Latin American Journal of Pharmacy
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense)*
Lat. Am. J. Pharm. **26** (5): 691-9 (2007)

Trabajos originales

Recibido el 6 de marzo de 2007
Aceptado el 23 de junio de 2007

Biomarcadores de Genotoxicidad en Individuos Expuestos al Arsénico

Adriana S. HICK, Matías G. PACZKOWSKI, Andrea B. GADANO & Marta A. CARBALLO *

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica),
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo es analizar el impacto subclínico sobre la salud que resulta de la exposición al arsénico mediante el agua de bebida, en dos grupos de individuos, uno de la provincia de Santiago del Estero (La Firmeza, Santos Lugares y Urutaú, con un n = 20) y el otro de la provincia de Santa Fe (Providencia, con un n = 20), como estudio piloto. La evaluación se llevó a cabo mediante el análisis de biomarcadores de efecto que actúan como dosímetros biológicos. Se realizaron determinaciones de índice mitótico (IM), cinética de proliferación celular (CPC), micronúcleo en mucosa oral (MnMO), frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH), y electroforesis de una sola célula (Test del cometa). Los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa en el IM ($p < 0,003$) y un incremento en la frecuencia de Mn ($p < 0,0001$) para el grupo de Santiago del Estero, mientras que en el grupo de la provincia de Santa Fe, los valores no difieren de los que presenta el grupo control. Los hallazgos sugieren que la exposición al arsénico en forma accidental no resulta inocua frente a una evaluación toxicogenética, siendo la susceptibilidad individual uno de los factores de mayor incidencia.

SUMMARY. "Genotoxicity Biomarkers in Arsenic Exposed Population". The aim of this work is to evaluate the subclinical impact of arsenic in drinking water over the population health in two individual groups, one of them of Santiago del Estero province (La Firmeza, Santos Lugares y Urutaú, n = 20), and the other one of Santa Fe province (Providencia, n = 20), as a pilot study. The evaluation was developed through effect biomarkers such as Mitotic Index (MI), Cellular Proliferation Kinetics (CPK), Micronucleous in epithelial cells (Mn), Sister Chromatid Exchanges (SCE) and Single Cell Electrophoresis (Comet assay). Our results shows a significative decrease in MI ($p < 0.003$) and significative increase ($p < 0.00001$) in Mn frequency in Santiago del Estero, while in Santa Fe, differences between control and exposed group, were not observed. These findings suggest that arsenic exposure is dangerous against this toxicogenetic evaluation and individual susceptibility is one of the most important incidence factors.

INTRODUCCIÓN

Los efectos tóxicos del arsénico se conocen desde la antigüedad y las consecuencias de su ingestión prolongada en baja concentración han sido analizadas desde el siglo XIX. Su distribución natural es muy heterogénea, y se lo encuentra como constituyente de aguas naturales a las que llega por erosión de tipo volcánico o superficial. En el caso de aguas superficiales, en vertientes calientes de alta concentración en Japón, Nueva Zelanda y Estados Unidos. Al mismo tiempo, fueron halladas aguas subterráneas de consumo humano con las mismas características en Inglaterra, Chile, México, Taiwán, India, Vietnam, Perú y también en Argentina [1-3].

La ingesta crónica de agua superficial o profunda que contiene arsénico en una concentración elevada, deriva en una serie de manifestaciones clínicas que constituyen un cuadro denominado inicialmente "enfermedad de Bell Ville" por ser en esa localidad de la Provincia de Córdoba donde se detectaron los primeros casos de la patología [4] que se conoce actualmente como Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE). Es una enfermedad social, que afecta profundamente a la población económicamente

PALABRAS CLAVE: Arsénico, Biomarcadores, Genotoxicidad.
KEY WORDS: Arsenic, Biomarkers, Genotoxicity.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. *E-mail:* macarballo2003@yahoo.com.ar

deprimida en las áreas rurales de la Argentina, que no poseen suministro de agua potable [5].

Una amplia zona de la Argentina presenta altos niveles de arsénico debido a la contaminación de las aguas subterráneas con cenizas volcánicas originadas en el holoceno. El riego y otras actividades humanas han generado un ascenso de la capa freática, conduciendo a un aumento de la concentración de arsénico [6,7]. Nuestro país ocupa el segundo lugar entre los países afectados considerando su contenido arsenical y las zonas endémicas que abarcan varias provincias como Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fe, Chaco, La Pampa, Córdoba, San Luis, Buenos Aires y Río Negro [4,8].

Una vez ingerido, el arsénico se distribuye en los distintos compartimientos corporales dependiendo del derivado que se trate, acumulándose en el hígado, los pulmones, la piel, los riñones, el pelo, las uñas y los dientes y en menor grado en el bazo, el corazón, el cerebro, los músculos y los huesos. Su excreción es fundamentalmente renal, encontrándose en orina como arsénico inorgánico (en baja proporción), MMA (monometil arsénico) y DMA (dimetilarsénico). También se excreta por las heces, la saliva, las uñas y los pelos [9]. Los efectos adversos del arsénico sobre la piel incluyen hiperqueratosis palmoplantar, hiperhidrosis, melanodermia y cáncer de piel [10].

La susceptibilidad individual y la variabilidad en el grado de metilación generan diferencias en los efectos adversos del arsénico [11,12]. La desnutrición también es un factor a considerar ya que, según datos reportados de Taiwan y del norte de Chile [13-15] los efectos de la contaminación con arsénico se ven aumentados en individuos desnutridos.

Se ha demostrado la actividad clastogénica y teratogénica del arsénico en diferentes sistemas de prueba [16-21]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido como recomendable para el arsénico en el agua de bebida una concentración inferior a los 10 µg/L, considerándose como límite superior tolerable los 50 µg/L. Se ha demostrado que valores superiores conllevan riesgo de neoplasias en los individuos expuestos [22-24]. El arsénico está asociado a cáncer de piel, de pulmón y de vejiga y ha sido descripto que una exposición durante 15 años a una concentración de 570 µg/l implica que una de cada 10 muertes por neoplasias en varones y 1 de cada 20 en mujeres, serán atribuibles al mencionado contaminante [24].

Los mecanismos de acción del arsénico como carcinógeno aún no han sido totalmente dilucidados. Los datos de la literatura, reportan que el arsénico actuaría indirectamente sobre el ADN, alterando la expresión genética [23,25]. Basados en estudios epidemiológicos, se lo considera carcinogénico en humanos (grupo 1 de la IARC), aunque los compuestos arsenicales no han demostrado producir cáncer en modelos animales [21,26,27].

El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio piloto para analizar el impacto subclínico sobre la salud en individuos expuestos al arsénico presente en el agua de bebida, a través del análisis de biomarcadores que actúan como dosímetros biológicos. Se analizarán biomarcadores de efecto tales como: citotoxicidad, mediante la evaluación del índice mitótico (IM); citostaticidad, por medio de la cinética de proliferación celular (CPC); clastogenicidad, por el test de micronúcleo en mucosa oral (MnMO), incremento de la inestabilidad cromosómica mediante la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y daño al material genético utilizando la metodología de electroforesis de una sola célula (test del cometa).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra Seleccionada

Para el presente trabajo se seleccionaron dos grupos de individuos expuestos al arsénico por el agua de bebida provista por pozos domiciliarios, de dos ubicaciones geográficas diferentes: una proveniente de la Provincia de Santiago del Estero y la otra de la Provincia de Santa Fe.

En Santiago del Estero el grupo estuvo conformado por 20 individuos (expuestos y controles) de las localidades de La Firmeza, Santos Lugares y Urutaú. En las dos primeras localidades se presentan niveles de arsénico en el agua de los pozos de las viviendas superior al límite aconsejado por la OMS (50 µg/L), mientras que en Urutaú el contenido de arsénico durante los últimos 10 años se ha encontrado en el límite establecido por la OMS (<10 µg/L).

La segunda población está constituida por individuos de la localidad de Providencia, Provincia de Santa Fe. La población de esta provincia presenta una alta heterogeneidad en cuanto al nivel de arsénico de las muestras de agua de cada vivienda. Conociendo este dato, se analizaron 10 individuos con baja concentración de arsénico en el agua de la vivienda (10 a 50 µg/L, inclusive) y 10 con alta concentración (superior a 50 µg/L).

En todos los casos, los individuos participan-

tes completaron una anamnesis en la que se los interrogaba tanto sobre antecedentes clínicos propios y familiares como sobre sus hábitos de vida, así como un consentimiento para participar en el estudio. Fueron seleccionaron aquellos individuos que no presentaran manifestaciones clínicas de HACRE.

Cultivo de linfocitos de sangre periférica

El cultivo se realizó de acuerdo a la metodología descripta en Carballo *et al.* [28]. A 1 ml de sangre entera heparinizada, se adiciona 1,5 ml de suero fetal bovino (Gibco), 7,5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), 0,1 ml de fitohemaglutinina (Gibco) y 100 µl de una solución de BrdU (bromo deoxiuridina, Sigma, 10 µg/ml), completando un volumen final de 10 ml. Los cultivos se realizan por duplicado y se incuban durante 72 h en una estufa de cultivo a 37 °C.

Una h antes de cumplidas las 72 h se adiciona colchicina (10 µg/ml, Sigma) permaneciendo a 37 °C durante 50 min. El material se centrifuga por 10 min a 1000 rpm y se realiza un tratamiento hipotónico utilizando una solución de KCl 0,075 M durante 50 min a 37 °C. Se detiene la hipotonía con 8 gotas de fijador de Carnoy (metanol: ácido acético glacial en proporción 3:1) y se centrifugan nuevamente las células durante 10 min a 1000 rpm, descartando el sobrenadante. La fijación se realiza adicionando 7 ml de fijador de Carnoy durante una 1 h en heladera (4 °C). Se centrifuga nuevamente, eliminándose el sobrenadante y realizando 3 lavados más con fijador. Posteriormente se procede a la realización de los extendidos en portaobjetos limpios y secos y se colorea con solución de Giemsa al 10% en buffer fosfato.

Índice Mitótico

La determinación del índice mitótico se realiza analizando el porcentaje de células en división con respecto al número de células estimuladas analizando 2.000 células por individuo/cultivo. El resultado se obtiene mediante la fórmula [29]:

$$IM = \frac{\text{N° de metafases}}{\text{N° total de células}} \times 100$$

Cinética de Proliferación Celular

Para realizar la coloración diferencial se utiliza la técnica de Perry & Wolff [30], modificada. El tratamiento consiste en colorear el extendido con solución de Hoescht 33258 (Sigma) durante 60 min en la oscuridad y posterior exposición a luz ultravioleta; luego se incuba en solución salina citratada (SSC) a 60 °C durante 2 h y por último se colorea con una solución de Giemsa al 3% en buffer fosfato durante 15 min.

En los preparados obtenidos se analizan 100 metafases sucesivas/ cultivo/ individuo y se estima la cinética de proliferación celular de cada muestra mediante el recuento de células en primera, segunda o tercera división mitótica. Así la CPC se evidencia como el porcentaje de cada una de las proporciones (M_1, M_2 y M_3) y para su expresión se utiliza el Índice de Replicación (IR):

$$IR = (Nº\ cel.M_1 + 2\ Nº\ cel.M_2 + 3Nº\ cel.M_3\ ) / 100$$

Intercambio de Cromátides Hermanas

El intercambio de material genético entre cromátides de un mismo cromosoma es un fenómeno que ocurre normalmente, como un mecanismo de reparación del daño cromosómico, a una baja frecuencia. La frecuencia de ICH se establece contando el número de intercambios por metafase/cultivo/individuo, visualizadas en 50 metafases de segunda división (con 46 centrómeros). Este resultado se informa como ICH/célula.

Técnica de electroforesis en gel de una sola célula

La técnica [31] se realiza sobre portaobjetos esmerilados, los cuales se cubren por una fina capa de 100 µl de agarosa (0,5%). Se toman entre 30.000 y 200.000 células (10 µl de la suspensión celular) y se resuspenden en 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% p/v. A continuación se coloca una tercera capa de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% p/v y se incuban las laminillas hasta solidificación a 4 °C durante 10 min. Una vez finalizada la preparación de los extendidos, se los somete a la acción de una solución de lisis (NaCl 2,5M; Na2EDTA 0.1 M; Tris 0,001 M) en frío. Se los incuba 1 h a 4 °C. Posteriormente, se colocan los preparados en una cuba de electroforesis horizontal, en la cual se incuban con buffer de corrida (Na2EDTA 0,0001 M -NaOH 0,3 M pH=13) durante 20 min, para lograr el desenrollamiento de la doble hebra de ADN. La electroforesis se lleva a cabo en frío 20 min a 25 volts.

Luego, los preparados son neutralizados con buffer Tris (pH=7). Posteriormente, se colorean con 50 µl de bromuro de etidio (Sigma, 0,02% p/v). El análisis microscópico de los preparados se realiza en un microscopio epi-fluorescente con filtro de excitación de 505-560 nm con luz

de mercurio de 100 w y filtro de barrido de 590 nm. La cuantificación del daño se realiza midiendo el largo de 100 cometas sucesivos generados por medio de un ocular graduado. Una vez establecido el largo de los cometas, se establece una categoría de daño para luego poder calcular el índice de daño mediante la siguiente fórmula:

N= Nº cél Cat I + 2 x Nº cél Cat I + 3 x Nº cél Cat III + 4 x Nº cél Cat IV

En todo tratamiento realizado se deben incluir controles positivos y negativos; el control positivo utilizado es peróxido de hidrógeno (5 exp-6 M). Dicha sustancia es altamente oxidante e induce en el ADN roturas doble y simple cadena y sitios álcali lábil.

Técnica de Micronúcleos de Mucosa Oral

Para la realización de esta técnica se humedece un hisopo estéril en solución fisiológica que se rota por la superficie interna de cada mejilla y se lo introduce en un tubo cónico con tapa que contiene 3 ml de solución fisiológica estéril para ser enviado al laboratorio para su posterior procesamiento [32].

En el laboratorio se procesó la muestra centrifugándola durante 10 min para obtener un precipitado celular a 1000 rpm y se resuspende en 3 ml de metanol (p.a.) durante 2-3 h en heladera o a temperatura ambiente, para fijar la muestra. Se repite 1 o 2 veces la fijación y se resuspende en metanol para realizar los extendidos en portaobjetos limpios y desengrasado. Los preparados se colorean con la tinción Schiff Fast Green (Merck) [33]. Se realiza el análisis en 1.000 células consecutivas/ preparado/ individuo con un aumento de 40X corroborando la presencia de micronúcleos a 100X. Todos los biomarcadores analizados fueron realizados por duplicado con el objeto de asegurar el número de datos apropiado para una correcta evaluación estadística. Los resultados se expresan como porcentaje de células con micronúcleo.

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los ensayos antes mencionados se realizó mediante Test de Análisis de la Varianza de dos criterios (ANOVA) con diseño de bloques al azar (ANOVA no paramétrico, Graphpad Instat) y Bonferroni. Con el fin de comparar el comportamiento del compuesto en estudio por medio de los biomarcadores de efecto seleccionados se empleó el Test U-Mann-Whitney de dos colas para muestras no apareadas.

RESULTADOS

Provincia de Santiago del Estero (SE)

Se analizaron variaciones en el índice mitótico, intercambio de cromátides hermanas, índice de replicación, micronúcleos en mucosa oral y Test del cometa en individuos expuestos a alta y a baja concentración de arsénico.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 1 a 4 siendo presentados por grupo de individuos de las distintas poblaciones evaluadas. En la Tabla 1 se presentan los resultados que corresponden a la población tomada como grupo control en la provincia de Santiago del Estero y en la Tabla 2 aquellos que corresponden a los individuos que consumen agua con alto contenido de arsénico.

En el análisis comparativo de ambas tablas se observa que existe una diferencia significativa para el Índice Mitótico ($p < 0,003$), mientras que no se presentan diferencias significativas para el Índice de Replicación, ni para el Intercambio de Cromátides Hermanas.

Ind.	Sexo	Edad	Localidad	Nivel de As en agua de consumo	IM	ICH	IR
1	F	52 años	Urutaú	<10 µg/L	6,90	7,650	2,155
2	M	58 años	Urutaú	<10 µg/L	4,80	7,235	1,965
3	F	40 años	Urutaú	<10 µg/L	4,40	9,150	2,380
4	M	66 años	Urutaú	<10 µg/L	6,55	7,325	2,395
5	M	41 años	Urutaú	<10 µg/L	4,85	8,855	2,040
X±ES					**5,5±0,51**	**8,04±0,40**	**2,18±0.09**

Tabla 1. Indice Mitótico, Intercambio de Cromátides Hermanas e Indice de Replicación en grupo Control de Santiago del Estero. IM: indice mitótico; ICH: intercambio de cromátides hermanas; IR: índice de replicación; Ind.: individuo.

En las Tablas 3 y 4 se observan los datos obtenidos para la misma población con el Test del Cometa y el Test de Micronúcleos. Los resultados muestran una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) para el Test de Mn, mientras que no se observan diferencias en el caso del Test del Cometa.

Provincia de Santa Fe

Se tomaron muestras de sangre periférica para analizar índice mitótico, intercambio de cromátides hermanas e índice de replicación. Los datos y los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 5 y 6.

La evaluación estadística realizada mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) demostró que no existen diferencias significativas para los biomarcadores analizados entre las dos subpoblaciones.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los efectos genotóxicos del arsénico y de sus sales han sido ampliamente reportados por la literatura, analizándose diferentes biomarcadores como el intercambio de cromátides hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas e inducción de micronúcleos [23,25] entre otros. El arsénico induce daño a nivel cromosómico, tanto *in vitro* como *in vivo,* encontrándose aberraciones numéricas y estructurales, así como incremento en la frecuencia de micronúcleos [34-37] y del intercambio de cromátides hermanas [38]. Los resultados reportados por la literatura in vivo han sido contradictorios ya que en algunos casos existe una correlación entre la ingesta de agua con altos niveles de arsénico y un incremento en los biomarcadores como ICH y en otros casos, no existe dicha correlación [35,39-41].

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo y datos de la literatura son coincidentes en la disminución significativa del índice mitótico en individuos con manifestaciones clínicas de HACRE [2]. En zonas contaminadas de México se observó que las poblaciones muestran una tendencia a la disminución en el mismo que podría deberse a una reducción en la

Ind.	Sexo	Edad	Localidad	Nivel de As en agua de consumo	IM	ICH	IR
6	M	25 años	La Firmeza	530 µg/L	2,05	7,710	2,080
7	F	22 años	Sts. Lugares	450 µg/L	3,95	8,675	2,375
8	F	47 años	Sts. Lugares	450 µg/L	2,65	8,170	2,210
9	M	52 años	Sts. Lugares	450 µg/L	3,20	10,440	2,180
10	M	57 años	Sts. Lugares	620 µg/L	3,20	8,145	2,120
X±ES					**3,01±0,32[a]**	**8,62±0.48**	**2,19±0,05**

Tabla 2. Indice Mitótico, Intercambio de Cromátides Hermanas e Indice de Replicación en grupo expuesto de Santiago del Estero. IM: indice mitótico; ICH: intercambio de cromátides hermanas; IR: índice de replicación; Ind.: individuo. [a] $p < 0.003$ IM Grupo control vs IM grupo expuesto.

Ind.	Sexo	Edad	Localidad	Nivel de As en agua de consumo	% Células c/ MN	Índice de daño
1	F	52 años	Urutaú	<10 µg/L	0,12	176
2	M	58 años	Urutaú	<10 µg/L	0,11	216
3	F	40 años	Urutaú	<10 µg/L	0,10	166
4	M	66 años	Urutaú	<10 µg/L	0,04	162
5	M	41 años	Urutaú	<10 µg/L	0,07	114
6	M	63 años	Urutaú	<10 µg/L	0,15	110
7	M	43 años	Urutaú	<10 µg/L	0,15	126
8	F	26 años	Urutaú	<10 µg/L	0,09	124
9	M	32 años	Urutaú	<10 µg/L	0,10	104
10	M	73 años	Urutaú	<10 µg/L	0,12	194
11	M	57 años	Urutaú	<10 µg/L	0,13	184
X±ES					**0.10±0,009**	**149,64±11,66**

Tabla 3. Test de Micronúcleo y Electroforesis de una sola Célula en grupo control de Santiago del Estero. Ind.: individuo; MN: micronúcleo.

Ind.	Sexo	Edad	Localidad	Nivel de As en agua de consumo	% Células c/ MN	Índice de daño
12	M	68 años	La Firmeza	530 µg/L	0,20	118
13	F	34 años	Sts. Lugares	378 µg/L	0,19	160
14	F	12 años	Sts. Lugares	378 µg/L	0,24	234
15	F	52 años	Sts. Lugares	620 µg/L	0,23	214
16	M	25 años	La Firmeza	530 µg/L	0,14	148
17	F	22 años	Sts. Lugares	450 µg/L	0,20	114
18	F	47 años	Sts. Lugares	450 µg/L	0,26	100
19	M	52 años	Sts. Lugares	450 µg/L	0,25	126
20	M	57 años	Sts. Lugares	620 µg/L	0,26	122
X±ES					**0,22±0.013[a]**	**148,44±15,05**

Tabla 4. Test de Micronúcleo y y Electroforesis de una sola Célula en grupo expuesto de Santiago del Estero. Ind.: individuo; MN: micronúcleo; [a] p<0.0001 Mn grupo control vs Mn grupo expuesto.

Individuo	Nivel de As en el agua de consumo	IM	ICH	IR
A	22.8 µg/L	2,20	5,440	1,925
B	42,7 µg/L	4,15	6,365	2,110
C	37,3 µg/L	5,40	4,930	1,960
D	37,3 µg/L	4,90	6,085	1,880
E	45,4 µg/L	4,50	6,600	1,915
F	50,2 µg/L	4,85	6,035	1,820
G	21,5 µg/L	5,20	9,550	1,545
H	45,4 µg/L	6,95	6,150	2,40
I	22,8 µg/L	6,00	6,100	2,080
J	45,4 µg/L	4,25	6,425	2,160
X ± ES		**4,84 ± 0,40**	**6,37 ± 0,39**	**1,97 ± 0,07**

Tabla 5. Indice Mitótico, Intercambio de Cromátides Hermanas e Indice de Replicación en grupo con bajo nivel de arsénico en Santa Fe (< 50 µg/L) IM: indice mitótico; ICH: intercambio de cromátides hermanas; IR: índice de replicación.

velocidad del ciclo celular [42-45]. Los resultados obtenidos para la población de la Provincia de Santiago del Estero coinciden con este análisis, ya que la variación en el índice mitótico entre las poblaciones expuestas a alta y a baja concentración de arsénico en el agua de bebida arrojó diferencias significativas (p < 0,003).

Existe evidencia en estudios *in vitro,* de un incremento en los valores de intercambio de cromátides hermanas inducido por el arsénico, haciéndose referencia a una alta variabilidad interindividual en la determinación de los biomarcadores [24,46]. Esta variabilidad estaría relacionada con la susceptibilidad individual en lo que se refiere al daño genético causado por el arsénico. Los factores que determinan esta susceptibilidad son tanto de origen genético como desnutrición, edad y hábitos de vida [47]. La susceptibilidad individual se pone de manifiesto en los datos presentados en este trabajo al analizar la gran dispersión existente en la determinación de los distintos biomarcadores.

En estudios sobre poblaciones que presentan sintomatologías de HACRE, se observó un incremento de los intercambios de cromátides hermanas por célula [3,41], siendo esta variación con respecto al grupo control mayor que la obtenida en el grupo de individuos asintomáticos [48]. En el presente trabajo no se han encontrado diferencias significativas en los valores de ICH entre las poblaciones analizadas. En el caso de los individuos de Santiago del Estero se observa que los valores medios de frecuencia de ICH son semejantes para ambas poblaciones, siendo significativamente elevados (p< 0,03) si se los compara con los valores históricos de nuestro laboratorio (X ± ES = 5,98 ± 1,04).

Este hecho podría deberse a distintos facto-

Individuo	Nivel de As en el agua de consumo	IM	ICH	IR
K	71,1 µg/L	6,00	8,33	2,175
L	164,2 µg/L	5,00	5,73	2,400
M	164,5 µg/L	4,20	7,25	2,355
N	83 µg/L	4,80	5,78	1,520
O	111,3 µg/L	3,50	5,85	2,315
P	118,4 µg/L	3,20	5,71	2,135
Q	77,2 µg/L	3,50	7,29	1,980
R	87,1 µg/L	4,90	5,58	2,195
S	121,0 µg/L	5,40	4,48	2,355
T	164,2 µg/L	4,85	6,31	2,090
X ± ES		**4,92 ± 0,38**	**6,23 ± 0,35**	**2,15 ± 0,08**

Tabla 6. Indice Mitótico, Intercambio de Cromátides Hermanas e Indice de Replicación en grupo con alto nivel de arsénico en Santa Fe (> 50 µg/L). IM: indice mitótico; ICH: intercambio de cromátides hermanas; IR: índice de replicación; ; Ind.: individuo.

res tales como el bajo número de individuos evaluados, los fenómenos de susceptibilidad individual y el hecho que en la localidad de Urutaú, los valores de contenido de arsénico en agua menores a 10 µg/ml, corresponden a los últimos 10 años, ya que previamente el agua de consumo tenía concentración de arsénico semejante a la de las otras localidades evaluadas.

Con el objeto de profundizar la caracterización del daño observado en el grupo Santiago del Estero, se encara la utilización de otros biomarcadores de efecto como el ensayo de electroforesis de una sola célula (Test del Cometa) y el Test del micronúcleo en células epiteliales de mucosa bucal. Los ensayos seleccionados aportan información con respecto a roturas de simple y doble cadena en condiciones alcalinas [49,50] y en el caso del ensayo de micronúcleo, permite caracterizar aneunógenos y clastógenos ya que por medio de esta metodología se detectan alteraciones numéricas y estructurales [51,52].

Los resultados obtenidos (Tablas 3 y 4) muestran que en el caso de el Test de cometa se observa un fenómeno semejante al que se produce con el ICH, o sea que los valores obtenidos para el índice de daño al ADN no son estadísticamente diferentes con respecto a los valores de la población control. a pesar de obtenerse en muchos casos valores individuales muy elevados. Esto corrobora el fenómeno de susceptibilidad individual como el principal factor en este tipo de resultados.

Es importante destacar que los valores promedio de daño al ADN determinados mediante este biomarcador en la población de Urutaú y La Firmeza son muy superiores a los valores históricos de nuestro laboratorio (X ± ES = 109,6 ± 3,35) (p < 0,04), demostrando, como en el caso del intercambio de cromátides hermanas, que la población posee un daño basal elevado por haber consumido durante mucho tiempo agua con elevado contenido arsenical. De esta manera se podría sugerir que ambas poblaciones se encuentran en riesgo a nivel genotóxico.

En el análisis de la frecuencia de micronúcleos, encontramos un incremento estadísticamente significativo en la inducción de micronúcleos (p < 0,0001) entre el grupo considerado como control y aquellos individuos que consumen agua con alto contenido arsenical. Cabe destacar que estos datos son coincidentes con los reportados en la literatura en cuanto a poblaciones expuestas mediante ingesta de agua con altos niveles de arsénico [36,53].

Sin embargo, los valores obtenidos para la frecuencia de MN en el grupo considerado como control, presentan una diferencia estadísticamente significativa (p< 0,001), cuando son comparados con los valores históricos de nuestro laboratorio (X ± ES = 0,016 ± 0,02). Nuevamente este biomarcador refleja la característica particular de este grupo de individuos, que presentan altos niveles de daño basal sin estar en los últimos 10 años expuestos a concentraciones de arsénico en el agua de bebida superior a las establecidas por nuestra legislación.

En el análisis de los datos de las poblaciones de la Provincia Santa Fe (Tablas 5 y 6), no se evidencian diferencias significativas para los biomarcadores analizados entre la población expuesta a altas concentraciones de arsénico y la no expuesta. En este caso en particular los habi-

tantes de esta localidad han sido advertidos desde hace varios años acerca de la contaminación de la napa freática y, de acuerdo al relevamiento realizado para este estudio, evita el consumo del agua de pozo de su vivienda utilizando agua potable. Este hecho se verificaría en los datos obtenidos en este estudio donde no se encuentra daño cito-genotóxico, con el diseño experimental utilizado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la exposición al arsénico en forma accidental no resulta inocua frente a una evaluación toxicogenética. Por consiguiente, es necesario considerar su potencial tóxico y encarar la toma de medidas pertinentes para la protección de la población expuesta. Se necesitan obtener respuestas en el ámbito de la Salud Pública para establecer un correcto suministro de agua potable libre de arsénico y accesible para toda la población, requerimiento mínimo e indispensable para asegurar un correcto desarrollo de las futuras generaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro, A.J. (1982) *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.* **16**: 3-5.
2. Carballo, M. A. (1987) *Medicina* **47**: 109-10.
3. Carballo, M. A. (2000) "Importancia de la Evaluación genotóxica en el Monitoreo Ambiental" Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
4. Astolfi, E., S.C. Besuschio, J.C. García Fernández, C. Guerra & A. Maccagno (1982) *"Hidroarsenicismo crónico regional endémico"*. Ed. Cooperativa General Belgrano. Buenos Aires:
5. Biagini, R.E., M.A. Salvador, R.S. de Qüerio, C.A. Torres Soruco, M. Biagini & A.D. Barrantes (1995) *Arch. Argent. Dermatol.* **45**: 47-52.
6. Ng, J., J. Wang & A. Shraim. (2003) *Chemosphere* **52**: 1353-9.
7. Gonsebatt, M.E. (2006) *"El ensayo de micronúcleos en tejidos epiteliales y su uso en la evaluación de efectos genotóxicos",* en "Genética Toxicológica". (M.D. Mudry, y M.A.Carballo, eds.). Ed. de los Cuatro Vientos. Buenos Aires, págs. 299-306.
8. Tello, E.E. (1981) *Arch. Argent. Dermatol.* **31**: 27-40.
9. Goyer, R.A. (1996) *"Toxic effects of Metals"* en "Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons" (C.D. Klaassen, M.O. Amdus & J. Doull, eds.) Ed. McGraw-Hill. USA, págs. 691-736.
10. Bertolero, F., E. Marafate, J. del Rade, R. Pietra & E. Sabbioni (1981) *Toxicology* **20**: 35-44.
11. Ahsan, H., Y.Chen, Q. Wang,V. Slavkovich, J.H. Graziano & R.M. Santella (2003) *Toxicol. Lett.* **143**: 123-31.
12. Chung, J., D. Kalman, L. Moore, M. Kosnett, A. Arroyo, M. Beeris, D. Mazunder & D. Smith (2002) *Environ. Health Persp.* **110**: 729-33.
13. Hsueh, Y, G. Cheng, M. Wu, H. Yu, T. Kuo & C. Chen (1995) *Br. J. Cancer* **71**: 109-14.
14. Hsueh, Y, H. Chiou, Y. Huang, W. Wu, C. Huang, M. Yang, L. Lue, G. Chen & C. Chen (1997) *Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**: 589-96.
15. Smith, A.H., A.P. Arroyo, D. Guha Mazunder, M.J. Kosnett, A.L. Hernandez, M. Beeris, M.M. Smith & L.E. Moore (2000) *Environ. Health Persp.* **108**: 617-20.
16. Rossman T.G., D. Stone, M. Molina & W. Troll (1980) *Environ. Mutagen.* **2**: 371-9.
17. Wan, B., R.T. Christian & S. W. Sookup (1982) *Environ. Mutagen.* **4**: 493-8.
18. Nordenson I. & L. Beckman (1982) *Hereditas* **96**: 175-81.
19. Okwi, T. & Y. Fujiwara (1986) *Mutat. Res.* **172**: 69-76.
20. IARC (1987) Monographs, Supplement 6. *Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Genetic Related Effects: An Updating of Selected.* International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
21. Lee, T. CH., N. Tanaka, P.W. Lamb, T.M. Gilmer & J.C. Barret (1988) *Science* **241**: 79-81.
22. Basu A.,J. Mahata, S. Gupta & A.K. Giri (2001) *Mutat. Res.* **488**: 171-94.
23. Schoën, A., B. Beck, R. Sharma & E. Dubé (2004) *Tox. Appl. Pharmacol.* **198**: 253-67.
24. Smith, A.H. & M.N.H. Smith (2004) *Toxicology* **198**: 39-44.
25. Rossman, T, A.N. Uddin & F.J. Burns (2004) *Tox. Appl. Pharmacol.* **198**: 394-404.
26. IARC (1980) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans Some Metals and Metalic Compounds.* Vol. 23. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, págs. 39-141.
27. Mushak, P. & A.F. Crocetti (1995) *Environm. Health Persp.* **103:** 684-9.
28. Carballo, M.A., A.M. Palermo & M.D. Mudry (2004) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **98**:139-47.
29. Rojas, E., L.A. Herrera, M. Sordo, M.E. Gonsebatt, R. Montero, R. Rodriguez & P. Ostrosky-Wegman (1992) *Anti-Cancer Drugs* **4**: 637-40.
30. Perry, P. & S. Wolff (1974) *Nature* **251**: 156-8.

31. Singh, N. P.,M.T. McCoy, R.R. Tice & E.L. Schneider (1988) *Exp. Cell Res.* **175**: 184-91.
32. Tolbert, P.E., A.M. Shy & J.W. Allen (1992) *Mutat. Res.* **271**: 69-77.
33. Rosin, M. P.(1987) *Mutat. Res.* **267**: 265-76.
34. Petres J., D. Barron & M. Hagedorm (1977) *Environ. Health Persp.* **19**: 223-7.
35. Gonsebatt, M.E., R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, G. García-Vargas, L.M. Del Razo, M.E. Cebrían & P. Ostrosky-Wegman (1992) International Seminar Procceding. *Arsenic in the Environmental and its Incidence on Health*. Univ. de Chile. Santiago, Chile, págs. 15-9.
36. Gonsebatt, M.E., L. Vega, A.M. Salazar, R. Montero, J. Blas, G. García-Vargas, L.M. Del Razo, A. Albores, M.E. Cebrían, M. Kelch & P. Ostrosky-Wegman (1997) *Mutat. Res.* **386**: 219-28.
37. Vega, L., M.E. Gonsebatt & P Ostrosky-Wegman (1995) *Mutat. Res.* **334**: 365-73.
38. Burgdort, W., K. Kurvink & J. Cervenka (1977) *Hum. Genet.* **36**: 69-72.
39. Liou, S., T. Gu & C. Chen (1996) *Cancer Epidemiol.* **5**: 103-7.
40. Lerda, D. (1994) *Mutat. Res.* **312**: 111-20.
41. Mahata, J., A. Basu, S. Ghoshal, J.N. Sarkal, A.K. Roy, G. Poddar, A.K. Nandy, A. Banerjee, K. Ray, A.T.Natarajan, R. Nilsson & A.K. Giri (2003) *Mutat. Res.* **534**: 133-43.
42. Ostrosky-Wegman, P., G. García, R. Montero, B.Pérez-Romero, R. Alvarez Chacón & C. Cortinas de Nava (1986) *Mutat. Res.* **173**: 81-7.
43. Li, J.H.& T.G. Rossman (1989) *Mol. Toxicol.* **2**: 1-9.
44. Lee- Chen, S.F., C.T. Yu, D.R. Wu & Y. Jan (1994) *Environ. Molec. Mutagen.* **23**: 116-20.
45. Ostrosky-Wegman P., M.E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega & L.A. Herrera (1991) *Mutat. Res.* **250**: 477-82.
46. Liou, S., Y. Chen, Ch. Loh, T. Yang, T. Wu, Ch. Chen & L. Hsieh (2003) *Toxicol. Lett.* **129**: 237-43.
47. Wegner,R, K. Radon, R. Heinrich-Ramm, B. Seeman, A. Riess, F. Koops, B. Poschadel & D. Szadkowski (2004) *Occup. Environ. Med.* **61**: 247-53.
48. Ghosh, P, A. Basu, J. Mahata, S. Basu, M. Sengupta, J.K. Das, A. Mukherjee, A. Sarkar, L. Mondal, K. Ray & A. Giri (2005) *Int. J. Cancer* **118**: 2470-8.
49. Angelis, K., M. Dusinska & A. Collins (1999) *Electrophoresis* **20**: 2133-8.
50. Tice, R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. Ryu & Y. Sasaki (2000) *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206-21.
51. Fenech, M. (2000) *Mutat. Res.* **455**: 81-95.
52. Boher, P.L., M.S. Filho, R.L. Paiva, I.L. da Silva & P.V. Rados (2006) *Acta Citologica* **49**: 265-72.
53. Mäki-Paakkanen, J., P. Kurttio, A. Paldy & J. Pekkanen (1998) *Environ. Mol. Mutagen.* **32**: 301-13.