros beneficios para la salud, como la prevención o mitigación del cáncer y las enfermedades autoinmunes, la reducción de la hipertensión y la prevención de la influenza (Ayfer Colak, Burak Toprak, Nese Dogan, 2013).

Hay receptores de vitamina D en muchos órganos (Jeon & Shin, 2018), y la deficiencia de vitamina D a largo plazo puede inducir una amplia gama de efectos biológicos dañinos. A pesar de esto, solo los efectos esqueléticos hasta la fecha han sido probados como causales en un sentido estricto.

2.8.1 Fisiología de la vitamina D

La vitamina D es una sustancia esencial para el metabolismo del calcio y la mineralización del hueso. Su fórmula química está formada por cuatro anillos de átomos de carbono y tiene muchas similitudes con el colesterol y la estructura básica de los esteroides. Se clasifica como secoesteroide por tener uno de los anillos abierto.

El organismo humano puede obtenerla por dos vías: síntesis en la piel por la acción de los rayos ultravioleta de la luz solar sobre la piel o por vía digestiva a través de la ingesta de alimentos que la contienen como la leche enriquecida o los pescados grasos.

La provitamina D (7-dehidrocolesterol, 7-DHC) se convierte en previtamina D en la piel por exposición a la radiación UVB. La previtamina D se isomeriza luego por el calor corporal para formar vitamina D₃. La vitamina D₃ se transporta luego por la sangre al hígado, donde se convierte en 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D). En los riñones, la formación de la forma activa de vitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D (1,25 (OH) 2D), está estrechamente regulada por la hormona paratiroidea (PTH). La 1,25-dihidroxivitamina D es importante para la captación de calcio y la movilización de las

reservas de calcio. Como se mencionó anteriormente, muchos órganos tienen receptores para la vitamina D, y en consecuencia la vitamina D es importante para muchas funciones corporales. Más recientemente, se encontró que la 1,25-dihidroxitamina D puede producirse en tejidos y células, desacoplando en parte la producción de 1,25-dihidroxitamina D y sus efectos de las funciones renales y la PTH (Khammissa et al., 2018).

Aunque los procesos subyacentes de la síntesis de vitamina D y su circulación son conocidas, aún la relación cuantitativa de la exposición a los rayos UV y la producción de vitamina D resultante se describen de manera inadecuada en humanos. (Mousavi, Amini, Heydarpour, Amini Chermahini, & Godderis, 2019). La formación, la ingesta y la circulación de la vitamina D están bien descritas en la literatura y se resumen en la figura 10.

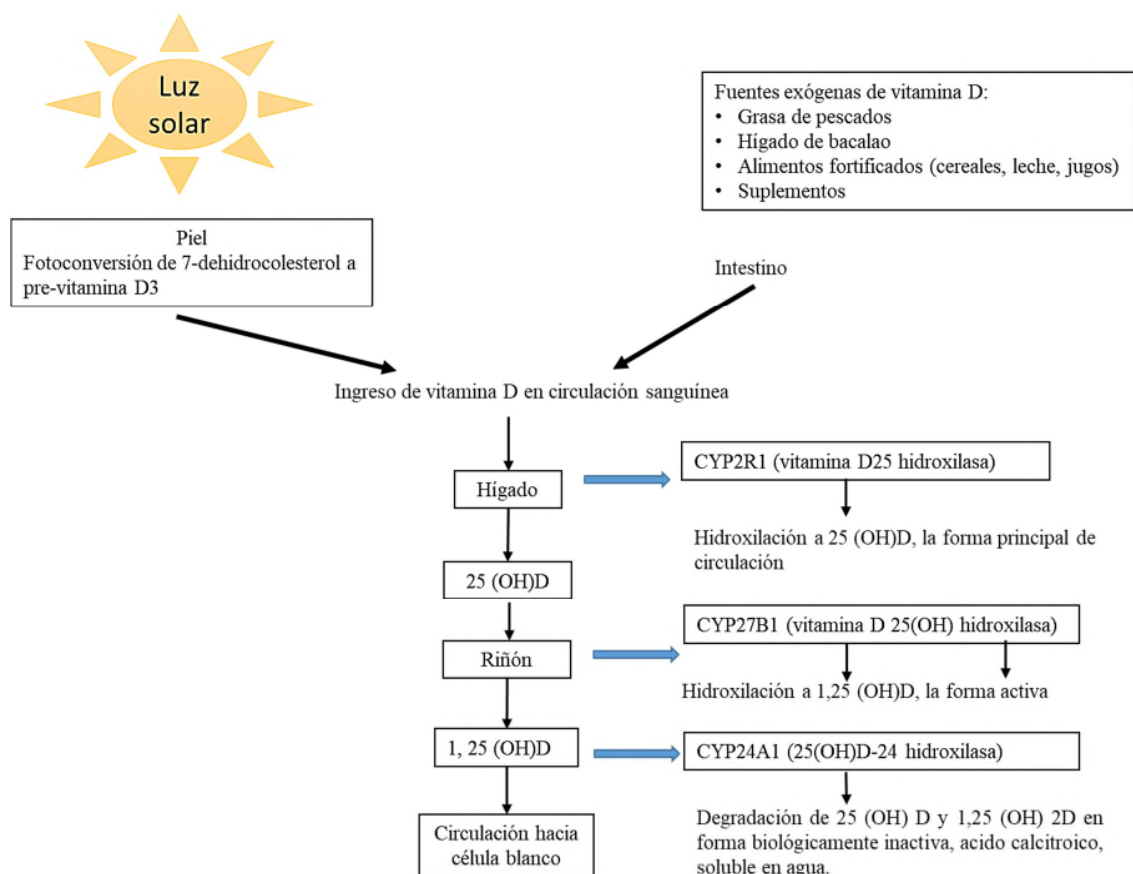


Figura 10. Síntesis de vitamina D y sus metabolitos.
Fuente: Modificado de Khammissa et al., 2018.

2. 8.2 Influencia de la vitamina D en procesos de reparación de daño genético

Los niveles adecuados de nutrientes son esenciales para el mantenimiento de la estabilidad genómica, su deficiencia puede influenciar en la absorción, retención, reparación y detoxificación de sustancias tóxicas (Nair-Shalliker, Armstrong, et al., 2012). La vitamina D es mejor conocida por su rol endocrino en fisiología de la mineralización de los huesos, pero durante los últimos años se ha descrito efectos pleiotrópicos de esta vitamina a nivel de otros tejidos relacionados a acciones autocrinas como ser inmunomodulación, neuroregulación, regulación de procesos celulares como ser la angiogénesis, proliferación, diferenciación y apoptosis (Mousavi et al., 2019).

Estudios epidemiológicos mostraron un incremento de algunos tipos de cáncer y otras enfermedades como diabetes, enfermedades autoinmunes entre otras con la deficiencia de vitamina D (Schöttker et al., 2013).

A pesar de la evidencia experimental sobre la relación de déficit de vitamina D y el incremento de daño oxidativo, aún son escasos los estudios en humanos sobre la relación de daño genético asociado al déficit de vitamina D. En el estudio realizado sobre la asociación de concentraciones de vitamina D con la longitud de telómeros en leucocitos en 2161 mujeres mostró una débil pero significativa correlación estadística ($r= 0.07$, $p < 0.001$) (Valdes et al., 2007). En otro estudio de 23 sujetos con historia de pólipo adenomatoso colorectal a los cuales se les suministró 800UI/día de suplemento de vitamina D durante 6 meses, los pacientes presentaron una disminución de los niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) medido en mucosa rectal normal. (Fedirko et al., 2010).

Recientemente se ha propuesto algunos mecanismos moleculares por los cuales la vitamina D modula los procesos de reparación de daño genético. Las células de los mamíferos poseen vías de transducción de señal en respuesta al daño al ADN (ADN damage response, DDR), las cuales censan el daño y establecen un sitio de respuesta para proteger la integridad del genoma y superar la amenaza mediante la activación y el reclutamiento de factores de mantenimiento del genoma en los sitios de daño del ADN. Una de las familias involucradas en la reparación del ADN es la familia poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), PARP es una enzima nuclear activada específicamente por rupturas de simple o doble cadena causadas directa o indirectamente por diversos agentes exógenos o endógenos. La activación de PARP, que requiere sustratos de NAD/ATP, se

produce en segundos en los sitios dañados, los altos niveles de daño en el ADN tienen la capacidad de activar al máximo PARP para eliminar la posible propagación de células altamente dañadas, sin embargo la sobre-activación patológica de PARP agota las reservas de NAD/ATP y, por lo tanto, conduce a la muerte celular, incluso antes de que pueda comenzar la reparación, y puede causar el deterioro funcional o la muerte de las células vecinas (Nair-Shalliker, Armstrong, et al., 2012). Por lo tanto, prevenir la activación en exceso de PARP podría ser beneficioso en el tratamiento, esto se puede prevenir mediante la inhibición de la actividad PARP, y esta regulación inhibitoria de la actividad PARP se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades.

La exposición a la irradiación UV de los queratinocitos incrementa la producción de óxido nítrico y secundariamente de EROs, este proceso está asociado a estrés oxidativo que produce daño al ADN, reduce la capacidad de reparación del ADN, supresión inmunológica y la formación de dímeros piridina ciclobutano (cylobutane pyridine dimers-CPD). En estudios in vitro, se vió que la administración de calcitriol reduce la producción de CPD inducida por UV en queratinocitos humanos (Smith et al., 1999). Otro estudio sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal mostró que la administración de calcitriol evita la sobre-activación de PARP, y además regulaba de manera positiva la actividad de la caspasa -3 uno de los mediadores de la apoptosis, concluyendo que la inhibición de la actividad de PARP por la vitamina D puede deberse siendo un mecanismo de protección para la prevención de los efectos perjudiciales de la activación excesiva de PARP en respuesta a estímulos tóxicos (Martinesi et al., 2008).

Por otro lado, se ha reportado por investigaciones recientes que la vitamina D3 puede atenuar los niveles de daño del ADN, modular las vías DDR a través de la inducción de expresión de genes de reparación, como el observado en fibroblasto humanos y de ratones en los cuales se demostró que la vía vitamina D/VDR regula la expresión de proteínas de reparación de ruptura de doble cadena (DSB double-strand break), y la hipovitaminosis D3 reduce la capacidad del mecanismo de reparación por recombinación homóloga (Graziano, Johnston, Deng, Zhang, & Gonzalo, 2016). Asimismo, se ha planteado un nuevo mecanismo por el cual la vitamina D interviene en la reparación del ADN, basado en los resultados del estudio del efecto de la hipovitaminosis D y su exacerbación en los niveles de daño al ADN en la fibrosis uterina en mujeres la cual fue

reducida posterior al tratamiento con vitamina D3 (Figura 11). La hipovitaminosis D induce acumulación de daño en el ADN, que promueve la acumulación de marcadores de daño del ADN como la histona γ -H2AX, y también reduce el reclutamiento de sensores DSB como las proteínas RAD50, MRE11 y NBS1, así como efectores y mediadores incluyendo CHECK1, CHECK2, BRCA1, BRCA2 y RAD51 resultando finalmente en defectos en la reparación del daño al ADN, el tratamiento con vitamina D3 rescata los defectos de reparación del ADN y reduce la carga de daño del ADN al reducir el marcador de daño γ -H2AX y reclutar proteínas reparadoras del ADN, incluidos los sensores de rotura de doble cadena como RAD50, MRE11 y NBS1, así como efectores y mediadores CHECK1, CHECK2, BRCA1, BRCA2 y RAD51, restaurando así la respuesta al daño del ADN (Ali, Shahin, Sabri, Al-Hendy, & Yang, 2018).

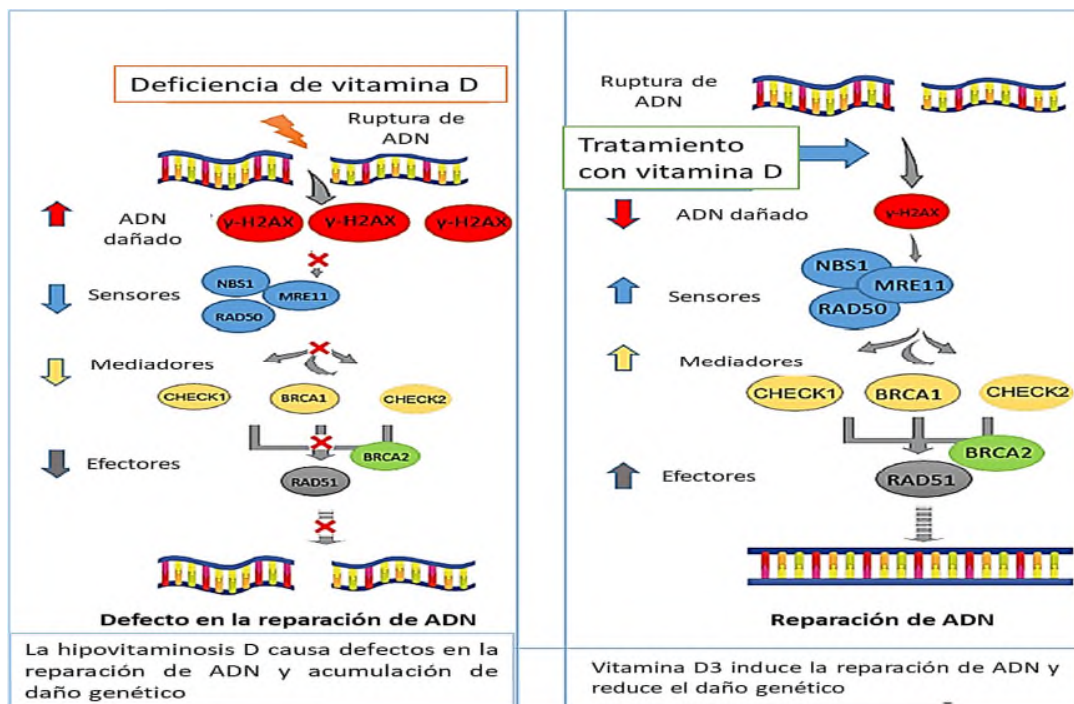


Figura 11. Modelo funcional de la relación entre la vitamina D/VDR y la respuesta a daño genético.
Fuente: Modificado de Ali et al., 2018.

2.8.3 Influencia de vitamina D en el metabolismo de metales pesados

La vitamina D interviene en procesos de absorción y asimilación de elementos inorgánicos esenciales (calcio, magnesio, cobre, zinc, cobalto, y selenio), pero también de elementos tóxicos como el plomo, aluminio, cobalto y estroncio (Schwalfenberg & Genuis, 2015). Así, la hipovitaminosis D tendría un efecto negativo para el metabolismo

del arsénico y su eliminación en los seres humanos. Este efecto se debería probablemente al efecto fisiológico de mayor absorción de As en detrimento de absorción de otros iones principalmente el calcio, por otro lado, también se ha reportado que la hipovitaminosis D tiene un efecto en la expresión génica de enzimas clave que intervienen en el metabolismo de As a través de afectación del patrón de metilación del genoma (Yager, Erdei, Myers, Siegel, & Berwick, 2016).

Sin embargo, no se ha establecido de manera definitiva los mecanismos por los cuales la vitamina D podría afectar de manera directa en el metabolismo de As. Existe evidencia de la asociación positiva de concentración sérica de 1-25 OH₂ vitamina D con excreción urinaria de As 3,4 (95%; IC 0,9-5,9) pg/mL con asociación débil con 25 OH vitamina D arsénico (Zamoiski et al., 2014). Otro estudio reporta la asociación de desarrollo de diabetes mellitus inducida por exposición a As con niveles bajos de vitamina D en población Koreana (Lee & Kim, 2013).

Por otra parte, en el estudio de Shiue se establece la relación entre las concentraciones de elementos químicos en orina y vitamina D con alteraciones de visión, equilibrio y audición en ancianos (Shiue, 2013). Recientemente también se ha establecido la asociación positiva entre la hipovitaminosis D y el desarrollo de pterigion (Jee, Kim, Cho, & Arroyo, 2016) y del desarrollo de pterigion y la exposición a As en agua de (Lin et al., 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El agua, factor vital para la vida, es considerada un factor decisivo para la calidad de vida de los pueblos, siendo la disponibilidad de agua de calidad y la conservación de los recursos hídricos condicionantes del desarrollo de las naciones. La contaminación del agua por metales pesados como el arsénico (veneno invisible, ya que no se lo puede detectar ni por el olor, ni color ni sabor) es un tema de preocupación internacional.

La presencia de As en aguas de consumo produce arsenicosis (llamado hidroarsenismo crónico regional, HACRE en Latinoamérica, Argentina) caracterizado por alteraciones dermatológicas como melanoderma, leucoderma y/o queratosis palmo-plantar, evolucionando hacia patologías más severas como cáncer de piel, hígado, pulmón, vejiga, esófago, estómago y colon.

Es importante mencionar la acción co-carcinogénica del arsénico en relación al efecto genotóxico de la radiación ultravioleta en poblaciones expuestas a ambos factores, debido a su capacidad de alterar los mecanismos de reparación de daño a ADN inducido por la radiación UV.

Actualmente, la mayor evidencia de los efectos carcinogénicos procede de estudios epidemiológicos de Bangladesh, México, y Argentina. Bolivia no está fuera de este contexto global de poblaciones expuestas crónicamente a agua contaminada con arsénico. Las comunidades rurales de la zona altiplánica del departamento de Oruro considerada entre las poblaciones con índices de salud más bajos de Bolivia y Latinoamérica (elevados índices de morbi-mortalidad materno-infantil, alta incidencia de enfermedades infecciosas y situación de extrema pobreza), por lo que se considera a sus habitantes como grupo vulnerable. Estas comunidades están expuestas a consumo de agua contaminada por metales pesados como el arsénico y elevada exposición a radiación ultravioleta solar, debido al lugar de residencia caracterizado por suelos cercanos a actividad volcánica y elevada altitud aproximadamente 4 000 metros sobre nivel del mar.

Es por esto, que consideramos imprescindible continuar estudios para establecer el riesgo genotóxico de los pobladores de la región altiplánica Boliviana del departamento de Oruro ubicada a elevada altitud, mediante la evaluación del estado clínico de los pobladores en relación al hidroarsenismo crónico endémico, la influencia de otros factores sobre el metabolismo de As como ser la región de residencia caracterizada por elevada altitud, hipoxia, elevada dosis de radiación ultravioleta; estado nutricional en relación a la vitamina D y su influencia en la excreción de metabolitos inactivos, el estado de metilación global del ADN como biomarcador de riesgo de neoplasias y por último la susceptibilidad individual y poblacional a toxicidad por As mediante el estudio de los polimorfismos de la AS3MT.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La concentración plasmática de vitamina D y los polimorfismos genéticos del gen AS3MT afectan el metabolismo de eliminación y daño genético en las mujeres residentes de comunidades del Lago Poopó expuestas a As en agua de consumo?

5. HIPÓTESIS

La capacidad del metabolismo de eliminación y el daño genético relacionadas a la exposición a As en agua de beber en las mujeres residentes en comunidades alrededor del Lago Poopó, están influenciados por los polimorfismos genéticos rs3740393 y rs11191439 del gen As3MT y el estatus de vitamina D.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de los polimorfismos de la As3MT y la concentración de vitamina D sobre el metabolismo de eliminación del arsénico y daño génico en mujeres del Lago Poopó expuestas a agua contaminada con arsénico.

6.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar los factores higiénicos y de salud de los pobladores en relación a la exposición crónica a arsénico.
2. Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos un solo nucleótido rs3740393 y rs11191439 del gen As3MT.
3. Determinar los valores plasmáticos de vitamina D2/D3 como marcador del estatus de vitamina D.
4. Establecer la influencia de los genotipos de AS3MT, estatus de vitamina D y factores modificadores sobre el metabolismo de eliminación de As.
5. Establecer la influencia de los genotipos de AS3MT, estatus de vitamina D y factores de riesgo sobre el daño genético producido por la exposición al As.

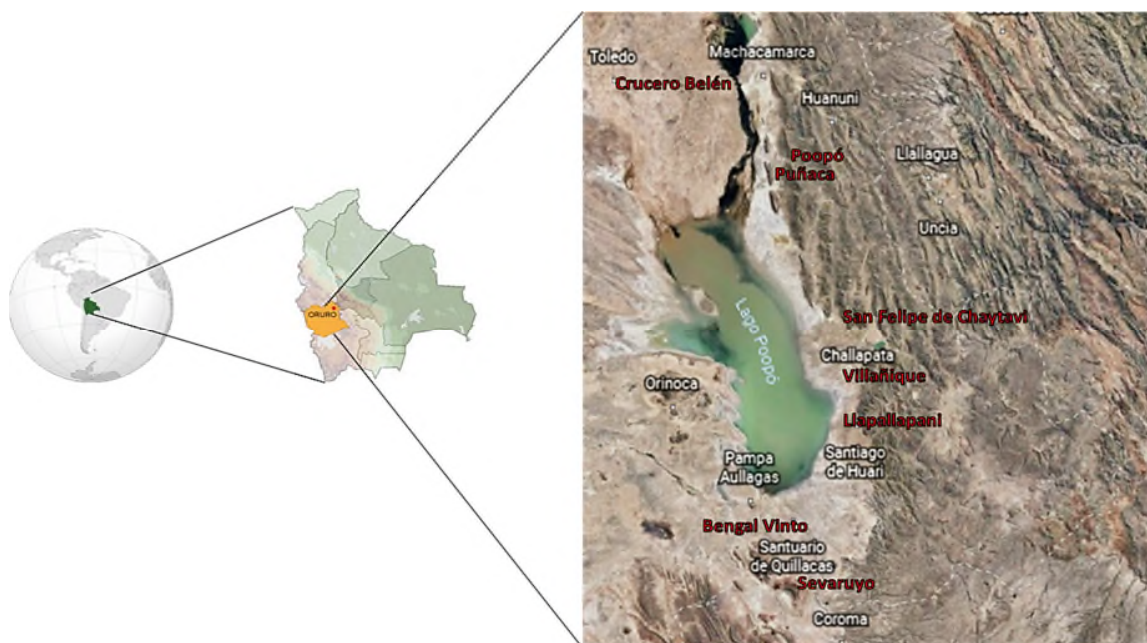
6.1 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño

Estudio observacional, transversal y analítico.

7.2 Lugar de estudio

Se estudió comunidades rurales cercanas al lago Poopó en la región norte y sur: Llapallapani, Puñaca, Poopó, Bengal Vinto, Crucero Belén, Sevaruyo, Vilañeque y San Felipe de Chaytavi (Figura 12).



Poblaciones	Provincia
1. San Felipe de Chaytavi	Cercado
2. Bengal Vinto	Ladislao Cabrera
3. Puñaca Tinta María	Poopó
4. Vilañequé	Eduardo Avaroa
5.	
6. Llapallapani	Sebastián Pagador
7. Crucero Belén	Cercado
8. Poopó	Poopó
9. Sevaruyo	Eduardo Avaroa

Figura 12. Comunidades alrededor del lago Poopó que participaron del estudio.

Fuente: Elaboración propia

7.3 Población de estudio

La población de estudio fueron 74 mujeres aparentemente sanas residentes en comunidades alrededor del Lago Poopó, las cuales fueron reclutadas entre noviembre de 2017 y agosto de 2018 y cuyo ingreso fue de manera voluntaria de acuerdo a los criterios de selección y con firma del consentimiento informado.

La población de estudio fue dividida en diferentes grupos de acuerdo a su etnicidad, genotipos de AS3MT y estatus de vitamina D para el análisis de la eficiencia del metabolismo de eliminación de As y daño genético.

Los hombres no se incluyeron en este estudio por tener diferente estilo de vida, ocupación, muchos de ellos tienen un movimiento de migración durante largos periodos de tiempo, por lo tanto presentan un patrón diferente de exposición al arsénico.

7.4 Criterios de selección grupo de expuestos

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Mujeres voluntarias de 16 a 60 años de edad• Estatus de residente permanente de la zona (residencia mayor a un año).• Función renal normal• Exposición a arsénico en agua de beber mayor a 10ug/L• Firmar el consentimiento informado.	<ul style="list-style-type: none">• Sujetos de sexo masculino• Residencia externa a la zona de estudio• Residencia en el lugar de estudio menor a 1 año• Enfermedad neoplásica diagnosticada y/o en tratamiento quimioterápico• Enfermedad renal crónica diagnosticada y/o en tratamiento• Negación de firmar el consentimiento informado.

7.5 Obtención de información poblacional

Las características demográficas, historia familiar, exposición solar, actividades laborales y domésticas, enfermedades anteriores, hábitos de vida, preferencias alimentarias, y factores de riesgo como ser ingesta de alcohol y tabaquismo se obtuvieron mediante entrevista y aplicación individual de cuestionarios descritos en Anexo 3 y 4.

Se evaluó el origen étnico según el lugar de nacimiento informado, complementado con información de la residencia de los padres y abuelos del participante.

7.6 Evaluación médica

Se realizó un examen médico para determinar estado nutricional se usó el índice de masa corporal, el cual fue calculado dividiendo el peso en kilogramos por la altura en metros cuadrados. La medición de presión arterial fue realizada usando tensiómetro mecánico. Se evaluó la presencia de lesiones dermatológicas por exposición a arsénico como melanodermia, hiperqueratosis e hiperhidrosis. Por otro lado, se evaluó presencia de pterigion como lesiones oculares por exposición solar- radiación ultravioleta, se escogió esta lesión por ser fácil de diagnosticar mediante simple inspección clínica. El tipo de piel fue evaluado como variable confundente para nivel de vitamina D plasmática, mediante examen clínico y respuesta solar según clasificación de OMS (Tabla 1).

Tabla 1
Clasificación de los fototipos de piel.

Fototipo	Tipo de piel	Reacción solar
1	Piel muy clara, ojos azules, casi albinos	Eritema intenso, se queman casi siempre, no se broncean.
2	Piel clara, ojos azules o claros, pelo rubio o pelirrojo	Reacción eritematosa. Propensión a las quemaduras. Consiguen bronceado mínimo
3	Piel blanca (caucásicos), ojos y pelos castaños	Eritema moderado. Pigmentación suave y gradual.
4	Piel mediterránea. Pelo y ojos oscuros	Ligero eritema. Rara vez se queman. Pigmentación fácil.
5	Morena, tipo india, Sudamérica, indostánicos	Eritema imperceptible. Pigmentación fácil e intensa.
6	Piel negra	No hay eritema. Nunca se queman.

Fuente: (Organización Mundial de la Salud, 2003).

7.7 Toma de muestras biológicas

7.7.1 Sangre venosa periférica

Se colectó 5 mL de sangre venosa periférica en tubos EDTA (Vacuette®). Se separó el plasma de cada tubo mediante sedimentación dentro de las 12 horas posterior a la toma de muestra de sangre total. Se alicuotó 250- 500 ul de plasma en tubos Eppendorf, posteriormente se protegió de la luz y se almacenó a -20°C, hasta su procesamiento.

7.7.2 Orina

Se recolecto la orina de las mujeres mediante técnica de chorro medio, para esto las mujeres recibieron instrucciones sobre la limpieza con toallitas húmedas del área genital previa a la recolección de orina para minimizar la contaminación de la muestra. Se evaluó un examen general rápido de orina mediante uso de tiras de orina (tiras de prueba Combur-7, Roche, Basilea, Suiza) para medir el pH, la glucosa, las cetonas, los leucocitos, los nitritos en la orina. y la proteína inmediatamente después del muestreo. Las muestras de orina y agua se almacenaron a -18 ° C durante cada viaje de campo (generalmente 3 días de duración) en un congelador portátil (ARB, Alice Springs, Australia). Las muestras se transportaron al Instituto de Genética de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia) y se almacenaron a -20 ° C hasta su posterior

envío. Las muestras se transportaron en hielo seco a Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia), donde se llevaron a cabo todos los análisis posteriores.

7.7.3 Toma de muestras de agua de consumo

Se recolectó muestras de agua de consumo de fuentes como pozos, grifos, o tanques en cada comunidad en frascos de polietileno de 20mL, verificados para pérdida de elementos traza. Además se midió in situ la concentración de arsénico mediante el kit de prueba rápida (MQuant, Merck, Darmstadt, Alemania). Además, en cada aldea se recolectaron muestras de agua de las principales fuentes de agua potable, principalmente de grifos, pozos o tanques (Figura 13). Las muestras se transportaron al Instituto de Genética de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior envío. Las muestras se transportaron en hielo seco a Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia), donde se llevaron a cabo todos los análisis posteriores.



Figura 13. Pozo de agua en un domicilio de agua de la comunidad de Vila Ñeque. (Foto tomada en octubre 2017).

7.8 Procesamiento de muestras

7.8.1 Medición de exposición a arsénico

Las muestras de agua fueron procesadas en el Environmental Institute, Karolinska Institutet según lo reportado por De Loma Olson (De Loma et al., 2019a):

“Al llegar, las muestras de agua se dividieron en alícuotas y se añadió HNO_3 1: 200 (67% p/p, NORMATOM Ultrapure para análisis de metales traza, VWR Chemicals, Filadelfia, EE. UU.) para evitar la precipitación de metales. Las muestras de agua y orina se

analizaron dentro de los 3 meses posteriores a la recolección y los resultados se informaron a las autoridades sanitarias y los municipios de Bolivia.

La determinación de arsénico (y elementos adicionales) en agua y orina se midieron mediante espectrometría de masa de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS; Agilent 7700 ×, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Las muestras se descongelaron a 7 ° C durante la noche y se dejaron a temperatura ambiente antes de diluir 10 veces con HNO₃ al 1% (67% p/p, NORMATOM Ultrapure para análisis de metales traza). Todas las puntas y tubos se lavaron previamente con ácido para evitar la contaminación de las muestras con elementos traza. Para garantizar la precisión analítica de las mediciones, todos los ensayos incluyeron materiales de referencia comerciales adecuados, Esta tabla también incluye los límites de detección (LOD) y los coeficientes de variación (CV), basados en el promedio de diferentes ejecuciones de arsénico, litio, boro, estroncio y cesio. En general, hubo un buen acuerdo entre las concentraciones obtenidas y los valores de referencia.

La evaluación de la exposición al arsénico inorgánico se basó en la suma de las concentraciones de metabolitos de arsénico (iAs + MMA + DMA) en la orina (denominados U-As). Antes de los análisis, se filtró aproximadamente 1 mL de cada muestra de orina a través de un filtro de jeringa de 0.20 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las concentraciones de metabolito de arsénico en la orina se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en línea con generación de hidruro y ICP-MS (HPLC-HG-ICP-MS) (HPLC: serie Agilent 1110, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania; columna Hamilton PRP-X100, Reno, EE. UU.; ICP-MS: Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Este método es capaz de separar y detectar formas trivalentes [As (III)] y pentavalentes [As (V)] de arsénico inorgánico, así como MMA y DMA. Debido a la rápida oxidación de As (III) a As (V), usamos solo iAs [suma de As (III) y As (V)] en las evaluaciones posteriores. La eficiencia de la metilación del arsénico se evaluó en función de las concentraciones relativas (%) de los diferentes metabolitos del arsénico en la orina (Vahter, 2002).”

7.8.2 Genotipificación de polimorfismos de AS3MT

Extracción y cuantificación del ADN

Se realizó la extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica, mediante utilización de kit QIAamp ADN Blood Mini Kit (250) QiAmp® (Cat No./ID: 51106).

Brevemente el método consistió en: pipetear 20 μL de Proteinasa K en un tubo de Eppendorf de 1.5mL, al cual se añade 200 μL de sangre periférica total más 4 μL de RNAasa Wizard® Genomic ADN Purification Kit (Promega, USA). Posteriormente se agregó 200 μL de solución AL, se vortexeó vigorosamente durante 15 segundos e incubó a 56°C durante 1 hora. Se centrifugó levemente y se añadió 200 μL de etanol al 96% y vortexeó por 15 segundos. Se trasvasó esta mezcla a una columna Quiamp Spin, y se centrifugó a 8000rpm (revoluciones por minuto) por 5 minutos, se desechó el tubo con el filtrado. Luego se añadió 500 μL del tampón AW1 a la columna con un tubo colector de 1.5mL y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos, y se desechó el tubo con el filtrado. Después, se añadió 500 μL de solución AW2 a la columna con un nuevo tubo recolector de 1.5 mL y se centrifugó a 14 000 rpm durante 8 minutos. La columna fue colocada en un nuevo tubo recolector limpio de 1.5 mL, se agregó 200 μL de solución AL y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para finalmente centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos para obtener ADN el cual se almacenó a 4°C hasta su análisis de calidad y cantidad.

Para saber el rendimiento de la extracción de ADN, se cuantificó las muestras en una corrida electroforética horizontal con gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio, las bandas de ADN se observaron en un trans-iluminador, revelando la presencia de ADN según la intensidad de la banda.

También se determinó la calidad y cantidad de ADN mediante espectrofotometría mediante el uso de uDrop Multiskan™ GO de Thermo Scientific™. Se usó el método de blanco específico para lo cual se colocó 2 μL del buffer de dilución del ADN/RNA en el primer pozo del μDrop Plate, y las muestras a determinar en el resto de los pocillos, realizando mediciones de absorbancia de 260nm/230nm, 260nm/280nm. Se obtuvo una media de calidad de 1.8 en la relación 260nm/280nm y de 2.0 en la relación 260nm/230nm, con una media de concentración de 78 ng/ μL .

Se ajustó la concentración de ADN de todas las muestras a 4 ng/ μL para realizar las pruebas de amplificación.

Amplificación por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) del SNP rs3740393 y rs 11191439 del gen AS3MT

Se investigó la presencia de los polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) rs3740393 y rs11191439 del gen As3MT relacionados previamente

con la capacidad de metilación del arsénico mediante RT-PCR (Engström et al., 2011) . El análisis de genotipificación fue realizado mediante discriminación alélica en el equipo Rotor Gen (Quiamp®) con el software Rotor-Gen Q – Pure Detection v.2.1.0 La amplificación fue realizada usando sondas TaqMan SNP (*Apply Biosystem, USA*) con *TaqMan Genotyping Master Mix (Apply Biosystem, USA)*.

Sondas Taqman de AS3MT usadas para RT-PCR	
rs AS3MT	Secuencia [VIC/FAM]
rs3740393	GTTCCCCTATTCCTTTCTTTGTTAT[G/C]TGGGGTCAATGTAATCATTAAATCAT Polimorfismo de G/C , sustitución de transición
rs11191439	ATTACAGGACATGAAAAAGAACTAA[C/T]GTTTGATGCCAATTTTACATTTAAG Polimorfismo C/T, sustitución de transversión

La RT-PCR fue llevada a cabo usando tubos de 0.1mL (Strip tubes and caps, 0.1 mL Quiamp, Cat. No. 981103) con un volumen final de 5µL bajo las siguientes condiciones: 0.125µL de sonda SNP, 2.5µL de TaqMan MasterMix, 0.375µL de agua desionizada, 2µL de ADN a una concentración de 4ng/µL.

La amplificación se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo (De Loma, Skröder, Raqib, Vahter, & Broberg, 2018):

	Pre-Incubación	Amplificación		
Temperatura °C	95°	95°	60°	72°
Tiempo (min)	10:00	0:10	1:00	0:01
Ciclos	1	45		
Cuantificación	-	-	Simple	Simple

Se incluyeron controles negativos en cada amplificación. Diez por ciento de las muestras para cada SNP fueron re-analizadas en pruebas separadas y todos los resultados mostraron concordancia con los resultados.

Los resultados se clasificaron en genotipo silvestre; genotipo heterocigoto y genotipo homocigoto mutante.

rs AS3MT	Genotipo silvestre	Genotipo heterocigoto	Genotipo homocigoto mutante
rs3740393	GG	GC	CC
rs11191439	TT	TC	CC

Se evaluó los genotipos mediante el Equilibrio de Hardy-Weinberg basado en el análisis de chi-cuadrado (criterio de desviación de $\chi^2 > 3.84$ [$p < 0.05$]).

7.8.3 Ensayo del cometa

El daño genotóxico se determinó mediante ensayo de cometa en linfocitos de sangre periférica según protocolo (Larrea, Tirado, & Ascarrunz, 2010). Las células fueron suspendidas en 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en tampón fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Los portaobjetos con suspensión celular fueron colocados con cubreobjetos y llevados a 4°C por 10 min., posteriormente se sumergieron en un buffer de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10, 1% Triton X-100 y 10% DMSO), por 1 hora a 4° C en la oscuridad, para permitir la lisis de las células embebidas y el desenrollamiento del ADN. Después de la incubación de las células en la solución de lisis, los portaobjetos fueron expuestos a buffer alcalino (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH buffer) pH >13 por 20 min. Finalmente, los portaobjetos fueron sometidos a electroforesis por 20 min. a 25 v y 300 mA en el mismo buffer, luego lavados con buffer 0.4 Tris-HCl (pH 7.5) para neutralizar el exceso de álcali y remover los detergentes y fijadas con etanol absoluto (96%) para finalmente ser almacenadas hasta su evaluación. Las placas fueron teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL) y luego las células fueron examinadas usando microscopio fluorescente Olympus BX51, con un aumento de 20x. Se realizó la adquisición de imágenes de 100 células por cada placa uso de software CellsSens Versión 16.0. La medición de daño genotóxico fue evaluado mediante la cuantificación de ADN presente en cola, el tail momet y el olive moment usando el software Comet Score TM Freeware v1.5.

7.8.4 Cuantificación de concentración sérica de vitamina D 25 OH

Se midió la concentración plasmática de Vitamina D₂/D₃ mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

usando el kit *25-OH Vitamin D3/D2 ORGENTEC Diagnostika GmbH* (catálogo #ORG 270).

Se descongeló las muestras de plasma a temperatura ambiente, se dispensó 80 µl de plasma del paciente en un tubo Eppendorf de 500 µL y se añadió 80 µL del reactivo diluyente se mezcló por inversión cuidadosamente, posteriormente se añadió 160 µL del reactivo extracto o liberador de la vitamina D, se mezcló por inversión cuidadosamente. Se pipeteó 100 µL de las muestras tratadas en la placa de 96 pocillos, se incubó durante 30 minutos a 25°C con agitación intermitente en el equipo *Multiskan Go (ThermoFisher)*. Posteriormente se realizó el lavado con 300ul de solución de lavado (solución WASH). A continuación se agregó 100µL de solución de conjugado dentro de cada pocillo y se dejó incubar por 15 minutos a 25 °C, se decantó el sobrenadante de la placa y se realizó el ciclo de lavado. Luego se añadió 100 µL de solución TBM, se incubó durante 15 minutos a 25°C, y finalmente se agregó 100 µL de solución STOP, con una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó la lectura a 450 nm en el equipo *Multiskan Go (ThermoFisher)*. Se repitió lectura de 10% de las muestras, en pruebas diferentes con resultados concordantes.

El intervalo de cálculo de este ensayo ELISA es de 5-120ng/mL. Los resultados obtenidos se clasificaron de acuerdo a (Holick, 2007; Munns et al., 2016):

- Deficiencia <12 ng/mL (<30nmol/L)
- Insuficiencia 12-20 ng/mL (30-50 nmol/L)
- Suficiencia >20-150 ng/mL (>50-375nmol/L)

7.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se elaboró una base de datos que reunió los datos obtenidos de las encuestas, examen clínico, y resultados obtenidos del procesamiento de las muestras en el laboratorio. Se utilizó el paquete estadístico RStudio versión 3.5.0 para los siguientes análisis:

- Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar distribución normal de variables.
- Como medidas de tendencia central y dispersión se utilizó la media y desviación estándar en variables de distribución normal. Se utilizó la mediana y el rango en las variables de distribución asimétrica.

- Se utilizó las pruebas de Wilcoxon para el análisis de diferencia entre los grupos étnicos aymara-quechua y urus.
- Las variables categóricas se presentan como frecuencias y porcentajes.
- Para la estimación de las frecuencias génicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Se utilizó las pruebas de Wilcoxon y de Kruscal Wallis para la comparación de medianas de las variables con distribución no paramétrica de %ADN en cola, U-As, % iAs, % MMA, %DMA, concentración plasmática vitamina D entre los distintos genotipos de AS3MT.
- El coeficiente de correlación de Spearman (Rs) se utilizó para analizar correlación entre variables numéricas.
- Se aplicó el análisis de correlación lineal múltiple para evaluar, en forma conjunta, la influencia del polimorfismo de AS3MT, exposición solar, concentración sérica de vitamina D 1,25 (OH)₂, sobre el daño genotóxico y lesión ocular.

7.10 Consideraciones éticas

El presente estudio se desarrolló en el marco del proyecto: “Metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en humanos relacionados con el consumo de aguas altamente mineralizadas conteniendo arsénico”, que cuenta con el correspondiente aval ético otorgado por el Comité Nacional de Bioética (2014) y adenda de modificación de protocolo (2017).

Todos los participantes recibieron información de manera personalizada y gratuita acerca de los objetivos y los alcances del estudio y firmaron el consentimiento informado (Anexos 1 y 2).

7. RESULTADOS

8.1 Distribución geográfica de la muestra poblacional

Se estudiaron 74 mujeres residentes de comunidades alrededor del lago Poopó, cuya distribución geográfica se muestra en la tabla 2.

Basados en la distribución geográfica, el 67,6 % de la población de estudio estuvo compuesta por mujeres de etnia Aymará-Quechua y el 32,4% mujeres Urus (Tabla 3).

Tabla 2***Distribución geográfica de la población de estudio en las comunidades alrededor del Lago Poopó.***

Comunidad	n	(%)
Sevaruyo	18	(24,3)
Bengal Vinto	3	(4,1)
Chaytavi municipio el choro	18	(24,3)
Crucero Belén	7	(9,5)
Puñaca	2	(2,7)
Villa Ñeque	8	(10,8)
Poopó	4	(5,4)
Llapallapani	14	(18,9)
Total	74	(100)

Fuente: Elaboración propia (2019)

La población habitante de esta región se caracterizó, mayormente, por ser rural y dispersa. La media de edad de toda la muestra poblacional fue de 36 años, con una mediana de residencia en el lugar de 15 años. La actividad económica de la poblacional está relacionada a la agricultura, ganadería y otras actividades como la artesanía (principalmente las comunidades Urus). Si bien el hábito tabáquico está presente en un mínimo porcentaje (1,4%), la exposición a plaguicidas es del 23%, esto estaría relacionado a la actividad agrícola que presenta la población.

Tabla 3***Características demográficas de la población.***

	Total	Aymará Quechua	Uru	p
Numero	74	50	24	-----
Edad años	36 (30-46)	36 (31-47)	36 (29-44)	0,540
Años de residencia	15 (4-35)	15 (5-36)	15 (4-29)	0,716
Ocupación				
Agricultura	24,3%	28,0%	16,6%	0,312
Ganadería	13,5%	16,0%	8,3%	
Otros (labores de casa, personal de salud y educación, artesanías)	62,2%	56,0%	75,1%	
Tabaquismo	1,4%	0,0%	4,1%	0.146
Exposición a plaguicidas en los últimos 6 meses	23%	30,0%	8,3%	0.048

Se reporta la mediana y los percentiles Q1 y Q3, o porcentaje en el caso de variables categóricas.

Se usó prueba de Wilcoxon cuando se compara medianas y test χ^2 para variables de proporciones.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.2 Estado de salud de la población de estudio

La población presentó IMC con una mediana de 28,6 kg/m², los valores de presión arterial sistólica y diastólica estuvieron dentro de valores normales (Whelton et al., 2018). No se encontró presencia de lesiones dermatológicas relacionadas al hidroarsenismo crónico. La población presentó una mediana de exposición solar prolongada de 7 horas/día, la medida de protección más usada contra la prolongada exposición solar es la ropa de mangas largas, sombrero de ala ancha, sin embargo, el uso de crema de protección solar es bajo al igual que gafas para sol. Respecto del tipo de piel, la mayoría de las mujeres estudiadas presentan fototipo de piel V (51,4%). El análisis comparativo de las características clínicas según grupo étnico no presentó diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4
Características clínicas de la población de estudio.

	Total	Aymará -Quechua	Urus	p
Peso kg	67 (56,1-73,2)	64,5 (55,5-71,1)	69,5 (57,6-77,2)	0,124
Talla m	1,49 (1,46-1,53)	1,50 (1,47-1,54)	1,48 (1,45-1,51)	0,146
IMC kg/m ²	28,6 (24,9-34,1)	27,6 (25,4-32,5)	28,8(26,4-34,1)	0,079
PAS mmHg	100 (94-110)	100 (96-110)	103 (90-116)	0,911
PAD mmHg	70 (60-78)	70 (60-70)	70 (60-80)	0,846
Arsenicosis (%)	0	0	0	-
Horas exposición solar	7 (4-7)	7 (4-9)	8 (5-10)	0,201
Uso de gafas	5,4 %	6%00	4,2%	0,744
Protector solar	6,8 %	6%	8,3%	0,708
Ropa manga larga	93,2 %	94,0%	91,7%	0,708
Sombrero ala ancha vs gorra	60 vs13 %	80vs20%	83,3vs12,5%	0,269
Pterigion (%)	42 %	44,0%	37,5%	0,595
Fototipo de piel				
III	8,1 %	8,0%	8,3%	0,833
IV	40,5 %	42,0%	37,5%	
V	51,4 %	50,0%	54,2%	

Se reporta la mediana y los percentiles Q1 y Q3, o porcentaje en el caso de variables categóricas.

Se usó prueba de Wilcoxon cuando se compara medianas y prueba χ^2 para variables de proporciones.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.3 Indicador de exposición ambiental

8.3.1 Arsénico en agua de beber

Los resultados de encuestas denotaron que las principales fuentes de agua utilizadas por las mujeres de las comunidades son el agua de pila y pozo, seguido de lluvia, tanque y embotellada (Figura 14). Sin embargo, es importante mencionar que el consumo de agua

no se realiza de forma exclusiva de una fuente sino de manera mixta, siendo el consumo de agua de pozo la principal fuente de agua sobre todo en la época seca en la región del Lago Poopó.

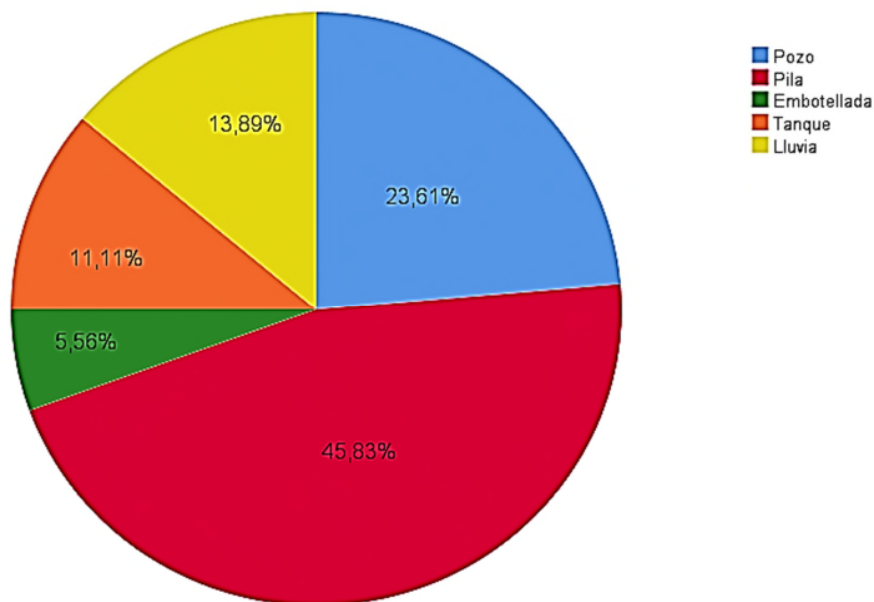


Figura 14. Fuentes de agua de consumo de las mujeres de las comunidades.
Fuente: Elaboración propia. (2019).

Las concentraciones de arsénico en agua de pozo en las comunidades estuvieron por encima del valor permitido por la OMS y la normativa boliviana, excepto en la comunidad de Poopó donde estuvo dentro del límite permitido (Tabla 5).

Tabla 5
Concentración de arsénico ($\mu\text{g/L}$) en agua de consumo en cada comunidad.

Comunidad	Media	Normativa Boliviana	OMS
Poopó	3,3	10	10
Pampa Aullagas	27		
Vilañeque	41		
Llapallapani	51		
Bengal Vinto	55		
Sevaruyo	121		
Puñaca	123		
Crucero Belén	201		
Chaytavi	452		

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.3.2 Arsénico en orina

La evaluación de exposición a arsénico inorgánico fue realizada en la sumatoria de las concentraciones de los metabolitos de arsénico (iAs+MMA+DMA) referida como U-As. Los metabolitos de arsénico fueron determinados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en línea con generación de hidruro y ICP-MS (HPLC-HG-ICP-MS) (HPLC: serie Agilent 1110, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania; columna Hamilton PRP-X100, Reno, EE. UU.; ICP-MS: Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) como esta descrito en De Loma et al (2019).

La cuantificación de As en orina se realizó en las 74 muestras de las mujeres. Los valores de U-As, expresados en $\mu\text{g/L}$, estuvieron comprendidos entre 11,78 y 288,70 $\mu\text{g/L}$, con una media de 93,30 $\mu\text{g/L}$ y una mediana (cuartil (Q) 2) de 69,29 $\mu\text{g/L}$ (Q1= 40,08 $\mu\text{g/L}$; Q3= 132,46 $\mu\text{g/L}$).

Los niveles de U-As por localidad se muestran en la tabla 5 y figura 15. Se observaron importantes diferencias entre las medias y las medianas para los valores de U-As de los habitantes de cada localidad, excepto para el caso de Poopó y Puñaca donde las medianas iguales a las medias (Tabla 6).

Dado que la mediana es un indicador más robusto que la media como medida descriptiva de un grupo de datos, se incluyeron también los cuartiles 1 y 3 (Q1 y Q3, respectivamente), los cuales indicaron entre qué valores estuvo comprendido el 50 % de los valores de U-As de los habitantes de cada localidad.

Tabla 6
Distribución de los valores de U-As ($\mu\text{g/L}$) en la población según lugar de residencia.

Comunidad	n	Media	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
Poopó	4	33,85	34,37	26,34	40,33	28,05	40,16
Villañeque	8	107,52	95,74	40,00	219,35	51,50	149,01
Llapallapani	14	60,70	50,57	16,29	130,00	40,16	83,48
Bengal Vinto	3	73,40	65,88	51,66	102,66	58,77	84,27
Sevaruyo	18	162,09	147,21	26,92	277,16	130,38	218,25
Puñaca	2	94,09	94,08	89,79	98,38	91,94	96,24
Crucero	7	66,13	38,74	24,24	170,37	34,00	80,76
Belen							
Chaytavi	18	70,54	43,91	11,78	288,70	33,50	88,50

Nota. U-As: sumatoria de las concentraciones de iAs, MMA y DMA; Q1=percentil 25 y Q3= percentil 75.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

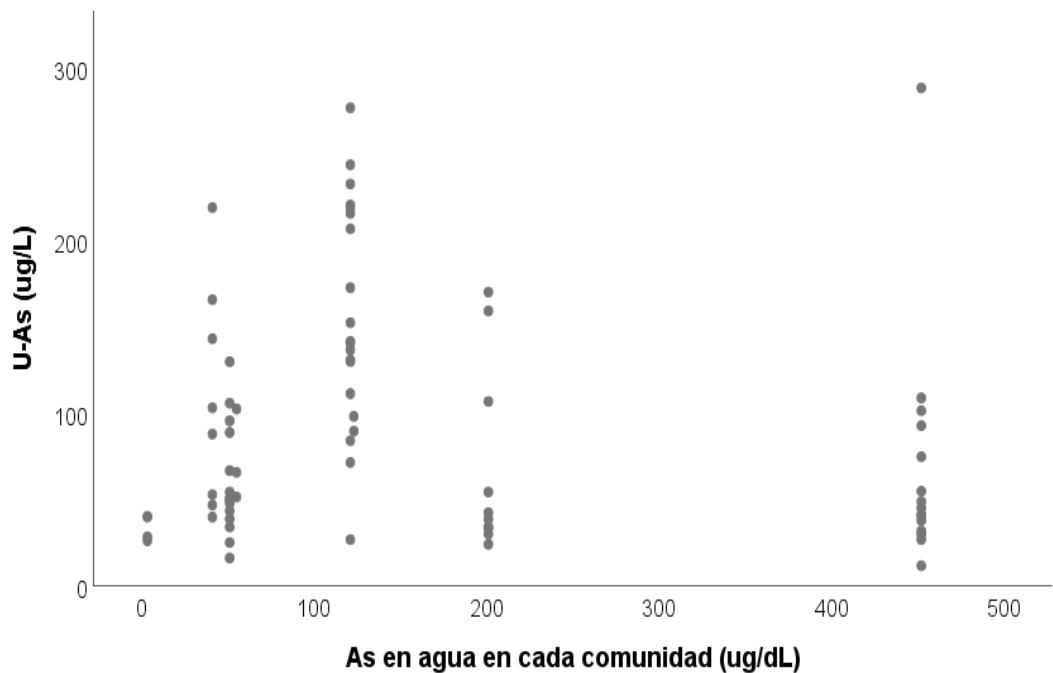


Figura 15. Gráfico de dispersión de concentración de arsénico total en orina en relación con la concentración media de arsénico en agua de beber por comunidad.
Fuente: Elaboración propia. (2019).

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple con el U-As (expresado en $\mu\text{g/L}$) como variable dependiente, mientras la edad, la concentración media de As en agua, el tiempo de residencia en las comunidades en años fueron las variables regresoras (Tabla 7).

El análisis de asociación entre el nivel de arsénico en agua de consumo y el porcentaje de U-As mostró una correlación débil ($r_s = 0,03$, $p\text{-value} = 0,7903$), este resultado puede ser explicado por otras fuentes de arsénico a las cuales las mujeres están expuestas como carnes de animales, arroz o quinua que contienen formas orgánicas de arsénico (Garrido, Strosnider, Wilson, Condori, & Nairn, 2017), o incluso el material de las viviendas hechas con ladrillos de adobes, que son ladrillos realizados con tierra del lugar que contiene arsénico y con el tiempo podría liberar arsénico (McEwen et al., 2016).

Por otro lado, los valores de U-As no estuvieron claramente influenciados por la concentración de As en agua. La influencia de la edad (como variable continua) mostró una correlación negativa pero no significativa, tampoco la frecuencia de toma de agua en cuanto a vasos día y el componente de estado nutricional (IMC) mostró tener influencia en el nivel de U-As.

Tabla 7
Regresión lineal de factores asociados a U-As.

Factor	Estimador	p
Modelo		0,012
Años de residencia	0,834	0,152
Edad	-0,518	0,511
Vasos día	6,844	0,133
IMC	-2,510	0,098

Valor significativo $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia. (2019).

Por otro lado, se evaluó la relación de etnicidad con respecto al nivel de U-As (Figura 16), para ello se definió a los grupos étnicos aymara-quechua y urus, se obtuvo que las mujeres urus tienen una ligera menor concentración de U-As en relación a las aymara-quechuas (mediana: 60,7 vs 73,3 respectivamente), diferencia que no fue significativa ($p\text{-value} = 0,607$).

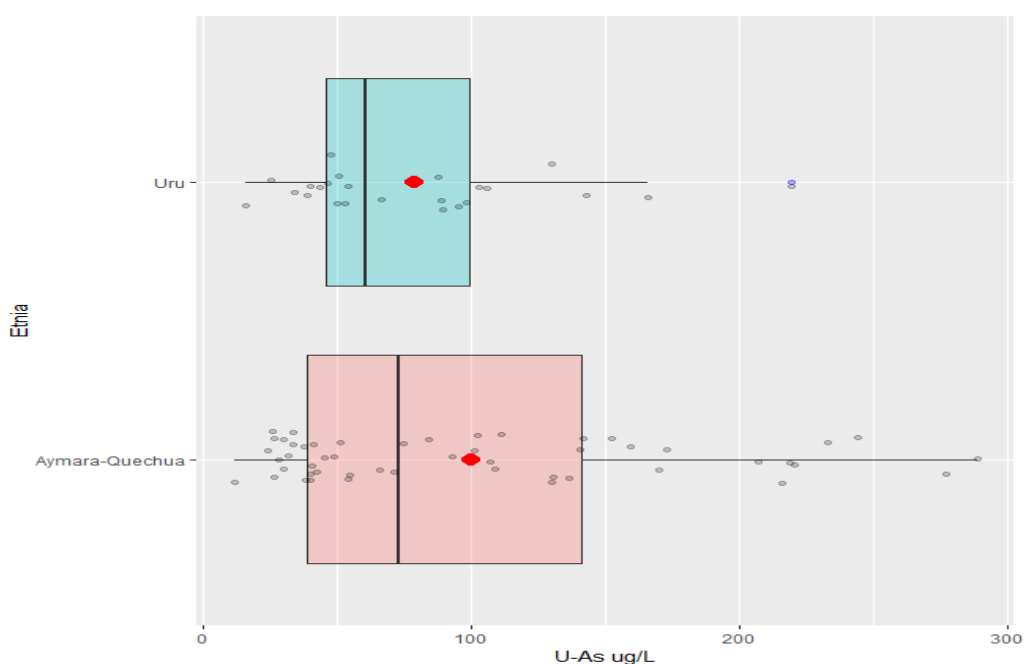


Figura 16. Diagrama de caja del nivel de U-As en relación a la etnicidad. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Wilcoxon $p\text{-value} < 0,05$

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4 Metabolismo de eliminación del arsénico inorgánico

8.4.1 Análisis de las especies producto del metabolismo del As inorgánico

Las especies que pueden encontrarse en orina son AsIII, AsV, MMA y DMAV. Sin embargo, dada la poca estabilidad de las especies AsIII y su rápida oxidación a AsV, se

usó iAs (la suma de AsIII y AsV) para la evaluación de la forma inorgánica presente en la orina.

El análisis descriptivo de los metabolitos de orina (Tabla 8 y Figura 17) mostró que la población de estudio tiene un eficiente metabolismo de eliminación de arsénico, ya que el porcentaje de DMA es superior al 80% y porcentaje de MMA% fue bajo.

Sin embargo, solo una mujer de la localidad de Chaytavi tuvo porcentajes bajos de las formas orgánicas en comparación con la forma inorgánica (%iAs=62,28, %MMA=3,34 y %DMA=34,38).

Tabla 8
Perfil metabólico de eliminación de arsénico en la población de estudio.

Metabolito	Media	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
iAs%	12,99	11,48	3,74	62,28	8,30	15,31
MMA%	6,75	6,43	1,70	16,67	4,56	8,21
DMA%	80,25	82,39	34,38	92,20	76,88	85,80

Nota. Q1=percentil 25 y Q3)= percentil 75.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

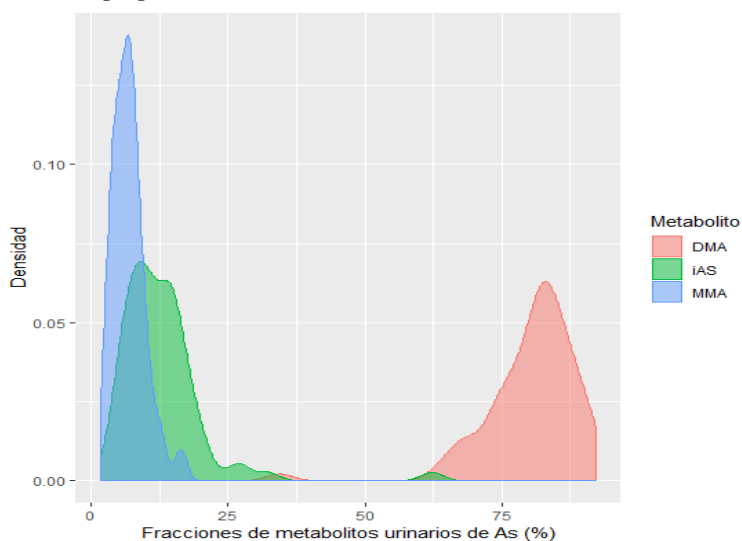


Figura 17. Metabolismo de eliminación de arsénico en la población de estudio.

Se muestra un gráfico de densidad, donde se aprecia que el metabolito de mayor porcentaje corresponde al DMA, seguido de MMA y iAs.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.2 Variabilidad en el perfil metabólico de Análisis de las especies producto del metabolismo del As inorgánico

Para el análisis de los factores que influyen en el perfil metabólico se realizó un análisis de correlación bivariado para estimación de relación entre el U-As y variables como edad, años de residencia, peso, talla, IMC, vitamina D, concentración de iAs en

agua de consumo y vasos consumidos por día, y metabolitos urinarios del arsénico (Figura 18). Este análisis de asociación mostró que el nivel de U-As no estuvo correlacionado con ninguna variable predictora, y tampoco con los metabolitos urinarios %iAs, %MMA o %DMA. El %iAs tuvo una correlación inversamente negativa con la edad ($r_s = -0,244$; $p = 0,035$). Asimismo, el %MMA presentó correlaciones negativas con el peso ($r_s = -0,460$; $p < 0,0001$), IMC ($r_s = -0,446$; $p < 0,0001$), número de vasos consumidos por día ($r_s = -0,244$; $p = 0,035$) y concentración de vitamina D ($r_s = -0,335$; $p = 0,004$). Mientras el DMA presentó correlaciones positivas con la edad ($r_s = -0,335$; $p = 0,004$), peso ($r_s = -0,335$; $p = 0,004$), IMC ($r_s = -0,335$; $p = 0,004$).

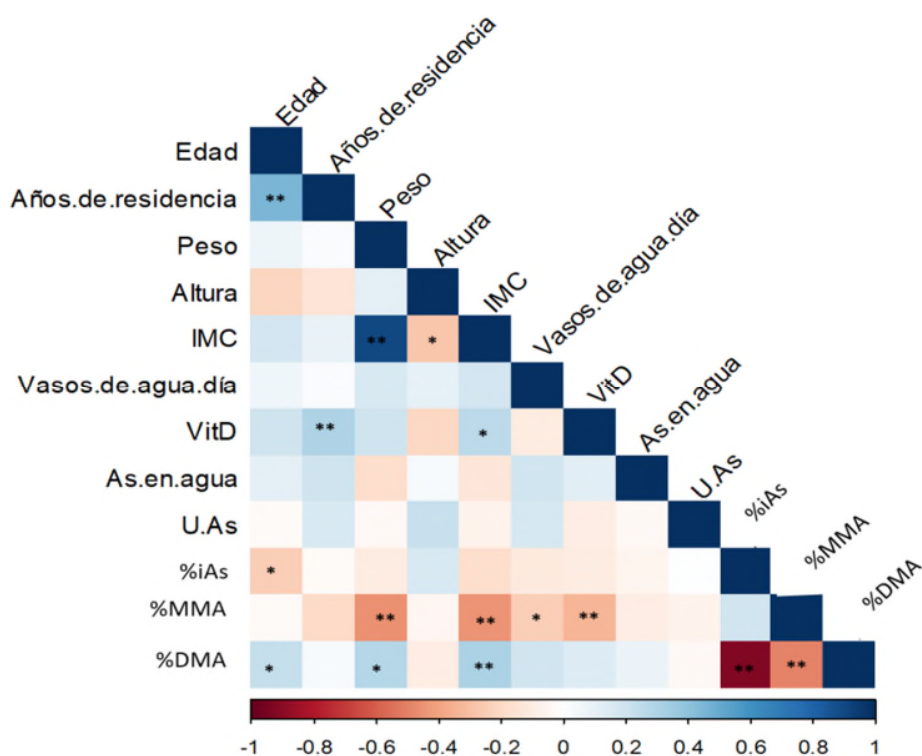


Figura 18. Heatmap de correlaciones entre fracciones del metabolismo de eliminación de arsénico y factores de influencia.

Nota: El peso fue determinado en kg, talla en m, edad en años, vitamina D como ng/mL y U-As en ug/L. Correlación de Spearman, valores p: * $<0,05$, ** $<0,001$.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.3 Edad y perfil metabólico

La edad como variable continua, mostró tener correlación negativa con él % de iAs ($R_s = -0,254$, $p = 0,0299$), y una correlación positiva con él % de DMA ($R_s = 0,260$, $p = 0,02637$). No

se observó una correlación significativa con él % de MMA ($R_s = -0.060$, $P = 0.6166$) (Figura 19).

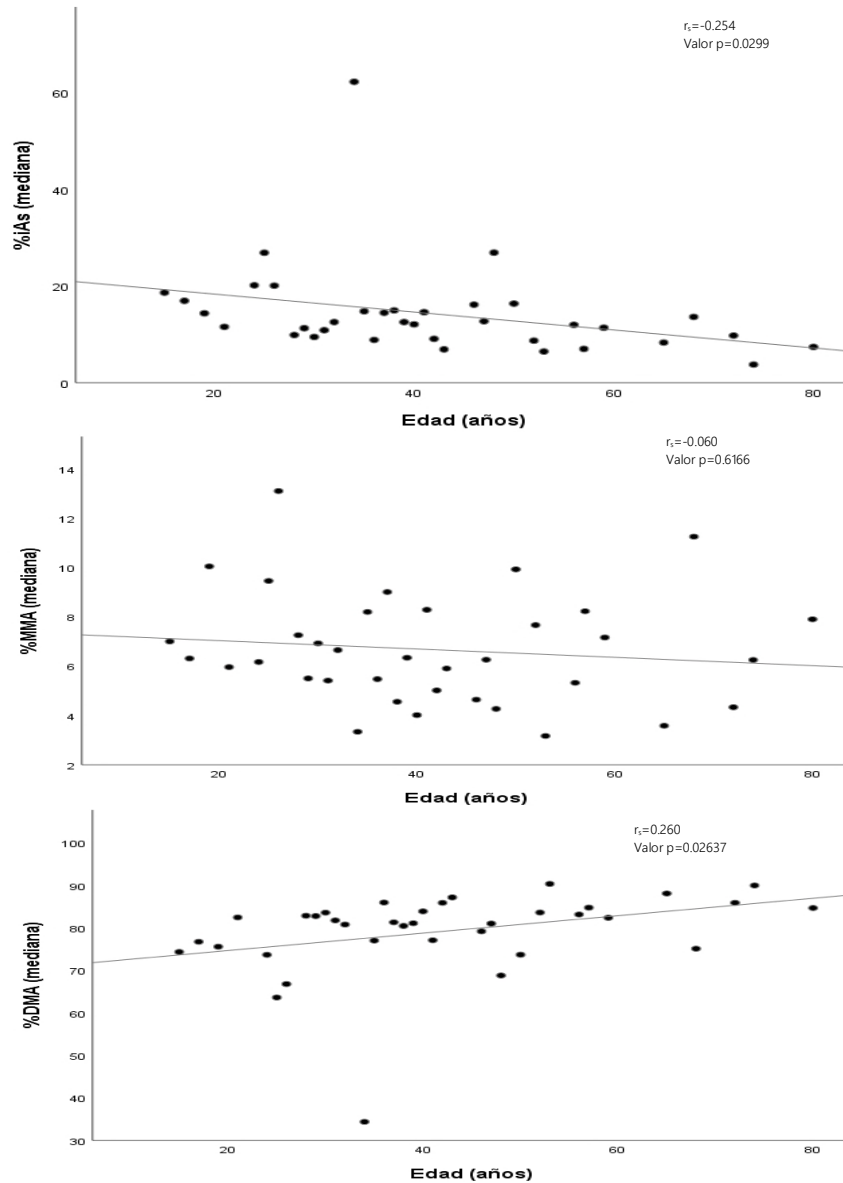


Figura 19. Porcentajes de iAs, MMA y DMA urinarios en función de la edad.
Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.4 Etnicidad y perfil metabólico

En relación a la diferencia entre grupos étnicos se pudo observar que las mujeres Urus como las mujeres Aymará-Quechuas tienen un metabolismo de eliminación eficiente del As. Por otra parte, la prueba de comparación entre etnias no mostró diferencia significativa para este grupo de 74 mujeres, en la eficiencia de eliminación (Tabla 9).

Tabla 9

Comparación de metabolismo de eliminación del As según grupo étnico.

Característica	Aymara-Quechua	Uru	p
%iAs	12,8 (8,6-15,5)	11,01 (8,0-14,1)	0,3177
%MMA	6,9 (4,5-8,8)	6,0 (4,8-7,10)	0,1918
%DMA	81,7 (75,1-84,6)	82,7 (78,7-86,8)	0,2042

Nota: Se reporta la media y los percentiles 25 y 75.

Prueba de U-Mann Withney, se usa como valor p 0.05

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.5 Polimorfismo genético y perfil metabólico

Para este trabajo se seleccionaron los polimorfismos de nucleótido único (SNP), rs 3740393 y rs 11191439 del gen codifica para la enzima As3MT, los cuales fueron realizados mediante RT-PCR (Figura 20).

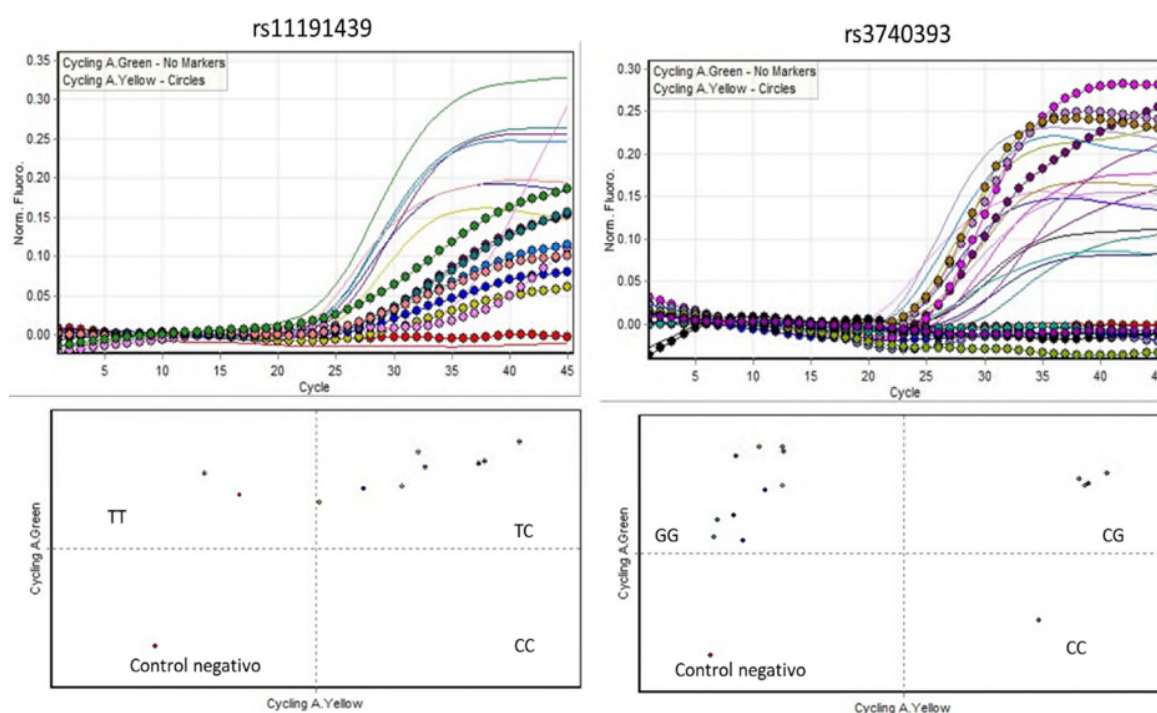


Figura 20. Amplificación de rs11191439 y rs3740393 por RT-PCR y análisis de scatter-plot para discriminación genotípica de ambos SNPs.

Fuente: Elaboración propia

En población total, el genotipo más frecuente del SNP 3740393 fue el CC n=47(63,6%), seguido del CG n=26 (35,1%) y GG n=1 (1,3%), mientras, en el caso del rs11191439 el

genotipo más frecuente fue el TT n=60 (81,1%) seguido del TC n=26 (18,9%), sin presencia del genotipo CC. En el análisis de frecuencias según etnicidad se observó similar distribución de ambos SNPs (Tabla 10).

Tabla 10

Distribución de los polimorfismos de rs3740393 y rs11191439 en la población total y por distinción de grupo étnico.

Población	Tamaño	rs3740393			rs11191439		
		CC	CG	GG	TT	TC	CC
Total	74	47	26	1	60	14	0
Aymara-Quechua	50	31	18	1	37	13	0
Urus	24	16	8	0	23	1	0

Fuente: Elaboración propia.

Respecto de la frecuencia del alelo menor (Tabla 11) se pudo observar que en el caso del rs3740393 el alelo C que es considerado el alelo de menor frecuencia en distintas poblaciones, en nuestra población presentó un FAM de 0,93, similar a lo observado en la población de San Antonio de los Cobres (FAM: 0,70), pero no así en la población de Bangladesh donde es de menor frecuencia (FAM: 0,18). Mientras que, en el caso del rs11191439 el alelo C presentó una frecuencia similar a la observada en poblaciones de Bangladesh o San Antonio de los Cobres.

Tabla 11

Frecuencia de alelo menor de SNP AS3MT en comparación con otras poblaciones.

SNP	Alelo	Poopó	Bangladesh	San Antonio de los Cobres
rs 3740393	C<G	0,93	0,18	0,70
rs 11191439	C<T	0,09	0,02	0,02

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.6 Equilibrio de Hardy-Weinberg

A partir de las frecuencias génicas observadas, se establecieron los valores esperados para los genotipos de cada SNP. A partir de estas, fue posible calcular si existían o no diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas en cada uno de los polimorfismos estudiados en las mujeres alrededor del lago Poopó. Se aplicó una prueba de Ji cuadrado con un 95% de confianza. La tabla 12 muestra los valores de genotipos observados y esperados para cada polimorfismo, y su respectiva prueba de homogeneidad, mediante el estadístico de Ji cuadrado (χ^2). El valor de χ^2 y su respectivo p-valor no son estadísticamente

significativos ($p < 0.05$) para rechazar la hipótesis de homogeneidad, por lo que se concluye que la población se encuentra en equilibrio genético para cada uno de los polimorfismos analizados.

Tabla 12
Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg.

	rs 3740393			MetMet	rs 11191439	
	CC	CG	GG		MetTreo	TreoTreo
Poopó	48	25	1	60	14	0
Esperado	49,5	22,0	2,5	60,7	12,7	0,7
Chi cuadrado	$\chi^2=1,29990$			$\chi^2=0,80775$		
p	0,254232			0,368786		

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.7 Perfil metabólico urinario del arsénico con relación a los polimorfismos rs3740393 y rs11191439 del AS3MT

Se realizó el análisis de los genotipos de los rs3740393 y rs11191439 con relación a las fracciones de metabolitos urinarios de arsénico (%iAs, %MMA, %DMA) y también se midió la capacidad metiladora de primer paso (iAs a MMA) y segundo paso (MMA a DMA) mediante los cocientes de las relaciones MMA/iAs y DMA/MMA, respectivamente. Asimismo, se determinó la existencia de diferencias entre los genotipos rs3740393 según el modelo recesivo (AA+Aa) (aa), el cual combina el genotipo homocigoto silvestre (wild type) más el heterocigoto, luego este se compara con el genotipo mutado, este análisis no se realizó en el caso del rs11191439 debido a que no se encontró ningún sujeto portador del genotipo mutado.

En el caso del rs 3740393 (Tabla 13), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos portadores del genotipo CC en comparación con los portadores CG y GG para la fracción de MMA y el cociente del segundo paso de metilación (DMA/MMA). Los % de MMA fueron de 6.20 y 7.36 para los individuos CG+GG, respectivamente ($P= 0,026$). El coeficiente DMA/MMA fueron de 13,51 y 10.99 para los individuos CC y CG+GG, respectivamente ($P= 0,039$).

Por otro lado, los sujetos portadores CC mostraron una fracción de iAs menor (10.35 vs 13,61), y una mayor fracción de DMA (82,71 vs 80,30) estas no fueron estadísticamente significativas. Para una mejor apreciación de los resultados con diferencia significativa se representa en grafico los resultados de %MMA y DMA/MMA en la figura 21.

Tabla 13

Perfil metabólico urinario del arsénico en relación a los polimorfismos rs3740393.

Genotipo	n	%iAs	%MMA	%DMA	MMA/iAs	DMA/MMA
CC	47	10.35	6.20	82.71	0.55	13.51
CG+GG	27	13.61	7.36	80.30	0.64	10.99
p		0.245	0.026	0.112	0.360	0.039

Prueba Wilcoxon, valor de diferencia significativa $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia. (2019).

Respecto del rs 11191439 (Tabla 14), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos portadores del genotipo TT en comparación con los portadores TC todas las fracciones, se evidencia que los portadores del genotipo TT tienen menor porcentaje de iAs y MM, pero mayor porcentaje de DMAA.

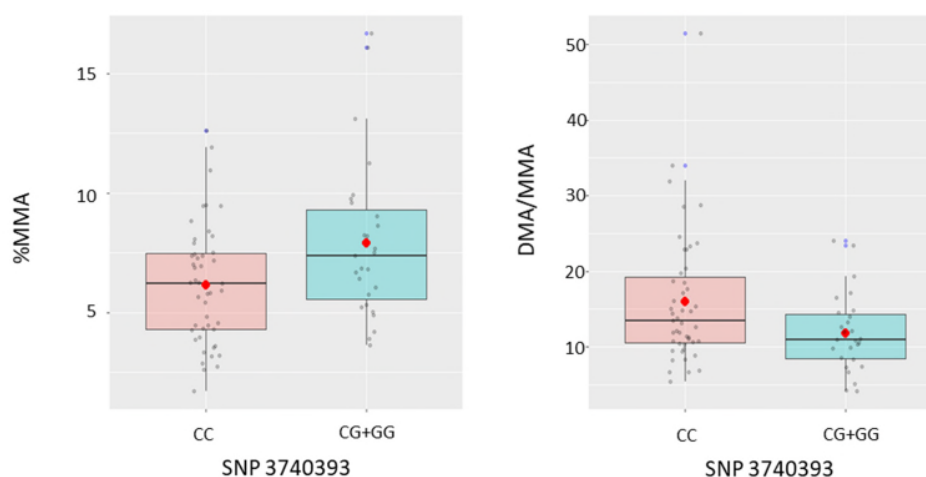
Tabla 14

Perfil metabólico urinario del arsénico en relación a los polimorfismos rs11191439.

Genotipo	n	%iAs	%MMA	%DMA	MMA/iAs	DMA/MMA
TT	60	11.24	6.51	82.39	0.57	12.38
TC	14	13.52	6.63	81.01	0.58	12.10
p		0.301	0.590	0.517	0.553	0.689

Prueba de Wilcoxon, valor de diferencia significativa $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia. (2019).

**Figura 21.** %MMA y cociente DMA/MMA para el SNP 3740393.

Nota: Las barras indican el intervalo de confianza del 95%, se muestra la variabilidad de los resultados entorno a la media (punto rojo).

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.4.8 Estatus de vitamina D y perfil metabólico

La mediana de concentración plasmática de vitamina D en las mujeres de estudio fue de 16,11 ng/mL (media de 19,14; Q1:12,71; Q3: 24,30). Se clasificó el estatus de vitamina de las participantes según recomendaciones del Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets (Munns et al., 2016). Se observó que la mayoría de las mujeres presenta un estado de suficiencia (43, 2%) seguido del estado de insuficiencia (41,9%) y finalmente el estado de deficiencia (14,9%), es decir, que la mayoría de la población del presente estudio presenta un estado de carencia de vitamina D (Figura 22).

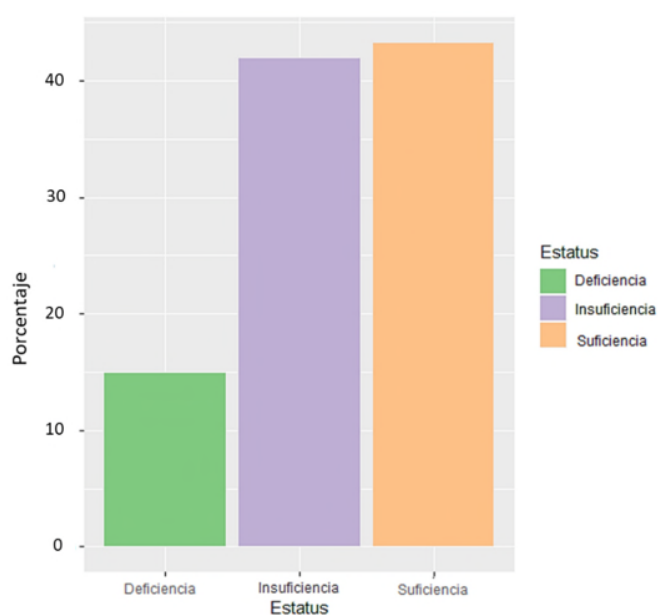


Figura 22. Estatus de vitamina D2/D3 en las mujeres del estudio.

Nota: Deficiencia <12 ng/mL, Insuficiencia 12-20 ng/mL y suficiencia >20 ng/mL según el Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets, 2016

Fuente: Elaboración propia.

Para identificar factores que podrían influenciar en la concentración plasmática de vitamina D, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, en el modelo se colocó variable dependiente la concentración plasmática de Vitamina D2/D3 de las participantes del estudio (Tabla 15). Según este modelo, la ocupación y el tabaco fueron asociados como factores de influencia significativa en la concentración de VitD, los fumadores tienen los otros factores que no mostraron tener asociación. Este modelo explica un 51,3% de la variabilidad en la concentración de VitD ($R^2=0,513$).

Tabla 15
Concentración de Vitamina D 25(OH) D2/D3 ajustada por otras variables.

	B (IC95%)	β
Edad	0,025* (-0,306; 0,355)	0,039
IMC	5,71 (-2,450;13,884)	1,145
Etnia ^a	-2,77 (-8,204;2,651)	-0,152
Ocupación ^b	1,22 **(0,418;2,038)	0,425
Tabaco ^c	16,50* (-0,524;33,537)	0,226
U-As ug/L	-0,008 (-0,056; 0,039)	0,039
Carne ^c	-0,10 (-0,355;0,141)	-0,119
Pescado ^c	-2,58 (-6,798;1,638)	-1,229
Sombrero-gorra ^c	6,802 (0,614;12,990)	-0,326
Protector solar ^c	-6,561 (-15,259;2,137)	-1,515
Fototipo de piel ^d	-0,907 (-3,895;2,081)	-0,610
Horas sol/día	0,687 (-0,562;1,936)	1,106
R ²	0,513	0,005

U-As: suma de las concentraciones de metabolitos en orina.

Nota: Resultados presentados como Coeficiente B (IC95%) y coeficiente estandarizado β para análisis de regresión lineal múltiple (diferencia significativa marginal $p < 0,1^*$, $p < 0,05^{**}$)

a: Etnia fue categorizada como Aymara-Quechua; b: ocupación fue categorizada como agricultores, ganadería, artesanas, educación; c: Las variables fueron categorizadas como si/no

d: Los fototipos de piel fueron III, IV, V

Fuente: Elaboración propia. (2019).

En cuanto a la concentración de los metabolitos urinarios de arsénico con respecto al estatus de vitamina D, se obtuvo que el estatus de suficiencia está asociado a un menor porcentaje de MMA en comparación con los otros grupos (Tabla 16).

Tabla 16
Perfil metabólico urinario del arsénico en relación al estatus de vitamina D.

Estatus Vit D	Suficiencia n=32	Insuficiencia n=31	Deficiencia n=11	p
%iAs	11,12	13,45	10,35	0,646
%MMA	5,14	7,38	7,43	0,004*
%DMA	82,69	80,52	82,69	0,325

Prueba de Kruskal Wallis, valor de diferencia significativa $p < 0,05$

Fuente: Elaboración propia. (2019).

En cuanto a la relación del estatus VitD con los coeficientes de metilación de primer (MMA/iAs) y segundo paso (DMA/MMA) se evidenció que las mujeres con un nivel suficientes de vitamina D tienen menor índice MMA/iAs (0,48) en comparación con los estados de insuficiencia (0,65) o deficiencia (0,65) ($p=0.311$). Asimismo, las mujeres con

un nivel de suficiencia de vitamina D tienen un mayor índice DMA/MMA (14,89), mientras los estados carenciales de insuficiencia y deficiencia tuvieron valores de 10,99 y 10,40, respectivamente ($p= 0.013$). Esto podría sugerir un efecto beneficioso de la vitamina D para una adecuada eliminación del As inorgánico (Figura 23).

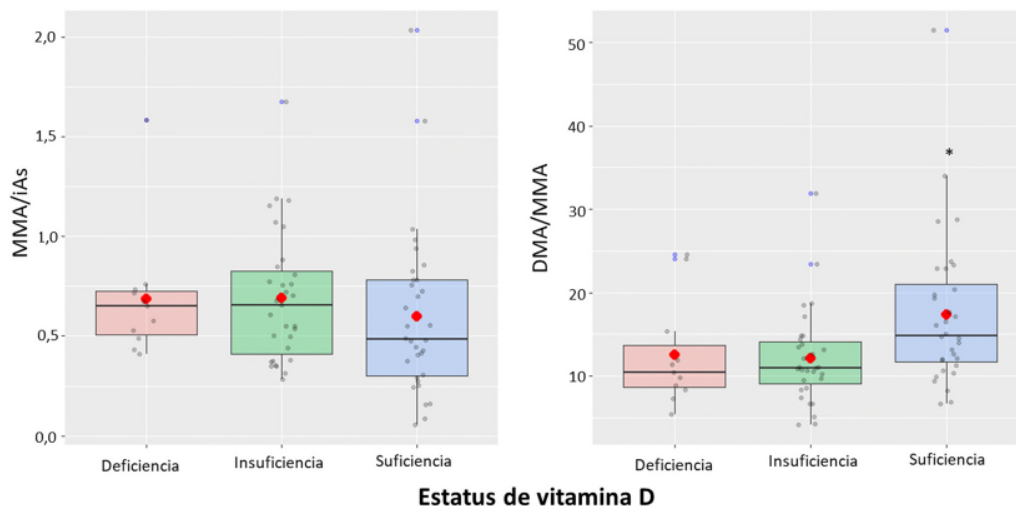


Figura 23. Relación del estatus de vitamina D y los índices de metilación MMA/iAs y DMA/MMA. Prueba de Kruskal-Wallis, valor de diferencia significativa $*p<0,05$. Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.5 Genotoxicidad del arsénico

8.5.1 Daño genotóxico en las mujeres expuestas a arsénico en el agua de beber

Se ha utilizado el ensayo del cometa en linfocitos de sangre periférica para evaluar el daño genético en la población. El análisis de cometa se ha realizado con el objetivo de determinar un posible efecto de rotura en la cadena de ADN producido por el estrés oxidativo que causa la exposición a arsénico. A este respecto se considerará como parámetro de daño genotóxico el porcentaje de ADN en la cola de cada célula (Figura 24), para finalmente obtener el promedio por 100 células por cada mujer participante del estudio.

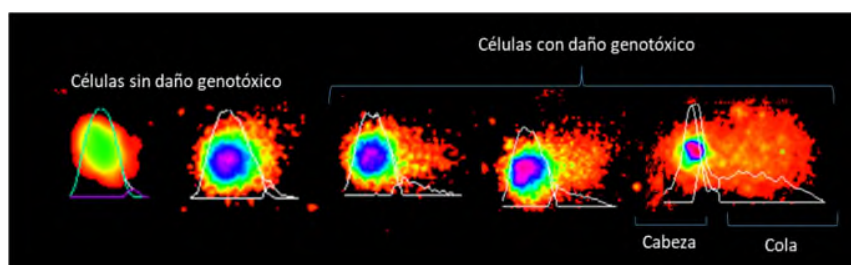


Figura 24. Daño genotóxico determinado mediante ensayo de cometa, evaluado a través del programa Comet Score. Se muestra las partes de una célula con daño: cabeza y cola. Fuente: Elaboración propia. (2019).

La información se presenta reunida en la tabla 17, donde se pueden ver los valores medios de ADN en cola, Olive Moment y Tail moment. Debido a que tanto los valores de ADN en cola como los Olive moment y tail moment siguen el mismo patrón. Por ello, se usó el % de ADN en cola para los análisis de correlación o asociación de daño, además el %ADN en cola tiene un significado biológico más claro que los otros parámetros.

Tabla 17
Daño genético por exposición a arsénico en la población de estudio.

	Media	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
%ADN en cola	10,55	8,70	0,00	30,35	5,34	14,59
Tail Moment	3,54	2,01	0,00	17,87	0,83	5,02
Olive Moment	3,15	2,19	0,05	13,41	1,10	4,62

Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.5.2 Daño genotóxico según perfil metabólico de eliminación de As

Se realizó una prueba de correlación entre el %ADN en cola y otras variables numéricas de influencia (Figura 25). Se observó que la variable con mayor asociación es la concentración plasmática de vitamina D que presenta una correlación negativa ($r_s=0,317$; $p=0,006$). La exposición a iAs en agua de consumo mostró una débil asociación negativa con el %ADN en cola ($r_s=-0,199$; $p=0,090$).

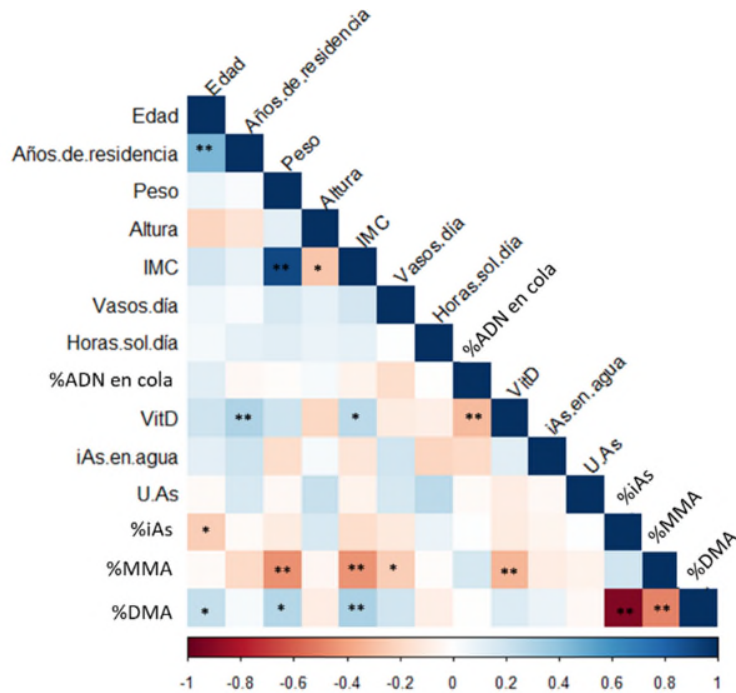


Figura 25. Heatmap de correlaciones entre el %ADN en cola de linfocitos de sangre periférica por ensayo del cometa y factores de influencia.

Nota: El peso fue determinado en kg, talla en m, edad en años, vitamina D como ng/mL y U-As en ug/L. Correlación de Spearman, valores p: * $<0,05$, ** $<0,001$.

Fuente: Elaboración propia. (2019).

Aunque las concentraciones de metabolitos urinarios de arsenico también mostraron una debil asociación, los porcentajes de las formas mas toxicas %iAs y %MMA presentaron una correlacion positiva (%iAs: $rs=0,002$; $p=0,990$ /%MMA: $rs=0,172$; $p=0,142$), mientras que el %DMA mostró una debil correlación negativa ($rs= - 0,001$; $p=0,994$). La exposición solar, el numero de vasos de agua consumidos no presentaron correlación con el %ADN en cola.

8.5.3 Daño genotóxico según etnicidad

Los resultados obtenidos al analizar la población expuesta, separando los grupos por etnia (Figura 26) indican que las mujeres Urus presentan una mediana de 9,36 % mientras las Aymara-Quechua de 8,70%, sin encontrar diferencias en cuanto al nivel de daño genético, medido con el ensayo del cometa, entre las poblaciones expuestas de ambos grupos étnicos ($p=0,470$).

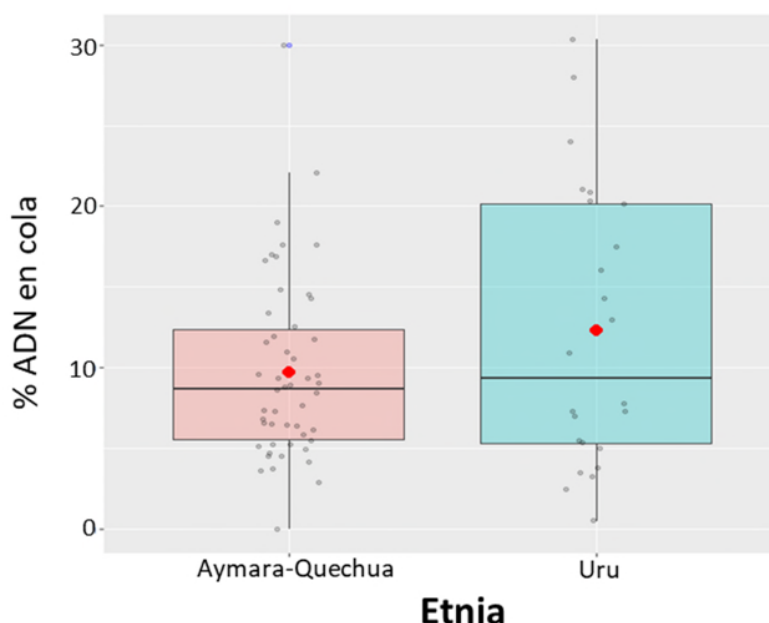


Figura 26. Relación del estatus de vitamina D y grupos étnicos
Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.5.4 Daño genotóxico según lugar de residencia

Al analizar el % de daño respecto al lugar de residencia de la población de mujeres (Figura 27), podemos ver que las de la comunidad de Puñaca presentan una mediana con mayor porcentaje de daño en relacion a las otras comunidades (22,73%), seguido de las mujers de Poopó (13,61), Villañeque (11,64%), Sevaruyo (10,24%),Bengal Vinto

(8,59%), Llapallapani (7,53%), Crucero Belen (6,39%) y finalmente Chaytavi (6,30%). Sin embargo, no se obtuvo una diferencia significativa entre grupos ($p=0,118$) por la prueba de Kruskal Wallis. Respecto a la correlación de concentración de As en agua de consumo y %ADN en cola, tampoco se obtuvo una correlación significativa ($rs=-0,198$; $p=0,089$)

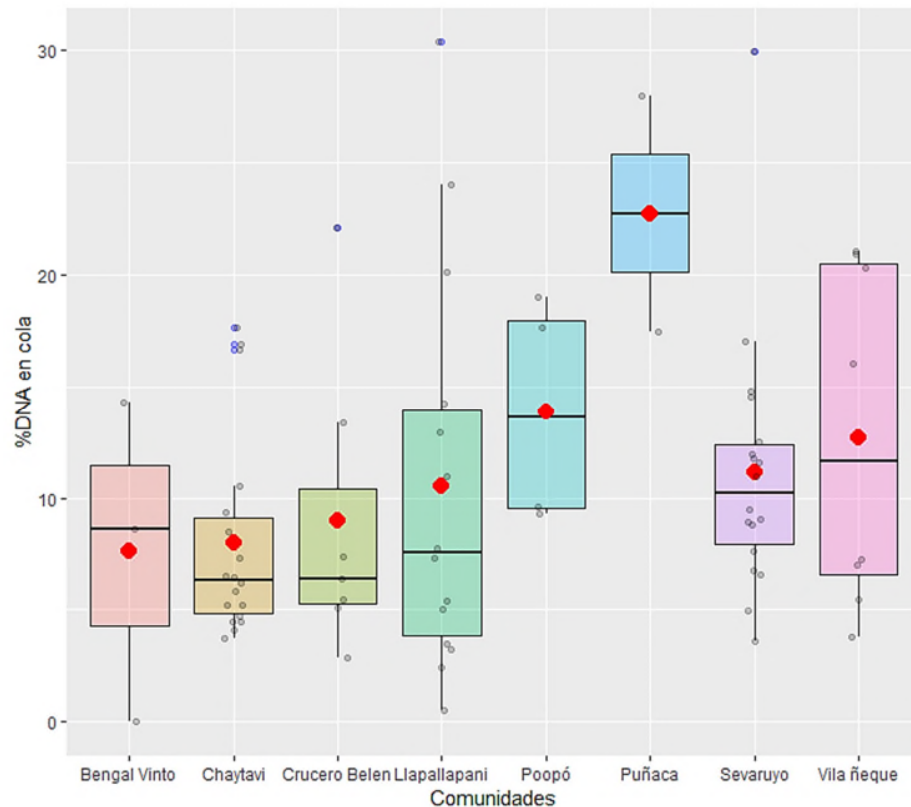


Figura 27. Relación del % de daño genético y comunidades de residencia de la población. Prueba de Kruskal Wallis, valor de diferencia significativa $p<0,05$. Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.5.5 Polimorfismo genéticos de AS3MT y daño genotóxico

También se estimó si el portar determinado genotipo de los SNP1111439 y SNP3740393 conferían una diferencia de protección o no en relación al % de daño genético, para esto se comparó el % ADN en los distintos genotipos (Figura 28). En el caso de los genotipos de SNP 11191439 se observó que el genotipo TT presenta un porcentaje menor de ADN en cola en comparación con el genotipo TC (7,71% vs 12,41%), aunque no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,124$). Por otro lado, el genotipo CC del SNP 3740393 presentó un ligero menor porcentaje de ADN en cola (8,60%) en comparación con los genotipos CG y GG (9,05%), sin diferencia significativa ($p=0,841$).

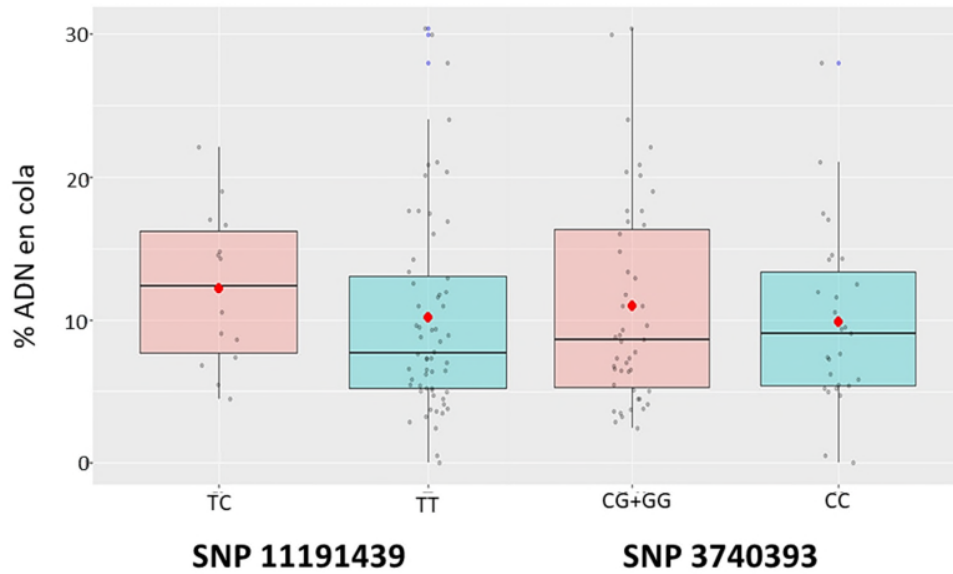


Figura 28. Relación del % de daño genético y genotipos de SNP1191439 y SNP 3740393 de la AS3MT
 Prueba de Kruskal Wallis, valor de diferencia significativa $p < 0,05$
 Fuente: Elaboración propia. (2019).

8.5.6 Estatus de vitamina D y daño genotóxico

En cuanto al análisis del estatus de vitamina D en relación al % de daño genético (Figura 29), las mujeres con un estatus de suficiencia presentan un menor porcentaje de ADN en cola significativo con los otros grupos ($p = 0,045$).

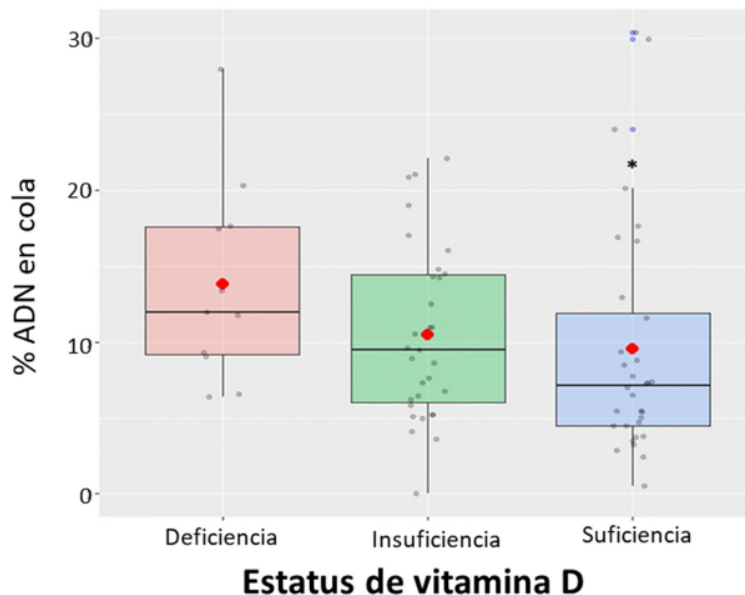


Figura 29. Relación del % de daño genético y estatus de vitamina D
 Prueba de Kruskal Wallis, valor de diferencia significativa * $p < 0,05$
 Fuente: Elaboración propia. (2019)

8.6 Exposición a arsénico y estatus de vitamina D en frecuencia de pterigion

La población de mujeres que conforman la población del presente estudio no mostraron datos clínicos de hidroarsenismo crónico regional como melanodermia, hiperqueratosis, e hiperhidrosis, pero se observó una frecuencia alta de pterigión (Figura 30), uno de los trastornos oculares más comunes, caracterizado por el crecimiento de tejido fibrovascular subepitelial desde la conjuntiva bulbar hasta la córnea que esta asociado a problemas estéticos, astigmatismo irregular y disminución de la visión.



Figura 30. Pterigion en mujer expuesta a arsénico y alta radiación solar.
Fuente: Propia, foto tomada en Octubre de 2017.

En el análisis comparativo entre grupos con y sin pterigion (Tabla 18) se observó que la edad mediana fue similar en ambos grupos, pero las mujeres con la enfermedad presentaron mayor tiempo de residencia (23 vs 13 años; $p=0,031$). A pesar de que la ocupación de agricultura es más frecuente en las mujeres con pterigión no se observó una diferencia significativa (35,5% vs 16,3%; $p=0,057$). El consumo de tabaco o las horas al día de exposición solar no mostraron ser diferentes en ambos grupos. El uso de lentes de protección UV es bajo en la población en general, su uso es menor en las mujeres con la patología en comparación con el otro grupo, pareciera no ser un factor determinante ($p=0,481$). En cuanto la mediana de concentración plasmática de vitamina D D2/D3 (Figura 31), se observa una diferencia significativa entre ambos grupos (21,1 vs 14,5 ng/mL; $p=0,045$), es decir, las mujeres con pterigión presentan niveles más altos, sin embargo, estos valores están dentro del estatus de suficiencia.

Tabla 18

Características de las clínicas y laboratoriales de mujeres participantes de acuerdo a la presencia de pterigion.

	Pterigion		p
	Si n=31	No n=43	
Edad	38 (32,5-46,5)	36 (28,5-44,0)	0,186
Años de residencia	23 (8,5-36,0)	13 (3,0-27,5)	0,031*
IMC kg/m ²	28,2 (26,2-34,6)	28,9 (24,2-33,5)	0,580
Ocupación agricultores	35,5%	16,3%	0,057
Tabaquismo	0,0%	2,3%	0,393
Horas sol/día ^c	7 (4,0-9,5)	7 (4,0-9,5)	0,732
Lentes de protección UV	3,2%	7,0%	0,481
Vitamina D ng/mL ^c	21,1 (13,6-24,7)	14,5(12,3-23,34)	0,045*
U-As ug/L	103,3(51,2-147,2)	50,4 (36,1-95,7)	0,004*
%iAs	12,8 (7,5-15,3)	10,9 (8,5-814,9)	0,711
%MMA	5,4 (4,3-7,5)	7,0 (5,7-8,3)	0,075
%DMA	80,5 (76,7-87,0)	82,4 (76,9-84,5)	0,810

Prueba de Wilcoxon, valor de significancia *p <0,05

Fuente: Elaboración propia. (2019)

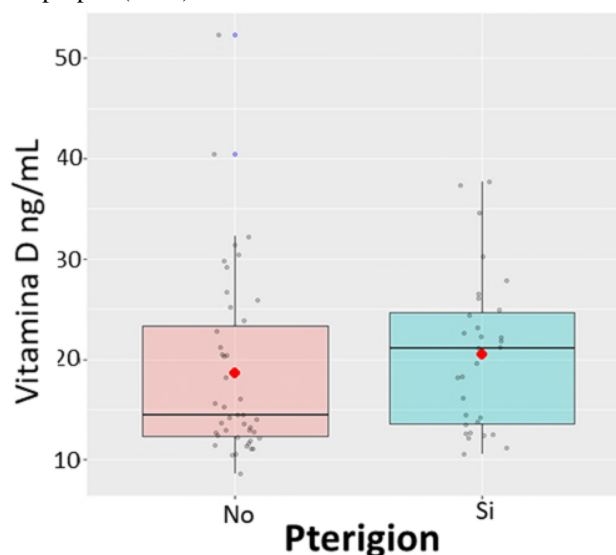


Figura 31. Relación de la concentración plasmática de vitamina D y pterigion

Prueba de Wilcoxon, valor de diferencia significativa *p<0,05

Fuente: Elaboración propia. (2019).

La mediana de U-As fue mayor en el grupo con la enfermedad (103,3 vs 50,4 ug/L; p=0,004) (Figura 32). Contrariamente, las formas tóxicas del arsenico tuvieron un patron

divergente ya que las proporciones de la forma iAs fue mayor en las mujeres con pterigion, mientras el %MMA no mostró el mismo padron, siendo mayor en el grupo sin la enfermedad. Por su parte el %DMA fue menor en las mujeres con pterigion.

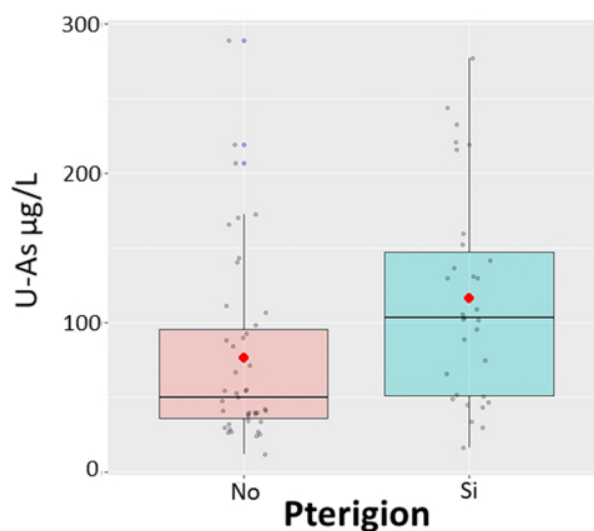


Figura 32. Relación de la concentración de U-As y pterigion
Prueba de Wilcoxon, valor de diferencia significativa * $p < 0,05$
Fuente: Elaboración propia. (2019).

En el analisis si existia diferencia entre ambos grupos respecto al %ADN en cola (Figura 33), aunque es esperba que el grupo con pterigion tuviera mayor daño genético, esto no fue observado, ya que el grupo sin pterigion presentó los porcentajes mas altos, aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa (7,3% vs 9,3; $p = 0,326$).

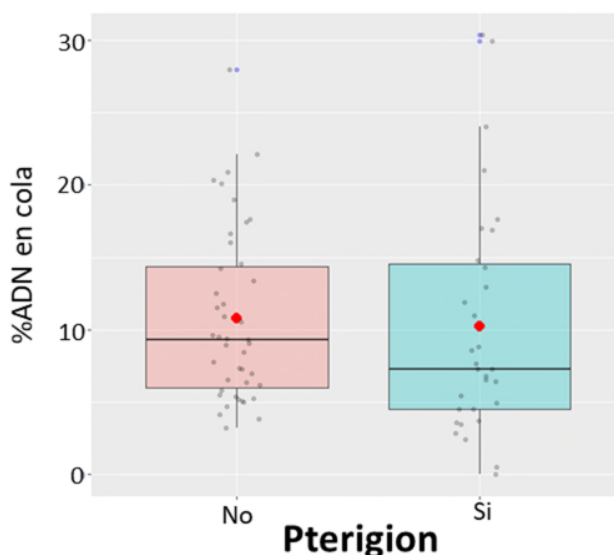


Figura 33. Relación del porcentaje de daño genético y pterigion
Prueba de Wilcoxon, valor de diferencia significativa * $p < 0,05$
Fuente: Elaboración propia. (2019).

8. DISCUSIÓN

La presencia de As en altas concentraciones, representa un problema ambiental y de salud para las diversas poblaciones expuestas. La amplia distribución del arsénico en los distintos ambientes naturales, y amplificación de exposición por la actividad antropogénica, como el uso de plaguicidas arsenicados, quema de carbón, y diversos usos industriales, entre otros, supone un aumento de la población expuesta a este metal pesado. Es importante considerar que una de las principales vías de exposición a As es la digestiva a través de la cual ingresa el agua de beber de consumo diario por las personas, preparación de alimentos, y agricultura (Castro de Esparza, 2006).

Si bien la IARC ha clasificado al As y sus componentes como carcinógenos humanos (IARC, 2012), el hecho que aún no se conozcan bien todos los mecanismos de acción en cuanto a su toxicidad, conlleva aún cierta ambigüedad en cuanto a la estimación del riesgo real de las personas expuestas al As. Si bien la OMS, propone un nivel de exposición de 10 ug/L, y argumenta que si el nivel mínimo de exposición debe ubicarse por debajo del nivel más bajo que produce toxicidad o daño (en el caso del As no se tienen datos precisos de este nivel de exposición crónica), entonces la concentración de arsénico en el agua debe ser 0, pero eso no sucede en la realidad de las comunidades del presente estudio.

La población que participó del presente estudio presenta características sociales y étnicas propias y diferentes en relación a otras poblaciones expuestas a arsénico en otros lugares del mundo. El altiplano boliviano es un lugar inhóspito debido a su altitud mayor a 3 600 msnm, una temperatura media anual de 10°C, clima seco de baja pluvialidad (menor a 1000mm anual), pero fue el lugar donde poblaciones autóctonas se adaptaron y desarrollaron, principalmente las poblaciones Aymara y Quechua que predominaron en el altiplano Boliviano, pero también se desarrollaron las poblaciones Uru, que descienden de los primeros humanos que llegaron al altiplano del continente Sudamericano. Los Urus del lago Poopó tienen una conformación genética diferente a los Aymara-Quechua y a los Uru Chipaya de Bolivia y también respecto de los Uru del Perú. Una diferencia entre estas poblaciones étnicas, es el tiempo de residencia en las zonas alrededor del lago Poopó, los Uru tienen una antigüedad mucho mayor en estas zonas que los Aymara-Quechua (Sandoval et al., 2013).

En el aspecto social los Urus del lago Poopó en el departamento de Oruro constituyen una minoría étnica y un enclave en un territorio predominantemente Aymara. La relación de los

Urus del lago Poopó con los Aymaras está marcada por situaciones que han limitado su desarrollo autónomo y el pleno ejercicio de sus derechos colectivos. Este último aspecto, cuyos antecedentes son bastante antiguos, parece ser la causa para que los Urus del lago Poopó, como minoría étnica, se encuentren sumidos en la pobreza y con riesgo de desaparecer. Ni siquiera las nuevas políticas estatales y regionales que enfatizan y priorizan el desarrollo de los pueblos originarios, han alcanzado significativamente a los Urus, lo cual puede deberse a la hegemonía de las mayorías étnicas Aymara y quechua. En este marco, los Urus vienen a ser una suerte de los excluidos (Lara Barrientos, 2012; Zdenka de la Barra Saavedra, Lara Barrientos, & Coca, 2011).

Exposición a aguas de consumo.

Este estudio muestra una exposición variable al arsénico inorgánico entre las mujeres indígenas que viven en aldeas alrededor del lago Poopó en Bolivia. Las concentraciones de arsénico encontradas en el agua son consistentes con las reportadas anteriormente en el área (Muñoz & Aguirre, 2014; Ormachea Muñoz et al., 2016). Las mujeres estudiadas presentaron un metabolismo de arsénico eficaz e inusual, caracterizado por un bajo% de MMA y un alto% de DMA en la orina, similar a otras mujeres indígenas en los Andes (Engström et al., 2011; Vahter et al., 1995). Además, la exposición al arsénico (U-As) no parece afectar la eficiencia de la metilación de arsénico.

Factores que influyen el metabolismo de eliminación de arsénico

Los principales predictores de la eficiencia de la metilación del arsénico parecían ser la etnicidad, el peso corporal, el número de vasos de agua consumidos de agua de manera independiente de la concentración de arsénico en la fuente de agua, y el estatus de vitamina D.

Un hallazgo importante del presente estudio fue que varios factores se asociaron con las fracciones de metabolito arsénico urinario, una medida de la eficiencia del metabolismo y, presumiblemente, la desintoxicación del arsénico (Vahter et al., 1995). Las mujeres Uru tuvieron un nivel similar de U-As en comparación con las Aymara-Quechua, aunque presentaron un 1,8% más bajo de iAs, un 0,9% más bajo de MMA y un 1,0% de DMA más alto, en comparación con las mujeres Aymara-Quechua, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, si se reportó una mayor capacidad metabólica del As en mujeres Urus en comparación con Aymara-Quechua, en el estudio de De Loma

et al. (2019), esta diferencia fue observada en un número mayor de mujeres de estudio de las mismas comunidad.

Anteriormente, se encontró que las mujeres indígenas en los Andes argentinos tenían un% de MMA más bajo que otras poblaciones estudiadas (mediana de 2.2%, rango de 0.0 a 11%), lo que indica un metabolismo de arsénico eficiente único (Vahter et al., 1995), posteriormente se relacionó que la selección de una mejor metabolización del arsénico estaba ligada al tiempo de exposición en un ambiente que contiene arsénico (Schlebusch et al., 2015). Los Urus tienen características que podrían explicar esta mejor adaptación al consumo de agua con arsénico, pues son una población que se considera de las más antiguas de Sudamérica, por lo tanto, se justifica que los análisis de seguimiento comprendan correctamente si existe una base genética para la variación observada en el metabolismo del arsénico entre grupos étnicos alrededor del lago Poopó.

El mayor peso corporal y IMC se asoció con un % de MMA más bajo en la orina en las mujeres estudiadas (0,8% de MMA más bajo en la orina por cada 10 kg de aumento en el peso corporal). Esta asociación también se observó en niños uruguayos (Kordas et al., 2016), y en varios grupos de estudio de EE. UU. (Gribble et al., 2013). Una hipótesis es que el mayor peso corporal refleja una mayor ingesta de proteínas y grupos metilo. De hecho, se sabe que un estado nutricional deficiente y una ingesta baja de proteínas dan como resultado una menor capacidad para metilar arsénico (Roh, Steinmaus, Marshall, Ferreccio, & Liaw, 2018; Steinmaus et al., 2005). Las mujeres alrededor del lago Poopó en Bolivia tenían un IMC mediano de 28,6 kg / m² (rango: 16-44), pero en general eran de baja estatura (la mitad de ellas eran más bajas que 1,49 m), lo que daba como resultado valores de IMC más altos.

La variable genética también fue tomada en el presente estudio, por ello se estudió a los polimorfismos de la AS3MT, rs11191439 y rs3740393, SNP que varios estudios han relacionado con la capacidad metiladora de poblaciones expuestas As (Balakrishnan et al., 2018; de la Rosa et al., 2017; García-Alvarado et al., 2018).

El AS3MT 14458 (rs11191439), se localiza en la región del exón 9, es una sustitución sinónimo (sustitución de Met a Thr) en el aminoácido base 287, y su diferencia funcional se ha investigado en algunos estudios. Respecto de la frecuencia de los genotipos del rs11191439, el genotipo más frecuente fue la variante wild type TT, seguido de la variante heterocigota TC, con una frecuencia alélica de T: 0,91 y C: 0,09, estas frecuencias son

similares a las poblaciones de San Antonio de los Cobres (Engström et al., 2011), japoneses (T: 0,99 y C:0,01), Tibetanos (T:0,97 y C:0,02), Chinos (T 1,0 y C:0,0) (Fujihara et al., 2009). Los estudios en humanos indican que el alelo C de este SNP mostró consistentemente una mayor capacidad de metilación en comparación con el portador del alelo T. Curiosamente, el efecto de este SNP se ha observado incluso en sujetos expuestos a bajos niveles de arsénico, por lo tanto, parece que la asociación del polimorfismo AS3MT rs11191439 con la metilación del arsénico puede ocurrir independientemente del estado de exposición al arsénico (Agusa et al., 2011).

Se ha sugerido un aumento del % de MMA en la orina relacionada con el riesgo de cáncer en estudios epidemiológicos anteriores (Jansen et al., 2015). Por lo tanto, los portadores del alelo C del rs11191439, que tienen una mayor metilación la capacidad desde iAs hasta MMA, puede estar en mayor riesgo de cánceres relacionados con arsénico (Gamboa-Loira et al., 2017).

El AS3MT 12390 (rs3740393) es un polimorfismo intrónico, que está relacionado con la capacidad metiladora de la AS3MT, si bien aún se desconoce la puede influenciar en la estructura y función de la enzima, el alelo C en este SNP está asociado a altas concentraciones de DMA como se predice a partir de los resultados consistentes de alta DMA/MMA en mexicanos, argentinos, taiwaneses y vietnamitas (Agusa et al., 2011). En la población de mujeres del presente estudio la frecuencia del genotipo CC fue mayor en comparación con el genotipo CG y solo un caso de genotipo GG. La frecuencia alélica fue C: 0,93 y G:0,07, esta frecuencia es similar a la encontrada en mujeres de San Antonio de Los Cobres donde la frecuencia CC y CG fueron más altos que el genotipo GG (Engström et al., 2011), como también de la población del Chilena del valle de Camarones donde el alelo tiene una frecuencia de 0,66 y el G de 0,34 (M. Apata et al., 2017), pero contrasta con las frecuencias encontradas en otras poblaciones como la Vietnamita (C: 0,22 y G:0,78), japonesa (C:0,37 y G: 0,63), Surcoreana (C: 0,28 y G: 0,72) tibetana (C:0,33 y G:0,67), poblaciones en las que es el alelo minoritario. Por lo tanto, esta distribución del alelo C, es única en poblaciones con ascendencia étnica Uru o Aymara-Quechua en Bolivia y Chile como la población Colla en Argentina.

En cuanto al estudio del metabolismo del arsénico en relación al estado nutricional, se ha determinado que factores nutricionales como la concentración de vitaminas como ácido fólico, cobalamina, tiamina, niacina, ácido pantoténico y piridoxina, son importantes para

una adecuada metilación del arsénico y su posterior eliminación, ya que están relacionados con altos porcentajes de DMA y una baja proporción de MMA y iAs (Yu, Liu, Li, & Wu, 2016). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el importancia de la vitamina D en el metabolismo del arsénico, a pesar de existir una preocupación a nivel mundial por los porcentajes de insuficiencia y deficiencia de esta vitamina en poblaciones de diferentes edades y países (Kapil et al., 2017; Munns et al., 2016).

Se sabe que la ingesta de vitamina D puede facilitar la absorción y asimilación de elementos inorgánicos esenciales como calcio, magnesio, cobre, zinc, hierro y selenio, pero también la absorción de elementos tóxicos como plomo, aluminio, cobalto y estroncio, sin embargo, poco se sabe sobre el efecto del arsénico en la producción de vitamina D y su forma activa, y sobre los efectos de la vitamina D sobre el metabolismo del arsénico (Schwalfenberg & Genus, 2015).

La población del presente estudio, presentó un estado de suficiencia del 43%, insuficiencia del 41,9%, y deficiencia del 14,9%, es decir, el 60,8% de la población presenta bajos niveles de vitamina D, pese a vivir en una región de elevada altitud, residencia en el área rural y ocupación al aire libre con una media de exposición de solar de 5 horas día. Resultados similares fueron observados en otras poblaciones con similares condiciones de vida, los Tíbetanos, población que presenta bajos niveles de vitamina D, los mismos que han sido asociados a su vestimenta usada por los tibetanos, la misma que cubre la mayor parte de su cuerpo (Norsang et al., 2009). Esta conclusión también podría ser usada en el caso de la población del presente estudio pues también se caracteriza por el uso de mantas, polleras largas, camisas de manga larga y uso de sombreros ala ancha.

Los resultados del presente estudio no muestran una correlación entre los niveles de vitamina D y U-As, es decir, ni la vitamina D influye aparentemente en el grado de exposición de arsénico, ni el arsénico parece influenciar en la producción o absorción de vitamina D, pero resulta importante mencionar que, las mujeres con un estatus de suficiencia de vitamina D presentaron porcentajes más bajos de MMA, y un coeficiente más alto en la relación DMA/MMA, lo que podría indicar un efecto en la capacidad de metilación del arsénico. No existe reportes en la literatura sobre este efecto encontrado en el presente estudio, pero se podría plantear la hipótesis: si la vitamina D promueve una mayor expresión de la AS3MT ó favorece algún paso durante el proceso de metilación del

arsénico como el relacionado con el proceso de óxido reducción del As dependiente de GSH (Sepidarkish et al., 2018; Shen et al., 2016).

Genotoxicidad del arsénico

Además de los estudios epidemiológicos destinados a determinar el riesgo carcinogénico asociado con la exposición a metales, el control biológico de las poblaciones humanas expuestas a posibles agentes xenobióticos nos brinda información valiosa sobre los biomarcadores de exposición y los biomarcadores de efecto. Los biomarcadores de efecto, los que se usan para detectar daño en el ADN, primario o fijo a nivel de gen o cromosoma, son de primordial importancia. Algunos de estos biomarcadores se consideran biomarcadores sustitutos del riesgo de cáncer, entre ellos el % de ADN en linfocitos de sangre periférica medido mediante la prueba del cometa y la frecuencia de Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (Annangi et al., 2016).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el daño genotóxico de las mujeres expuestas a arsénico en agua de beber, para ello se usó la prueba del cometa, de forma general se observó una media de %ADN de 10,55% y una mediana de 8,7%, en cuanto a los valores del Tail moment se tuvo una media de 3,54 y una mediana de 2,01, valores que son similares a los observados en otros estudios como la población en el Norte de Assam en India, donde la población expuesta a arsénico en agua de beber presenta una media de 3,44% y 4,93% (Roy, Mukherjee, & Giri, 2016), pero más baja que lo reportado en la población mexicana del Municipio de Francisco I. Madero, Coahuila, que también presenta exposición a arsénico en agua de beber con un 32,5% de ADN en cola (Jiménez-Villarreal et al., 2017).

En nuestro estudio se halló que el % de ADN en cola no tuvo correlación con la concentración de As en agua de beber, aunque fue mayor en algunas mujeres de determinada comunidad, como fue el caso de la comunidad Puñaca que tuvo el porcentaje más alto, 22%, cuya media de concentración de iAs en agua fue del 101 ug/L. Asimismo, tampoco se observó una correlación del %ADN en cola con los metabolitos urinarios del arsénico.

Un resultado interesante fue observar que los genotipos relacionados con una mayor capacidad metiladora, también estaban relacionados con un menor daño genético, ya que el genotipo TT del rs111191439 y el genotipo CC presentaron una diferencia de 4,7% y 0,5%, respectivamente. Esta protección de estos genotipos también fue reportada en otros

estudios, como el realizado por Sampayo-Reyes et al (2010), en adultos y niños mexicanos donde se observó que la variable TT de rs11191439 tienen un efecto protector sobre el daño genético (Sampayo-Reyes et al., 2010), por otro lado, aunque con otro biomarcador de efecto como son los micronúcleos en linfocitos de sangre periférica se observó el mismo efecto (Hernández et al., 2014). No se encontró un estudio del efecto de las variables genóticas del rs3740393 respecto al daño genético.

Finalmente, respecto al estatus de vitamina D, el estado de suficiencia está relacionado a un menor daño genético en la población expuesta a As. Este efecto protector de la vitamina D sobre el daño genético fue reportado por otros estudios (Fagundes et al., 2019; Nair-Shalliker, Fenech, Forder, Clements, & Armstrong, 2012).

Exposición a arsénico y estatus de vitamina D en frecuencia de pterigion

La prevalencia de pterigion fue del 41,9%, esta prevalencia es mayor, si se compara con los resultados del estudio Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis (2018), que reporta una incidencia global de pterigion en mujeres del 12% (Rezvan et al., 2018). La presencia de pterigion en la población, mostró estar asociada a los años de residencia de las mujeres en el lugar de residencia, pero no a otros factores de exposición solar. Sin embargo, mostró una relación con la exposición a As ya que los niveles de U-As fueron más altos en las mujeres con la patología en comparación con las que no presentaron la enfermedad. Estos resultados son similares a los obtenidos con a los observados en la población de Taiwán, donde los individuos con mayor grado de exposición a arsénico presentaron mayor riesgo de pterigion (OR: 4,99; IC:2.78–8.97) (Lin et al., 2008). Asimismo, se encontró una asociación de pterigion con la concentración de vitamina D, ya que las mujeres con pterigion presentaron mayores niveles de vitamina D (21,1 vs 14,5 ng/mL), esta relación también fue reportada en otras poblaciones como la Coreana, (Jee et al., 2016).

En base a estos resultados se podría plantear que el arsénico favorece el desarrollo de pterigion debido a la exposición solar, ya que se conoce que el arsénico actúa como un co-carcinógeno de la radiación UV, al inhibir los mecanismos de reparación del ruptura de cadena o de dímeros de timina en el DNA (Banerjee & Giri, 2014; Faita et al., 2013). Por otro lado, los niveles de vitamina D altos en estas personas pretenden ejercer un efecto antioxidante y de protección respecto de la exposición solar (Nair-Shalliker, Fenech, et al., 2012).

9. CONCLUSIONES

Las poblaciones alrededor del lago Poopó se caracterizan por estar conformadas por las etnias Aymara-Quechua y Uru, que presentan un estilo de vida caracterizado por prolongada exposición solar debido a sus actividades como la agricultura o el pastoreo, que presenta un consumo de agua de diversas fuentes entre ellas agua de pozo contaminada con altas concentraciones de arsénico.

La población de estudio no presenta datos de hidroarsenismo como melanodermia, hiperpigmentación. Sin embargo, se logró identificar una alta frecuencia de pterigion que está asociada a la prolongada exposición solar y exposición a arsénico.

La población en general presenta alta eficiencia en el metabolismo de eliminación de arsénico.

Los genotipos CC del rs3740393 y TT del rs11191439, presentan asociación a un alto porcentaje de DMA y bajo porcentaje de MMA en orina.

El estatus de suficiencia de vitamina D está asociado a un alto índice de segunda metilación, lo que podría sugerir un efecto beneficioso de la vitamina D para una adecuada eliminación del arsénico inorgánico.

En el presente estudio se evidencia que existe daño genotóxico relacionado a la exposición a arsénico inorgánico en el agua de consumo, porcentaje de MMA y iAs.

Los genotipos CC del rs3740393 y TT del rs11191439, presentan asociación a un bajo porcentaje de daño genotóxico en comparación con los otros genotipos de estos SNP.

La suficiencia de vitamina D está asociada a un menor % de daño.

10. PERSPECTIVAS

Durante la realización del presente trabajo fueron surgiendo ideas y propuestas tanto durante el desarrollo de la parte experimental como durante el análisis y la discusión de los resultados de esta tesis. Estas ideas pretenden ser disparadoras de nuevas perspectivas de análisis y de nuevas investigaciones relacionadas con este tema.

El presente trabajo tuvo una limitación muy importante, el tamaño total de la muestra que es pequeño en comparación a los realizados en otros países como la Argentina, EE UU, e incluso la India, países que cuentan con programas de seguimiento de poblaciones de un gran número de personas, de ambos sexos y de diversos grupos etarios. Por ello, la primera perspectiva es ampliar los estudios de biomonitorización a un mayor número personas,

incluir a los hombres y niños, los cuales también presentan exposición a As en agua de beber en la región del Lago Poopó.

Otra limitación de este trabajo, fue no contar con una población control para ampliar el análisis de daño genotóxico y la frecuencia de pterigion y así tener mayor fuerza en los resultados y conclusiones, esto se debió a la consideración que casi toda la población de la región del Lago Poopó puede considerarse expuesta a As u otros metales pesados, por ello se plantea la posibilidad de poder contar con un grupo control de otra región del Altiplano Boliviano, por ejemplo poblaciones del departamento de La Paz, que presenta similitudes en las características geográficas, altitud, y la población que es Aymara-Quechua y por lo tanto comparte similitudes en el estilo de vida, ocupación y dieta.

El mismo análisis realizado en esta tesis puede extenderse a otros factores (no incluidos en este estudio) como exposición simultánea a otros elementos como litio o flúor, entre otros, ya que poblaciones con distinto nivel de exposición al As pueden mostrar (o no mostrar) la influencia, dependiendo del factor que se estudie y de los niveles de exposición que se comparen.

Entre los factores que influyen en el metabolismo del As se pueden diferenciar los que son inherentes a la persona, es decir que no pueden modificarse, como el género, la edad, la etnia o la presencia de determinado polimorfismo genético, de aquellos como el nivel de exposición, el estado nutricional, la exposición simultánea a otros elementos y compuestos, que sí pueden modificarse y sobre los cuales, de alguna manera, sí se puede trabajar para que influyan favorablemente sobre el metabolismo del As, como la suplementación de vitaminas como la D, ácido fólico, vitaminas del complejo B entre otros.

El nivel de exposición fue analizado en este trabajo, y quedó claro que es un factor sobre el que necesariamente hay que trabajar. Es decir que no solo debe disminuirse el nivel de exposición de la población porque a menores exposiciones habrá menores daños, sino también porque ciertos subgrupos poblacionales verán afectada su capacidad de metabolizar favorablemente el As frente a exposiciones elevadas.

Sería interesante continuar con la identificación de otros factores y sus influencias sobre el metabolismo del As.

La medición de biomarcadores como la 8-OHdG, actividad de superóxido dismutasa o catalasa, sería muy útil para valorar el nivel de estrés oxidativo en la población. Asimismo,

sería de interés el estudio de mecanismo de adaptación y protección frente al estrés oxidativo causado por el As.

Estudio de factores que regulan la biotransformación del arsénico en poblaciones expuestas crónicamente investigar cómo estos marcadores se relacionan con modificaciones desfavorables del perfil metabólico urinario del As podría brindar una herramienta para detectar en forma precoz los cambios que llevan al riesgo de desarrollo de hidroarsenicismo y de los cánceres relacionados

El estudio de polimorfismos de otros genes relacionados con la capacidad de metilación como los GSTs, o MTHF podría brindar una información sobre la susceptibilidad genética a daño a la salud por exposición a As. En el caso particular de SNP de MTHF, la detección de un genotipo desfavorable, podría identificar a personas que podrían beneficiarse de tratamiento con ácido fólico y con ello ayudar a la metabolización del As y disminuir el riesgo de enfermedades.

Finalmente, este trabajo tiene el propósito de ayudar a visualizar una problemática de salud pública en Bolivia, la contaminación del agua con metales pesados, pero también espera que esta visualización planteé la realización de proyectos de intervención, de implementación de tecnología de remoción de As del agua en todas las comunidades afectadas para mejorar la calidad de vida de la población.

11. REFERENCIAS

- Agusa, T., Fujihara, J., Takeshita, H., & Iwata, H. (2011). *Individual variations in inorganic arsenic metabolism associated with AS3MT genetic polymorphisms*. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3390/ijms12042351>
- Ali, M., Shahin, S. M., Sabri, N. A., Al-Hendy, A., & Yang, Q. (2018). Hypovitaminosis D exacerbates the DNA damage load in human uterine fibroids, which is ameliorated by vitamin D3 treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*, (October), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0184-6>
- Annangi, B., Bonassi, S., Marcos, R., & Hernández, A. (2016). Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 770(2015), 140–161. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.003>
- Antonelli, R., Shao, K., Thomas, D. J., Sams, R., & Cowden, J. (2014). AS3MT, GSTO, and PNP polymorphisms: Impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility. *Environmental Research*, 132, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.012>
- Apata, M. A. (2015). *Señales de adaptación humana al hidroarsenicismo en los valles andinos de Arica y Parínacota: Evidencias de variantes protectoras del gen Arsénico [+3]Metiltransferasa*. Universidad de Chile.
- Apata, M., Arriaza, B., Llop, E., & Moraga, M. (2017). Human adaptation to arsenic in Andean populations of the Atacama Desert. *American Journal of Physical Anthropology*, 163(1), 192–199. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23193>
- Ayfer Colak, Burak Toprak, Nese Dogan, F. U. (2013). Effect of sample type, centrifugation and storage conditions on vitamin D concentration. *Biochemia Medica*, 23(3), 321–325.
- Balakrishnan, P., Jones, M. R., Vaidya, D., Tellez-Plaza, M., Post, W. S., Kaufman, J. D., ... Navas-Acien, A. (2018). Ethnic, geographic, and genetic differences in arsenic metabolism at low arsenic exposure: A preliminary analysis in the multi-ethnic study of atherosclerosis (mesa). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(6), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061179>
- Banerjee, N., & Giri, A. K. (2014). Arsenic induced health effects, genetic damage and genetic variants in the population exposed to arsenic through drinking water in West Bengal. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(3), 565–581. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i3/55130>
- Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., ... Toujaguez, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*, 429, 2–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>
- Castro de Esparza, M. (2006). Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y

su efecto en la salud pública, (June), 24. Retrieved from <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/cd51/arsenico-agua.pdf>

- Chen, C. J. (2014). Health hazards and mitigation of chronic poisoning from arsenic in drinking water: Taiwan experiences. *Reviews on Environmental Health*, 29(1–2), 13–19. <https://doi.org/10.1515/reveh-2014-0007>
- Chen, Y. C., Su, H. J., Guo, Y. L., Hsueh, Y. M., Smith, T. J., Ryan, L. M., ... Christiani, D. C. (2003). Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. *Cancer Causes and Control*, 14, 303–310.
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Cullen, W. R. (2014). Chemical mechanism of arsenic biomethylation. *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/tx400441h>
- de la Rosa, R., Steinmaus, C., Akers, N. K., Conde, L., Ferreccio, C., Kalman, D., ... Smith, M. T. (2017). Associations between arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) and N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (N6AMT1) polymorphisms, arsenic metabolism, and cancer risk in a Chilean population. *Environ Mol Mutagen.*, 58(6), 411–422. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.21.Propionibacterium>
- De Loma, J., Skröder, H., Raqib, R., Vahter, M., & Broberg, K. (2018). Arsenite methyltransferase (AS3MT) polymorphisms and arsenic methylation in children in rural Bangladesh. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 357, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.020>
- De Loma, J., Tirado, N., Ascui, F., Levi, M., Vahter, M., Broberg, K., & Gardon, J. (2019). Elevated arsenic exposure and efficient arsenic metabolism in indigenous women around Lake Poopó Bolivia. *Science of the Total Environment*, 657, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.473>
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., & Cebrian, M. E. (2009). Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.020>
- Deb, D., Biswas, A., Ghose, A., Das, A., Majumdar, K. K., & Guha Mazumder, D. N. (2013). Nutritional deficiency and arsenical manifestations: A perspective study in an arsenic-endemic region of West Bengal, India. *Public Health Nutrition*, 16(9), 1644–1655. <https://doi.org/10.1017/S1368980012004697>
- Drobná, Z., Martin, E., Kim, K. S., Smeester, L., Bommarito, P., Rubio-Andrade, M., ... Fry, R. C. (2016). Analysis of maternal polymorphisms in arsenic (+3 oxidation state)-methyltransferase AS3MT and fetal sex in relation to arsenic metabolism and infant birth outcomes: Implications for risk analysis. *Reproductive Toxicology*, 61, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.02.017>

- Engström, K., Broberg, K., Concha, G., Nermell, B., Warholm, M., & Vahter, M. (2007). Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: Evidence from Argentina. *Environmental Health Perspectives*, *115*(4), 599–605. <https://doi.org/10.1289/ehp.9734>
- Engström, K., Vahter, M., Mlakar, S. J., Concha, G., Nermell, B., Raqib, R., ... Broberg, K. (2011). Polymorphisms in arsenic(+III oxidation state) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. *Environmental Health Perspectives*, *119*(2), 182–188. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002471>
- Fagundes, G. E., Macan, T. P., Rohr, P., Paganini, A., Rodrigues da Rocha, F., Pereira, M., ... Moraes de Andrade, V. (2019). Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. *Mutagenesis*, *39*(2), 135–145. <https://doi.org/10.1093/mutage/gez001>
- Faita, F., Cori, L., Bianchi, F., & Andreassi, M. G. (2013). Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(4), 1527–1546. <https://doi.org/10.3390/ijerph10041527>
- Fedirko, V., Bostick, R. M., Long, Q., Flanders, W. D., McCullough, M. L., Sidelnikov, E., ... Shaikat, A. (2010). Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: A randomized clinical trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *19*(1), 280–291. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0448>
- Francesconi, K., & Kuehnelt, D. (2004). Determination of arsenic species a critical review. *Analyst.*, *129*(5), 373-95.
- Fujihara, J., Fujii, Y., Agusa, T., Kunito, T., Yasuda, T., Moritani, T., & Takeshita, H. (2009). Ethnic differences in five intronic polymorphisms associated with arsenic metabolism within human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *234*(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.026>
- Fujihara, J., Kunito, T., Agusa, T., Yasuda, T., Iida, R., Fujii, Y., & Takeshita, H. (2007). Population differences in the human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene polymorphism detected by using genotyping method. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *225*(3), 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.010>
- Gamboa-Loira, B., Cebrián, M. E., Franco-Marina, F., & López-Carrillo, L. (2017). Arsenic metabolism and cancer risk: A meta-analysis. *Environmental Research*, *156*(April), 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.016>
- García-Alvarado, F. J., Neri-Meléndez, H., Pérez Armendáriz, L., & Rivera Guillen, M. (2018). Polimorfismos del gen Arsénico 3 Metiltransferasa (As3MT) y la eficacia urinaria del metabolismo del arsénico en una población del Norte de México. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *35*(1), 72–76. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3565.72>
- Gardon, J., Tirado, N., Broberg, K., & Vahter, M. (2016). Arsenic exposure and metabolims among women in Bolivia. In *Arsenic Reasearch and Global Sustanainability* (pp. 392–

393).

- Garrido, A. E., Strosnider, W. H. J., Wilson, R. T., Condori, J., & Nairn, R. W. (2017). Metal-contaminated potato crops and potential human health risk in Bolivian mining highlands. *Environmental Geochemistry and Health*, 39(3), 681–700. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9943-4>
- Gomez-Rubioa, P., Klimentidisb, Y. C., Cantu-Sotoc, E., Meza-Montenegroc, M. M., Billheimerd, D., Lue, Z., ... Klimeckia, W. T. (2012). Indigenous American ancestry is associated with arsenic methylation efficiency in an admixed population of northwest Mexico. *J Toxicol Environ Health A*, 75(1), 36–49. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.615107>. Indigenous
- Gonzalez Alonso, S., Esteban-Hernandez, J., Valcarcel Rivera, Y., Hernandez-Barrera, V., & de Miguel, A. (2010). Water pollution in sources close to oil-producing fields of Bolivia. *Revista Panamericana De Salud Publica-Pan American Journal of Public Health*, 28(4), 235–243.
- Graziano, S., Johnston, R., Deng, O., Zhang, J., & Gonzalo, S. (2016). Vitamin D/Vitamin D Receptor Axis Regulates DNA Repair During Oncogene-Induced Senescence. *Oncogene*, 35(41), 5362–5376. <https://doi.org/10.1038/nm.2451.A>
- Gribble, M. O., Crainiceanu, C. M., Howard, B. V., Umans, J. G., Francesconi, K. A., Goessler, W., ... Navas-acien, A. (2013). Body composition and arsenic metabolism: a cross-sectional analysis in the Strong Heart Study. *Environmental Health*, 12(107), 1–10.
- Hall, M. N., & Gamble, M. V. (2012). Nutritional Manipulation of One-Carbon Metabolism: Effects on Arsenic Methylation and Toxicity. *Journal Of Toxicology*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/595307>
- Herath, I., Vithanage, M., Bundschuh, J., Maity, J. P., & Bhattacharya, P. (2016). Natural Arsenic in Global Groundwaters: Distribution and Geochemical Triggers for Mobilization. *Current Pollution Reports*, 2(1), 68–89. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0028-2>
- Hernández, A., & Marcos, R. (2008). Genetic variations associated with interindividual sensitivity in the response to arsenic exposure. *Pharmacogenomics*, 9(8), 1113–1132.
- Hernández, A., Paiva, L., Creus, A., Quinteros, D., & Marcos, R. (2014). Micronucleus frequency in copper-mine workers exposed to arsenic is modulated by the AS3MT Met287Thr polymorphism. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 759, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.010>
- Hernández, A., Xamena, N., Sekaran, C., Tokunaga, H., Sampayo-Reyes, A., Quinteros, D., ... Marcos, R. (2008). High arsenic metabolic efficiency in AS3MT 287 Thr allele carriers. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(4), 349–355.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med*, 357(3), 266–281.
- Hong, Y. S., Song, K. H., & Chung, J. Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure.

Journal of Preventive Medicine and Public Health, 47(5), 245–252.
<https://doi.org/10.3961/jpmph.14.035>

- Huang, C. Y., Lin, Y. C., Shiue, H. S., Chen, W. J., Su, C. T., Pu, Y. S., ... Hsueh, Y. M. (2018). Comparison of arsenic methylation capacity and polymorphisms of arsenic methylation genes between bladder cancer and upper tract urothelial carcinoma. *Toxicology Letters*, 295, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.035>
- Huang, L., Wu, H., & Van Der Kuijp, T. J. (2015). The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: A review by global geographical distribution. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(4), 432–452. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.958139>
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00084-X)
- Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicological Sciences*, 123(2), 305–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>
- IARC. (2012). *Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC Monographs* (Vol. 100). Retrieved from <https://www.iarc.fr/>
- Iqbal, M., Yuan, Z., Sattar, A., Hafeez, M. A., Iqbal, Z., Shabbir, M. A., ... Xie, S. (2016). Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.020>
- Jansen, R. J., Argos, M., Tong, L., Li, J., Rakibuz-Zaman, M., Islam, M. T., ... Ahsan, H. (2015). Determinants and consequences of arsenic metabolism efficiency among 4,794 individuals: Demographics, lifestyle, genetics, and toxicity. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(2), 381–390. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0718>
- Jee, D., Kim, E. C., Cho, E., & Arroyo, J. G. (2016). Positive Association between Blood 25-Hydroxyvitamin D Levels and Pterygium after Control for Sunlight Exposure. *PloS One*, 11(6), e0157501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157501>
- Jeon, S. M., & Shin, E. A. (2018). Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 20. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>
- Jiménez-Villarreal, J., Rivas-Armendariz, D., Pineda-Belmontes, C., Betancourt-Martínez, N., Macías-Corral, M., Guerra-Alanis, A., ... Morán-Martínez, J. (2017). Detection of damage on single- or double- stranded DNA in a population exposed to arsenic in drinking water. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 1–12.
- Johnston, R., Heijnen, H., & Wurzel, P. (2001). Safe Water Technology. In *United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water*, World Health Organisation (pp. 1–98).

- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., ... Valko, M. (2011). Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), 95–107. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>
- Kapaj, S., Peterson, H., Liber, K., & Bhattacharya, P. (2006). Human Health Effects From Chronic Arsenic Poisoning—A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 41(10), 2399–2428. <https://doi.org/10.5624/isd.2015.45.1.61>
- Kapil, U., Pandey, R., Goswami, R., Sharma, B., Sharma, N., Ramakrishnan, L., ... Sofi, N. (2017). Prevalence of Vitamin D deficiency and associated risk factors among children residing at high altitude in Shimla district, Himachal Pradesh, India. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 21(1), 178. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.196031>
- Karagas, M. R., Gossai, A., Pierce, B., & Ahsan, H. (2015). Drinking Water Arsenic Contamination, Skin Lesions, and Malignancies: A Systematic Review of the Global Evidence Margaret. *Curr Environ Health Rep*, 2(1), 52–68. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0040-x.Drinking>
- Kessel, M., Liu, S. X., Xu, A., Santella, R., & Hei, T. K. (2002). Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234–235, 301–308. <https://doi.org/10.1023/A:1015927406142>
- Khairul, I., Wang, Q. Q., Jiang, Y. H., Wang, C., & Naranmandura, H. (2015). Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget*, 8(14), 23905–23926. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14733>
- Khammissa, R. A. G., Fourie, J., Motswaledi, M. H., Ballyram, R., Lemmer, J., & Feller, L. (2018). The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9276380>
- Kile, M. L., Hoffman, E., Rodrigues, E. G., Breton, C. V., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., ... Christiani, D. C. (2011). A pathway-based analysis of urinary arsenic metabolites and skin lesions. *American Journal of Epidemiology*, 173(7), 778–786. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq427>
- Kordas, K., Queirolo, E. I., Mañay, N., Peregalli, F., Ying, P., Lu, Y., & Vahter, M. (2016). Low-level arsenic exposure : Nutritional and dietary predictors in first-grade Uruguayan children. *Environmental Research*, 147, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.022>
- Kuo, C., Moon, K. A., Wang, S., Silbergeld, E., & Navas-acien, A. (2013). The Association of Arsenic Metabolism with Cancer , Cardiovascular Disease , and Diabetes : A Systematic Review of the Epidemiological Evidence. <https://doi.org/10.1289/EHP577>
- Lara Barrientos, M. (2012). Discriminación hacia minorías étnicas: el caso de los urus del lago Poopó. *Tinkazos*, 15(31), 57–78. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1990-

74512012000100004&lang=pt

- Larrea, M. M., Tirado, N., & Ascarrunz, M. E. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biochimie*, 18(2), 31–43.
- Lee, B.-K., & Kim, Y. (2013). Association of diabetes mellitus with a combination of vitamin d deficiency and arsenic exposure in the korean general population: analysis of 2008-2009 korean national health and nutrition examination survey data. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 25(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2052-4374-25-7>
- Li, L., & Chen, F. (2016). Oxidative stress, epigenetics, and cancer stem cells in arsenic carcinogenesis and prevention I. Arsenic in environmental and occupational settings. *Curr Pharmacol Rep*, April(2), 2(2):57-63. <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0049-y>
- Lin, W., Wang, S., Wu, H., Chang, K., Yeh, P., Chen, C., & Guo, H. (2008). Associations between Arsenic in Drinking Water and Pterygium in Southwestern Taiwan, (7), 952–955. <https://doi.org/10.1289/ehp.11111>
- López-Carrillo, L., Gamboa-Loira, B., Becerra, W., Hernández-Alcaraz, C., Hernández-Ramírez, R. U., Gandolfi, A. J., ... Cebrián, M. E. (2016). Dietary micronutrient intake and its relationship with arsenic metabolism in Mexican women. *Environmental Research*, 151, 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.08.015>
- Martinesi, M., Treves, C., D'Albasio, G., Bagnoli, S., Bonanomi, A. G., & Stio, M. (2008). Vitamin D Derivatives Induce Apoptosis and Downregulate ICAM-1 Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Bowel Dis*, 14(5), 597–604. <https://doi.org/10.1002/ibd.20354>
- Martinez, V. D., Becker-santos, D. D., Vucic, E. A., Lam, S., & Lam, W. L. (2011). Induction of Human Squamous Cell-Type Carcinomas by Arsenic. *Journal of Skin Cancer*, 2011(ID 454157), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/454157>
- Matthews, N. H., Fitch, K., Li, W.-Q., Morris, J. S., Christiani, D. C., Qureshi, A. A., & Cho, E. (2019). Exposure to Trace Elements and Risk of Skin Cancer: A Systematic Review of Epidemiologic Studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 28(1), 3–21. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0286>
- Mayer, J. E., & Goldman, R. H. (2016). Arsenic and skin cancer in the USA: the current evidence regarding arsenic-contaminated drinking water. *International Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/ijd.13318>
- McEwen, A. R., Hsu-Kim, H., Robins, N. A., Hagan, N. A., Halabi, S., Barras, O., ... Vandenberg, J. J. (2016). Residential metal contamination and potential health risks of exposure in adobe brick houses in Potosí, Bolivia. *Science of the Total Environment*, 562, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.152>
- Medina Pizzali, M., Robles, P., Mendoza, M., & Torres, C. (2018). Ingesta de arsénico: El impacto en la alimentación y salud humana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 35(1), 93–102. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3604.93>

- Méndez-Gómez, J., García-Vargas, G. G., López-Carrillo, L., Calderón-Aranda, E. S., Gómez, A., Vera, E., ... Rojas, E. (2008). Genotoxic effects of environmental exposure to arsenic and lead on children in Region Lagunera, Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1140, 358–367. <https://doi.org/10.1196/annals.1454.027>
- Minatel, B. C., Sage, A. P., Anderson, C., Hubaux, R., Marshall, E. A., Lam, W. L., & Martínez, V. D. (2018). Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environment International*, 112(August 2017), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.017>
- Molina, C. I., Ibañez, C., & Gibon, F.-M. (2012). Proceso de biomagnificación de metales pesados en un lago hiperhalino (Poopó , Oruro , Bolivia): Posible riesgo en la salud de consumidores Biomagnification process of heavy metals of a hiperhaline lake. *Ecología En Bolivia*, 47(2), 99–118.
- Mousavi, S. E., Amini, H., Heydarpour, P., Amini Chermahini, F., & Godderis, L. (2019). Air pollution, environmental chemicals, and smoking may trigger vitamin D deficiency: Evidence and potential mechanisms. *Environment International*, 122(November), 67–90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.052>
- Munns, C. F., Shaw, N., Kiely, M., Specker, B. L., Thacher, T. D., Ozono, K., ... Högler, W. (2016). Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(2), 394–415. <https://doi.org/10.1195/000443136>
- Muñoz, M. O., & Aguirre, J. Q. (2014). Distribución de arsénico geogénico en agua superficial y subterránea en el altiplano central boliviano. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 54–60.
- Nair-Shalliker, V., Armstrong, B. K., & Fenech, M. (2012). Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.02.005>
- Nair-Shalliker, V., Fenech, M., Forder, P. M., Clements, M. S., & Armstrong, B. K. (2012). Sunlight and vitamin D affect DNA damage, cell division and cell death in human lymphocytes: A cross-sectional study in South Australia. *Mutagenesis*, 27(5), 609–614. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges026>
- Norsang, G., Ma, L., Dahlback, A., Zhuoma, C., Tsoja, W., Porojnicu, A., ... Moan, J. (2009). The vitamin D status among tibetans. *Photochemistry and Photobiology*, 85(4), 1028–1031. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00552.x>
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (2012). Inventario y diagnóstico hidrológico en comunidades vulnerables en el Altiplano Lapaz y Oruro. *Plan VII Proyecto Dipecho Binacional Perú - Bolivia*.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). *Índice UV solar Mundial*. Retrieved from <http://www.who.int/uv>

- Ormachea M, M. R. (2015). *Hydrogeochemistry of naturally occurring arsenic and other trace elements in the central Bolivian Altiplano - Sources, mobility and drinking water quality*. KTH Royal Institute of Technology.
- Ormachea Muñoz, M., Garcia Aróstegui, J. L., Bhattacharya, P., Sracek, O., Garcia Moreno, M. E., Kohfahl, C., ... Bundschuh, J. (2016). Geochemistry of naturally occurring arsenic in groundwater and surface-water in the southern part of the Poopó Lake basin, Bolivian Altiplano. *Groundwater for Sustainable Development*, 2–3, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2016.04.002>
- Ormachea Muñoz, M., Wern, H., Johnsson, F., Bhattacharya, P., Sracek, O., Thunvik, R., ... Bundschuh, J. (2013). Geogenic arsenic and other trace elements in the shallow hydrogeologic system of Southern Poopó Basin, Bolivian Altiplano. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.078>
- Palus, J., Lewinska, D., Dziubaltowska, E., Stepnik, M., Beck, J., Rydzynski, K., & Nilsson, R. (2005). DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46(2), 81–87. <https://doi.org/10.1002/em.20132>
- Pierce, B. L., Tong, L., Argos, M., Gao, J., Jasmine, F., Roy, S., ... Ahsan, H. (2013). Arsenic metabolism efficiency has a causal role in arsenic toxicity: Mendelian randomization and gene-environment interaction. *International Journal of Epidemiology*, 42(6), 1862–1872. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt182>
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). (2011). *Perspectivas del medio ambiente en el Sistema Hidrico TDPS*. Retrieved from <http://200.7.163.146/owncloud/index.php/s/dCQlvBEVfSwmzus>
- Quino, I., & Quintanilla, J. (2013). Índice De Calidad Del Agua En La Cuenca Del Lago Poopó - Uru Uru Aplicando Herramientas Sig. *Revista Boliviana de Química*, 30(1), 91–101. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339679013>
- Ramírez, A. V. (2013). Exposición ocupacional y ambiental al arsénico. Actualización bibliográfica para investigación científica. *An Fac Med*, 74(4), 237–247. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11362238>
- Ramos Ramos, O. E., Cáceres, L. F., Ormachea Muñoz, M. R., Bhattacharya, P., Quino, I., Quintanilla, J., ... García, M. E. (2012). Sources and behavior of arsenic and trace elements in groundwater and surface water in the Poopo Lake Basin , Bolivian Altiplano. *Environ Earth Sci*, 66, 793–807. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1288-1>
- Rezvan, F., Khabazkhoob, M., Hooshmand, E., Yekta, A., Saatchi, M., & Hashemi, H. (2018). Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. *Survey of Ophthalmology*, 63(5), 719–735. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.03.001>
- Roh, T., Steinmaus, C., Marshall, G., Ferreccio, C., & Liaw, J. (2018). Age at Exposure to Arsenic in Water and Mortality 30–40 Years After Exposure Cessation ORIGINAL. *Am J Epidemiol.*, 187(11), 2297–2305. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy159/5063615>

- Rossman, T. G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research*, 533, 37–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.009>
- Roy, P., Mukherjee, A., & Giri, S. (2016). Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytochrome assay and comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.019>
- Sage, A. P., Minatel, B. C., Ng, K. W., Stewart, G. L., Dummer, T. J., Lam, W. L., & Martinez, V. D. (2017). Oncogenomic disruptions in arsenic-induced carcinogenesis. *Oncotarget*, 8(15), 25736–25755. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15106>
- Salnikow, K., & Room, E. (2009). *Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium*. *Chem Res Toxicol* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1021/tx700198a>. Genetic
- Sampayo-Reyes, A., Hernández, A., El-Yamani, N., López-Campos, C., Mayet-Machado, E., Rincón-Castañeda, C. B., ... Marcos, R. (2010). Arsenic Induces DNA Damage in Environmentally Exposed Mexican Children and Adults. Influence of GSTO1 and AS3MT Polymorphisms. *Toxicological Sciences*, 117(1), 63–71. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq173>
- Sandoval, J. R., Lacerda, D. R., Jota, M. S. A., Salazar-Granara, A., Vieira, P. P. R., Acosta, O., ... Genographic Project Consortium. (2013). The genetic history of indigenous populations of the Peruvian and Bolivian Altiplano: the legacy of the Uros. *PloS One*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073006>
- Schlebusch, C. M., Gattepaille, L. M., Engström, K., Vahter, M., Jakobsson, M., & Broberg, K. (2015). Human adaptation to arsenic-rich environments. *Molecular Biology and Evolution*, 32(6), 1544–1555.
- Schlebusch, C. M., Lewis, C. M., Vahter, M., Engström, K., Tito, R. Y., Obregón-Tito, A. J., ... Broberg, K. (2013). Possible positive selection for an arsenic-protective haplotype in humans. *Environmental Health Perspectives*, 121(1), 53–58.
- Schöttker, B., Haug, U., Schomburg, L., Köhrle, J., Perna, L., Müller, H., ... Brenner, H. (2013). Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 782–793. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.047712>
- Schwalfenberg, G. K., & Genuis, S. J. (2015). Vitamin D, essential minerals, and toxic elements: Exploring interactions between nutrients and toxicants in clinical medicine. *Scientific World Journal*, 2015(July). <https://doi.org/10.1155/2015/318595>
- Selander L, S. P. (2017). *Occurrence and distribution of heavy metals in Lake Poopó, Bolivia*. Lund University.
- Sepidarkish, M., Farsi, F., Akbari-fakhrabadi, M., Namazi, N., Almasi-hashiani, A., Maleki, A., & Heshmati, J. (2018). The effect of Vitamin D supplementation on oxidative stress

- parameters: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.011>
- SERGEOMIN. Inventariación de Recursos Naturales Renovables (Hídricos) y No Renovables (Minerales e Hidrocarburos) del Departamento de Oruro, 24 Boletín del Servicio Geológico y Minero de Bolivia. § (1999). Retrieved from <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>
- Shankar, S., Shanker, U., Shikha, Shankar, S., Shanker, U., & Shikha. (2014). Arsenic Contamination of Groundwater: A Review of Sources, Prevalence, Health Risks, and Strategies for Mitigation, Arsenic Contamination of Groundwater: A Review of Sources, Prevalence, Health Risks, and Strategies for Mitigation. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/304524>, 10.1155/2014/304524
- Shen, H., Niu, Q., Xu, M., Rui, D., Xu, S., Feng, G., ... Jing, M. (2016). Factors affecting arsenic methylation in arsenic-exposed humans: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020205>
- Shi, H., Shi, X., & Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1–2), 67–78. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000007262.26044.e8>
- Shiue, I. (2013). Urinary environmental chemical concentrations and vitamin D are associated with vision, hearing, and balance disorders in the elderly. *Environment International*, 53, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.006>
- Smith, D. C., Johnson, C. S., Freeman, C. C., Muindi, J., Wilson, J. W., & Trump, D. L. (1999). A phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clinical Cancer Research*, 5, 1339–1345. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29282937%0Ahttp://bvgsalud.c17.net/openurl?sid=EMBASE&issn=10780432&id=doi:&atitle=A+phase+I+trial+of+calcitriol+%281%2C25-dihydroxycholecalciferol%29+in+patients+with+advanced+mal>
- Stassen, M. J. M., Preeker, N. L., Ragas, A. M. J., van de Ven, M. W. P. M., Smolders, A. J. P., & Roeleveld, N. (2012). Metal exposure and reproductive disorders in indigenous communities living along the Pilcomayo River, Bolivia. *Science of the Total Environment*, 427–428, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.072>
- Steinmaus, C., Yuan, Y., Kalman, D., Atallah, R., & Smith, A. H. (2005). Intraindividual Variability in Arsenic Methylation in a U . S . Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(4), 919–924.
- Sumi, D., & Himeno, S. (2012). Role of Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase in Arsenic Metabolism and Toxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(11), 1870–1875. <https://doi.org/10.1248/bpb.b212015>
- Sun, H. J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L. P., & Ma, L. Q. (2014). Arsenic and

- selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environment International*.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.019>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Udensi, U. K., Pacurari, M., Stevens, J. J., Patlolla, A. K., ... Kumar, S. (2018). State of the science review of the health effects of inorganic arsenic: Perspectives for future research. *Environmental Toxicology*, 1–15.
<https://doi.org/10.1002/tox.22673>
- Thomas, D. J., Li, J., Waters, S. B., Xing, W., Adair, B. M., Drobna, Z., ... Styblo, M. (2007). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 232(1), 3–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202581> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2408740>
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181–182, 211–217.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00285-8)
- Vahter, M., Concha, G., Nermell, B., Nilsson, R., Dulout, F., & Natarajan, A. T. (1995). A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology And*, 293(4), 455–462.
[https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90066-7)
- Valdes, A. M., Gardner, J. P., Paximadas, D., Kimura, M., Nessa, A., Lu, X., ... Aviv, A. (2007). Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women 1–3. *American Journal of Clinical Nutrition*, (April), 1420–1425.
- Van Damme, P. (2002). *Disponibilidad, uso y calidad de los recursos hídricos en bolivia. Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible, Johannesburgo*.
<https://doi.org/10.1109/PERCOMW.2016.7457072>
- Vuyyuri, S. B., Ishaq, M., Kuppala, D., Grover, P., & Ahuja, Y. (2007). Evaluation of Micronucleus Frequencies and DNA Damage in Glass Workers Exposed to Arsenic. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 490(April), 483–490.
<https://doi.org/10.1002/em>
- Wang, Y. H., Yeh, S. Der, Wu, M. M., Liu, C. T., Shen, C. H., Shen, K. H., ... Chen, C. J. (2013). Comparing the joint effect of arsenic exposure, cigarette smoking and risk genotypes of vascular endothelial growth factor on upper urinary tract urothelial carcinoma and bladder cancer. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 1139–1146.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.056>
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Himmelfarb, C. D., ... Gentile, F. (2018). 2017 ACC / AHA / AAPA / ABC / ACPM / AGS / APhA / ASH / ASPC / NMA / PCNA Guideline for the Prevention , Detection , Evaluation , and Management of High Blood Pressure in Adults A Report of the American College of Cardiology / *Hypertension*, 71, e13–e115.
<https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000065>

- WHO. (2001). *Environmental Health Criteria 224 ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS (Second Edition)*.
- Xu, X., Drobná, Z., Voruganti, V. S., Barron, K., González-Horta, C., Sánchez-Ramírez, B., ... Mendez, M. A. (2016). Association between variants in arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) and urinary metabolites of inorganic arsenic: Role of exposure level. *Toxicological Sciences*, *153*(1), 112–123. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw112>
- Yager, J. W., Erdei, E., Myers, O., Siegel, M., & Berwick, M. (2016). Arsenic and ultraviolet radiation exposure: melanoma in a New Mexico non-Hispanic white population. *Environmental Geochemistry and Health*, *38*(3), 897–910. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9770-4>
- Yamanaka, K., & Okada, S. (1994). Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environmental Health Perspectives*, *102*(SUPPL. 3), 37–40.
- Yu, H., Liu, S., Li, M., & Wu, B. (2016). Influence of diet, vitamin, tea, trace elements and exogenous antioxidants on arsenic metabolism and toxicity. *Environmental Geochemistry and Health*. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9742-8>
- Zamoiski, R. D., Guallar, E., García-Vargas, G. G., Rothenberg, S. J., Resnick, C., Andrade, M. R., ... Silbergeld, E. K. (2014). Association of arsenic and metals with concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D among adolescents in Torreón, Mexico. *Environmental Health Perspectives*, *122*(11), 1233–1238. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307861>
- Zdenka de la Barra Saavedra, S., Lara Barrientos, G. M., & Coca, R. O. C. (2011). *Exclusión y subalternidad de los urus del lago Poopó*. Programa de Investigación Estratégica en Bolivia.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1. Hoja de información

HOJA DE INFORMACION

Metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en humanos relacionados con el consumo de aguas altamente mineralizadas conteniendo arsénico.

Código.....

Estimado Señor (a): En el Departamento de Oruro la riqueza en minerales es bien conocida. La naturaleza de los suelos de las regiones del Sur del departamento hace que en ciertas comunidades el agua contiene alta concentración en elementos minerales. Ciertos de estos elementos son buenos para la salud, sin embargo, en ciertos pueblos se ha observado la presencia de trazas de arsénico, boro, litio, y otros elementos metálicos.

El arsénico es el más preocupante de estos elementos por el hecho que consumido durante muchos años puede dañar a la salud provocando enfermedades agudas o favoreciendo enfermedades crónicas.

Todas las personas no tienen el mismo riesgo delante de la toxicidad del arsénico. Ciertas personas eliminan el arsénico de manera que no sea demasiado tóxico, cuando otras no tienen esta capacidad.

Entender mejor estos procesos de eliminación y evaluar los daños potenciales para la salud humana es un desafío para los científicos y los médicos.

Proponemos desarrollar en su comunidad un estudio sobre la exposición de las personas a estos minerales y sobre todo al arsénico para evaluar los riesgos y conocer mejor la manera con la que el cuerpo elimina estos minerales. Para eso necesitamos medir parámetros químicos y biológicos en orina y en sangre de adultos voluntarios, residentes permanentes de su comunidad.

Los resultados serán entregados en forma individual, con las aclaraciones y los detalles útiles para su entendimiento. Además, los promedios de la población y la comparación con otras comunidades serán presentados en forma colectiva durante reuniones públicas.

Garantizamos a usted el anonimato completo de su propio resultado que no será entregado a nadie más que a usted.

Si Usted acepta participar, le pediremos contestar preguntas sobre sus datos personales y sus hábitos, para determinar su exposición a arsénico (encuesta). Además de eso, permitiremos la toma de una muestra de sangre (10 ml volumen de una cuchara), de mucosa bucal, además entregarnos una muestra de orina en el tubo que le proporcionaremos. Las muestras de sangre y mucosa bucal serán obtenidas por una persona profesional. Estas muestras juntamente con la de orina serán analizadas en laboratorios de alta calidad y sin costo para usted, pero usted tampoco recibirá ningún tipo de retribución por participar en el estudio.

Su participación es absolutamente voluntaria, y si usted decide hacerlo le rogamos firmar su consentimiento en las líneas siguientes. Esperamos contar con su colaboración, ya que los resultados de este estudio irán en directo beneficio de usted y de la comunidad. Para aclarar cualquier duda o pregunta, puede dirigirse a:

Dra. Noemí Tirado Bustillos

CI: 2369439 L.P.

INVESTIGADORA RESPONSABLE. Teléfonos: Of. 2229613 – Cel. 79663058

Dr. Josue Mamani Jarro

CI:680826 L.P.

Co-investigador

Celular: 79564894

12.2 Anexo 2. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en humanos relacionados con el consumo de aguas altamente mineralizadas conteniendo arsénico.

Población del Sur del Lago Poopó

Código

Yo..... Con CI.....

Dirección.....

Municipio.....

Después de haber leído y haberme informado del estudio que están realizando, el Instituto de Genética de la UMSA, el KI, y el IRD, para evaluar la competencia a eliminar el arsénico y sus potenciales efectos dañinos sobre la salud humana, acepto participar y seguir los pasos del estudio entendido que puedo cancelar mi participación a cualquier momento, mi aceptación siendo totalmente voluntaria.

Entiendo que mi participación es voluntaria y tengo el derecho de retirarme en cualquier momento del estudio.

Firma del participante

Firma de uno de los investigadores principal

Firma del encargado de la encuesta y del muestreo

12.3 Anexo 3. Cuestionario dirigido

CUESTIONARIO DIRIGIDO

Metabolismo de eliminación del arsénico y daño genotóxico en humanos relacionados con el consumo de aguas altamente mineralizadas conteniendo arsénico.

CODIGO:

Fecha:

Lugar de inclusión:

1. Nombre y apellido:
2. Dirección/Localidad:.....
.....
3. Número de celular o teléfono fijo:



CODIGO:

1. Lugar de inclusión:.....
2. Pueblo donde vive:.....
3. Edad: años
4. Tiempo de residencia en la localidad: años (menos de la edad, ir al N° 4a)
 - 4a. Donde vivía antes?
5. De dónde es su padre?..... De dónde es su madre?.....
Y sus abuelos paternos?..... Y sus abuelos maternos?.....
Y sus bisabuelos paternos?..... Y sus bisabuelos maternos?.....
6. Ocupación:

7. Cuántos hijos tiene? Cuántos años tiene (n):
8. Tienen sus hijos alguna enfermedad (tiroides, riñón, corazón, diabetes, cáncer)?
.....
9. Hay algún familiar que también es parte de este estudio?
- Relación?:.....

Hábitos alimenticios

9. Consume:	Si	No	Cuántas veces al día?
Sopa:
Mate
Café
Jugo
Leche en polvo
Leche de cabra o de vaca?
Té
Mate de coca?
Mastica coca?
Si la respuesta es SI:	con qué frecuencia?		

10. De dónde provienen los vegetales que Ud. consume?
.....

11. Cuáles son los vegetales que Ud. más consume?.....
.....

12. Cuáles son las frutas que Ud. más consume?.....
.....

13. Que come normalmente:
En el desayuno?

En el almuerzo?

En la cena?

Come carne? Cuántas veces en la semana? En el mes?

Come pescado? Cuántas veces en la semana? En el mes?

14.
Comentarios.....
.....
.....

Consumo de agua

15. ¿Qué cantidad de agua bebe por día? 1 vaso 2 vasos 3 vasos Más de 3 vasos.....

16. De donde obtiene el agua?

Antecedentes de consumo de alcohol

17. Ingiere bebidas alcohólicas en la actualidad? No Si..... (Si la respuesta es SI, llenar cuestionario adicional)

Antecedentes de fumador

18. Fuma? No Si (si la respuesta es SI, llenar cuestionario adicional)

Antecedentes de enfermedades

19. Tuvo alguna enfermedad importante durante la infancia?

.....

20. Tiene alguna de las siguientes enfermedades:

Problemas del corazón? No..... Si.....

Tratamiento.....

Hipertensión (presión alta) No.....Si..... Tratamiento.....

Diabetes No..... Si..... Tratamiento.....

Infecciones (piel, gripe) No..... Si.....

Tratamiento.....

Problema de tiroides (bocio? Hipo o hipertiroidismo?)

No..... Si..... Cuál?.....

Tratamiento.....

Reumatismo No..... Si.....

Tratamiento.....

Cáncer No..... Si..... Tipo.....

Tratamiento.....

Otras enfermedades No..... Si..... Cuál.....

Tratamiento.....

21. Toma alguna otra medicación? No..... Si..... Cuál?

.....

Cuestionario adicional sobre antecedentes de consumo de alcohol y tabaco.

Antecedentes de consumo de alcohol

22. Hace cuánto tiempo toma alcohol?

.....

23. Con qué frecuencia toma? Veces al mes:..... al año:.....

Antecedentes de fumador

24. Cuanto tiempo hace que fuma? años meses

25. Qué fuma? cigarrillos armados chala pipa cigarros

26. Cuantos por día?

27. Fumaba antes? Si No

28. Cuánto tiempo hace que dejó? años meses

12.4 Anexo 4. Cuestionario de exposición solar

CUESTIONARIO RELACIONADO A EXPOSICIÓN SOLAR

1. DATOS PERSONALES

Nombre:	Código
Edad:	Fecha:

2. DATOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

En que horario está expuesto a la luz solar en durante el día:

Mañana						Tarde						
6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6

Medidas de protección durante exposición solar:

Sombrero de ala ancha		Manga corta	
Gorra		Uso de gafas de sol	
Manga larga		Protector solar	

3. DATOS CLÍNICOS

Quemadura solar durante exposición solar:

Con facilidad	
Requiere exposición mantenida e intensa	
Requiere exposición muy intensa	
Nunca	

Bronceado durante exposición solar:

Nunca	
Mínimo	
Con facilidad	
Muy fácilmente	
Siempre	

Presencia de cataratas oculares:

Si	Unilateral
	Bilateral
No	

Presencia de pterigión:

Si	Unilateral
	Bilateral
No	

Fototipo de piel según OMS:

I	II	III	IV	V	VI
Piel muy blanca, quemadura solar, sin bronceado	Piel blanca, quemadura solar común bronceado difícil	Piel con quemadura solar y bronceado gradual	Piel con bronceado fácil y rara quemadura solar	Piel morena natural, bronceado fácil, sin quemadura	Piel de raza negra

4. EXPOSICIÓN A OTROS AGENTES GENOTÓXICOS DURANTE LOS ULTIMOS 6 MESES:

Plaguicidas/pesticidas		Pinturas y solventes:		Actividad minera:	
Si	Si la respuesta fue si, cual usa:	Si		Si	
No		No		No	