
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



ARSÉNICO, PROPIEDADES Y EFECTOS

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**OPCIÓN
TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
MARÍA ELENA SANDOVAL PINTO**

**DIRECTOR
DR. ALFREDO IGNACIO FERIA VELASCO**

**ASESOR
DRA. RUTH DE CELIS CARRILLO**



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
COMITÉ DE TITULACIÓN



COORD. BIOL. 237/2011

C. MARIA ELENA SANDOVAL PINTO
PRESENTE

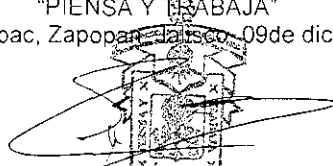
Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO** opción **Trabajo Monográfico de Actualización** con el título **“ARSÉNICO, PROPIEDADES Y EFECTOS”**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo al **Dr. Alfredo I. Feria Velasco** y como asesor a la **Dra. Ruth de Celis Carrillo**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 09 de diciembre de 2011.



DRA. TERESA DE JESUS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

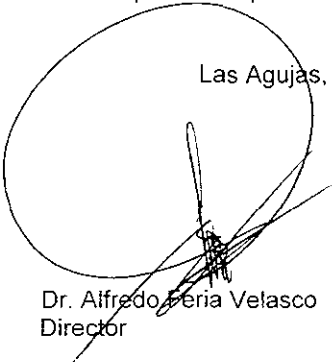

M. C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARÍO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

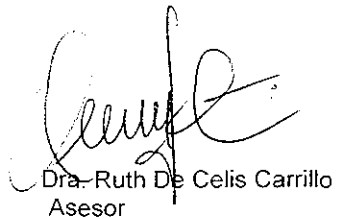
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Investigación y Estudios de Posgrado**, opción **Trabajo Monográfico de Actualización** con el título: "**MONOGRAFÍA: ARSÉNICO, PROPIEDADES Y EFECTOS**" que realizó el/la **pasante María Elena Sandoval Pinto** con número de código **303714535** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.


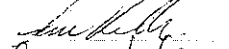
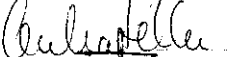

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 9 de Diciembre del 2011




Dr. Alfredo Feria Velasco
 Director



Dra. Ruth De Celis Carrillo
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. María Guadalupe Garibay Chávez		9/12/2011
M.C. Aurora Rosas Ramírez		9 Dic 2011
Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos		9 Dic 2011
Supl. Dr. Javier García Velasco		09/12/11

12/12/2011
 Vo. B.


ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE IMÁGENES	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1. CARACTERÍSTICAS	5
1.2. COMPUESTOS DE ARSÉNICO.....	6
1.2.1. <i>Compuestos inorgánicos</i>	6
1.2.2. <i>Compuestos orgánicos</i>	8
1.3. USOS DEL ARSÉNICO.....	9
2. EL ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE.....	12
2.1 CICLOS	16
2.1.1 <i>Actualización del ciclo de carácter estático</i>	19
2.1.2 <i>Arsénico en el agua</i>	22
2.1.3 <i>Arsénico en el aire</i>	22
2.1.4 <i>Arsénico en el suelo</i>	23
2.2 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL.....	23
2.3 CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO EN MÉXICO.....	26
2.3.1 <i>Normatividad</i>	26
3 PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN MEDIO AMBIENTAL	30
3.1 EXTRACCIÓN Y FUNDICIÓN DE MINERALES	30
3.2 QUEMADO DE CARBÓN.....	31
3.3 PESTICIDAS, HERBICIDAS, INSECTICIDAS Y PLAGUICIDAS	31
3.4 OTRAS FUENTES.....	33
4 EXPOSICIÓN DE PLANTAS A ARSÉNICO	34
4.1 FITOTOXICIDAD.....	35
4.2 ABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN LA PLANTA	38
4.2.1 <i>Translocación</i>	43
4.3 METABOLISMO DEL ARSÉNICO EN LAS PLANTAS.....	44
4.4 NIVELES DE ARSÉNICO EN DISTINTOS CULTIVOS.....	45
4.5 ESENCIABILIDAD DEL ARSÉNICO PARA LAS PLANTAS.....	48
5 EXPOSICIÓN DE ANIMALES Y HUMANOS AL ARSÉNICO.....	49

5.1 ENTRADA DEL ARSÉNICO AL ORGANISMO	49
5.1.1 Absorción	50
5.1.2 Distribución.....	51
5.1.3 Excreción.....	53
5.2 METABOLISMO DEL ARSÉNICO EN EL ORGANISMO	55
5.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN	67
5.4 GENOTOXICIDAD.....	71
5.4.1 Genotoxicidad <i>In vitro</i>	72
5.4.2 Genotoxicidad <i>In vivo</i>	74
5.5 CARCINOGENESIS	76
6 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO	82
6.1 ARSÉNICO TOTAL	82
6.2 COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE ARSÉNICO	83
6.3 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS	85
6.3.1 Métodos de reducción.....	86
6.3.2 Métodos de atomización.....	86
6.3.3 Estado de oxidación del arsénico.....	86
6.3.4 Concentración de ácido.....	87
6.3.5 Puesta en disolución de la muestra.....	87
6.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON CÁMARA DE GRAFITO.....	88
6.5 ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA GENERADO POR INDUCCIÓN.....	90
7 BIBLIOGRAFÍA.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Nomenclatura de diversos compuestos, orgánicos e inorgánicos, del arsénico (WHO, 1981).	7
Tabla 2.- Principales causas de la presencia de arsénico en los alimentos (Cervera, 1990).	13
Tabla 3.- Flujos de arsénico relacionados con el ciclo global del elemento. Todos los flujos se expresan como 108 g/año. (Mackenzie et al., 1979).....	17
Tabla 4.- Tiempos de residencia (años) del arsénico en diversos ecosistemas o compartimentos (Mackenzie et al., 1979).....	20
Tabla 5: Concentración de arsénico en agua, suelo, aire y alimentos	21
Tabla 6.- Contenidos de arsénico para un 50 % de reducción del crecimiento (Datos obtenidos inmediatamente después de la aplicación de arsenito sódico (Woolson, 1973a)).....	34
Tabla 7.- Niveles de arsénico en plantas de tomate. (S.N. suelo natural, S.C. suelo contaminado y L.T. límites de toxicidad).....	45
Tabla 8.- Efectos clínicos de la arsenicosis en estados sucesivos de gravedad.....	67
Tabla 9.- Resumen de los efectos sobre la salud de la exposición aguda al Arsénico en distintos sistemas	70
Tabla 10.- Reacciones de reducción de compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico (WHO, 1981).....	84

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1.- Ciclo global biogeoquímico del arsénico. Las reservas de cada compartimento y los flujos entre los compartimentos, se expresan como 108 g y 108 g/año, respectivamente (Mackenzie et al., 1979).....	18
Figura 2.- Ciclo local aire-suelo para el arsénico (WHO, 1981).	19
Figura 3.- Mapa de países en los que se han detectado problemas de	24
Figura 4.- Esquema del metabolismo del As	59

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS

Elemento químico, cuyo símbolo es As y su número atómico, 33. El arsénico se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza (cerca de $5 \times 10^{-4}\%$ de la corteza terrestre) (N.A.S., 1977). Es uno de los 22 elementos conocidos que se componen de un solo nucleido estable, As; el peso atómico es de 74.922. Se conocen otros 17 nucleidos radiactivos de As (Wildfang *et al.*, 2000).

Existen tres alótropos o modificaciones polimórficas del arsénico. La forma a cúbica de color amarillo se obtiene por condensación del vapor a muy bajas temperaturas (WHO, 1981). La b polimórfica negra, que es isoestructural con el fósforo negro. Ambas revierten a la forma más estable, la l, gris o metálica, del arsénico romboédrico, al calentarlas o por exposición a la luz. La forma metálica es un conductor térmico y eléctrico moderado, quebradizo, fácil de romper y de baja ductibilidad (N.A.S., 1977).

Al arsénico se le encuentra natural como mineral de cobalto, aunque por lo general está en la superficie de las rocas combinado con azufre o metales como Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sn. El principal mineral del arsénico es el FeAsS (arsenopirita, pila); otros arseniuros metálicos son los minerales FeAs₂ (löllingita), NiAs (nicolita), CoAsS (cobalto brillante), NiAsS (gersdorfita) y CoAs₂ (esfaltita). Los arseniatos y tioarseniato naturales son comunes y la mayor parte de los minerales de sulfuro contienen arsénico (Wildfang *et al.*, 2000). La As₄S₄ (realgarita) y As₄S₆ (oropimente) son los minerales más importantes que contienen azufre. El óxido, arsenolita, As₄O₆, se encuentra como producto de la alteración debida a los agentes atmosféricos de otros minerales de arsénico, y también se recupera de los polvos colectados de los conductos durante la extracción de Ni, Cu y Sn; igualmente se obtiene al calcinar los arseniuros de Fe, Co o Ni con aire u oxígeno (WHO, 1981). El elemento puede obtenerse por calcinación de FeAsS o

FeAs_2 en ausencia de aire o por reducción de As_4O_6 con carbonato, cuando se sublima As_4 .

El arsénico elemental tiene pocos usos. Es uno de los pocos minerales disponibles con un 99.9999+ % de pureza. En el estado sólido se ha empleado ampliamente en los materiales láser GaAs y como agente acelerador en la manufactura de varios aparatos (Ferguson y Gavis, 1972). El óxido de arsénico se utiliza en la elaboración de vidrio. Los sulfuros de arsénico se usan como pigmentos y en juegos pirotécnicos. El arseniato de hidrógeno se emplea en medicina, así como otros compuestos de arsénico. La mayor parte de la aplicación medicinal de los compuestos de arsénico se basa en su naturaleza tóxica (Wildfang *et al.*, 2000).

1.2. COMPUESTOS DE ARSÉNICO

Debido a la complejidad que en ocasiones presenta la nomenclatura de los compuestos químicos, y para evitar confusiones, en este apartado vamos a enumerar los principales compuestos derivados del arsénico, tanto orgánicos como inorgánicos, indicando su formulación correcta y algunas de las principales propiedades físico-químicas (Tabla 1) (WHO, 1981).

1.2.1. *Compuestos inorgánicos*

El arsénico pertenece al grupo V a, y las principales valencias que el elemento presenta en la naturaleza son -3, +3 y +5. El principal compuesto comercial es el óxido de As (III), As_2O_3 , que a temperaturas superiores a 1073 °C pasa a ser un dímero gaseoso de fórmula molecular As_4O_6 . Este compuesto se obtiene como un subproducto en la extracción del cobre, zinc y plomo (Crecelius *et al.*, 1974; Ragaini *et al.*, 1977). El arsénico normalmente está presente como arseniuros metálicos o como sulfuros de arsénico, que durante los diversos

tratamientos a los que se somete al cobre para su extracción y transformación se volatilizan y por condensación de estos gases se obtiene el óxido (WHO, 1981). Este compuesto presenta un punto de ebullición relativamente bajo, 465 °C, aunque puede sublimar a temperaturas inferiores a ésta.

Su solubilidad en agua es baja, un 2 % a 25 °C, sin embargo, ésta se eleva cuando se emplea como disolvente una disolución acuosa del ácido clorhídrico o una disolución de carácter básico, por ello sus soluciones comerciales son ligeramente ácidas y contienen ácido arsenioso (H_3AsO_3) (WHO, 1981).

El ácido arsénico (forma pentavalente) y el arsenioso (forma trivalente) son especies termodinámicamente estables bajo condiciones oxidantes y reductoras, respectivamente (WHO, 1981). Sin embargo, el predominio de una de las formas no implica por supuesto la no existencia de la otra.

El arseniato de plomo, el arseniato cúprico, el acetoarseniato de cobre (II) o verde de París, y el arseniato de calcio, compuestos que se utilizan como insecticidas, presentan una baja solubilidad en agua (Crecelius *et al.*, 1974; Ragaini *et al.*, 1977).

Los haluros de arsénico y la arsina no son compuestos que se encuentren libres en el medio ambiente, aunque son especies de suma importancia en el análisis químico.

Tabla 1.- Nomenclatura de diversos compuestos, orgánicos e inorgánicos, del arsénico (WHO, 1981).

Nombre (Sinónimo)	Fórmula
Arsénico Inorgánico, As (III)	
óxido de arsénico (III), trióxido de arsénico	As_2O_3 ó As_4O_6
ácido ortoarsenioso, ácido arsenioso	H_3AsO_3
ácido metaarsenioso	$HAsO_2$
(orto)arsenitos, sales del ác. ortoarsenioso	$H_2AsO_3^-$, $HAsO_3^{2-}$,

	AsO_3^{3-} ,
cloruro de arsénico (III), tricloruro de arsénico	AsCl_3
sulfuro de arsénico (III), trisulfuro de arsénico	As_2S_2
Arsénico inorgánico, As (V)	
óxido de arsénico (V), pentóxido de arsénico	As_2O_5
ácido ortoarsénico, ácido arsénico	H_3AsO_4
ácido metaarsénico	HAsO_3
(Orto)arseniato, sales del ác. arsénico	H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} , AsO_3^{3-}
Arsénico orgánico	
ácido metilarsínico, ácido metanoarsónico	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$
ácido dimetilarsónico, ácido cacodílico	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
óxido de trimetilarsina	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
metilarsina	CH_3AsH_2
dimetilarsina	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$
trimetilarsina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}$
ácido arsanílico, ác. p-aminobenceno-arsónico	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{AsO}(\text{OH})_2$
ácido 4-nitrofenilarsónico, ác. p-nitrofenilarsónico	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{AsO}(\text{OH})_2$
arsenobetaína	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COOH}$
arsenocolina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
dialquilcloroarsina	R_2AsCl
alquildicloroarsina	RAsCl_2

1.2.2. Compuestos orgánicos

El arsénico está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico, debido a la elevada estabilidad del enlace carbono-arsénico bajo las condiciones medioambientales normales (pH y potencial redox).

Como consecuencia de la actividad biológica, se producen diversos compuestos de arsénico metilados como son la di y trimetilarsina (Creelius *et al.*, 1974; Ragaini *et al.*, 1977). Estas especies tras una oxidación se transforman en los ácidos metilarsónico y dimetilarsónico, compuestos que forman sales solubles con los metales alcalinos.

Mediante una reducción estos ácidos pueden volver a su forma primitiva de arsenias. Cabe mencionar que en los últimos años se han encontrado en organismos marinos compuestos tales como la arsenobetaína y la arsenocolina (WHO, 1981).

1.3. USOS DEL ARSÉNICO

Comercialmente, el As elemental se obtiene como subproducto del tratamiento de otros minerales metálicos como el oro, la plata y el cobre, o por calentamiento de la arsenopirita (FeAsS), en el que se produce As en estado puro. En la naturaleza, el As se encuentra como constituyente de una gran variedad de minerales usualmente combinado con minerales sulfurados como el oropimente (As_2S_3) y el rejalgar (AsS). Éstos han sido usados desde hace siglos como cosméticos debido a la coloración amarilla del oropimente y anaranjada del rejalgar.

Aunque el As en estado puro no es tóxico, muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de As son extremadamente tóxicos y han sido utilizados como insecticidas y plaguicidas. A modo de ejemplo, el arsenito de sodio (NaAsO_2) es efectivo contra la langosta, el trióxido de arsénico (As_2O_3) es un potente veneno para roedores, y el arsenito de calcio $\text{Ca}(\text{AsO}_4)_2$ se usa como plaguicida contra el gorgojo del algodón y el escarabajo de la patata. Los compuestos de As conocidos como adamsita (cloroarsina difenilamínica) y lewisita (B-clorovinildicloroarsina) se utilizaron como gases venenosos a partir de la primera guerra mundial. El As se

utiliza también en la fabricación de vidrio y como preservante de la madera, además de utilizarse comercialmente en aleación con el plomo para la fabricación de baterías de almacenamiento y en la fabricación de balas. Recientemente, el As se está utilizando para fabricar semiconductores de arseniuro de galio, para su uso en diodos emisores de luz y en células solares.

Todas las aleaciones de As son venenosas en altas dosis pero, a pesar de su demostrada toxicidad, el As también se ha utilizado como agente terapéutico frente a diversos procesos patológicos. El uso terapéutico del As se conoce desde unos 5 siglos A.C, cuando Hipócrates recomendaba su uso para tratar los abscesos ulcerados. Posteriormente, los médicos han prescrito preparaciones de As para tratar alteraciones de la piel, tuberculosis, asma y lepra. Durante la Edad Media se usaron diversos compuestos de As (i) como medicinas y también para producir venenos. Durante el siglo XIX la solución de Fowler (a base de As) se utilizó como tratamiento contra la leucemia y la dermatitis. A dosis terapéuticas, los compuestos de As se han mostrado eficaces para combatir diversas enfermedades tales como la anemia, el asma, el reumatismo, la neuralgia, el cólera, la malaria, la psoriasis y la sífilis; utilizándose también como estimulante general en casos de debilidad. Sin embargo, basándose en la evidencia acumulada sobre la toxicidad y la carcinogenicidad de los compuestos de As(i), muchos de sus usos médicos se han reducido.

En 1905 se demostró que algunos compuestos de arsénico eran eficaces contra la tripanosomiasis o enfermedad del sueño. Esto condujo a un estudio sistemático del uso terapéutico y de las propiedades del As, liderado por Paul Ehrlich quien recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908 (Tong *et al.*, 2001). Ehrlich sintetizó un compuesto conocido como salvarsán o 606, que resultó ser extraordinariamente efectivo contra la sífilis y otras enfermedades infecciosas como la frambesia y la disentería amébrica (causadas por protozoos). Ehrlich mantuvo la teoría de que los compuestos sintéticos podían matar los parásitos sin causar serios daños al hospedero, iniciándose así el desarrollo de la

quimioterapia. Hoy el As es considerado obsoleto en su uso como tratamiento de la sífilis, habiéndose reemplazado por antibióticos más eficaces, pero todavía se utiliza contra la amebiasis y en estados avanzados de la enfermedad del sueño.

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

2. EL ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE

Sus formas minerales solubles, básicamente representadas por el anhídrido arsénico As_2O_3 , utilizado en numerosos crímenes, son fácilmente absorbidas por el intestino (Derache, 1990).

El arsénico es un elemento ubicuo, se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre (ocupa el vigésimo lugar en la lista por orden de abundancia decreciente). Se suele presentar en combinación con otros elementos ($FeAsS$, As_2S_3 , As_2S_2 , etc.), siendo un constituyente natural de los suelos (su concentración media se sitúa entre 1 y 2 ppm (N.A.S., 1977)).

Compuestos inorgánicos importantes de arsénico son el tricloruro y varios arseniatos, tales como, arseniato de plomo, acetoarseniato de cobre y el hidruro gaseoso, arsina (AsH_3). Entre los compuestos orgánicos de arsénico de interés destacan los ácidos monometilarsónico y dimetilarsónico, la arsenobetaína y la arsenocolina.

Las principales causas de la presencia de arsénico en los alimentos se resumen en la Tabla 2 (Cervera, 1990). El arsénico se encuentra omnipresente en los alimentos, ya que cantidades mínimas del mismo se incorporan por contaminación.

Los alimentos de origen vegetal y animal presentan contenidos de As relativamente bajos. Sin embargo, los alimentos de origen marino muestran contenidos de contaminante más altos que el resto, de forma que la cantidad total de arsénico ingerida por el hombre, depende de la cantidad de dichos alimentos en su dieta, pudiéndose alcanzar contenidos máximos de hasta 40 $\mu g/g$ (Cervera, 1990).

Los alimentos llegan al consumidor como producto final de una larga cadena de producción, preparación y procesado durante la cual pueden ser contaminados por elementos metálicos. Estos elementos se encuentran presentes en toda la biosfera, corteza terrestre, suelos, aguas, atmósfera, en todos los seres vivos de la naturaleza y, en consecuencia, en los elementos.

Los minerales son indispensables para el organismo, no sólo desde el punto de vista cuantitativo sino también cualitativo: intervienen en la constitución de los tejidos y en la regulación hídrica. Los oligoelementos son necesarios en cantidades muy pequeñas, inferiores al miligramo por día; sin embargo, algunos minerales tienen una importancia vital en los sistemas enzimáticos.

Tabla 2.- Principales causas de la presencia de arsénico en los alimentos (Cervera, 1990).

Residuos de usos industriales:
- Producción de aceros especiales
- Fabricación de pinturas, vidrio y esmaltes.
Residuos de usos agrícolas y áreas relacionadas:
- Herbicidas, fungicidas.
- Insecticidas, rodenticidas.
- Fosfatos que contienen arsénico.
Suplementación mineral de los piensos:
- Utilización de ácido arsenioso en la alimentación de cerdos y aves de corral para promover su crecimiento.
Residuos de usos farmacéuticos:
- Utilizado en el tratamiento de enfermedades parasitarias.
- Se han usado compuestos organoarsenicales en el tratamiento de sífilis.
Residuos emitidos directamente a la atmósfera:
- Gases de combustión del carbón y gases industriales.

Entre los macroelementos podemos destacar el sodio, potasio, calcio, fósforo, magnesio, azufre, hierro y zinc; y entre los oligoelementos resaltan el yodo, flúor, cobre, cobalto, cromo, manganeso y selenio. Entre éstos últimos podemos incluir como elementos minoritarios, al arsénico que tiene una función en la fosforilación, el cadmio (antagonista del zinc), el molibdeno, el vanadio y el níquel (Derache, 1990).

Las concentraciones características de los elementos metálicos se deben mantener en el organismo humano entre límites muy estrechos, variables de uno a otro elemento, pero siempre a niveles de traza ($\mu\text{g/g}$) o ultratrazas (ng/g), por lo que reciben la denominación genérica de elementos "traza". De otro modo, el crecimiento, salud y fertilidad del hombre se alteran. El hombre sano regula suficientemente la ingesta de los alimentos mediante la sensación del hambre o de saciedad.

En el caso de los elementos traza, este control no existe y los resultados sólo son visibles algunos años más tarde. Diversos elementos traza son esenciales para nuestra salud, su deficiencia en las dietas puede provocar la alteración de una función biológica que pasa de un valor óptimo a un subóptimo.

Esta alteración se corrige cuando se proporciona un suplemento que permite alcanzar de nuevo los niveles fisiológicos óptimos. Otros elementos, entre los que se encuentra el arsénico (metaloide), no tienen una función probada en el metabolismo humano, por lo que su ingestión continua, aún en bajas concentraciones, durante largos períodos de tiempo, puede originar el que se manifiesten sus efectos toxicológicos, produciéndose cambios fisiológicos y desórdenes estructurales. Se ha comprobado en ensayos con animales que los efectos de un aporte subóptimo de elementos traza aparecen al cabo de dos o tres generaciones. Por otra parte, estos hechos adquieren especial importancia en algunos grupos de población que ingieren durante largos períodos de tiempo

dietas muy reiterativas, como por ejemplo: recién nacidos o enfermos sometidos a nutrición parenteral total (Cervera, 1990).

La toxicidad de los elementos traza puede producir alteraciones diversas en los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y en las funciones hematopoyéticas y renal, dependiendo la severidad de la manifestación clínica de la duración e intensidad de la exposición. Todo ello da lugar a distintos procesos patológicos, como disfunciones renales, hipertensión, arteriosclerosis, inhibición del crecimiento, desmineralización ósea, supresión de la boca, estómago e intestino. Producen por otra parte efectos abortivos, trastornos psicomotores, irritabilidad y dolores de cabeza.

Los elementos traza tienen también, efectos teratógenos induciendo desarrollos anormales en el feto y malformaciones genéticas, debido a sus efectos genotóxicos, y a que atraviesan la placenta, produciendo mutaciones somáticas y germinales, alteraciones cromosómicas y cambios en la membrana. Estos efectos pueden tener lugar a muy bajas dosis, ya que los elementos traza se acumulan en el feto, alcanzándose de este modo concentraciones más elevadas que en la madre.

El riesgo de contaminación por alimentos contaminados por arsénico se ilustró a principio de este siglo por una etiología desgraciadamente célebre citada en Inglaterra en el Lancashire y Staffordshire, que causó más de 6000 víctimas con 70 muertos (Derache, 1990).

Estos accidentes estaban asociados al consumo de cerveza contaminada por arsénico, que provenía del ácido sulfúrico, muy impuro, utilizado en la fabricación de glucosa, por hidrólisis del almidón. La glucosa así obtenida, que contenía varios centenares de ppm de arsénico, determinaba un contenido de 5 a 20 ppm en la cerveza, cantidad que podía determinar bastante rápidamente la aparición de un polineuritis arsenical clásica. De hecho, se piensa que antes de

descubrir esta etiología en 1900, varios centenares de casos de fatal desenlace se atribuían por error a una neuritis alcohólica.

2.1 CICLOS

En los últimos años, y probablemente debido al espectacular auge que ha experimentado el sentimiento ecologista, se han propuesto diferentes ciclos para el arsénico, bien para ecosistemas aislados o bien para sistemas globales. Pero antes de pasar a considerar un ciclo estimativo global, parece conveniente el estudio de las magnitudes de los diferentes flujos de transferencia de arsénico a lo largo y ancho de la superficie terrestre.

En la Tabla 3 (Mackenzie *et al.*, 1979), se aprecia como para el arsénico, las emisiones naturales son menores que las emisiones de carácter antropogénico (la proporción entre las emisiones industriales y el contenido natural del elemento en la atmósfera es menor que la unidad).

El arsénico es lanzado a la atmósfera en cantidades significativas desde plantas generadoras de energía por quemado de carbón; siendo estas emisiones en estado gaseoso debidas a los bajos puntos de ebullición que presenta el arsénico y sus derivados. Por tanto, también se producirá este tipo de fenómeno en procesos de carácter vulcanístico y en el quemado de vegetación. A temperatura ambiente el arsénico se libera a la atmósfera como compuestos volátiles, producto de la metilación biológica. Las entradas estimadas en la atmósfera procedentes de actividades industriales, 780 108 g/año, son elevadas si las comparamos con los procedentes de la minería, 460 108 g/año o con el arsénico contenido en el polvo volcánico o continental, 28108 g/año.

Tabla 3.- Flujos de arsénico relacionados con el ciclo global del elemento. Todos los flujos se expresan como 108 g/año. (Mackenzie *et al.*, 1979).

Elemento	Minería	Emisiones		Contenido		E_a/E_n
		Emisiones Polvo	Antropogénicas (E_a)	Naturales (E_n)	Ríos	
As	460	28	780	2900	3000	0.3
Hg	89	0.4	110	410	50	0.3
Zn	58000	360	8400	10000	25000	0.8
Cu	71000	190	2600	2600	11000	1.0
Fe	600000	280000	110000	49000	9900000	2.2

Mackenzie *et al.* (1979) propusieron un ciclo biogeoquímico global (Figura 1) para describir el papel del arsénico en cada uno de los ecosistemas fundamentales así como los flujos que entre ellos se establecen, basándose en la recopilación y evaluación de multitud de datos procedentes de muy diversas fuentes.

En medios reductores como son los sedimentos, el arseniato es reducido a arsenito y éste mediante metilación y oxidación es transformado en compuestos tales como los ácidos metil y dimetilarsónico (Figura 4). Diversos microorganismos como hongos, bacterias y levaduras, transforman estos ácidos anteriores en derivados metilados de la arsina, trimetilarsina o dimetilarsina, que pueden emitirse a la atmósfera. Según Mackenzie *et al.* (1979) 210 108 gramos de arsénico se pierden anualmente en la atmósfera desde la superficie terrestre debido a estos procesos.

El arsénico comercial se obtiene por recuperación y purificación de gases ricos en el elemento, procedentes de los procesos de extracción y fundición de minerales de cobre, zinc y plomo. La cantidad finalmente recuperada representa únicamente un pequeño porcentaje del contenido total de arsénico en estos minerales. De forma que una gran fracción del elemento no recuperado se deja escapar a la

atmósfera, suponiendo 455 108 g/año. Mientras que la emisión debida al tratamiento y procesamiento de minerales sulfurados representa 600 108 g/año.

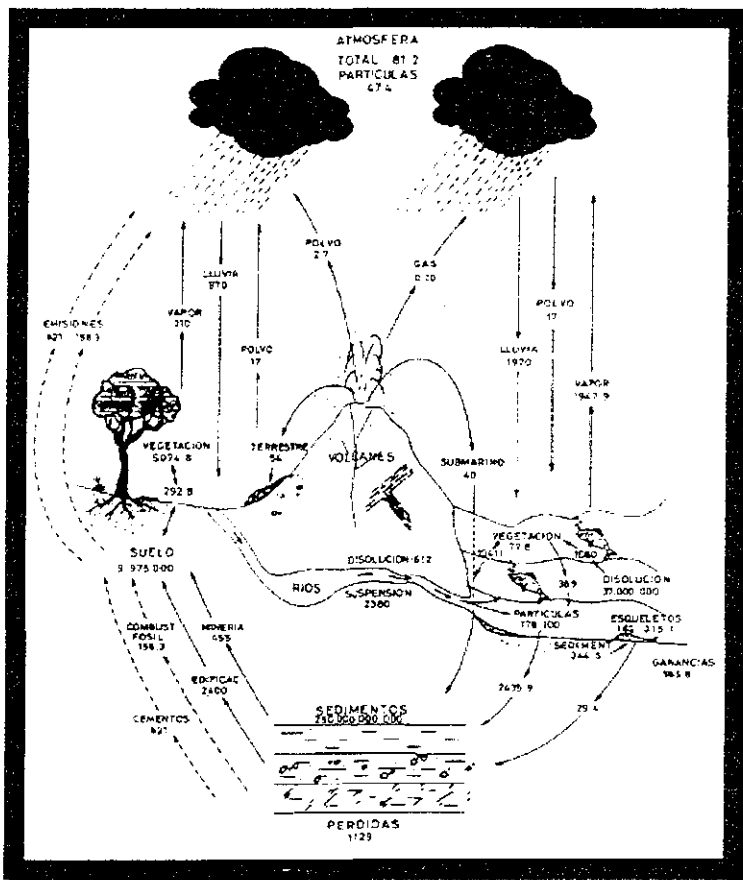


Figura 1.- Ciclo global biogeoquímico del arsénico. Las reservas de cada compartimento y los flujos entre los compartimentos, se expresan como 10⁸ g y 10⁸ g/año, respectivamente (Mackenzie *et al.*, 1979).

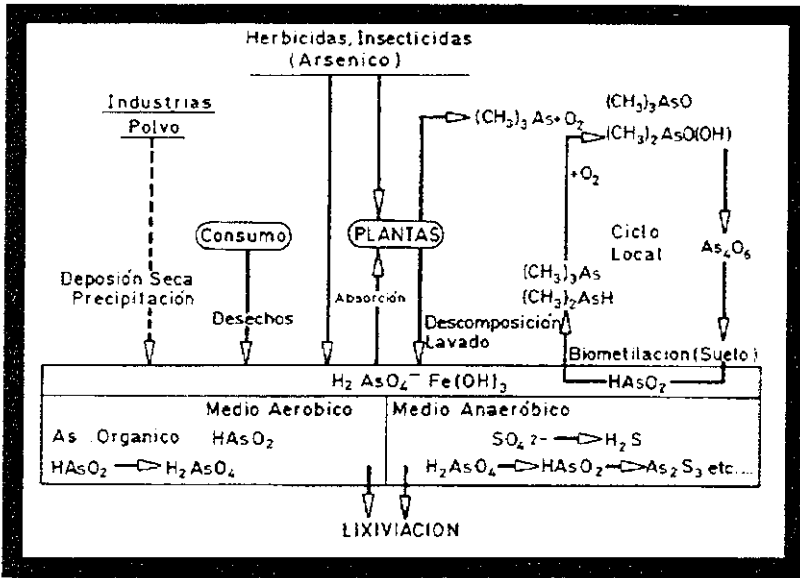


Figura 2.- Ciclo local aire-suelo para el arsénico (WHO, 1981).

2.1.1 Actualización del ciclo de carácter estático

La actividad humana ha modificado el ciclo global para el arsénico (Figura 1), produciendo pérdidas de As de los sedimentos, 1129 108 g/año, y enriqueciendo los suelos, 660 108 g/año y los océanos, 566 108 g/año.

La atmósfera se considera como un compartimento en régimen estacionario, es decir, sin pérdidas ni ganancias de arsénico. Este hecho se justifica si pensamos en el hecho de que las formas volátiles de As emitidas a la atmósfera son rápida y totalmente disueltas en el agua de lluvia y eliminadas cuando esta se precipita sobre la superficie terrestre. El tiempo de residencia de estos compuestos en la atmósfera es de 10 días, aproximadamente el mismo espacio temporal que permanece el agua en este compartimento.

En la actualidad, existe un elevado flujo de arsénico desde los ríos hacia los océanos como consecuencia de la fuerte erosión y degradación que está sufriendo la superficie continental.

Gran cantidad del contaminante se transporta como material en suspensión, y una vez que se alcanza el océano se incorporan a los sedimentos oceánicos, aunque una parte del arsénico puede incorporarse al agua.

En la Tabla 4 (Mackenzie *et al.*, 1979) se recogen los tiempos de residencia estimados para el arsénico en distintos compartimentos o ecosistemas individuales. En ella se observa como el tiempo de residencia del elemento contaminante en la vegetación terrestre y oceánica es similar al del carbono orgánico en estos mismos compartimentos, de modo que no se dan acumulaciones significativas de arsénico en la vegetación, aunque algún organismo vegetal en particular pueda acumular puntualmente el contaminante.

Tabla 4.- Tiempos de residencia (años) del arsénico en diversos ecosistemas o compartimentos (Mackenzie *et al.*, 1979).

Compartimento	Arsénico	Selenio	Mercurio
Sedimentos	99.800.000	93.500.00	90.800.000
Océano (disolución)	9.400	2.200	880
Suelo	2.400	4.600	280
Vegetación Terrestre	17	17	22
Vegetación Oceánica	0,07	0,07	0,12
Atmosfera (Total)	0,03	0,03	0,1

Por último indicar que aunque la actividad humana ha desplazado del equilibrio el ciclo global estacionario descrito con anterioridad para el arsénico, y debido a que los tiempos de residencia del contaminante en los suelos, océanos y sedimentos son enormes si los comparamos con el espacio temporal ocupado por la vida humana, la posibilidad de una acumulación de arsénico en alguno de estos ecosistemas hasta niveles tóxicos está totalmente injustificada, aunque es cierto que puede ocasionar problemas puntuales a tener en cuenta. A continuación se analizan brevemente las diferentes vías de exposición poblacional al As y en la Tabla 5 se presenta un resumen de algunos datos publicados de la concentración de As en agua, suelo, aire y alimentos.

Tabla 5: Concentración de arsénico en agua, suelo, aire y alimentos

Agua (µg/L)		
Medio analizado	Medio no Contaminado	Medio Contaminado
Superficial	< 10	500
Subterránea	1-2	300
Suelo(mg/kg)		
Suelo	5(rango de 1 a 40)	
Zonas con uso de pesticidas con As		50-500
Refinerías mineras contaminantes		> 27.00
Refinerías y uso de pesticidas con As		20.100-35.500
Aire (ng/m³)		
Área rural	0,02-4	
Área urbana	0,04	3-200
Área industrial		> 1000
Alimentos (ng As/Kg)		

Alimentos	< 1,0	3.000,0
Peces marinos	64,7	291,9
Hojas	47,9	134,9
Bulbos	1,9	124,8
semillas	16,0	22,7

2.1.2 Arsénico en el agua

El As está presente en el agua por la disolución natural de minerales de depósitos geológicos, la descarga de los efluentes industriales y la sedimentación atmosférica. El As en el agua, se encuentra generalmente como especie inorgánica y, mientras que en las aguas superficiales se encuentra mayoritariamente en forma de As^{+5} , en las aguas subterráneas se encuentra como As^{+3} (Basu *et al.*, 2001). La presencia de formas orgánicas de As es, en general, poco significativa y en el proceso de tratamiento de aguas estas especies organoarsenicales se consideran de poca importancia en comparación con las especies de As(i). En las aguas superficiales de un ambiente no contaminado, los niveles de As pueden llegar a ser de 10 $\mu g/L$ y en aguas superficiales contaminadas pueden aumentar hasta 5 mg/L. En cuanto a las aguas subterráneas, en zonas no contaminadas el valor traza es de 1 a 2 $\mu g/L$ y supera los 3 mg/L en zonas contaminadas, llegando a superar en casos extremos los 6 mg/L en aguas de consumo humano, tal y como ocurre en Bangladesh (Morgan, 2001).

2.1.3 Arsénico en el aire

En el proceso de refinamiento del cobre y de la plata, el As se libera al ambiente en pequeñas partículas, que pueden ser inhaladas o absorbidas por la piel y las mucosas al depositarse sobre ellas, aumentando así la exposición de los trabajadores y de los residentes en zonas industriales o mineras. El As particulado se recupera y purifica para su venta, ya que se utiliza principalmente como

conservante de la madera. En zonas libres de contaminación, el As se presenta en algunos ng/m^3 y en zonas contaminadas este valor supera los 1.000 ng/m^3 (Morgan, 2001).

2.1.4 Arsénico en el suelo

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

2.2 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

El arsénico tiene una amplia distribución en la naturaleza, estando presente en la tierra, el aire y el agua. Es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre, estando ampliamente difundido en las rocas ígneas y sedimentarias. En el ambiente el As se encuentra combinado con oxígeno, cloro y azufre formando compuestos inorgánicos. En animales y plantas se combina con carbono e hidrógeno, formando compuestos orgánicos. La contaminación ambiental por As puede aumentar debido a diversas actividades humanas tales

como la minería, los procesos industriales en los que se usa el carbón como fuente de energía, la industria del vidrio y la agricultura (Léonard y Lauwerys, 1980).

Son cada vez más los países en los que se conocen problemas de arsenicismo, entre los que destacan en orden alfabético Argentina, Bangladesh, Bolivia, Canadá, Chile, China, EEUU, Eslovaquia, Hungría, India, Japón, México, Mongolia, Perú, Polonia, Rumania, Tailandia y Taiwan (Santolaya *et al.*,1995; Benko *et al.*, 1999; Chien *et al.*, 1999; Aposhian *et al.*, 2000a y b; Basu *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2001), entre otros. En la Figura 3 se presenta un mapa en el que se destacan los países en los que se han detectado problemas de arsenicismo.

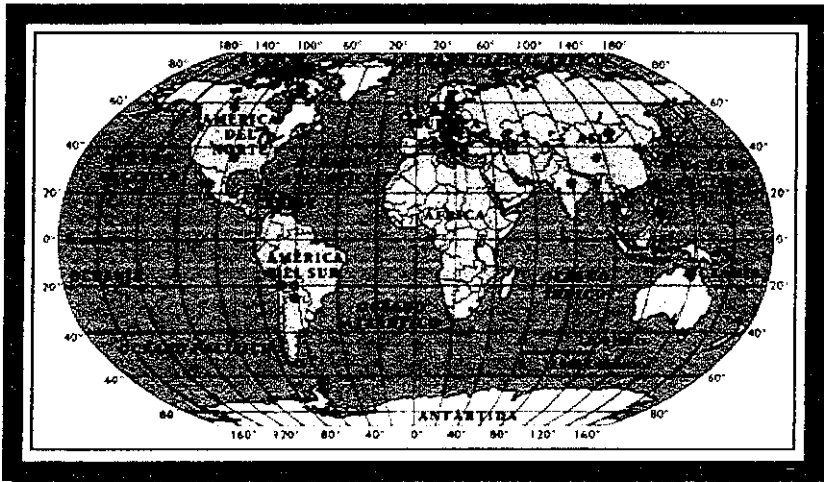


Figura 3.- Mapa de países en los que se han detectado problemas de Arsenicismo. (Santolaya *et al.*,1995)

- Bangladesh. La población de este país se calcula en 120 millones de habitantes. Es un país en pobreza extrema y por tanto carente de sistemas de salud que puedan proporcionar datos reales pero se sabe que el área

afectada que comprende 150,000 km², las concentraciones de arsénico alcanzan los 25 µg/L. (Anawar, et. al. 2003)

- ▣ Taiwán. El área afectada comprende 4000 km² la concentración de arsénico varía de 0.1 a 18 µg/L. Las manifestaciones más abundantes son el síndrome del pie negro, cáncer y problemas hepáticos. Se encuentra mayoritariamente como As⁺³. (Smedley y Kinninburgh, 2002)

- ▣ Mongolia. El área afectada es de aproximadamente 30,000 km² en la región de Ba Men y la llanura de Tumet-cuenca donde la concentración de arsénico es hasta 24 µg/L. El arsénico está mayoritariamente como As⁺³. (Smedley y Kinninburgh, 2002)

- ▣ Norte de China. Las provincias afectadas son principalmente Xinjiang y la cuenca de Dzungaria y Shanxi abarcando un área de 38,000 km². Las concentraciones varían de 0.4 a 12 µg/L en pozos profundos y en pozos superficiales 0 a 0.68 µg/L. Las concentraciones más altas de arsénico se asocian a aguas artesianas obtenidas en sondeos profundos (0.4-7.5 µg/L) en contraste con los pozos superficiales donde se han obtenido valores <0.1 µg/L. (Wang y Huang, 1994).

- ▣ Vietnam. El área afectada abarca principalmente el delta del río Rojo 1,200 km² los rangos de concentración de As alcanza en algunas regiones 30 µg/L. Esto debido aparentemente a las condiciones fuertemente reductoras, alta alcalinidad, y concentraciones altas de Fe, Mn y NH₄, así como alta salinidad en el acuífero superficial. (Berg, et al., 1994)

- ▣ Chile. El área afectada abarca las regiones de Antofagasta y Coquimbo 125,000 km² el rango de concentración de arsénico van de los 1 a 10 µg/L mayormente en las regiones de Antofagasta y Coquimbo, la mayor parte del arsénico en el agua se encuentra como As⁺⁵. (Sancha y Castro, 2001)

- ▣ Argentina. El área afectada mayormente abarca la llanura Chacopampeana de aproximadamente 100,000 km² las concentraciones de arsénico en algunas regiones alcanza hasta los 53 µg/L la mayor parte del arsénico en el agua se encuentra como As⁺⁵. (Smedley y Kinniburgh, 2002)

- ▣ Estados Unidos. Los estudios realizados demuestran que existen altas concentraciones de arsénico principalmente en los estados de Nevada, California y Arizona. Afecta 350.000 km² la concentración alcanza los 26 µg/L en Nevada y California. (Del Razo, *et al.*, 1994)

2.3 CONTAMINACIÓN DE ARSÉNICO EN MÉXICO

En México la Norma Oficial establece como límite 0.5 µg/L de arsénico para agua potable (NOM-127-SSA1-1994), sin embargo, la población expuesta a beber agua con niveles de arsénico que ponen en riesgo su salud asciende a más de 8 millones de habitantes, localizados principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Sonora y Jalisco entre otras. El área afectada es de más 4000 km² mayormente en la región lagunera, las concentraciones arsenicales pueden alcanzar 6.2 µg/L. Debido a las condiciones oxidantes. pH entre 6.3 y 8.9 la mayor parte del arsénico en el agua se encuentra como As⁺⁵ (Del Razo, *et al.*, 1994; Wyatt, *et al.*, 1998; Espinoza y Lugo, 2006).

2.3.1 Normatividad

En este rubro, en nuestro país no hay más antecedentes que la adopción de los límites establecidos en Estados Unidos sin que se hayan hecho investigaciones pertinentes para tomar una decisión. A su vez, este límite fue establecido en 1942 por consenso entre un grupo de científicos y permanece vigente hasta la fecha. Existen en nuestro país las normas para aguas residuales y agua potable, y aunque también se cuenta con las dependencias

gubernamentales encargadas de que se cumplan, no hay información disponible de que se estén llevando a cabo, ni si cuentan con equipo suficiente para llevar un control sistemático de empresas contaminantes o de organismos encargados del agua potable.

A continuación se citan las normas establecidas al respecto:

a) NOM-127-SSA1-1994.

La ley que regula el contenido de arsénico en agua potable es la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización”.

1.- Objetivo y campo de aplicación.

Esta Norma Oficial Mexicana establece los límites permisibles de calidad y los tratamientos de potabilización del agua para uso y consumo humano, que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados o cualquier persona física o moral que la distribuya, en todo el territorio nacional.

En el punto 4.3 se presenta una Tabla que establece el límite permisible para varios elementos, y en el segundo renglón indica que el límite permisible para arsénico es de 0.05 µg/L, es decir, 50 ppb (NOM-127-SSA1-1994). La fecha de emisión de esta norma fue del 30 de noviembre de 1995, siendo Director General de Salud Ambiental el Sr. Gustavo Olaiz Fernández. Se publicó en el diario oficial de la federación CVIII 13, 18 de enero de 1996, p.6.

b) NOM-117-SSA1-1994.

La ley que determina el método oficial de prueba para la determinación de arsénico en agua es la NOM-117-SSA1-1994. "Bienes y Servicios, método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica" (NOM-117-SSA-1-1994).

Fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de junio de 1995 para ser efectiva a partir de los treinta días después de su publicación.

c) NOM-CCA-031-ECOL/1993.

Esta norma oficial mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes entre los que se incluye arsénico en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios el tratamiento de aguas residuales los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal, indica que el máximo permisible para arsénico es de 0.5 µg/L (NOM-CCA-031-ECOL/1993). Se publicó en el diario oficial del 14 de octubre de 1993 para ser aplicada en las mismas condiciones que la anterior norma.

d) EPA-815-F-00-007.

Para los Estados Unidos de Norteamérica, la dependencia que reglamenta la calidad del agua potable es la Environmental Protection Agency (EPA). Office of Water, y en la norma EPA-815-F-00-007 de abril del 2000 aparece en el cuadro de contaminantes, en el segundo renglón el arsénico y la concentración permisible establecida en 0.05 µg/L o sea 50 ppb (EPA-815-F-00-07, 2001).

e) EPA-816-K-02-018.

La reforma más reciente data del 22 de febrero del 2002 en que se aprobó esta norma, y en ella se establece que el nuevo límite para la concentración de arsénico para agua potable es de 0.1 µg/L (EPA-816-K-02-018).

La contaminación ambiental de las aguas con As puede ocurrir cuando estas se filtran a través de suelos que tienen altas concentraciones del elemento en forma natural o de manera antrópica. El agua tiene la capacidad de distribuir el As a otros focos secundarios de exposición. Los alimentos que están en contacto con altas concentraciones de As en alguna fase de su producción pueden concentrar el elemento, convirtiéndose en vías alternativas de exposición poblacional. Sin embargo, la mayor vía de exposición de la población humana al As ocurre a través del arsénico disuelto en agua.

3 PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN MEDIO AMBIENTAL

Existen tres fuentes principales de contaminación de arsénico en el medio ambiente; fundición de metales, quemado de carbón y el uso de pesticidas que en su composición contengan arsénico (Lepp, 1981).

3.1 EXTRACCIÓN Y FUNDICIÓN DE MINERALES

La existencia de arsénico en minerales de zinc-plomo, de cobre y su presencia en muchas piritas son causa de contaminación por arsénico en el entorno de los sitios de fundición y tratamiento de los minerales, debido a la volatilización de algunos compuestos durante el proceso de fundición (Crecelius *et al.*, 1974; Ragaini *et al.*, 1977). La mayoría de estas emisiones gaseosas se dan en forma de trióxido, el cual forma ácido arsenioso al disolverse en agua. Los minerales auríferos también contienen altas concentraciones de arsénico, principalmente como arsenopirita, desembocando en problemas de polución cerca de las minas de oro (O'Toole *et al.*, 1971; Rosehart y Lee, 1973; Jervis y Tiefenbach, 1979).

El polvo y los gases emanados desde las operaciones de fundición han contaminado suelos y plantas, variando los grados según la distancia desde la zona de muestreo al lugar de polución, existencia de invemaderos, altura, etc. De este modo, suelos superficiales cercanos a fundiciones de cobre o plomo presentan concentraciones que oscilan entre las 260-380 ppm de arsénico; niveles de contaminación que provocan o conllevan contenidos de aproximadamente 60-80 ppm de arsénico en planta (O'Toole *et al.*, 1971).

En la actualidad y a lo largo de todo el mundo, se encuentran depósitos de desechos mineros y escorias de fundiciones que contienen grandes cantidades de arsénico y metales pesados asociados. De tal forma, que *Deschampsia cespitosa*

cultivada en este tipo de sustrato, puede almacenar hasta 5000 ppm; hojas de *Mature Agrostis tenuis* acumularon más del 1 % del contaminante presente en el suelo. Pero los valores principales en hierbas y diversos cultivos, se encuentran alrededor de 1000 y 3000 ppm (peso seco) (Porter y Peterson, 1975). Por tanto, estos sustratos soportan un empobrecimiento y una reducción en la flora, que además ha debido desarrollar una tolerancia al arsénico en los últimos tiempos.

3.2 QUEMADO DE CARBÓN

El arsénico aparece ampliamente en el carbón como arsenopirita (Swaine, 1977) y se da como trióxido en las emisiones desde las plantas carboníferas (Bencko y Symon, 1977). La concentración de arsénico en el carbón de Estados Unidos, Australia y Gran Bretaña varía entre 0.5 y 93 mg As/kg (Swaine, 1977; Lim, 1979) siendo el americano el de mayores valores. El carbón marrón de Checoslovaquia puede contener más de 1.500 mg As/kg (Bencko y Symon, 1977). Las partículas de polvo aerotransportadas pueden contener más de 1700 ppm de arsénico; habiéndose hallado elevados niveles de este elemento contaminante en suelos recogidos alrededor de una estación generadora (Temple *et al.*, 1977).

3.3 PESTICIDAS, HERBICIDAS, INSECTICIDAS Y PLAGUICIDAS

Desde el siglo diecinueve hasta la mitad del siglo veinte los arsenicales inorgánicos fueron usados como pesticidas generales en huertos y cultivos de patatas. El arseniato de plomo fue usado para el control de insectos en huertos y como pesticida en la lucha contra el agusanado de manzanas y peras (*Laspeyresia pomonella*) y en la actualidad sigue empleándose por coadyuvar a la acción de los modernos fungicidas (endureciendo la piel, no perjudicando a los depredadores de la araña roja, pulgones y otras plagas).

El arseniato de calcio fue utilizado como insecticida en algodón y tabaco, siendo empleado también en espolvoreo contra el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), cuca de la alfalfa (*Colaspidema*), aunque su empleo ha decrecido considerablemente.

El verde de París (acetoarsenito de cobre), arseniato de magnesio, arseniato de cinc, arsenito de cinc y muchos otros han sido usados a través de los tiempos como insecticidas específicos.

El arsenito sódico ha sido ampliamente usado como herbicida y esterilizante no selectivo del suelo, además se utiliza en el viñedo para la lucha contra yesca o apoplejía parasitaria (*Stereum hirsutum*), excoriosis (*Phomopsis viticola*), piral (*Sparganothis pilleriana*). Enfermedades estas de suma importancia en los viñedos españoles, y particularmente en los de la Comunidad Valenciana. Su uso está autorizado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación español (1988), en forma de aplicación invernal muy cuidadosa.

El ácido arsénico ha sido usado extensivamente como desecante de algodón (Levander, 1977). Más recientemente los arsenicales orgánicos, metanoarsoniato monosódico (MSMA), metanoarsoniato disódico (DSMA), y ácido cacodílico (CA) óxido de hidroxidimetilarsina se han introducido como herbicidas, silvicidas y desecantes.

Se han encontrado residuos de arsénico en suelos que han recibido arsenicales orgánicos e inorgánicos, pero son especialmente altos en suelos de viejos huertos que han recibido arseniato de plomo durante muchos años. En general, estos suelos contienen más de 2500 mg As/kg (Woolson *et al.*, 1971a) y son fitotóxicos para varios cultivos; dependiendo este grado de toxicidad del pH, de las concentraciones de fosfato, hierro y aluminio y de la cantidad de materia orgánica.

La fitotoxicidad es también dependiente de la sensibilidad del cultivo, así pues, el arsénico total del suelo no refleja adecuadamente la forma en que es disponible el elemento para la planta o su grado de toxicidad.

3.4 OTRAS FUENTES

El arsénico no ha sido un elemento de mucho interés en los estudios realizados sobre lodos de depuradoras y aguas residuales y ha sido generalmente olvidado por los servicios analíticos. Sin embargo, Haan (1978) dio valores entre 5.8 y 45.9 ppm en lodos de Holanda; Furr *et al.* (1976) dieron valores de 3 a 30 ppm en lodos de U.S.A. y Temple *et al.* (1977) encontraron valores de 4.2 a 19.8 ppm en lodos de Canadá.

4 EXPOSICIÓN DE PLANTAS A ARSÉNICO

Los compuestos de As han sido usados en agricultura como pesticidas, insecticidas, herbicidas o defoliantes durante muchos años. Los arsenicales orgánicos han reemplazado, en la mayoría de los casos, a los inorgánicos como herbicidas selectivos o generales. Son aplicados en proporciones más bajas que los arsenicales inorgánicos y de este modo se reducen en general los problemas asociados con la acumulación de arsénico en suelos agrícolas (Walsh y Keeney, 1975), pero puntualmente pueden persistir y merecen ser estudiados.

La acumulación de arsénico en las plantas puede estar afectada por muchos factores, incluyendo las especies de plantas, el tipo de compuestos utilizados, los métodos de aplicación, las condiciones del suelo y la aplicación de fertilizantes. Es raro que la acumulación de arsénico en las plantas alcance niveles perjudiciales para los seres vivos, porque invariablemente el crecimiento es reducido antes de que el contenido alcance niveles tóxicos.

Esto lo demostró Woolson (1973a), calculando los valores que se tendrían en los cultivos cuando su crecimiento hubiera sido reducido al 50 % (Tabla 6). Se puede concluir afirmando que los agricultores desecharían el cultivo, ante la reducción de la cosecha y la consecuente disminución de beneficios que este hecho conllevaría.

Tabla 6.- Contenidos de arsénico para un 50 % de reducción del crecimiento (Datos obtenidos inmediatamente después de la aplicación de arsenito sódico (Woolson, 1973a)).

Contenido de arsénico en diferentes cultivos para producir una reducción en el crecimiento de un 50% (GR⁵⁰)		
Cultivo	Arsénico (ppm)	
	Parte Comestible	Planta Completa
Rábano	76.0	43.8

Espinaca	10.0	10.0
Ejotes	4.2	3.7
Repollo	1.5	3.4
Jitomates	0.7	4.5

4.1 FITOTOXICIDAD

La fitotoxicidad del arsénico viene determinada por la forma química presente en el suelo. El arsenito es más fitotóxico que el arseniato y ambos son mucho más fitotóxicos que el metanoarsoniato monosódico (MSMA) y el ácido cacodílico (CA). Si los arsenicales son aplicados foliarmente, entonces el CA es el más fitotóxico (Sachs y Michaels, 1971).

La fitotoxicidad de los residuos de arsénico está influenciada más por las formas químicas que presenten que por su cantidad (Woolson *et al.*, 1971b). Es raro que la disminución de una cosecha pueda ser correlacionada con el arsénico total del suelo (Sandberg y Allen, 1975). Los diferentes compuestos varían en su disponibilidad y por tanto, en su toxicidad; siendo el arsénico soluble en agua más fitotóxico que otros más fuertemente enlazados. Woolson *et al.* (1971b) mostraron una correlación significativa entre el logaritmo del arsénico total y la reducción del crecimiento en cereales ($r = 0.74$), pero cuando la suma de las fracciones de arsénico soluble en agua, arsénico-calcio, arsénico-aluminio, y arsénico-hierro se correlacionan con el crecimiento, el coeficiente de correlación es de 0.82. Si observamos crecimientos pobres en el cultivo de alfalfa y cebada, éstos se deberán al arsénico soluble de los suelos (Lepp, 1981). Woolson *et al.* (1971b) encontraron correlaciones significativas entre la reducción del crecimiento y el arsénico extraíble con bicarbonato y una mezcla de ácidos. Walsh y Keeney (1975) sugieren que el uso de bicarbonato sódico o la mezcla ácidaextractante

para predecir la fitotoxicidad del arsénico sería más conveniente, porque son rutinariamente usados para determinar el fósforo disponible.

La textura del suelo es un factor importante en la determinación de la fitotoxicidad del arsénico añadido al suelo. Altas proporciones de arseniato de calcio aplicadas desembocan en residuos de arseniato en suelos de textura gruesa en cultivos de algodón. Estos residuos causan reducción en el crecimiento de varias plantas incluyendo el algodón, soja y arroz.

Similares proporciones de aplicación a suelos de textura fina no producen problemas tóxicos a estas plantas. Woolson (1973a) también observó efectos similares de la textura. En estudios similares sobre el efecto del arsénico en el crecimiento de cereales, una toxicidad mucho más pronunciada se observó en un suelo con poca arcilla que en otro con mucha arcilla. Las reducciones de la cosecha están directamente relacionadas a los niveles de arsénico extraíbles del suelo en acetato amónico. Woolson (1973a) encontró correlaciones que dan cuenta del 64 - 83 % de la variación entre los niveles de arsénico disponible y el crecimiento de la planta.

Este investigador empleó ecuaciones de regresión para determinar los niveles de arsénico disponibles necesarios para reducir el crecimiento de una planta en un 50%. De tal forma que al aumentar el tamaño de las partículas que constituyen el suelo, aumentan los efectos fitotóxicos.

Otro factor a tener en cuenta es el potencial redox (Eh) del suelo. Su efecto se demuestra por ejemplo, en el caso del cultivo de arroz, donde las condiciones reductoras bajo las cuales crece pueden hacer más disponible al arsénico, o pueden reducir el arseniato a arsenito, que es una forma más tóxica. Reed y Sturgis (1936) mostraron que los granjeros del sur de USA tienen dificultades en los campos de arroz que previamente han sido usados para algodón y han sido tratados con arseniato de calcio, quizás debido a estas razones (hay también

evidencias de que el arroz es más sensible a la toxicidad de arsénico que otros cultivos que crecen en suelos no inundados).

Los compuestos orgánicos de As son aplicados en proporciones considerablemente más bajas que los inorgánicos, resultando menos fitotóxicos para los cultivos. Los herbicidas, en cuya composición interviene el ácido metanoarsónico monosódico (MSMA) o el ácido cacodílico (CA), son aplicados, a ciertos cultivos, más de tres veces en una misma estación, en proporciones que no exceden los 4.5 kg de MSMA por ha. o los 5.6 kg de CA por ha. Se calculó que la entrada más grande de arsénico elemental era como MSMA (5.5 kg) o como CA (9 kg). Normalmente las proporciones requeridas para la mayoría de los cultivos agrícolas y para el control de malas hierbas no serían mayores. Sólo se han encontrado pequeños efectos en el crecimiento de soja y avena como consecuencia de los residuos del DSMA aplicado a suelos dedicados al cultivo de algodón (Lepp, 1981).

Basándose en estudios de invernadero, se puede afirmar que el algodón tolera hasta 50 ppm de arsénico. Sin correcciones por pérdidas de arsénico, se ha calculado que se tardaría más de 40 años para que los niveles de DSMA alcanzaran esta concentración usando las proporciones recomendadas (Lepp, 1981). Sin embargo, los cultivos realizados en rotación con el algodón son más susceptibles. Debido a esta mayor sensibilidad por parte del arroz al DSMA, se han investigado los efectos de diferentes niveles de DSMA sobre diversos tipos de suelos. Así la importancia de la textura del suelo en la determinación de la fitotoxicidad de las adiciones de arsénico se demostró otra vez. La adición de DSMA a niveles entre 2.5 y 100 ppm, sólo afectó significativamente al crecimiento del arroz cuando éste se desarrollaba sobre un suelo margo-limoso, pero no le afectaba si se trataba de un suelo arcilloso.

Incorporaciones de DSMA redujeron el crecimiento del algodón inicialmente, pero la toxicidad decreció con el tiempo. Resultados similares se han conseguido por otros autores.

En lo particular, los daños causados por el metanoarsoniato monosódico (aplicación foliar) sobre arroz, dependen fundamentalmente del estado de desarrollo en el que se efectuó la aplicación, existiendo sobre todo un estado específico del desarrollo (probablemente meiosis), en el cual el cultivo es mucho más susceptible para su esterilización (Richard *et al.*, 1981; Wauchope *et al.*, 1982), y por lo tanto, los efectos perjudiciales serán muy superiores a los esperados para esa cantidad de producto aplicado.

4.2 ABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN LA PLANTA

En raíces, todos los aniones son fuertemente adsorbidos a la superficie de la membrana, posteriormente sigue una conducción metabólica, una transferencia selectiva al simplasto y por último son transportados a la parte superior de la planta (Meharg y Macnair, 1990). En particular la adsorción del arsenito y del arseniato en la superficie radicular externa es bastante rápida e intensa, obteniéndose de esta forma concentraciones muy altas de arsénico en las raíces de plantas que se desarrollan en cultivo hidropónico (Wauchope, 1983).

La velocidad del proceso de adsorción-absorción sigue el siguiente orden, de mayor a menor: arseniato, arsenito y compuestos orgánicos, en plantas de soja (Wauchope, 1983).

Existe una serie de antecedentes que indican que el arseniato compite con el fosfato como substrato en su sistema de toma, en una amplia variedad de especies: angiospermas, musgos, líquenes, hongos y bacterias (Meharg y Macnair, 1990).

La toma de arsénico por semillas de cebada se encontró por Asher y Reay (1979) que consistía en una fase inicial rápida, seguida por una fase "estable", que dura un mínimo de 40 minutos. Ambas fases están marcadamente afectadas por

la temperatura. El fosfato se encontró que era un poderoso inhibidor de la toma de arseniato, siendo afectadas ambas fases de la toma. Este hecho nos indica que ambos iones son transportados por el mismo mecanismo (el cual tiene una mayor afinidad por el fosfato que por el arseniato).

Cuando el arseniato y el arsenito son suministrados a plantas sanas, ambas fases de la toma son aparentemente de 3 a 4 veces superiores para arseniato que para arsenito. Parece ser que la toma de arsenito es también un proceso metabólico, pero la vía de entrada a la planta no se ha establecido.

Por último, otro trabajo que demuestra la anterior afirmación es el de Wells y Richardson (1985), donde se observó que el fosfato era un inhibidor competitivo en la toma de arseniato.

Meharg y Macnair (1990), parten ya del hecho de que ambos iones son tomados por un sistema común (mayor afinidad por el fosfato), e intentan ver las diferencias existentes entre los sistemas de toma de individuos no tolerantes y tolerantes al arsénico de *Holcus lanatus*. Sus resultados indican que en plantas no tolerantes, la toma de fosfato y arseniato parece ser bifásica, consistiendo en una etapa de alta afinidad (concentración baja), y otra de baja afinidad (concentración alta). Mientras que en plantas tolerantes la etapa de alta afinidad parece no existir.

Posteriormente estos mismos autores (Meharg y Macnair, 1991) demuestran que aunque la toma de arseniato en plantas tolerantes se reduce (frente a las no tolerantes), su transporte a la parte superior no se ve afectado (se transporta un mayor porcentaje del elemento tomado que en el otro tipo de individuos) y por tanto, este hecho no explica adecuadamente el fenómeno de tolerancia. Una posible solución que se sugiere es la destoxicación bioquímica del elemento en el interior de las plantas, según la cual, el arseniato dentro de las células sería metilado y convertido en un derivado trimetilado de la ribosa (Meharg y Macnair, 1991). Este fenómeno biológico se produce en ambos tipos de plantas,

pero en las no tolerantes la velocidad del proceso no es suficiente para eliminar la acumulación que se produce del elemento.

Aunque los compuestos orgánicos de As pueden ser absorbidos desde la disolución de nutrientes a través de la raíz y en una menor extensión desde el suelo, su vía principal de entrada es a través de las hojas y tallos (Hiltbold, 1975). Siendo su entrada dependiente de la temperatura y de la permeabilidad de la superficie foliar.

La translocación de los arsenicales orgánicos desde los tejidos tratados es esencial, si el herbicida tiene una función metabólica. La superioridad de los metanoarsoniatos sobre el arsenito sódico yace en parte en su mayor translocación.

Rumberg sugirió que las rápidas lesiones del tratamiento del arsenito sódico pueden ser responsables de su menor transporte.

El arsenito, usualmente, produce síntomas de lesiones a las pocas horas del tratamiento, mientras que el DSMA requiere muchas horas o incluso días para producir clorosis.

Los autores solamente son capaces de recuperar entre el 30 y el 40 % del arsénico marcado como DSMA en las hojas, mientras el 85 % del arsenito se recupera. Se asume que el resto ha ido a las raíces.

Un tema importante al considerar la posible competencia en la toma de nutrientes desde la disolución del suelo, entre el As y distintos compuestos del suelo, es el de la fertilización.

La adición de nutrientes al suelo puede causar competencia entre los elementos por los sitios de fijación y por la toma de las raíces. La adición de fertilizantes puede afectar significativamente a la disponibilidad del arsénico del

suelo: si tenemos niveles altos de As la adición de N y P o N, P y K aumenta la disponibilidad de As. Los niveles son significativamente reducidos por la adición de carbonato de calcio (Woolson, 1972).

Se concluye que la adición de nitrato amónico y dihidrógeno fosfato de calcio es el mejor tratamiento de fertilización, ya que da los niveles de arsénico disponibles más bajos, los menores residuos de arsénico y los menores efectos en el crecimiento de la planta, indiferentemente del tratamiento de arsénico. La adición de N, N y P o N, P y K han incrementado los residuos de arsénico en maíz. El fósforo es el material fertilizante que más influencia tiene en la toxicidad de arsénico (Woolson, 1972). La toma del arseniato, pero no del arsenito, está afectada por el fosfato (Clements y Munson, 1947). Esto se debe al hecho de que el arseniato y el fosfato son químicamente similares y compiten por los mismos sitios en los suelos y en los sistemas de transporte. El fósforo ha sido usado para reducir la toxicidad del arsénico, habiendo notado diversos autores (Woolson *et al.*, 1973) una disminución en la toxicidad al aumentar los niveles de fósforo en una amplia variedad de cultivos.

En experimentos aumentando la proporción fósforo/arsénico, se causaron reducciones en la toma de arsénico. A proporciones molares de fósforo/arsénico de 4/1 o mayores la toxicidad de arsénico en trigo se reducía sustancialmente. Rumberg *et al.* (1960) encontraron resultados similares cuando las disoluciones contenían suficiente arsénico para ser tóxico.

Las proporciones de fósforo: arsénico en suelo, sin embargo, no parecen ser un indicador adecuado de sus interacciones y efectos en el crecimiento de la planta. Walsh y Keeney (1975) sugirieron que este hecho es parcialmente debido a la dificultad de evaluar el fósforo y el arsénico "disponibles" del suelo.

En suelos normalmente bajos en fósforo, las adiciones de fósforo causan una reducción significativa en la toxicidad de arsénico en algunas hierbas. Sin

embargo, no se encontraron efectos en tratamientos con más fósforo. En un suelo con tratamientos de fósforo altos, las hierbas no exhibieron efectos significativos del fósforo en la toxicidad de arsénico.

Existe una gran controversia sobre el efecto que produce la adición de fósforo sobre la toma o absorción de arsénico. A niveles de arsénico comparables a los del suelo, la adición de fósforo ha aumentado significativamente el contenido de arsénico en la planta, en contraste, sin embargo, el efecto de arsénico sobre el fósforo no fue consistente. La cantidad de fósforo en la disolución del suelo parece gobernar la toma de arsénico en la planta, porque cuando el fósforo en la disolución es alto, la absorción de arsénico se reduce. Everett (1962) también encontró que algunas aplicaciones de fósforo podían incrementar la toma de arsénico, pero encontró que las lesiones esperadas se eliminaron con contenidos de fósforo más altos en la planta.

Diversos investigadores (Lepp, 1981) han mostrado que la adición de fósforo incrementa la toxicidad de arsénico para muchos cultivos. Jacobs *et al.* (1970) encontraron que las producciones de maíz se reducían, similarmente, independientemente de los niveles de fósforo aplicados. A niveles de 80 microgramos de arsénico/g de suelo, el fósforo no influye en la toxicidad de arsénico en un suelo limoso, pero se aumentan los efectos tóxicos en un suelo arenoso. Similares resultados se obtuvieron cuando adiciones de fósforo se hicieron a un suelo arenoso por Woolson *et al.* (1973a,b).

Woolson (1975a) concluyó diciendo que niveles bajos de fósforo adicionados a un suelo tóxico en arsénico, desplazarían el arsénico de las partículas del suelo y aumentarían la toxicidad para las plantas, pero mayores aplicaciones de fósforo competirían con el arsénico en la superficie de la raíz y disminuirían la toxicidad.

4.2.1 Translocación

Una vez el arsénico ya ha sido absorbido por la planta, los compuestos de dicho elemento (particularmente como arsénico pentavalente), fluyen a través de la planta en pocas horas (Wauchope, 1983), moviéndose tanto simplástica (transporte activo de citoplasma a citoplasma) como apoplásticamente (transporte extracelular).

Los pasos a seguir por los citados compuestos cuando son absorbidos por la raíz (si se absorben por vía foliar, se deberá acudir al paso adecuado) (Wauchope, 1983): raíz → xilema → hojas → floema, hojas → floema → raíces, parte aérea, xilema.

El transporte de arsenito desde las raíces está limitado por su alta toxicidad para las membranas radiculares (Wauchope, 1983). El arseniato es más rápidamente adsorbido y translocado, debido a su menor toxicidad para las raíces. De tal forma, que si se trabaja con cantidades no letales de este último compuesto, se pueden observar concentraciones similares tanto en hojas como en raíces.

La translocación de los arsenicales orgánicos desde los tejidos foliares tratados es esencial, si el herbicida tiene una función metabólica. La superioridad de los metanoarsoniatos sobre el arsenito sódico como herbicida, yace en parte en su mayor translocación (Hiltbold, 1975). Rumberg *et al.* (1960) sugirieron que las rápidas lesiones del tratamiento foliar de arsenito sódico puede ser responsable de su menor transporte (el comportamiento del arseniato es muy similar a éste, pero con una translocación algo superior). El arsenito, usualmente, produce síntomas de lesiones a las pocas horas del tratamiento, mientras que el DSMA requiere muchas horas o incluso días para producir clorosis. Los autores solamente son capaces de recuperar entre el 30 y el 40 % del arsénico marcado como DSMA en

las hojas, mientras el 85 % del arsenito se recupera. Se asume que el resto ha ido a las raíces.

Un estudio que corrobora la última afirmación es el de Wauchope y Street (1987), donde se indica que tras aplicar MSMA a plantas de arroz (*Oryza sativa*), su nivel disminuye exponencialmente con el tiempo, debido a una translocación hacia las raíces y una posterior exudación a la disolución del suelo. También Odanaka y col. (1985a,b,c), confirman el fenómeno de la exudación de compuestos de As (metilados o no) por parte de la raíz. Además indican que la translocación del elemento desde las raíces de plantas de arroz a la parte superior parece estar muy restringida, más del 95 % del total absorbido permanece en dicho orgánulo (Sachs y Michaels, 1971). El comportamiento de MSMA, arsenito y arseniato coincide con el anteriormente indicado.

4.3 METABOLISMO DEL ARSÉNICO EN LAS PLANTAS

Como el arsénico es químicamente similar al fósforo, es probable que participe en muchas reacciones celulares. Compuestos organoarsenicales específicos, por ejemplo, arsenobetaína, arsenocolina o arsenolípidos se han encontrado en algunos organismos, y el arsénico se ha demostrado que reemplaza al fósforo en los grupos fosfatos del DNA (Lepp, 1981). Sin embargo, la incorporación del arsénico en los procesos metabólicos en las plantas superiores ha recibido poca atención.

El arsenito es tan tóxico que simplemente destruye todos los tejidos con los que entra en contacto, probablemente por reacción con los grupos sulfhidrúlicos de las proteínas (Wauchope, 1983), causando degradación de membranas, disrupción de las funciones de la raíz e incluso muerte celular y rápida necrosis si el contacto ha sido foliar (Wauchope, 1983). La acción del arseniato es, sin embargo, más sutil y delicada. Se conoce que desacopla la fosforilación en la

mitocondria (Wauchope, 1983), inhibe la absorción foliar de otros elementos químicos, y tiene un profundo efecto en los sistemas enzimáticos.

Cuando uno considera la variedad de reacciones en las plantas que incluyen grupos sulfhidrúlicos y fósforo, fácilmente aprecia el número de vías en las cuales el arsenito y el arseniato pueden interferir en los procesos fisiológicos y bioquímicos que constituyen el crecimiento.

El mecanismo de fitotoxicidad de los arsenicales orgánicos no se conoce muy bien, pero se ha sugerido que afectan al contenido de aminoácidos, a la respiración, a la síntesis de clorofila (Wauchope, 1983), pero de momento no se ha podido demostrar rotundamente ninguna de estas hipótesis.

4.4 NIVELES DE ARSÉNICO EN DISTINTOS CULTIVOS

Los residuos más altos de arsénico se encuentran en las raíces de plantas (por ejemplo remolacha y rábano), con valores intermedios en las partes altas vegetativas (espinacas e hierbas), y las semillas comestibles y los frutos contienen los niveles más bajos de arsénico (Woolson, 1973a; Walsh y Keeney, 1975). El límite para el contenido de arsénico en frutos, cultivos y vegetales es de 2,6 mg As/kg en peso fresco (US Public Health Service).

En particular, los niveles hallados en bibliografía (Wauchope, 1983) para nuestro cultivo (*Lycopersicum esculentum*) se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7.- Niveles de arsénico en plantas de tomate. (S.N. suelo natural, S.C. suelo contaminado y L.T. límites de toxicidad)

Hojas (ppm)		Raíces (ppm)		Frutos (ppm)		Hojas (ppm)
S.N.	S.C.	S.N.	S.C.	S.N.	S.C.	L.T.
1-7	6-330	0.3	13-1700	0.01-3	0.2-1.4	5-100

Los efectos de tratamientos con arsenicales inorgánicos y orgánicos sobre el contenido de As en diversos cultivos se ha investigado bajo aplicaciones normales y excepcionalmente altas. Johnson y Hiltbold (1969) encontraron que la adición de metanoarsoniatos a niveles de 5.6 y 11.2 kg/ha aunque no afectaban el rendimiento, incrementaban el contenido de arsénico en algodón, soja, trigo, avena, arveja, trébol y sorgo.

Se notó una diferencia en la toma, dependiente de la forma del herbicida, en algunos cultivos; el algodón mostró más toma de MSMA y DSMA que de MAMA (ácido metanoarsónico monoamónico), mientras que no hubo diferencias en plantas de soja. Tratamientos equivalentes realizados entre 5 y 85 años de aplicación, aumentaron el contenido en patatas, pero el arsénico estaba por debajo de los límites de detección en la porción comestible de guisantes y maíz tierno (Jacobs *et al.*, 1970). Johnson y Hiltbold (1969), a partir de sus estudios de los efectos de tratamientos normales con DSMA, sugirieron que solamente un uso sostenido de DSMA puede incrementar los residuos de arsénico en el suelo suficientemente para ser manifestado en el contenido de arsénico del cultivo. Los valores detectados en cultivos, sin embargo, son mucho más altos que los que citan Sandberg y Allen (1975), después de tratamientos equivalentes a 10 veces una aplicación normal.

Los residuos de arsénico en plantas pueden ser relacionados con los niveles de arsénico en el suelo, pero existen muchas dificultades para obtener buenas correlaciones. Los resultados de Woolson (1973a,b), nos indican que existe una mejor correlación entre el arsénico disponible del suelo y el contenido de toda la planta que con el contenido correspondiente a la zona comestible. El contenido de arsénico de maíz creciendo en arena es 10 veces superior al de maíz creciendo en un suelo limoso. Los últimos valores se reflejan en los niveles de arsénico disponible del suelo. Sus resultados enfatizan la importancia de los efectos del suelo en la toxicidad de los compuestos arsenicales añadidos y residuales.

Existen diferencias en la toma de arsénico y en la variación de las concentraciones en planta según las especies vegetales.

Hay también una diferencia en la toma entre cultivos de invierno y de verano, incluso con los mismos niveles de arsénico disponibles (Johnson y Hiltbold, 1969).

Una explicación que se ha sugerido es que el frío y la humedad del invierno hacen que la transpiración y absorción de agua y arsénico sea mucho menor que la que se da en cultivos de verano.

Sin embargo, para otros autores como Wauchope (1983) aunque la toma de elementos traza, en general, depende tanto de la especie de planta como de la disponibilidad del elemento, existen pocas diferencias en la toma de arseniato y arsenito entre distintas especies de plantas superiores y las concentraciones de sus tejidos son proporcionales a los contenidos de arsénico en la disolución nutritiva o a la concentración de arsénico disponible del suelo.

Incluso cuando se han usado aplicaciones elevadas en experimentos, el contenido de arsénico en cultivos raramente ha subido por encima de los niveles normales, y ciertamente nunca por encima de los niveles recomendados (Jacobs *et al.*, 1970; Sandberg y Allen, 1975). Se puede concluir que el mayor peligro de la presencia de pesticidas arsenicales es que disminuyen la productividad más bien que crean un peligro para la toma de arsénico por parte de los consumidores de estos vegetales (Jacobs *et al.*, 1970).

Woolson y Kearney en 1973 calcularon los niveles de arsénico necesarios para causar efectos claramente perjudiciales para las plantas. En el suelo, un nivel de arsénico extraíble de 5 mg As/kg es tóxico para especies sensibles, mientras que uno de 50 mg As/kg en plantas menos sensibles puede reducir el crecimiento más del 50 %. Las concentraciones de arsénico en planta que limitan las cosechas son de 1 mg As/ kg o más en soja (cultivo sensible) y de 4.4 o superiores en

algodón. Concentraciones de arsénico en planta correspondientes a un 50 % de reducción de crecimiento son de 0.7 mg As/kg en frutos de tomate, 10 en hojas de espinaca y más de 76 en la raíz del rábano.

4.5 ESENCIABILIDAD DEL ARSÉNICO PARA LAS PLANTAS

El arsénico no se ha demostrado que sea un nutriente esencial para la planta, aunque ha sido recientemente probada su esencialidad para el metabolismo animal. Sin embargo, varios autores encontraron estimulaciones del crecimiento por adiciones de arsénico, hallándose beneficios para el crecimiento de guisantes, trigo y patatas, pero no para judías.

Jacobs *et al.* (1970) encontraron un débil aumento en patatas y maíz, pero no en guisantes y judías, con adiciones de 45 kg de arsenito sódico/ha. Se han observado aumentos en el rendimiento en trigo, centeno, maíz, soja y algodón, cuando el arsénico, en forma de arseniato de calcio, se ha añadido a niveles de 500 a 1200 mg As/kg (Cooper *et al.*, 1932, mencionado por Lepp en 1981). Es posible que las adiciones de arseniato puedan desplazar al fosfato del suelo en ciertas situaciones, con un incremento en la disponibilidad del fosfato (Jacobs *et al.*, 1970). Woolson *et al.* (1971b) conjeturaron que las respuestas de arsénico que ellos habían observado eran debidas al aumento de actividad de los sistemas de las plantas, por pequeñas cantidades de arsénico. Otros pesticidas se ha demostrado que estimulan el crecimiento a dosis subletales.

5 EXPOSICIÓN DE ANIMALES Y HUMANOS AL ARSÉNICO

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

5.1 ENTRADA DEL ARSÉNICO AL ORGANISMO

En el medio ambiente, la biota está constantemente expuesta a una gran cantidad de sustancias con las cuales interacciona en sus actividades vitales. La mayoría de compuestos con los que está en contacto pueden ser tóxicos a determinadas dosis.

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

El proceso de transporte y transformación que experimenta el compuesto tóxico desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los

que se almacena y en los que causa lesiones es muy complejo. Por conveniencia, para facilitar su estudio se considera que consta de cuatro pasos: absorción, distribución, excreción y metabolismo, los que se presentan a continuación.

5.1.1 Absorción

La absorción se define como el proceso por el cual, el xenobiótico atraviesa las membranas y capas celulares hasta llegar al torrente sanguíneo. El ingreso del compuesto tóxico en el organismo usa los mismos mecanismos de transporte diseñados para movilizar compuestos de estructura similar. Los principales mecanismos de transporte son la difusión simple y el transporte activo.

Una misma dosis química puede producir diferentes efectos, dependiendo de la vía por la cual ingresa. La ingestión es la vía de exposición más común; sin embargo, la inhalación y la absorción dérmica forman parte importante de varias rutas de exposición.

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

La tasa de absorción del As en el tracto gastrointestinal depende de su forma química y de la concentración en la que se encuentre. Además, existen diferencias en la absorción tanto entre individuos como entre especies. En 1977,

Crecelius observó que el As(i) ingerido por un voluntario se eliminaba por la orina en un 80% pasadas 61 h, sugiriendo que la absorción del As es bastante baja. Los estudios de Charbonneau y colaboradores (1980) en hámsters expuestos a dosis orales de As⁺⁵ marcado, revelaron una absorción pobre, debido a que aproximadamente el 70% de la dosis fue detectada en las heces. Los resultados en ratas, publicados en 1994 por Hughes y colaboradores, muestran porcentajes similares de excreción a los de los humanos, después de la administración oral de As⁺⁵ (Hughes *et al.*, 1994). Por otro lado, en estos estudios se ha determinado que las formas organoarsenicales provenientes de los organismos marinos son absorbidas con bastante facilidad (Crecelius, 1977; Charbonneau *et al.*, 1978).

En las poblaciones humanas expuestas crónicamente al As mediante el consumo de agua contaminada, o por contacto con el suelo, la absorción dérmica del As representa una ruta de exposición limitada, aunque significativa y en el caso que esto ocurra, puede presentarse toxicidad severa, por ejemplo, después de la exposición a plaguicidas que contienen MMA; en estos casos, la inhalación constituye otra vía de exposición importante (Hessl y Berman, 1982). Conviene señalar que los estudios de absorción dérmica del As en humanos son escasos.

5.1.2 Distribución

Se entiende por distribución la localización y concentración del xenobiótico en los diferentes tejidos. La distribución no es sólo la acción de transportar el compuesto tóxico, sino el hecho de que el tóxico se encuentre en los órganos con una concentración determinada. La distribución de un compuesto dentro del organismo depende de varios factores, como sus características químicas, el tamaño molecular, la permeabilidad con la que se puede desplazar por las membranas, etc. En el camino hacia el sitio de acción, el compuesto puede ser captado por proteínas plasmáticas, transportado hacia determinadas células, ver restringido su paso por membranas selectivas o ser lo suficientemente liposoluble como para ser almacenado en el tejido graso. Como ya se ha comentado, la

distribución del As es altamente dependiente de su forma química, de la ruta de administración, de la dosis y de la especie en que se estudie la exposición (Wildfang *et al.*, 2000).

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

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

5.1.3 Excreción

La concentración de un compuesto tóxico se puede disminuir mediante su excreción. Todas las secreciones corporales pueden excretar compuestos químicos, pero las tres principales vías son la orina, las heces y el aire exhalado.

La excreción de los xenobióticos utiliza los mismos mecanismos que tiene el organismo para excretar los desechos metabólicos endógenos. Un compuesto tóxico puede, dependiendo de sus características, ser excretado por diferentes vías como la orina, las heces, la bilis, el sudor, el aire exhalado, etc. Los riñones son los órganos más importantes en la excreción ya que eliminan directamente las sustancias tóxicas de la sangre. Para que una sustancia sea eliminada por la orina es necesario que sea soluble en agua; así los compuestos liposolubles se tienen que biotransformar en hidrosolubles para poder ser excretados por esta vía. El As se excreta tanto por vía urinaria como fecal (Wildfang *et al.*, 2000). En 1981, experimentos de Buchet y colaboradores determinaron que en humanos el As se excreta mayoritariamente por vía urinaria en unos 8 días después de la ingestión oral (Buchet *et al.*, 1981b). Sin embargo, la vida media para la excreción del As por la vía urinaria aumenta al aumentar la dosis de exposición (Wildfang *et al.*, 2000). En 1994 Hughes y colaboradores determinaron que, en ratones, no se observa una relación dependiente de la dosis en la eliminación de As^{+5} o de DMA; sin embargo, la eliminación de MMA sí que ocurre de una manera dependiente de la dosis. Buchet y colaboradores también estudiaron la excreción de As por vía urinaria en humanos y encontraron que la tasa de excreción de los metabolitos del As estaba relacionada linealmente con la cantidad absorbida (Buchet *et al.*, 1981b) y que, al ingerir unos 500 μ g de $NaAsO_2$, los tiempos medios de eliminación de MMA y DMA, fueron menos de 4 y 11 horas respectivamente (Buchet *et al.*, 1981a).

No cabe duda de que la dieta puede influir en las cantidades de As excretado. El As puede ser ingerido a través de diferentes alimentos como hortalizas, pescados, mariscos y otros alimentos procesados, que en alguna fase de su producción o preparación hayan estado en contacto con As. Así, por ejemplo, los alimentos marinos pueden contener grandes cantidades de As orgánico en diferentes formas y, al ser consumidos, el As es eliminado rápidamente, aumentando su concentración en la orina (Buchet *et al.*, 1994). Aproximadamente el 50% del As contenido en el pescado es eliminado en 2 días, después de los cuales la tasa de excreción decrece hasta llegar a un nivel basal (Freeman *et al.*, 1979).

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

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

En 1991, Gyurasics y colaboradores determinaron que el As^{+3} y As^{+5} , al ser administrados por vía intravenosa en ratas, aumentan la excreción biliar de tioles endógenos, incluyendo el glutatión, de una manera dependiente de la dosis. Se observó que el As^{+3} era más fácilmente excretado por la bilis que el As^{+5} y que la

mayor excreción de ambas especies de As ocurría a los 15 min después de la administración (Gyurasics *et al.*, 1991b). Se propuso que el As^{+3} y el As^{+5} , al ser reducido a As^{+3} , forman complejos poco estables con el glutatión que son transportados a la bilis (Gyurasics *et al.*, 1991a).

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

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de los efectos de la exposición de los organismos al As es su metabolismo, ya que puede presentar una gran complejidad, y como ya se ha visto puede variar considerablemente dependiendo de la especie que se estudie. Actualmente todavía existen muchas incógnitas y controversias referentes al metabolismo del As, el que se presenta en detalle en el siguiente apartado.

5.2 METABOLISMO DEL ARSÉNICO EN EL ORGANISMO

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

Anteriormente hemos mencionado que, para reducir la posibilidad de que una sustancia produzca una respuesta tóxica, se puede disminuir la cantidad de

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

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

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

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

estas reacciones es un gran aumento de la solubilidad en agua del xenobiótico, o de su metabolito lo que facilita su eliminación del organismo.

El modelo actual sobre el metabolismo del As se caracteriza por dos tipos de reacciones en muchas especies, incluyendo la humana. El primero es una biotransformación de Fase I, consistente en una oxidación/reducción que cambia el estado de valencia del As, permitiendo el paso de As^{+5} a As^{+3} . El segundo tipo de reacción es la metilación en la que las formas de As trivalentes son metiladas secuencialmente a productos mono-, bi- o trimetilados, actuando la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo y la forma reducida del glutatión (GSH) como cofactor esencial (Morgan *et al.*, 2001). En 1973, Braman y Foreback demostraron la presencia de As metilado en orina humana y, cuatro años más tarde, Crecelius (1977) realizó un experimento *In vivo* en el cual demostró que existía un proceso de metilación del As en humanos. En este experimento, un voluntario ingirió vino, agua y carne de cangrejo en conserva, que contenían As(i), y luego se detectaron dos metabolitos metilados de As en su orina, en las siguientes proporciones: 15-20% MMA y 55-65% DMA; también se detectó un 20-25% de As(i). Estos datos fueron corroborados posteriormente por Buchet y colaboradores (1981a).

En otro estudio, cinco voluntarios ingirieron 3 mg de $NaAsO_2$ y, mediante el análisis de orina para As total y especiado, se demostró que el 48% de la dosis era eliminada a los 5 días; asimismo se determinó que la vida media del As total era de aproximadamente 30 h. El As(i) fue eliminado mayoritariamente durante las primeras horas; sin embargo, esta eliminación disminuyó rápidamente al aumentar las proporciones de metabolitos metilados de As, mayoritariamente en forma de DMA (Buchet *et al.*, 1980). Otro experimento realizado por el mismo grupo, con voluntarios que ingirieron 500 μg de As(i) en forma de $NaAsO_2$, permitió determinar que el efecto observado en el experimento anterior se aceleraba con un pretratamiento con agentes lipotrópicos como la metionina, la colina o la vitamina B (Buchet *et al.*, 1981a).

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

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

Investigaciones llevadas a cabo usando MMA metiltransferasa de hígado de conejo demostraron que para realizar la primera metilación se usa As^{+3} y no As^{+5} (Zakharyan *et al.*, 1995). Al estudiar la actividad de la As metiltransferasa de hígado de hámster parcialmente purificada, se corroboraron dichos resultados (Wildfang *et al.*, 1998). Estudios *In vitro* con concentraciones bajas de As^{+3} ($1\mu M$)

han evidenciado que la formación de DMA aumenta con el tiempo, mientras que la concentración de MMA se mantiene relativamente constante durante el tiempo de incubación (Georis *et al.*, 1990), lo que sugiere que, a bajas dosis, el As^{+3} es metilado hasta lograr disparar el segundo paso de la metilación en el que se produce DMA. La secuencia de pasos aceptados que se suceden durante el metabolismo del As se presentan en la Figura 4 (Marnell *et al.*, 2003).

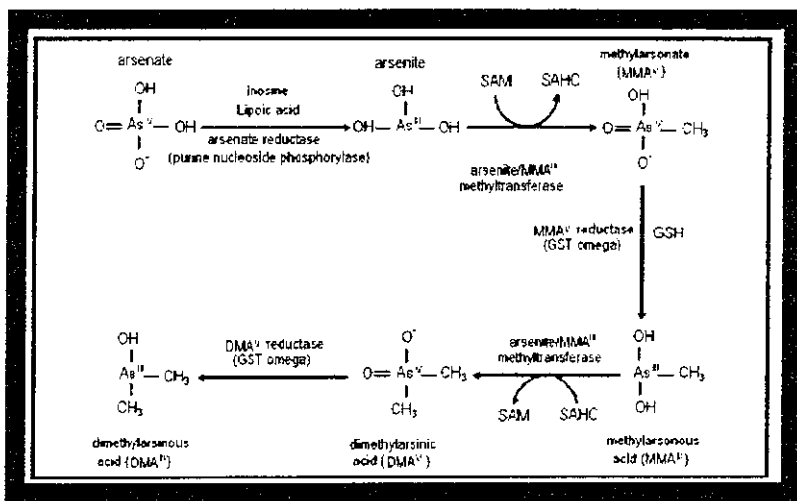


Figura 4.- Esquema del metabolismo del As (Marnell *et al.*, 2003)

En numerosos estudios realizados tanto *In vivo* como *In vitro* se ha comprobado la existencia de cofactores esenciales para la metilación del As. Se ha determinado que estos factores esenciales son la S-adenosilmetionina (SAM) (Buchet y Lauwerys, 1985, 1988; Zakharyan *et al.*, 1995) y tioles reducidos, principalmente glutatión (GSH) (Buchet y Lauwerys, 1987; Buchet y Lauwerys 1988; Zakharyan *et al.*, 1995). Buchet y Lauwerys determinaron que el agotamiento de GSH *In vivo* mediante el tratamiento con phorone aumenta más del doble la excreción de As total durante las primeras 24 h después del

tratamiento, debido mayoritariamente al aumento en la excreción de As(i), demostrando así la importancia del GSH endógeno en la metilación del As en ratas (Buchet y Lauwerys, 1988). Estos resultados fueron corroborados al usar arsenito metiltransferasa purificada de hígado de conejo, donde la cisteína era mas activa que el GSH (Zakharyan *et al.*, 1995).

Por otro lado, los estudios realizados por Zakharyan y colaboradores (1995) indican que el GSH puede proporcionar el ambiente reducido necesario para la metilación del As. También se ha observado que otros compuestos tiólicos, como el ditioneitol (DTT), el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido dimercaptopropanosulfónico (DMPS), disminuyen la metilación del As al aumentar la concentración de tiol, mientras que el mercaptoetanol aumenta la metilación del As *In vitro* (Buchet y Lauwerys, 1988).

El hecho de que los metabolitos encontrados en la orina humana después de la exposición a As⁺³ y As⁺⁵ sean mayoritariamente ácido monometilarsónico (MMA⁺⁵) y ácido dimetilarsínico (DMA⁺⁵) y que, en ratas, después de la exposición a As⁺³ se encuentren mayoritariamente complejos de As y glutatión (As-GSH), han llevado a Hayakawa y colaboradores (2005) a estudiar si los complejos As-GSH eran sustratos para la As metiltransferasa mediante el uso de la enzima Cyt19. Los análisis sugirieron que el As triglutatión (ATG) fue generado monoenzimáticamente a partir de As⁺³ cuando el GSH se encontraba a concentraciones de 2 mM o mayores. Los autores proponen que la enzima Cyt19 cataliza la transferencia del grupo metilo de SAM al As produciendo MMA y DMA. En este estudio se vió que la metilación del As era catalizada por Cyt19 sólo cuando ATG estaba presente en la mezcla de reacción. Además, el diglutatión de monometilarsónico (MADG) fue el sustrato de Cyt19 para las sucesivas metilaciones a glutatión dimetilarsínico (DMAG). Por otro lado, ácido monometilarsenioso (MMA⁺³), el producto de la hidrólisis de MADG, no fue metilado a DMA por Cyt19. Estos resultados sugieren que los complejos As-GSH como ATG y MADG fueron convertidas a MADG y DMAG, respectivamente.

Ambas MADG y DMAG presentaron inestabilidad en la solución cuando la concentración de GSH era menor a 1 mM, siendo hidrolizados y oxidados a MMA⁺⁵ y DMA⁺⁵, respectivamente. Los autores proponen que el metabolismo del As⁺³ a As metilado via Cyt19 ocurre via ATG y MADG más que por oxidaciones y metilaciones de As⁺³ y MMA⁺³ y proponen una ruta metabólica diferente (Hayakawa *et al.*, 2005).

En un estudio con personas voluntarias se midieron los efectos de la administración de cinco dosis de NaAsO₂, durante cinco días consecutivos, encontrándose que el porcentaje de MMA y DMA excretado disminuye un 10% en respuesta al aumento de la dosis, lo que se vio reflejado principalmente en la excreción de DMA después de la mayor dosis (1 mg NaAsO₂), y la producción de MMA permaneció casi lineal (Buchet *et al.*, 1981b). El hecho de que los metabolitos metilados del As estuvieran presentes en la orina en una concentración significativa, incluso a altas dosis, después de exposiciones repetidas, indica que la capacidad total de metilación no se satura. Hopenhayn Rich y colaboradores (1993), después de revisar estudios de poblaciones expuestas al As, concluyeron que los humanos no presentan un umbral para la metilación del As. Sin embargo, otros autores sugieren que hay una relación sublineal o umbral entre la ingestión de As y el cáncer de piel y de otros órganos internos (Rudell *et al.*, 1996).

Estudios en humanos indican que después de la administración oral de arsenito (As⁺³), los únicos metabolitos que se encuentran en la orina son: As(i), MMA y DMA. Buchet y colaboradores (1981a) encontraron que, después de la administración oral de 500 µg de MMA, aproximadamente el 13% se metilaba a DMA. En un estudio realizado en 1987 por Marafante y colaboradores en voluntarios a quienes se había administrado DMA por vía oral, se detectaron bajos niveles (alrededor del 4%) de óxido trimetilarsénico (TMAO) en la orina. En este mismo estudio se encontró que tanto ratones como hámsters metabolizan el DMA

administrado por vía oral a TMAO en una proporción de 3,5% y 6,4%, respectivamente (Marafante *et al.*, 1987). Se han detectado concentraciones más altas de TMAO en hámsters después de la administración de DMA por vía oral (Yamauchi y Yamamura, 1984a), pero no se han detectado compuestos trimetilados de As en sistemas homogeneizados de hígado de rata (Buchet *et al.*, 1981b). Sin embargo, en ratas a las que se les administró DMA por vía oral se encontró que el TMAO aumentaba en función de la dosis (H. Chen *et al.*, 1996).

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

En cuanto a la toxicidad del As, generalmente se consideraba que la metilación era una vía de detoxificación en mamíferos. Los estudios de Buchet y colaboradores (1981a) indicaron que los metabolitos metilados del As se excretaban con mayor rapidez que el As no metilado. Más tarde, Vahter y Marafante (1983) demostraron que estas especies eran menos reactivas en los tejidos y Lewis y Sweet (1985) determinaron que los metabolitos de As(i) presentaban una menor toxicidad aguda. Desde entonces, se consideró que la metilación era el primer paso para la biotransformación del As(i) y para su detoxificación en muchos animales.

Sin embargo, se ha observado que los monos titís (Vahter *et al.*, 1982), los chimpancés (Vahter *et al.*, 1995), los monos tamarin (Zakharyan *et al.*, 1996) y los conejillos de Indias (Healy *et al.*, 1997), son especies que no excretan derivados

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

Desde que se descubrió que en el metabolismo del As los productos metilados incluían MMA^{+3} , MMA^{+5} , ácido dimetilarsenioso (DMA^{+3}) y DMA^{+5} , se ha estudiado cada uno de ellos por separado en cuanto a su potencial toxicológico.

Un experimento en el que se incubaron distintos tipos celulares con As^{+3} , As^{+5} , MMA^{+3} y DMA^{+3} , determinó que los compuestos metilados trivalentes son más tóxicos que el As^{+3} datos que han sido confirmados por estudios posteriores (Petrick *et al.*, 2001). Aposhian y colaboradores (1999, 2000a), basándose en estudios poblacionales en humanos consideran que el MMA^{+3} es más tóxico que el As^{+3} y sugieren que la metilación es sólo un proceso de biotransformación.

Posteriormente, un estudio de Styblo y colaboradores evidenció que la metilación es un proceso que incrementa la toxicidad y la carcinogénesis (Styblo *et al.*, 2002).

Los resultados de un estudio realizado en hámster dorado por Sampayo Reyes y colaboradores (2000) revelan la presencia de MMA^{+3} y DMA^{+3} en el hígado de hámster después de la exposición a As^{+5} , señalando la necesidad de reexaminar los resultados de toxicidad y de carcinogenicidad del As(i) en tejidos de mamíferos.

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

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

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

2,2% de MMA en la orina, en vez del 10-20% esperado, estos datos han sido corroborados posteriormente por Seoane y colaboradores (1998).

Un estudio de Vahter (2002) parece indicar que los individuos con un bajo porcentaje de MMA en la orina son más rápidos en eliminar el As ingerido.

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

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

contenido de As en el agua de consumo, la capacidad metiladora y el contenido de As en la orina (Chiou *et al.*, 1997).

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

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

5.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN

La mayoría de los compuestos de As son altamente tóxicos. Se calcula que la dosis letal en humanos está entre los 100 y 500 mg de As y que la toxicidad aguda por vía oral se produce a concentraciones ente 5 y 50 mg en adultos. Sin un tratamiento apropiado, una dosis de 10 mg As/kg de anhídrido arsenioso puede ser mortal. Se sabe que el exceso de exposición a As provoca arsenicosis, pudiendo causar dermatitis, envenenamiento agudo o crónico y cáncer, entre otras enfermedades. La exposición al As puede afectar de diferentes maneras a una población, dependiendo del tipo de exposición. El riesgo para la salud humana está asociado a la especie química en que éste se encuentre, a la concentración en que se dé, y al tiempo de exposición. En la Tabla 8 se presentan las alteraciones de la salud provocadas por la exposición al As.

Tabla 8.- Efectos clínicos de la arsenicosis en estados sucesivos de gravedad

Etapas	Efecto
Preclínica	No hay alteraciones de la salud
Inicial	Malestar general, pérdida de peso, conjuntivitis, bronquitis, efectos gastrointestinales, melanososis y queratosis
Secundaria	Despigmentación (leucomelanososis) en distintas áreas del cuerpo, hiperqueratosis, neuropatías periféricas y hepatopatías.
final	Nefropatías, hepatopatías, gangrena, cáncer de piel, de pulmón, de vejiga y muerte.

Los efectos de una exposición crónica al As (exposición a bajas dosis durante un tiempo prolongado) suelen tardar entre 5 y 20 años en manifestarse (WHO, 2004).

Inicialmente consisten en un malestar general, que incluye adelgazamiento, cólicos, diarreas, astenia, mialgias, ataralgias y, en casos graves, dermatitis exfoliativas. Los principales síntomas en humanos son una severa inflamación del tracto gastrointestinal, anomalías cardíacas, colapsos y coma. El As también tiene una acción irritante que causa inflamación local de la piel, ulceración y perforación del septo nasal. Algunas especies de As también pueden funcionar como alérgicas de contacto. (Wildfang *et al.*, 2000; Morgan, 2001).

La exposición crónica al As se produce principalmente por el consumo de agua contaminada, lo que se denomina hidroarsenicismo (arsenicosis producida principalmente por el contacto con agua contaminada). En los casos de hidroarsenicismo crónico, los síntomas más frecuentes son: hiperqueratosis palmoplantar, dermatitis de verrugas alérgicas, estrías blancas en las uñas de las manos, problemas cardiovasculares, isquemia miocárdica, hipertensión, disfunciones hepáticas, cambios hematológicos y epitelomas de la piel (Léonard y Lauwerys, 1980; Santolaya *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1999; Brown, 1999; Basu *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2001). Se ha determinado que la dosis total de As(i) necesaria para provocar hiperqueratosis palmoplantar en el 50% de los individuos es de 11 a 16 g por vía oral.

Los efectos de la toxicidad aguda frecuentemente se detectan a las pocas horas de la exposición y se caracterizan por vómitos intensos acompañados por una severa irritación, dolor en la faringe y el epigastrio, además de una sensación de quemadura local. Estos síntomas se manifiestan como un síndrome gastrointestinal severo que continúa con diarreas, pudiendo llegar al shock con coma y a la muerte (Morgan, 2001). Esta reacción clínica se debe a que el As

actúa como un inhibidor enzimático que, al combinarse con los grupos sulfhidrilos, interfiere en el metabolismo celular, principalmente de las células endoteliales.

Una de las principales manifestaciones de la intoxicación aguda es la vasodilatación parálitica de los capilares sanguíneos con una alteración de la permeabilidad, lo que explica los vómitos, la diarrea y los edemas subcutáneos que suelen aparecer. Como consecuencia, se observa hipotensión arterial y shock, además de lesiones parenquimatosas en casi todos los órganos. Los efectos de dosis subletales son náuseas, vómitos, diarreas, calambres musculares y polineuritis, y pueden ser causa de graves hepatitis con ictericia, hemorragias, glomerulonefritis y miocarditis, exantemas escarlatinoformes y morbiliformes. (Santolaya *et al.*, 1995; Wildfang *et al.*, 2000; Morgan 2001).

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

En cuanto a la exposición aguda (exposición a altas dosis de As durante un tiempo corto), se han descrito diversos efectos sobre la salud de poblaciones

afectadas (Tabla 9) entre los que se incluyen diversos efectos sobre la piel como el cáncer, enfermedad de los pies negros, enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales y escamosas, melanosis, hiperqueratosis palmoplantar y despigmentación. Además de problemas de hígado como ictericia, agrandamiento del hígado, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica, en el sistema nervioso se han descrito problemas de neuropatías periféricas y pérdida de oído.

Tabla 9.- Resumen de los efectos sobre la salud de la exposición aguda al Arsénico en distintos sistemas

sistema	Efectos
Piel	Cáncer de piel, enfermedad de los pies negros, enfermedad de bowen, carcinoma de células basales y escamosas, melanosis, hiperqueratosis palmoplantar y despigmentación de la piel.
Hígado	Ictericia, agrandamiento del hígado, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica.
Nervioso	Neuropatías periféricas y pérdida de oído.
Cardiovascular	Manifestaciones cardiovasculares, acrocianosis, enfermedad de Raynaud, hipertensión, arterial e infarto al miocardio,
Hematopoyético	Megaloblastosis
Respiratorio	Enfermedades pulmonares y cáncer de pulmón
Endocrino	Diabetes mellitus y bocio.

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

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

5.4 GENOTOXICIDAD

Un compuesto es considerado genotóxico si induce daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas con un bajo grado de toxicidad. El As ha resultado ser genotóxico en diferentes estudios, tanto *In vitro* como *in vivo*, siendo capaz de inducir alteraciones tales como micronúcleos (MN), aberraciones cromosómicas (CA) e intercambios de cromátidas hermanas (SCE). Se sabe que el As^{+3} es más genotóxico que el As^{+5} . En distintos estudios se han analizado por separado los compuestos de As metilados, tanto trivalentes como pentavalentes, y parece ser que los compuestos pentavalentes, MMA^{+5} y DMA^{+5} , son menos genotóxicos que el As^{+3} , pero sus análogos trivalentes, MMA^{+3} y DMA^{+3} , son por lo menos tan citotóxicos como el As^{+3} (Gebel, 2001). Esto indica que el As trivalente parece ser altamente tóxico aunque esté metilado (Petrick et al., 2000; Styblo *et al.*, 2000). Por esta razón como ya se ha comentado, actualmente se ha puesto en duda la hipótesis de que la metilación es un proceso de detoxificación del As.

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

5.4.1 Genotoxicidad In vitro

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

A altas concentraciones (10 mM) tanto el DMA⁺³ como el DMA⁺⁵ presentan resultados positivos de mutación génica en *E. coli* (Yamanaka *et al.*, 1997). El DMA⁺⁵ también resulta genotóxico en ensayos con células humanas y de otros mamíferos (Endo *et al.*, 1992; Oya-Ohta *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1997). Después de la exposición a As se han observado incrementos significativos en la frecuencia de enlaces cruzados DNA-proteína, en cultivos de células embrionarias de hámster (Rossman *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1985b; Kochhar *et al.*, 1996), en linfocitos humanos (Larramendy *et al.*, 1981; Jha *et al.*, 1992; Rasmussen y Menzel, 1997) y en fibroblastos (Okui y Fujiwara, 1986; Jha *et al.*, 1992; Dong y Luo, 1993) Se ha demostrado que el As⁺³ induce MN en células CHO y V79 utilizando el test de MN con y sin bloqueo de la citocinesis mediante el uso de citocalasina-B (cyt- B) (Wang *et al.*, 1997; Gebel, 1998). El As⁺³ también induce

MN en linfocitos periféricos humanos, tanto aislados como en sangre completa, después del bloqueo de la citoquinesis con cytochalasin-B (Schaumloffel y Gebel, 1998).

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

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

Asimismo, se ha demostrado que después del tratamiento con As^{+3} se inducen frecuencias significativamente elevadas de SCE, tanto en experimentos con linfocitos humanos y líneas celulares linfoblastoides (Gebel *et al.*, 1997; Rasmussen y Menzel, 1997), como en células epiteliales de hámster chino (Lee *et al.*, 1985b). Se ha puesto de manifiesto que el As^{+3} tiene una potencia de inducción de SCE de más de un orden de magnitud superior en comparación con el As^{+5} .

Esto puede explicarse debido a la menor absorción de As^{+5} por las células en relación con la absorción de As^{+3} . Sin embargo hay que señalar que *In vitro*, solo una baja proporción de As^{+5} es reducida a As^{+3} (Gebel, 2001).

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

5.4.2 Genotoxicidad In vivo

En cuanto a los estudios realizados en animales, la frecuencia de MN aumenta en ratones expuestos a arsenito de sodio y arsenito potásico mediante administración intraperitoneal (Tinwell *et al.*, 1991; Deknudt, 1986) o por vía oral (Tice *et al.*, 1997), mientras que el As_2S_3 no es capaz de inducir MN, presumiblemente debido a su baja solubilidad y, por lo tanto, de su escasa biodisponibilidad (Tinwell *et al.*, 1991).

Estudios realizados en ratas han demostrado que después del tratamiento con As^{+3} por vía oral se produce un aumento de la frecuencia de CA (Das *et al.*, 1993; Roy- Choudhury *et al.*, 1996). Kashiwada y colaboradores (1998) encontraron que las ratas, después del tratamiento con DMA, presentaban un elevado número de células aneuploides.

Existen bastantes estudios que evalúan los efectos genotóxicos del As ocasionados por exposiciones humanas crónicas a través del consumo de agua contaminada.

Sin embargo, los estudios de exposiciones laborales son menos frecuentes. En la mayoría de estos trabajos se estudia la exposición al As^{+3} , pero como en el hombre el As es metilado metabólicamente, se estudia a la vez la exposición al As^{+5} , al MMA y al DMA.

Los estudios de biomonitorización de poblaciones laboralmente expuestas a As han determinado que el riesgo de contraer cáncer aumenta en los trabajadores debido a su exposición a compuestos de As (Welch *et al.*, 1982; Pershagen, 1985; Gerhardtsson y Nordberg, 1993; Buchet y Lison, 1998; Lubin *et al.*, 2000). A pesar de que el MMA y el DMA son utilizados como herbicidas, pesticidas o conservantes de la madera, entre otros usos, no hay estudios de evaluación de la genotoxicidad de estos compuestos después de la exposición laboral. Esto se debe en parte, a que normalmente se dan exposiciones a mezclas más o menos complejas de distintos compuestos, lo que dificulta el análisis de los efectos individuales de los distintos elementos o compuestos (Gebel, 2001).

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

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

5.5 CARCINOGENESIS

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

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

Hay pocos estudios que demuestren de forma concluyente que el As es carcinogénico en animales (Rudnay y Borzsonyi, 1981; Pershagen *et al.*, 1984; Katsnel'son *et al.*, 1986). Por lo general, en estos estudios se emplean

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

Los estudios realizados en poblaciones humanas expuestas a As, han encontrado una respuesta directamente dependiente de la dosis, al relacionar la exposición a altas concentraciones de As en el agua de consumo humano y la incidencia de cáncer (Chen *et al.*, 1992; Lerda, 1994; Santolaya *et al.*, 1995; Gonsebatt *et al.*, 1997; Nakadaria *et al.*, 2002). Un estudio realizado en una población de Taiwan en un área caracterizada por presentar endémicamente la enfermedad de los pies negros, reveló que la tasa de cáncer de piel era de 10,6 por cada 1.000 habitantes (Tseng, 1968). Otros estudios realizados en esta zona han demostrado un alto índice de mortalidad por cáncer de vejiga, pulmón e hígado, además de detectar cáncer de piel en más de un 6% de la población mayor de 30 años (Hsu *et al.*, 1997).

Como ya hemos apuntado, el As ha resultado ser un dilema para los investigadores debido a la dificultad para encontrar un buen modelo animal cuyos resultados sean extrapolables a la carcinogénesis en humanos (Wang *et al.*,

2002a) y, además, a que sus mecanismos de genotoxicidad no han sido completamente caracterizados (Goering *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2001; Gebel, 2001). Esto ha llevado a formular diferentes hipótesis sobre la carcinogénesis del As, que incluyen varios mecanismos de genotoxicidad, entre los que se cuentan alteraciones de la reparación del DNA, metilación del DNA, cambios en la expresión génica y amplificación génica, entre otros (Simeonova y Luster, 2000; Kitchin, 2001; IARC, 2004).

Además, tanto el As como sus metabolitos metilados han sido considerados carcinógenos (Rossman *et al.*, 2001), comutagénicos (Li y Rossman, 1991), promotores del cáncer (Yamamoto *et al.*, 1995; Yamanaka *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998), e inhibidores de la reparación del DNA (Okui y Fujiwara, 1986; Hartman y Speit, 1996; Andrew *et al.*, 2003). Aunque el As induce efectos clastogénicos y aneugénicos, su papel como iniciador en el proceso de la carcinogénesis a través de mutaciones puntuales ha sido cuestionado debido a las débiles evidencias de efectividad en la inducción de mutaciones génicas (Noda *et al.*, 2002; IARC, 2004). Varios investigadores han estudiado el efecto del As en la reparación del daño génico (Lee-Chen *et al.*, 1992; Hartman y Speit, 1996; Yamanaka *et al.*, 1997; Hartwing *et al.*, 1997; Yager y Wiencke, 1997; Snow *et al.*, 1999). En 1991 se demostró que el As⁺³ inhibe la reparación postreplicativa en células (CHO)K1 irradiadas con UV y que, en fibroblastos humanos, inhibe principalmente el mecanismo de reparación por escisión de los dímeros de pirimidina (Lee-Chen *et al.*, 1992). Al estudiar células alveolares humanas de tipo II (L-132), se comprobó que la metilación metabólica del As a DMA está implicada en la inducción de daño en el DNA, demostrándose que la metilación del As(i) tiene consecuencias genotóxicas debido a la inhibición de las enzimas de reparación (Yamanaka *et al.*, 1997). En el mismo año, otro estudio en células humanas puso de manifiesto que el As⁺³ puede potenciar el daño genético a través de su reacción con ditioles e interfiriendo en las funciones normales de las proteínas de reparación del DNA (Yager y Wiencke, 1997). Hartwing y colaboradores, utilizando fibroblastos humanos irradiados con UV, demostraron que el As⁺³ afecta al mecanismo de

reparación por escisión de nucleótidos (NER), concretamente en las etapas de escisión y ligación (Hartwing *et al.*, 1997).

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

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

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

La alteración de los patrones de metilación del DNA ha sido observada en poblaciones expuestas a As en Taiwan y en Australia (Castren *et al.*, 1998; Boonchai *et al.*, 2000). Yamanaka y colaboradores (1990) demostraron que en el proceso de metilación de MMA⁺⁵ a DMA⁺⁵, se induce síntesis reparadora del DNA, lo que indica la inducción previa de daño genético y, que se ha puesto en marcha algún tipo de mecanismo de reparación por escisión. Como ya se ha indicado, el As es metilado enzimáticamente, consumiéndose S-adenosilmetionina (SAM) en el proceso. Como las DNA metiltransferasas también requieren SAM, podría ser que la metilación estuviera relacionada con la carcinogénesis del As. La hipótesis es que la metilación del As produce una hipometilación del DNA lo que facilitaría la transformación maligna de las células con niveles bajos de SAM. La inducción de hipometilación del DNA debida al As resultó ser directamente dependiente de la dosis y del tiempo de exposición (Zhao *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Mass y Wang (1997), se determinó que la exposición crónica al As produce la hipermetilación del gen p53, impidiendo la expresión normal del gen.

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

Los estudios relativos a la genotoxicidad de los metabolitos pentavalentes del As (MMA⁺⁵ y DMA⁺⁵) han aportado generalmente resultados negativos, o bien

han evidenciado una genotoxicidad débil, en comparación con las especies de As(i) (IARC, 2004). Sin embargo, estudios realizados por Yamanaka y colaboradores (Yamanaka *et al.*, 1989a y b, 1990) demostraron que el DMA⁺³, metabolito del DMA⁺⁵, produce radicales peróxido que son capaces de romper el DNA. Los mismos autores han demostrado recientemente que se produce estrés oxidativo después de la exposición al óxido de dimetilarsénico (DMI), un compuesto modelo del DMA⁺³, por la producción de peróxido de arsénico dimetilado, resultando en la formación de cis-imina glicol (Yamanaka *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha demostrado que el As induce factores de crecimiento celular que causan un aumento de la proliferación celular y, en último término, favorecen la carcinogénesis (Germolec *et al.*, 1998).

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

6 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO

Como anteriormente hemos indicado en el capítulo dedicado al estudio del arsénico en el medio ambiente, los últimos trabajos de investigación dedicados a la toxicología de alimentos y a su repercusión en la salud humana, han demostrado lo importante que resulta conocer la naturaleza de los distintos metabolitos del arsénico, ya sean éstos orgánicos o inorgánicos y lo indispensable de poseer métodos analíticos adecuados para dosificarlos selectivamente.

Debido, probablemente a esta necesidad, esta línea de investigación ha experimentado avances espectaculares que permiten que en la actualidad dispongamos de muy diversas técnicas o métodos instrumentales para la cuantificación del arsénico: técnicas de espectrometría de absorción-emisión atómica, de absorción molecular, de fluorescencia atómica y de rayos X, la activación neutrónica-espectrometría y los métodos electrométricos.

De todas ellas y aunque a continuación vamos a describir adecuadamente las principales, la de mayor popularidad (presenta dos ventajas importantísimas, su especificidad y su sensibilidad), es la de la espectrometría de absorción atómica (AAS), que ha experimentado en los últimos años un avance extraordinario, habiendo perfeccionado los métodos que utilizan la generación de hidruros junto a la absorción-emisión atómica (H-AAS, H-ICP-AES), los métodos electrotérmicos con cámara de grafito (ET-AAS), y por último la espectrometría de plasma acoplado por inducción (ICP-AES).

6.1 ARSÉNICO TOTAL

Uno de los métodos más comúnmente utilizados para la determinación del arsénico total es el método de Gutzeit (Vogel, 1955).

El método clásico para la determinación de As a niveles de 1 a 100 µg es el espectrofotométrico, usando complejos de arsina con dietilditiocarbamato de plata (SDDC) (WHO, 1981). El arsénico es reducido a arsina por zinc granular en ácido clorhídrico o por borohidruro sódico. La arsina obtenida reacciona con el SDDC empleando como disolvente piridina y de esta forma se obtiene un complejo de color rojo, cuya absorbancia se determina a 533 nm.

Existe en bibliografía un gran número de trabajos acerca del uso del método del SDDC y frecuentemente se elige como método estándar de análisis. Aunque también existen diversos trabajos en los que la piridina se sustituye por L-eritro- 2-(metilamina)-1-fenilpropano-1-ol en cloroformo (WHO, 1981).

El ión arseniato reacciona con el molibdato amónico formando un complejo, que en su forma reducida presenta un color azul. Su límite de detección es de 0.1 µg, bajo condiciones favorables. Una adaptación de este método se usa para determinar las cantidades de arseniato, arsenito y fosfato existentes en agua de mar (WHO, 1981).

6.2 COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE ARSÉNICO

Bajas concentraciones de arsénico inorgánico, As (III) y As (V), pueden determinarse en agua marina usando el método anteriormente citado del azul de molibdeno.

El arsénico (III) y (V) se extraen mediante el empleo del tolueno de las soluciones acuosas acidificadas que los contienen.

La separación de la forma pentavalente de la trivalente se realiza teniendo en cuenta el pH y una reducción selectiva de las especies con borohidruro sódico. Los arsenicales orgánicos y los compuestos metilados de arsénico se reducen siguiendo las pautas indicadas en la Tabla 10. Donde podemos apreciar como al tamponar un medio a pH 4, se produce la reducción del As(V), y a pH 1.5 todos los

compuestos se reducen. Los compuestos metilados obtenidos de esta forma se pueden recoger en una pequeña "trampa" y ser separados y detectados de forma individual. Este método ha sido utilizado entre otros casos, en el estudio de orina humana (WHO, 1981).

Existen otras técnicas para la determinación específica de diversos compuestos, pero parece que son menos utilizadas.

Entre ellas destacan la detección mediante una cromatografía de gas de las arsinas recogidas en tolueno (se utiliza un detector de plasma estimulado por microondas); reacciones electroquímicas del ácido dimetilarsínico y de la trimetilarsina; la conversión del ácido dimetilarsínico en su correspondiente yoduro, el cual puede determinarse mediante cromatografía de gases (WHO, 1981).

Indicar que durante los últimos años se han realizado enormes esfuerzos para avanzar en la determinación de los distintos compuestos orgánicos de arsénico que pudieran encontrarse los organismos marinos; habiéndose detectado la presencia de arsenobetaína en langosta y de diferentes arsenofosfolípidos en algas.

A continuación vamos a describir los aspectos más importantes las técnicas espectrofotométricas, aunque para mayor información sobre ellas se puede consultar la bibliografía que se facilita en el correspondiente apartado.

Tabla 10.- Reacciones de reducción de compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico (WHO, 1981).

Compuestos	pK _{a1}	pH	Producto
HAsO ₂	9.23	<7	AsH ₃
H ₃ AsO ₄	2.20	>4.0	Sin reaccion
		1.5	AsH ₃
(CH ₃ AsO(OH) ₂)	4.1	>5.0	Reaccion debil

		1.5	CH_3AsH_2
$((\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}))$	6.2	1.5	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$
$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$	-	1.5	$(\text{CH}_3)_3\text{As}$
$(\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}(\text{OH})_2)$	-	1.5	$\text{C}_6\text{H}_5\text{AsH}_2$
$p\text{-H}_2\text{N-C}_6\text{H}_4\text{AsO}(\text{OH})$	-	1.5	$\text{H}_3+\text{NC}_6\text{H}_4\text{AsH}_2$

6.3 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUIOS

La primera técnica utilizada fue la espectrometría de absorción atómica con llama (F-AAS), que hizo que procedimientos que hasta ese momento eran tediosos se convirtiesen en procesos de rutina. Sin embargo, diversos elementos, como el arsénico (longitud de onda extrema, 193.7 nm), presentaban límites de detección excesivamente altos si se introducían directamente en la llama.

Debido a esta limitación es prácticamente obligatorio recurrir a técnicas más sensibles, tal es el caso de la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (H-AAS).

Recordemos que la base en la que se fundamenta esta técnica es la transformación de los compuestos minerales del arsénico, obtenidos tras la correspondiente mineralización, en su hidruro covalente o arsina (H_3As), por medio del hidrógeno nascente (Derache, 1990).

El proceso global podría resumirse en las siguientes etapas, las disoluciones acuosas problema se acidifican y se tratan con un agente reductor, con lo que se obtiene el correspondiente hidruro covalente volátil. Este compuesto es arrastrado por un gas inerte (argón o nitrógeno, generalmente), desde el frasco reactor al interior de los diferentes sistemas de atomización, donde el hidruro se descompone en átomos metálicos gaseosos, que pueden ser cuantificados mediante el empleo de AAS o AES.

A continuación se detallan algunas de las etapas de mayor interés del proceso global anterior.

6.3.1 Métodos de reducción

Como ya se indicó al describir el método de Gutzeit, el primer agente reductor utilizado para realizar la conversión del elemento en su correspondiente hidruro es el sistema metal-ácido (zinc granular-ácido clorhídrico), aunque también es posible la utilización del ácido sulfúrico. El principal inconveniente que presenta este tipo de reducción es la gran cantidad de tiempo que se requiere para completar el proceso, y por tanto, por la dificultad que este hecho conlleva a la hora de automatizar este tipo de determinaciones.

Un hito importante en el desarrollo de esta técnica se estableció cuando el agente reductor metal-ácido fue sustituido por el sistema reductor tetrahidrobórato (III) sódico-ácido, ya que con esta sustitución se mejoró en aspectos tan importantes como el rendimiento y el tiempo de reacción. La concentración de este compuesto recomendada por la famosa marca de aparatos analíticos Perkin Elmer es del 3 % de (NaBH_4) en 1 % de NaOH , aunque según Cervera (1990), ésta varía ampliamente dentro del intervalo de 0.5 a 10 % (p/v).

6.3.2 Métodos de atomización

Entre otros se pueden nombrar, la llama aire-acetileno, la llama gas inerte-hidrógeno-aire forzado, los tubos de cuarzo y tubos de grafito.

6.3.3 Estado de oxidación del arsénico

Debido a que la generación de la arsina es mucho más cómoda y sensible a partir de la forma trivalente que de la pentavalente, la reducción del As (V) a As (III) será un paso previo imprescindible a la formación de la arsina. El producto utilizado para este paso es el yoduro potásico. Según los trabajos de Cervera (1990) que posteriormente fueron confirmados por nuestros estudios (Carbonell,

1992; Burló *et al.*, 1992a,b), es suficiente el empleo de 1 mL de yoduro potásico al 2 %, dejando transcurrir un tiempo de reacción mínimo de 5 minutos.

6.3.4 Concentración de ácido

Como ya hemos dicho con anterioridad, se pueden emplear tanto el ácido clorhídrico como el sulfúrico para la reducción del arsénico (V); aunque, normalmente se emplea el primero de ellos. En nuestros trabajos (Carbonell, 1992; Burló *et al.*, 1992a,b), la concentración del ácido a emplear se mostró como un factor crucial a la hora de la determinación del arsénico, por ello y guiados por la recomendación establecida por Perkin Elmer en su manual de Condiciones estándar para la determinación de arsénico, donde se indica que el disolvente a utilizar debe ser una disolución de HCl 1.5 %, pasamos a ensayar con niveles similares al indicado. La conclusión a la que se llegó es que se debe de trabajar con una concentración final de ácido clorhídrico de 0.6 N (rangos de linealidad y lecturas máximas).

6.3.5 Puesta en disolución de la muestra

Los procedimientos utilizados para la puesta en disolución de la muestra son los usualmente utilizados: mineralización por vía seca, mineralización por vía húmeda y ataques ácidos a presión. La única diferencia la establece la volatilidad del elemento (As), que puede conllevar pérdidas importantes.

Por este motivo es necesario que al utilizar la mineralización por vía seca se utilice un agente de incineración que evite las ya mencionadas pérdidas por volatilización y que facilite la mineralización. Los productos utilizados con tal fin son el nitrato magnésico, $Mg(NO_3)_2$ y el óxido magnésico MgO , o mezclas de ambos.

En lo referente a la mineralización por vía húmeda, la mezcla más utilizada es la formada por ácido nítrico-ácido perclórico- ácido sulfúrico. Aunque debido al

cuidadoso manejo que requiere el ácido perclórico algunos investigadores prefieren prescindir de él.

En la actualidad, diversos investigadores entre los que nos encontramos, trabajan con ataques ácidos a presión en hornos microondas; proceso que economiza gran cantidad de tiempo y evita pérdidas debidas a la volatilización del elemento.

Las mezclas más empleadas son las formadas por ácido nítrico y agua oxigenada o bien por ácido nítrico-agua oxigenada-ácido perclórico.

Si bien en principio se optó por la mineralización por vía húmeda en la actualidad se tiende a retornar a los procesos por vía seca con uso de un agente de incineración (permite economizar tiempo y fundamentalmente no requiere la presencia continuada del controlador), así como al empleo de técnicas de ataque ácidos a presión con microondas.

6.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON CÁMARA DE GRAFITO

Los primeros trabajos publicados sobre esta técnica surgen, en la década de los setenta, ante los resultados negativos que se obtenían en la determinación mediante espectrofotometría de absorción de llama de diversos elementos Mo, As, etc.

Como principal ventaja presenta una elevada sensibilidad y fundamentalmente permite la utilización de micromuestras, es decir, se necesitan cantidades muy reducidas de muestra (10-20 μL).

De forma general, podríamos resumir las etapas de que consta esta técnica en cuatro etapas o fases:

1.- Fase de secado: en ella se evapora el disolvente en el que se encuentra contenida la muestra.

2.- Fase de calcinación: se eleva la temperatura con el fin de eliminar los residuos de la matriz (etapa fundamental).

3.- Fase de atomización: se producen átomos libres del elemento a determinar, es equivalente al efecto que la llama consigue o produce sobre las muestras a estudiar en la espectrofotometría de absorción atómica en llama.

4.- Fase de limpieza: se elimina la muestra sobrante. Las principales limitaciones de esta técnica vienen dadas por la dificultad que en ciertas ocasiones conlleva la eliminación de las interferencias espectrales, químicas, de absorción de fondo y los efectos de matriz. Estas dificultades se ven resaltadas o amplificadas en el caso del arsénico, pues este elemento presenta una longitud de onda de 193.7 nm (ultravioleta lejano), que es una zona limítrofe y muy proclive a las interferencias, por ello este elemento se considera tradicionalmente como difícil de determinar mediante esta técnica y tradicionalmente se prefiere la espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros. Aunque en los últimos años, están produciéndose grandes avances que permiten que el arsénico ya se pueda determinar por esta técnica sin que sean necesarias etapas previas de concentración.

Evidentemente y como consecuencia de las limitaciones anteriores, es imprescindible el uso de un corrector de fondo (existencia de diversos compuestos que absorben a una longitud de onda próxima a la del arsénico, y que por tanto comportarán una sobreestimación en la cuantificación del elemento), bien se trate de un corrector de fondo continuo (Arco de Deuterio), o bien de un corrector con efecto Zeeman.

Recientemente se ha producido un espectacular avance en la aplicación de esta metodología debido a la introducción del concepto Stabilized Temperature Platform Furnace (STPF).

Tecnología que implica la atomización de la muestra en una plataforma del tipo L'Vov, el empleo de un modificador de matriz, la utilización del máximo poder de calentamiento y la interrupción del flujo de gas durante la etapa de atomización.

6.5 ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA GENERADO POR INDUCCIÓN

Según indica Cervera (1990), la espectrometría de emisión atómica ha experimentado un fuerte impulso con el desarrollo de las fuentes de plasma generado por inducción (ICP). Esta técnica presenta importantes ventajas, tales como:

- Bajos límites de detección y buena precisión.
- Amplio intervalo de calibración.
- Interferencias químicas casi inexistentes debido a las elevadas temperaturas que se alcanzan en la antorcha.
- Posibilidad de análisis multielemental.

Pero como es evidente, también existen ciertas dificultades:

- Interferencias de carácter físico (problemas de nebulización, transporte y desolvatación).
- Interferencias espectrales. Se trata del inconveniente más importante y por ello se requiere un control cuidadoso de los interferentes.

El arsénico al ser determinado directamente mediante esta técnica presenta un relativamente alto límite de detección instrumental. Este hecho ha conducido al acoplamiento de la generación de hidruros a la espectrometría de emisión atómica con plasma generado por inducción (ICP-AES). Con esta asociación se ha conseguido reducir el límite de detección unas diez veces.

La puesta en disolución de las muestras, generalmente, se ciñe al empleo de la mineralización por vía húmeda con diferentes mezclas ácidas (nitríco, perclórico, sulfúrico) y agua oxigenada.

Es necesario mencionar como punto y final de este apartado, que la ICP-AES es probablemente la técnica que presenta una mejor perspectiva de futuro en cuanto a su utilización en la determinación de arsénico, pero evidentemente sin olvidar la AAS con generación de hidruros.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, S.K. 1989. Inhibition of *In vivo* genotoxicity by coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 27 :787-792.
- Abraham, S.K. 1991. Inhibitory effects of coffee on the genotoxicity of carcinogens in mice. *Mutat. Res.*, 262 :109-114.
- Abraham, S.K. 1995. Inhibitory effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice. *Mutat. Res.*, 347 :45-52.
- Abraham, S.K., Singh, S.P. 1999. Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 733-739.
- Abraham, S.K., Stopper, H. 2004. Anti-genotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro- N-nitrosoguanidine in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 561: 23-33.
- Aeschbacher, H.U., Meier, H., Ruch, E., Wurzner, H.P. 1984. Investigation of coffee in sister chromatid exchange and micronucleus tests *in vivo*. *Food Chem. Toxicol.*, 22: 803-807.
- Ahmad, S., Kitchin, K.T., Cullen, W.R. 2002. Plasmid DNA damage caused by methylated arsenicals, ascorbic acid and human liver ferritin. *Toxicol. Lett.*, 133: 47- 57.
- Aidoo, A., Lyn-Cook, L.E., Lensing, S., Wamer, W. 1994. Ascorbic acid (vitamin C) modulates the mutagenic effects produced by an alkylating agent *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24: 220-228.
- Albertini, R.J., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P. 1996. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 104 Supl. 3: 503-510.
- Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J.X., Buolamwini, J. 1997. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 10004-10012.
- Ames, B.N., Gold, L.S. 1990. Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7772-7776.

- Andersen, M.E., Clewell, H.J., Snow, E.T., Yager, J.W. 1999, Mode of action studies for assessing carcinogenic risks posed by inorganic arsenic. En: Arsenic Exposure and Health Effects. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 397-406.
- Andrew, A.S., Karagas, M.R., Hamilton, J.W. 2003, Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *Int. J. Cancer.*, 104: 263-268.
- Antoccia, A., Tanzarella, C., Modesti, D., Degrassi, F., Citokinesis Block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 287: 93-99, 1993.
- Aposhian, H.V., Arroyo, A., Cebrian, M.E., Del Razo, L.M., Hurlbut, K.M., Dart, R.C., Gonzalez-Ramirez, D., Kreppel, H., Speisky, H., Smith, A., Gonsbatt, M.E., Ostrosky-Wegman, P., Aposhian, M.M. 1997. DMPS-arsenic challenge test. I: Increased urinary excretion of monomethylarsonic acid in humans given dimercaptopropane sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282: 192-200.
- Aposhian, H.V. 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 37: 397-419.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Wildfang, E.K., Healy, S.M., Gailer, J., Radabaugh, T.R., Bogdan, G.M., Powell, T.A., Aposhian, M.M. 1999. How is inorganic arsenic detoxified? In W.R Chapell, CO Abernathy y RL Calderón (Eds.). Arsenic exposure and health effects. Elsevier Science, USA, pp. 289-297.
- Aposhian, H.V., Gurzau, E.S., Le, X.C., Gurzau, A., Healy, S.M., Lu, X., Ma, M., Yip, L., Zakharyan, R.A., Maiorino, R.M., Dart, R.C., Ticus, M.G., González-Ramírez, D., Morgan, D.L., Avram, D., Aposhian, M.M. 2000a. Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 693-697.
- Aposhian, H.V., Zheng, B., Aposhian, M.M., Le, X.C., Cebrian, M.E., Cullen, W., Zakharyan, R.A., Ma, M., Dart, R.C., Cheng, Z., Andrewes, P., Yip, L., O'Malley, G.F., Maiorino, R.M., van Voorhies, W., Healy, S.M., Titcomb, A. 2000b. DMPS-arsenic challenge test. II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMAIII), excreted in human urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165: 74-83.

- Aso, T., Abiko, Y. 1978. Tissue distribution of arsenic after subcutaneous implantation of arsenic trioxide pellet in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 3: 109-115.
- ATSDR, 1989. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology. Toxicological profile for arsenic. USA.
- Basu, A., Ghosh, P., Das, J.K., Banerjee, A., Ray, K., Giri, A.K. 2004. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13: 820-827.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.*, 488: 171-194.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K., Sarkar, J.N., Poddar, G., Nandy, A.K., Sarkar, P.K., Dutta, P.K., Banerjee, A., Das, M., Ray, K., Roychaudhury, S., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K. 2002. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.*, 516: 29-40.
- Beckman, G., Beckman, L., Nordenson, I. 1977. Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ. Health. Perspect.*, 19: 145-146.
- Benko, V., Rames, J., Götzl, M. 1999. Preliminary incidence analysis in skin basalioma patients exposed to arsenic in environmental and occupational settings. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 201-205.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J.W., Mannervik, B. 1994. Detoxication of base propanals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 1480-1484.
- Bettley, F.R., O'Shea, J.A. 1975. The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 92: 563-568.
- Biggs, M.L., Kalman, D.A., Moore, L.E., Hopenhayn-Rich, C., Smith, M.T., Smith, A.H. 1997. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat. Res.*, 386: 185-195.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J.

2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 275: 24798-24806.
- Board, P.G., Webb, G.C., Coggan, M. 1989. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.*, 53 :205-213.
- Boonchai, W., Walsh, M., Cummings, M., Chenevix-Trench, G. 2000. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, 136: 195-198.
- Borgoño, J.M., Greiber, R. 1972. Epidemiological study of arsenicum in the city of Antofagasta. En: *Trace substances in Environmental Health*, DD Hamphill (Ed.), Columbia: University of Missouri.
- Braman, R.S., Foreback, C.C. 1973. Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, 182: 1247-1249.
- Brown, K.G. 1999. Observations on arsenic exposure and Hhealth effects. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 407-413.
- Brown, M.E., Fan, A.M. 1994. Arsenic: Risk assessment for California drinking water standards. *J. Hazardous Mater.*, 39: 149-159.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. 1985. Study of inorganic arsenic methylation by rat liver *In vitro*: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch.. of Toxicol.*, 57: 125-129.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. 1987. Study of factors influencing the *In vivo* methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 91: 65-74.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R. 1988. Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 3149-3153.
- Buchet, J.P., Lison, D. 1998. Mortality by cancer in groups of the Belgian population with a moderately increased intake of arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 71: 125-130.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. 1980. Comparison of several methods for the determination of arsenic compounds in water and in urine. Their application for the study of arsenic metabolism and for the monitoring of workers exposed to arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 46: 11-29.

- Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. 1981a. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48: 71-79.
- Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. 1981b. Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48: 111-118.
- Buchet, J.P., Pauwels, J., Lauwerys, R. 1994. Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environ. Res.*, 66: 44-51.
- Byron, W.R., Bierbower, G.W., Brouwer, J.B., Hansen, W.H. 1967. Pathologic changes in rats and dogs from two-year feeding of sodium arsenite or sodium arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 10: 132-147.
- Cairns, J. 1975. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255: 197-200.
- Calderón, R.L., Hudgens, E., Le, X.C., Schreinemachers, D., Thomas, D.J. 1999. Excretion of arsenic in urine as a function of exposure to arsenic in drinking water. *Environ. Health. Perspect.*, 107: 663-667.
- Castren, K., Ranki, A., Welsh, J.A., Vahakangas, K.H. 1998. Infrequent p53 mutations in arsenic-related skin lesions. *Oncol. Res.*, 10: 475-482.
- Creelius, E.A. 1977. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health Perspect.*, 19: 147-150.
- Charbonneau, S.M., Hollins, J.G., Tam, G.K., Bryce, F., Ridgeway, J.M., Willes, R.F. 1980. Whole-body retention, excretion and metabolism of [⁷⁴As]arsenic acid in the hamster. *Toxicol. Lett.*, 5: 175-182.
- Charbonneau, S.M., Spencer, K., Bryce, F., Sandi, E. 1978. Arsenic excretion by monkeys dosed with arsenic-containing fish or with inorganic arsenic. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 470-477.
- Chen, C.J., Chen, C.W., Wu, M.M., Kuo, T.L. 1992. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer*, 66: 888-892.

- Chen, C.L., Liu, Q., Relling, M.V. 1996. Simultaneous characterization of glutathione Stransferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, 6: 187-191.
- Chen, H., Yoshida, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S., Inoue, I., Endo, G. 1996. Methylation and demethylation of dimethylarsinic acid in rats following chronic oral exposure. *Applied. Organometallic Chemistry*, 10: 741-745.
- Chen Y, Megosh LC, Gilmour SK, Sawicki JA, O'Brien TG. 2000. K6/ODC transgenic mice as a sensitive model for carcinogen identification. *Toxicol. Lett.*, 116: 27-35.
- Chien, C.J., Hsu, L.I., Tseng, C.H., Hsueh, Y.M., Ciou, H.I. 1999. Emerging epidemics of arseniasis in Asia. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 113-121.
- Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Hsieh, L.L., Hsu, L.I., Hsu, Y.H., Hsieh, F.I., Wei, M.L., Chen, H.C., Yang, H.T., Leu, L.C., Chu, T.H., Wu, C.C., Yang, M.H., Chen, C.J. 1997. Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione Stransferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat. Res.*, 386: 197-207.
- Chouchane, S., Snow, E.T. 2001. *In vitro* effect of arsenical compounds on glutathionerelated enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 517-522.
- Chung, J.S., Kalman, D.A., Moore, L.E., Kosnett, M.J., Arroyo, A.P., Beeris, M., Mazumder, D.N., Hernández, A.L., Smith, A.H. 2002. Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health. Perspect.*, 110: 729-733.
- Cikrt, M., Bencko, V., Tich, M., Benes, B. 1980. Biliary excretion of 74As and its distribution in the golden hamster after administration of 74As(III) and 74As(V). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 24: 384-388.
- Concha, G. 2001. Metabolism of inorganic arsenic and biomarkers of exposure. Tesis Doctoral, Karolinska Institutet, Suecia.
- Concha, G., Nermell, B., Vahter, M.V. 1998a. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ. Health Perspect.*, 106: 355-359.

- Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Nermell, B., Vahter, M. 1998b. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol. Sci.*, 44: 185-190.
- Concha, G., Vogler, G., Nermell, B., Vahter, M. 2002. Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 75: 576-580.
- Das, T., Roychoudhury, A., Sharma, A., Talukder, G. 1993. Modification of clastogenicity of three known clastogens by garlic extract in mice *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 383-388.
- Deknudt, G. 1986. Chemical induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated in G0 prior to stimulation by different mitogens and revealed 72 h later in second division cells. *Mutat. Res.*, 174: 67-70.
- Del Razo, L.M., García-Vargas, G.G., Hernández, M.C., Gomez-Muñoz, A., Cebrían, M.E. 1999. Profile of urinary arsenic metabolites in children chronically Exposed to Inorganic arsenic in Mexico. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chappell WR, Abernathy CO y Calderón RL. (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 281-287.
- De Marini, D.M. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.*, 567: 447-474.
- Dong, J.T., Luo, X.M. 1993. Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNAprotein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat. Res.*, 302: 97-102.
- Ducoff, H.S., Neal, W.B., Straube, R.L., Jacobson, L.O., Brues, A.M. 1948. Biological studies with arsenic⁷⁶. II. Excretion and tissue localization. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 69: 548-554.
- Dulout, F.N., Grillo, C.A., Seoane, A.I., Madema, C.R., Nilsson, R., Vahter, M., Darroudi, F., Natarajan, A.T. 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.*, 370: 151-158.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 34-4.,

- Eguchi, N., Kuroda, K., Okamoto, A., Horiguchi, S. 1997. Metabolites of arsenic induce tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 141-145.
- Elhajouji, A., Santos, A.P., van Hummelen, P.Y., Kirsch-Volders, M. 1994. Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo_a_pyrene. *Mutagenesis*, 9: 307-313.
- Endo, G., Kuroda, K., Okamoto, A., Horiguchi, S. 1992. Dimethylarsenic acid induces tetraploids in Chinese hamster cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 131-137.
- EPA. <http://www.epa.gov/safewater/ars/implement.html>, 2002.
- Evans, H.J. 1988. Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutat. Res.*, 204: 355- 363.
- Falck, G., Catalán, J., Norppa, H. 1997. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutat. Res.*, 392: 71-79.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut. Res.*, 285: 35-44.
- Fenech, M., Morley, A.A. 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *In vivo* ageing and low dose X-radiation. *Mutat. Res.*, 161: 193-198.
- Fenech, M., Morley, A.A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29-36.
- Fenech, M., Neville, S. 1992. Conversion of excision repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Molec. Mutagen.*, 19: 27-36.
- Fischer, A.B., Buchet, J.P., Lauwerys, R.R. 1985. Arsenic uptake, cytotoxicity and detoxification studied in mammalian cells in culture. *Arch. Toxicol.*, 57: 168-172.
- Fontham, E., Correa, P., Rodriguez, E., Lyn, Y. 1986. Validation of smoking history with the micronuclei test. *En: Mechanisms in tobacco carcinogenesis.*

Banbury report, Hoffman D y Harris C (Eds.), 23, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 113-119.

Francesconi, K.A., Tanggaar, R., McKenzie, C.J., Goessler, W. 2002. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin. Chem.*, 48: 92-101.

Freeman, H.C., Uthe, J.F., Fleming, R.B., Odense, P.H., Ackman, R.G., Landry, G., Musial, C. 1979. Clearance of arsenic ingested by man from arsenic contaminated fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 224-229.

Frenz, P.Y., Sancha, A.M. 1997. Determinación de los niveles de exposición a As en la población chilena. En: "Protección de la competitividad de los productos mineros de Chile: antecedentes y criterios para la regulación ambiental del As" Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile y Centro de Investigación Minero Metalúrgica- CIMM, Chile. FONDEF 2- 24.

Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J.L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar, K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clapper, M.L., Coutelle, C., Daly, A., Dell'Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C.M., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D.W., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L.L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M.C., van Lieshout, E.M., London, S., Manni, J.J., Maugard, C.M., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F.F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W.H., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P.G., Sim, E., Sinnet, D., Strange, R.C., Stucker, I., Sugimura, H., To-Figueras, J., Vineis, P., Yu, M.C., Taioli, E. 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10: 1239-1248.

Gebel, T. 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203: 249-262.

Gebel, T. 1998. Suppression of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. *Mutat. Res.*, 412: 213-218.

Gebel, T., Christensen, S., Dunkelberg, H. 1997. Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. *Anticancer Res.*, 17: 2603-2607.

- Georis, B., Cardenas, A., Buchet, J.P., Lauwerys, R. 1990. Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicology*, 63: 73-84.
- Gerhardsson, L., Nordberg, G.F. 1993. Lung cancer in smelter workers--interactions of metals as indicated by tissue levels. *Scand J Work Environ. Health*, 19: 90- 94.
- Germolec, D.R., Spalding, J., Yu, H.S., Chen, G.S., Simeonova, P.P., Humble, M.C., Bruccoleri, A., Boorman, G.A., Foley, J.F., Yoshida, T., Luster, M.I. 1998. Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth factors. *Am. J. Pathol.*, 153: 1775-1785.
- Ginsburg, J.M. 1965. Renal mechanism for excretion and transformation of arsenic in the dog. *Am. J. Physiol.*, 208: 832-840.
- Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D., Waalkes, M.P. 1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.*, 49: 5- 14.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzman, P., Blas, J., Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G., Albores, A., Cebrian, M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.*, 386: 219- 228.
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S., Marcos, R. 2004. *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19: 129-135.
- Gurr, J.R., Lin, Y.C., Ho, I.C., Jan, K.Y., Lee, T.C. 1993. Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. *Mutat. Res.*, 319: 135-142.
- Gyurasics, A., Varga, F., Gregus, Z. 1991a. Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous glutathione and xenobiotics with glutathione-dependent hepatobiliary transport. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 937-944.
- Gyurasics, A., Varga, F., Gregus, Z. 1991b. Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 465-468.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C. 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.*, 58: 4117-4121.

- Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, G.C., Wolf, C.R. 1997. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18: 641-644.
- Harrington-Brock, K., Cabrera, M., Collard, D.D., Doerr, C.L., McConnell, R., Moore, M.M., Sandoval, H., Fuscoe, J.C. 1999. Effects of arsenic exposure on the frequency of HPRT-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: a pilot study. *Mutat. Res.*, 431:247-257.
- Hartmann, A., Speit, G. 1996. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27: 98-104.
- Hartwig, A., Groblichhoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R., Mullenders, L.H. 1997. Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UVirradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18: 399-405.
- Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Mille, E., Saker, D., Shen, J., Zaragoza, M. 1996. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28: 167-175.
- Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X., Hirano, S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch. Toxicol.*
- Hayes, J.D., Pulford, D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30: 445-600.
- Healy, S.M., Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. 1997. Enzymatic methylation of arsenic compounds: IV. *In vitro* and *In vivo* deficiency of the methylation of arsenite and monomethylarsonic acid in guinea pig. *Mutat. Res.*, 386: 229-239, (Erratum in: *Mutat. Res.*, 387(3): 173, 1997).
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., McGregor, J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.
- Heddle, J.A. 1976. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. En: *Mutation-induced chromosome damage in man*. Evans HJ, Lloyd DC (Eds.), University press, Edimburg, pp. 191-200.

- Hernández, A., Céspedes, W., Xamena, N., Surrallés, J., Creus, A., Galofré, P., Marcos, R. 2003. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett.*, 190: 37-44.
- Hessl, S.M., Berman, E. 1982. Severe peripheral neuropathy after exposure to monosodium methyl arsonate. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 19: 281-287.
- Hinwood, A.L., Sim, M.R., Jolley, D., de Klerk, N., Bastone, E.B., Gerostamoulos, J., Drummer, O.H. 2003. Hair and toenail arsenic concentrations of residents living in areas with high environmental arsenic concentrations. *Environ. Health. Perspect.*, 111: 187-193.
- Hollins, J.G., Charbonneau, S.M., Bryce, F., Ridgeway, J.M., Tam, G.K.H., Willes, R.F. 1979. Whole body retention and excretion of (⁷⁴As)arsenic in the adult beagle dog. *Toxicol. Lett.*, 4: 7-13.
- Hopenhayn-Rich, C., Smith, A.H., Goeden, H.M. 1993. Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. *Environ. Res.*, 60: 161-177.
- Hsu, Y.H., Li, S.Y., Chiou, H.Y., Yeh, P.M., Liou, J.C., Hsueh, Y.M., Chang, S.H., Chen, C.J. 1997. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges and delayed cell proliferation in peripheral lymphocytes of Bowen's disease patients and matched controls of arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Mutat. Res.*, 386: 241-251.
- Hu, Y., Su, Y., Snow, E.T. 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation. *Mutat. Res.*, 408: 203-218.
- Hughes, M.F., Menache, M., Thompson, D.J. 1994. Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 22: 80-89.
- IARC. 1986. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco smoking, Vol. 38, Lyon.
- IARC. 2003. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants including arsenic. Lyon, France. International Agency for Research of Cancer,
- Jager, J.W., Ostrosky-Wegman, P. 1997. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat. Res.*, 386: 181-184.

- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R., Natarajan, A.T. 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat. Res.*, 284: 215-221.
- Jongen, W.M., Cardinaals, J.M., Bos, P.M., Hagel, P. 1985. Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products. *Food. Chem. Toxicol.*, 23: 669-673.
- Karagas, M.R., Morris, J.S., Weiss, J.E., Spate, V., Baskett, C., Greenberg, E.R. 1996. Toenail samples as an indicator of drinking water arsenic exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5: 849-852.
- Kashiwada, E., Kuroda, K., Endo, G. 1998. Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 413: 33-38.
- Katsnel'son, B.A., Neizvestnova, Y.M., Blokhin, V.A. 1986. Induction of cancer by the chronic action of arsenic. *Vopr. Onkol.* 32: 68-73.
- Kenyon, E.M., Hughes, M.F. 2001. A concise review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsinic acid. *Toxicology*, 160: 227-236.
- Ketterer, B., Harris, J.M., Talaska, G., Meyer, D.J., Pemble, S.E., Taylor, J.B., Lang, N.P., Kadlubar, F.F. 1992. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ. Health Perspect.*, 98: 87-94.
- Kitchin, K.T., Ahmad, S. 2003. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 137: 3-13.
- Kitchin, K.T. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172: 249-261.
- Klaassen, C.D. 1974. Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29: 458-468.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H., Harrington-Brock, K., Allen, J.W., Winkfield, E., Poorman-Allen, P., Kundu, B., Funasaka, K., Roop, B.C., Mass, M.J., DeMarini, D.M. 2003. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42: 192-205.
- Kochhar, T.S., Howard, W., Hoffman, S., Brammer-Carleton, L. 1996. Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Lett.*, 84: 37-42.

- Kote-Jarai, Z., Easton, D., Edwards, S., Jefferies, S., Durcocher, F., Jackson, R., Singh, R., Ardern-Jones, A., Murkin, A., Dearnaley, D., Shearer, R., Kirby, R., and the CRC/BPG UK familial prostate cancer study collaborators, Houlston, R., Eeles, R. 2001. Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics*, 11: 325-330.
- Kurtio, P., Komulainen, H., Hakala, E., Kahelin, H., Pekkanen, J. 1998. Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 297-305.
- Larramendy, M.L., Popescu, N.C., Dipaolo, J.A. 1981. Induction by inorganic metal salts of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human and Syrian hamster cells. *Environ. Mutagen.*, 3: 597-606.
- Lee, T.C., Huang, R.Y., Jan, K.Y. 1985b. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 148: 83-89.
- Lee, T.C., Oshimura, M., Barrett, J.C. 1985a. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis*, 6: 1421-1426.
- Lee-Chen, S.F., Yu, C.T., Jan, K.Y. 1992. Effect of arsenite on the DNA repair of UVirradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis*, 7: 51-55.
- Léonard, A., Lauwerys, R.R. 1980. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutat. Res.*, 75: 49-62.
- Lerda, D. 1994. Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.*, 312: 111-120.
- Lewis, R.L., Sweet, D.V. 1983-1984 Registry of toxic effects of Chemical Substances.
- Supplement, U.S. 1985. Department of Health and Human Services, Lewis RL, Sweet DV (Eds.). Cincinnati.
- Li, J.H., Rossman, T.G. 1991. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol. Met.*, 4: 197-200.
- Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yamamoto, S., Yoshida, K., Endo, G., Fukushima, S. 1998. Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder

carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett.*, 134: 29- 36.

Lin, H.J., Han, C.Y., Bernstein, D.A., Hsiao, W., Lin, B.K., Hardy, S. 1994. Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 15: 1077-1081.

Liou, S.H., Lung, J.C., Chen, Y.H., Yang, T., Hsieh, L.L., Chen, C.J., Wu, T.N. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res.*, 59: 1481-1484.

Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K. 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 1643-1648.

Loffredo, C.A., Aposhian, H.V., Cebrian, M.E., Yamauchi, H., Silbergeld, E.K. 2003. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ. Res.*, 92: 85-91.

Lubin, J.H., Pottern, L.M., Stone, B.J., Fraumeni, J.F. Jr. 2000. Respiratory cancer in a cohort of copper smelter workers: results from more than 50 years of follow-up. *Am. J. Epidemiol.*, 151: 554-565.

Lucero, L., Pastor, S., Suarez, S., Durban, R., Gomez, C., Parron, T., Creus, A., Marcos, R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.*, 464: 255-262.

Ma, M., Le, C. 1998. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clinical Chemistry*, 44: 539-550.

Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, S., Sarkar, J.N., Roy, A.K., Poddar, G., Nandy, A.K., Banerjee, A., Ray, K., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K. 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.*, 534: 133-143.

Mahata, J., Chaki, M., Ghosh, P., Das, L.K., Baidya, K., Ray, K., Natarajan, A.T., Giri, A.K. 2004. Chromosomal aberrations in arsenic-exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India. *Cytogenet. Genome Res.*, 104: 359-364.

- Maiti, S., Chatterjee, A.K. 2001. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Arch. Toxicol.*, 75: 531-537.
- Majer, B.J., Laky, B., Knasmüller, S., Kassie, F. 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.*, 489: 147-172.
- Mäki-Paakkanen, J., Kurttio, P., Paldy, A., Pekkanen, J. 1998. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32: 301-313.
- Mandal, B.K., Ogra, Y., Suzuki, K.T. 2003. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189: 73-83.
- Mannervik, B. 1985. Glutathione peroxidase. *Methods. Enzymol.*, 113: 490-495.
- Mannervik, B. 2003. Novel polymorphisms in the glutathione transferase superfamily. *Pharmacogenetics*, 13: 127-128.
- Mannervik, B., Danielson, U.H. 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, 23: 283-337.
- Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Dillio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R. 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282: 305-306.
- Marafante, E., Vahter, M., Norin, H., Envall, J., Sandstrom, M., Christakopoulos, A., Ryhage, R. 1987. Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *J. Appl. Toxicol.*, 7: 111-117.
- Marnell, L.L., Garcia-Vargas, G.G., Chowdhury, U.K., Zakharyan, R.A., Walsh, B., Avram, M.D., Kopplin, M.J., Cebrián, M.E., Silbergeld, E.K., Aposhian, H.V. 2003. Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem. Res. Toxicol.*, 16: 1507-1513.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J., Marcos, R. 2004. Evaluation of micronucleus induction in a

- Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat. Res.*, 564: 65-74.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J.P., Gebel, T.W., Surrallés, J., Marcos, R. 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicol. Lett.*, 155: 319-327.
- Mass, M.J., Wang, L. 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 386: 263-277.
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D. 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 355-361.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T. 1997a. Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 1051-1056.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T. 1997b. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 31-36.
- Morgan, A. 2001. Arsenic exposure and health effects. Office of water, office of science and technology. Health and Ecological Criteria Division. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, Chapter 3.
- Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M., Fukushima, S. 2000. Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in keratin (K6)/ODC transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 579-581.
- Muñoz, O., Díaz, O.P., Leyton, I., Nunez, N., Devesa, V., Suner, M.A., Velez, D., Montoro, R. 2002. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 642-647.
- Nakadaira, H., Endoh, K., Katagiri, M., Yamamoto, M. 2002. Elevated mortality from lung cancer associated with arsenic exposure for a limited duration. *J. Occup. Environ. Med.*, 44: 291-299.

- Nakamuro, K., Sayato, Y. 1981. Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutat. Res.*, 88: 73-80.
- Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R.P., Cullen, W.R., Mass, M.J. 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1627-1634.
- Ng, J.C., Seawright, A.A., Qi, L., Garnet, C.M., Moore, M.M., Chriswell, B. 1998. Tumors in mice induced by chronic exposure of high arsenic concentration in drinking water. En: *Book of Abstracts of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects*, San Diego, CA, USA, pp. 28.
- Nilsson, R., Jha, A.N., Zaprianov, Z., Natarajan, A.T. 1993. Chromosomal aberrations in humans exposed to arsenic in Sredongorie area, Bulgaria. *Fresenius Environ. Bull.*, 2: 59-64.
- Noda, Y., Suzuki, T., Kohara, A., Hasegawa, A., Yotsuyanagi, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Yamanaka, K., Okada, S. 2002. *In vivo* genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse. *Mutat Res.*, 513: 205-212.
- Nordenson, I., Sweins, A., Beckman, L. 1981. Chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to trivalent and pentavalent arsenic. *Scand. J. Work Environ. Health*, 7: 277-281.
- Nordenson, I., Beckman, G., Beckman, L., Nordstrom, S. 1978. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead. *Hereditas*, 88: 263-267.
- Nordenson, I., Beckman, L. 1982. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. VII. Reanalysis and follow-up of chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas*, 96: 175-181.
- Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C. 1993. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis*, 8: 519-525.
- Okui, T., Fujiwara, Y. 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 172: 69-76.

- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., Garcia-Vargas, G., Del Razo, L.M. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.*, 250: 477-482.
- Oya-Ohta, Y., Kaise, T., Ochi, T. 1996. Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutat. Res.*, 357: 123-129.
- Ozkul, Y., Donmez, H., Erenmemisoglu, A., Demirtas, H., Imamoglu, N. 1997. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis*, 12: 285-287.
- Pastor, S., Creus, A., Parrón, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S., Marcos, R. 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, 18: 249-258.
- Pastor, S., Creus, A., Xamena, N., Siffel, C., Marcos, R. 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40: 101-109.
- Pastor, S., Gutierrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A., Marcos, R. 2001b. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.*, 495: 147-156.
- Pastor, S., Gutierrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S., Marcos, R. 2001a. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 16: 539-545.
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., Taylor, J.B. 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, 300: 271- 276.
- Pershagen, G. 1985. Lung cancer mortality among men living near an arsenic-emitting smelter. *Am. J. Epidemiol.*, 122: 684-694.

- Pershagen, G., Nordberg, G., Bjorklund, N.E. 1984. Carcinomas of the respiratory tract in hamsters given arsenic trioxide and/or benzo[a]pyrene by the pulmonary route. *Environ. Res.*, 34: 227-241.
- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Aposhian, V.H. 2000. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163: 203-207.
- Petrick, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A., Aposhian, H.V. 2001. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 651-656.
- Pi, J., Yamauchi, H., Kumagai, Y., Sun, G., Yoshida, T., Aikawa, H., Hopenhayn-Rich, C., Shimojo, N. 2002. Evidence for induction of oxidative stress caused by chronic exposure of Chinese residents to arsenic contained in drinking water. *Environ. Health Perspect.*, 110: 331-336.
- Picker, J.D., Fox, D.P. 1986. Do curried foods produce micronuclei in buccal epithelial cells? *Mutat. Res.*, 171: 185-188.
- Pickett, C.B., Lu, A.Y. 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 743-764.
- Radack, K.L., Pinney, S.M., Livingston, G.K. 1995. Sources of variability in the human lymphocytes micronucleous assay: a population-based study. *Environ. Molec. Mutagen.*, 26: 26-36.
- Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Mukherjee, S.C., Mondal, B.K., Paul, K., Lodh, D., Biswas, B.K., Chanda, C.R., Basu, G.K., Saha, K.C., Roy, S., Das, R., Palit, S.K., Quamruzzaman, Q., Chacrabarti, D. 2001. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India - a review and commentary. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 39: 683-700.
- Ramírez, M.J., Surrallés, J., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R. 1997. Aneugenic activity in human cultured lymphocytes. An overall study with colchicine using the micronucleus assay and fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Mutagenesis*, 12: 405-410.
- Ramírez, M.J., Surrallés, J., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R. 1999. Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells. *Mutat. Res.*, 440: 163-169.
- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., Ostrosky-Wegman, P. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism

- for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.*, 386: 291-298.
- Rasmussen, R.E., Menzel, D.B. 1997. Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.*, 386: 299-306.
- Rebbeck, T.R. 1997. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 733-743.
- Richeldi, L., Sorrentino, R., Saltini, C. 1993. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of berillium disease. *Science*, 262: 242-244.
- Rojewski, M.T., Baldus, C., Knauf, W., Thiel, E., Schrezenmeier, H. 2002. Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br. J. Haematol.*, 116: 555-563.
- Rossman, T.G., Stone, D., Molina, M., Troll, W. 1980. Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.*, 2: 371-379.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J., Bosland, M.C. 2001. Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 176: 64-71.
- Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. 2001. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochem. J.*, 358: 257-262.
- Roy Choudhury, A., Das, T., Sharma, A., Talukder, G. 1996. Dietary garlic extract in modifying clastogenic effects of inorganic arsenic in mice: two-generation studies. *Mutat. Res.*, 359: 165-170.
- Rudell, R., Slayton, T.M., Beck, B. 1996. Implications of As genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 23: 87-105.
- Rudnay, P., Borzsonyi, M. 1981. The tumorigenic effect of treatment with arsenic trioxide *Magyar Onkol.*, 25: 73-77.
- Rushmore, T.H., Pickett, C.B. 1993. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.*, 268: 11475-11478.

- Sakurai T, Kojima C, Ochiai M, Ohta T, Fujiwara K. 2004. Evaluation of *in vivo* acute immunotoxicity of a major organic arsenic compound arsenobetaine in seafood. *Int. Immunopharmacol.* 4: 179-184.
- Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Fukushima, S., 1999. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid (DDMA) in p53 knockout and wild type C57BL/6T mice. *Nutr. Cancer*, 34: 220-228.
- Sampayo-Reyes, A., Zakharyan, R.A., Healy, S.M., Aposhian, H.V. 2000. Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 1181-1186.
- Sancha, A.M., Vega, F., Fuentes, S., Venturino, H., Baron, A.M., Moreno, V., Salazar, A.M. 1993. Exposición al arsénico de la población atacameña. Departamento de Ingeniería Civil, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Santolaya Biondi, R., Salazar, L., Santolaya Cohen, R. 1995. Arsénico: impacto sobre el hombre y su entorno, II Región de Chile (Antofagasta). Programa Ambiente 02. Centro de Investigaciones Biológicas y Médicas de Altura-CIEMA, División Chuquicamata- CODELCO, Chile.
- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R., Levis, A.G. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the buccal mucosa. *Mutagenesis*, 2: 11-17.
- Sarto, F., Tomarin, R., Giacomelli, L., Canova, A., Raimondi, F., Ghiotto, C., Fiorentino, M.V. 1990. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitubercular therapy. *Mutat. Res.*, 288: 157-169.
- Schaumloffel, N., Gebel, T. 1998. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis*, 13: 281-286.
- Schwerdtle, T., Walter, I., Mackiw, I., Hartwig, A. 2003. Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis*, 24: 967-974.
- Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W., Pearson, W.R. 1988. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85: 7293-7297.
- Seoane, A.I., Grillo, C.A., Nilsson, R., Darroudi, F., Nataranjan, A.T., Dulout, F.N. 1998. Alteraciones cromosómicas y metabolismo del arsénico en poblaciones humanas expuestas en forma crónica en Argentina. En:

Evaluación Mutagénica y Genotóxica. E. de la Peña, CSIC, I. Burguete, y A. Guadaño (Eds.). Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental SEMA, Star Ibérica, Madrid, pp. 239-248.

- Shimizu, M., Yano, E. 1987. Mutagenicity of instant coffee and its interaction with dimethylnitrosamine in the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 189 :307-311.
- Simeonova, P.P., Luster, M.I. 2000. Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19: 281-286.
- Smith, A.H., Arroyo, A.P., Mazumder, D.N., Kosnett, M.J., Hernandez, A.L., Beeris, M., Smith, M.M., Moore, L.E. 2000. Arsenic-induced skin lesions among Atacameño people in Northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ. Health. Perspect.*, 108: 617-620.
- Smith, G., Smith, C.A.D., Wolf, C.R. 1995. Pharmacogenetic polymorphisms En: *Environmental Mutagenesis*. Phillips DH, Venitt S (Eds.) BIOS Scientific Publishers Ltda., UK, chapter 5.
- Snow, E.T., Hu, Y., Yan, C.C., Chouchane, S. 1999. Modulation of DNA repair and glutathione levels in human keratocytes by micromolar arsenite. En: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 243-251.
- Stich, H.F., Rosin, M.P. 1983a. Micronuclei in exfoliated human cells as an internal dosimeter for exposures to carcinogens. En: *Carcinogens and mutagens in the environment*, H.F. Stich (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 17-25.
- Stich, H.F., Rosin, M.P. 1983b. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human bucal mucosa cells. *Int. J. Cancer*, 31: 305-308.
- Stich, H.F., Parida, B.B., Brunnemann, K.D. 1992. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int. J. Cáncer*, 50 :172-176.
- Stich, H.F., Stich, W., Rosin, M.P. 1985. The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci.*, 34: 337-342.
- Stocker, R., Ames, B.N. 1987. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8130- 8134.

- Stybło, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch. Toxicol.*, 74: 289-299.
- Stybło, M., Drobna, Z., Jaspers, I., Lin, S., Thomas, D.J. 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ. Health Perspect.*, 110: 767-771.
- Surrallés, J., Natarajan, A.T. 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.*, 392: 165-174.
- Surrallés, J., Antocchia, A., Creus, A., Degrassi, F., Tanzarella, C. 1994. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. *Mutagenesis*, 9: 347-353.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R. 1995a. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 341: 169-184.
- Surrallés, J., Catalán, J., Creus, A., Norppa, H., Xamena, N., Marcos, R. 1995b. Micronuclei induced by alachlor, mitomycin-C and vinblastine in human lymphocytes: presence of centromeres and kinetocores and influence of staining technique. *Mutagenesis*, 10: 417-423.
- Suzuki, K.T., Tomita, T., Ogra, Y., Ohmichi, M. 2001. Glutathione-conjugated arsenics in the potential hepato-enteric circulation in rats. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 1604-1611.
- Takagi, Y., Matsuda, S., Imai, S., Ohmori, Y., Masuda, T., Vinson, J.A., Mehra, M.C., Puri, B.K., Kaniewski, A. 1988. Survey of trace elements in human nails: an international comparison. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 690-695.
- Tam, G.K., Charbonneau, S.M., Lacroix, G., Bryce, F. 1979. *In vitro* methylation of 74As in urine, plasma and red blood cells of human and dog. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 69-71.
- Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Hasegawa, T., Makino, Y., Seko, Y., Hanioka, N., Ando, M. 2003. Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301: 516-520.

- Taningher, M., Malacarne, D., Izzotti, A., Ugolini, D., Parodi, S. 1999. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.*, 436: 227-261.
- Thorgeirsson, U.P., Dalgard, D.W., Reeves, J., Adamson, R.H. 1994. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 19: 130-151.
- Tian, D., Ma, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X.C., Ni, Z., Allen, J., Collins, B., Shreinemachers, D., Mumford, J.L. 2001. Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *J. Toxicol. Environ. Health*, 64: 473-484.
- Tice, R.R., Yager, J.W., Andrews, P., Crecelius, E. 1997. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutat. Res.*, 386: 315-334.
- Tinwell, H., Stephens, S.C., Ashby, J. 1991. Arsenite as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: mouse micronucleus assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's solution. *Environ. Health. Perspect.*, 95: 205-210.
- Titenko-Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M.T. 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat. Res.*, 417: 101-114.
- Titenko-Holland, N., Moore, L.E., Smith, M.T. 1994. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.*, 312: 39-50.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271:69-77.
- Tong, Q., Zeng, F., Zheng, L., Zhao, J., Lu, G. 2001. Apoptosis inducing effects of arsenic trioxide on human bladder cancer cell line BIU-87. *Chin Med J (Engl)*. 114: 402-406.
- Tseng, W.P., Chu, H.M., How, S.W., Fong, J.M., Lin, C.S., Yeh, S. 1968. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J. Nat. Cancer Inst.*, 40: 453-463.
- Tsuchida, S. 1997. Glutathione Transferases En: *Encyclopedia of Cancer*, Vol. 1. Academic Press, Inc., pp. 733-743.

- Vahter, M. 1994. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8: 157-182.
- Vahter, M. 1999. Variation in human metabolism of arsenic. In: *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapell WR, Abernathy CO, Calderón RL (Eds.) Elsevier Science, USA, pp. 267-280.
- Vahter, M. 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.*, 112-113: 209-217.
- Vahter, M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182: 211-217.
- Vahter, M., Concha, G. 2001. Role of metabolism in arsenic toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, 98: 1-5.
- Vahter, M., Marafante, E., Lindgren, A., Dencker, L. 1982. Reduction and subcellular binding of arsenate in marmoset monkeys after injection of 74As-arsenite. *Arch. Toxicol.*, 51: 65-77.
- Vahter, M., Marafante, E. 1983. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem. Biol. Interact.*, 47: 29-44.
- Vahter, M., Couch, R., Nermell, B., Nilsson, R. 1995. Lack of methylation of inorganic arsenic in the chimpanzee. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133: 262-268.
- Van Pelt, F.N., Haring, R.M., Overkamp, M.J., Weterings, P.J. 1991. Micronucleus formation in cultured human keratinocytes following exposure to mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, 252: 45-50.
- Venegas, W., Zapata, I., Carbonell, E., Marcos, R. 1998. Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción, Chile. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 18: 123-129.
- Vig, B.K., Figueroa, M.L., Cornforth, M.N., Jenkins, S.H. 1984. Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am. J. Ind. Med.*, 6: 325-338.
- Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C., Jan, K.Y., Huang, H. 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology*, 121: 229-237.
- Wang, J.P., Qi, L., Moore, M.R., Ng, J.C. 2002. A review of animal models for the study of arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 133: 17-31.

- Wang, T.S., Chung, C.H., Wang, A.S., Bau, D.T., Samikkannu, T., Jan, K.Y., Cheng, Y.M., Lee, T.C. 2002. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1254-1258.
- Wamer, M.L., Moore, L.E., Smith, M.T., Kalman, D.A., Fanning, E., Smith, A.H. 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 3: 583-590.
- Watanabe, C., Inaoka, T., Kadono, T., Nagano, M., Nakamura, S., Ushijima, K., Murayama, N., Miyazaki, K., Ohtsuka, R. 2001. Males in rural Bangladeshi communities are more susceptible to chronic arsenic poisoning than females: analyses based on urinary arsenic. *Health Perspect.*, 109: 1265-1270.
- Watson, M.A., Stewart, R.K., Smith, G.B., Massey, T.E., Bell, D.A. 1998. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19: 275-280.
- Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S. 1999. Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 20: 1873-1876.
- Weinstein, I.B. 1988. The origins of human cancer: molecular mechanisms and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.*, 48: 4135- 4143.
- Welch, K., Higgins, I., Oh, M., Burchfiel, C. 1982. Arsenic exposure, smoking, and respiratory cancer in copper smelter workers. *Arch. Environ. Health.*, 37: 325-335.
- Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., Wade, M. 1993. *In vivo* and *in vitro* percutaneous absorption and skin decontamination of arsenic from water and soil. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 20: 336-340.
- Whitbread, A.K., Tetlow, N., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Board, P.G. 2003. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics*, 13: 131-144.
- WHO, 1992. World Health Organization Water-related diseases. Arsenicosis. 2004. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/arsenicosis/en/
- Wiencke JK, Yager JW. Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 195-200.

- Wildfang, E., Healy, S., Aposhian, H.V. 2000. Arsenic. In: Molecular Biology and Toxicology of Metals. Rudolph Zalupski and Mercedes (Eds.) University School of Medicine- Macon, GA, USA. and Janes Koopatnick, London Cancer Center. London, Ontario, Canada.
- Wildfang, E., Radabaugh, T.R., Aposhian, H.V. 2001. Enzymatic methylation of As compounds. IX. Liver arsenite methyltransferase and arsenate reductase activities in primates. *Toxicology*, 168: 213-221.
- Wildfang, E., Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. 1998. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VI. Characterization of hamster liver arsenite and methylarsonic acid methyltransferase activities *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152: 366-375.
- Wu, P.A., Loh, C.H., Hsieh, L.L., Liu, T.Y., Chen, C.J., Liou, S.H. 2004. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat. Res.*, 562: 27-38.
- Xue, K.X., Wang, S., Ma, G.J., Zhou, P., Wu, P.Q., Zhang, R.F., Xu, Z., Chen, W.S., Wang, Y.Q. 1992. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int. J. Cancer*, 50: 702-705.
- Yager, J.W., Wiencke, J.K. 1997. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat. Res.*, 386: 345-351.
- Yamamoto, S., Konishi, Y., Matsuda, T., Murai, T., Shibata, M.A., Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Kuroda, K., Endo, G., Fukushima, S. 1995. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.*, 55: 1271-1276.
- Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Hori, T., Yano, Y., Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Chen, H., Yoshida, K., Kuroda, K., Endo, G., Fukushima, S. 1997. Possible carcinogenic potential of dimethylarsinic acid as assessed in rat *in vivo* models: a review. *Mutat. Res.*, 386: 353-361.
- Yamanaka, K., Okada, S. 1994. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health. Perspect.*, 102: 37-40.
- Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., Okada, S. 1989a. Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 43-50.

- Yamanaka, K., Ohba, H., Hasegawa, A., Sawamura, R., Okada, S. 1989b. Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37: 2753-2756.
- Yamanaka, K., Hoshino, M., Okamoto, M., Sawamura, R., Hasegawa, A., Okada, S. 1990. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168: 58-64.
- Yamanaka, K., Hayashi, H., Tachikawa, M., Kato, K., Hasegawa, A., Oku, N., Okada, S. 1997. Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat. Res.*, 394: 95-101.
- Yamanaka, K., Katsumata, K., Ikuma, K., Hasegawa, A., Nakano, M., Okada, S. 2000. The role of orally administered dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in the promotion and progression of UVB-induced skin tumorigenesis in hairless mice. *Cancer Lett.*, 152: 79-85.
- Yamanaka, K., Mizol, M., Kato, K., Hasegawa, A., Nakano, M., Okada, S. 2001. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol. Pharm. Bull.*, 24: 510-514.
- Yamanaka, K., Mizoi, M., Tachikawa, M., Hasegawa, A., Hoshino, M., Okada, S. 2003. Oxidative DNA damage following exposure to dimethylarsinous iodide: the formation of cis-thymine glycol. *Toxicol. Lett.*, 143: 145-153.
- Yamanaka, K., Ohtsubo, K., Hasegawa, A., Hayashi, H., Ohji, H., Kanisawa, M., Okada, S. 1996. Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice. *Carcinogenesis*, 17: 767-770.
- Yamanaka, K., Tezuka, M., Kato, K., Hasegawa, A., Okada, S. 1993. Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by *in vivo* and *in vitro* exposure of cells to dimethylarsinic acid. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 191: 1184- 1191.
- Yamauchi, H., Yamamura, Y. 1984a Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 74:134-140.
- Yamauchi, H., Yamamura, Y. 1984b. Metabolism and excretion of orally ingested trimethylarsenic in man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 682-687.

- Yih, L.H., Ho, I.C., Lee, T.C. 1997. Sodium arsenite disturbs mitosis and induces chromosome loss in human fibroblasts. *Cancer Res.*, 57: 5051-5059.
- Yin, Z.L., Dahlstrom, J.E., Le Couteur, D.G., Board, P.G. 2001. Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 983-987.
- Yu, L., Kalla, K., Guthrie, E., Vidrine, A., Klimecki, W.T. 2003. Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione S-transferase omega 1-1 and purine nucleoside phosphorylase polymorphisms in European and indigenous Americans. *Environ. Health Perspect.*, 111: 1421-1427.
- Zakharyan, R.A., Aposhian, H.V. 1999. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 1278-1283.
- Zakharyan, R., Wu, Y., Bogdan, G.M., Aposhian, H.V. 1995. Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.*, 8: 1029-1038.
- Zakharyan, R.A., Wildfang, E., Aposhian, H.V. 1996. Enzymatic methylation of arsenic compounds. III. The marmoset and tamarin, but not the rhesus, monkeys are deficient in methyltransferases that methylate inorganic arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140: 77-84.
- Zakarayan, R.A., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.M., Aposhian, V. 1999. Enzymatic methylation of arsenic compounds: VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158: 9-15.
- Zakharyan, R.A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S.M., Tsapralis, G., Board, P.G., Liebler, D.C., Aposhian, H.V. 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 1051-1057.
- Zhang, T.C., Cao, E.H., Qin, J.F. 2002. Opposite biological effects of arsenic trioxide and arsenacetin involve a different regulation of signaling in human gastric cancer MGC-803 cells. *Pharmacology*, 64: 160-168.
- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., Waalkes, M.P. 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10907-10912.

Zimniak, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S.S., Srivastava, S.K., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. 1994. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur. J. Biochem.*, 224: 893-899.