

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de

MAGÍSTER EN SALUD AMBIENTAL

“Evaluación de daño oxidativo y genotóxico y su relación con variables nutricionales en poblaciones expuestas a Arsénico en agua de bebida de la zona centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina”

Bqca. Ana María Quiroga

Directora de Tesis: Dra. María Fernanda Simoniello

Lugar de realización: Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

2021

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional del Litoral y en particular a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por permitirme realizar mi carrera de Posgrado y posibilitarme concretar este trabajo de Tesis de Maestría.

A la Universidad Nacional del Litoral (Proyecto CAI+D, UNL 50320180200309LI) y a la Agencia Santafesina de Ciencia Tecnología e Innovación (Proyecto ASACTEI 2010-IO-16) por el financiamiento del trabajo.

A la Universidad Nacional de Misiones por haberme brindado los elementos necesarios para mi formación científica y académica desde los inicios como estudiante y actualmente como docente, además por otorgarme los permisos necesarios para el cursado de la Maestría y el trabajo de Tesis que se desarrollaron en la provincia de Santa Fe.

Al Ministerio de Salud a través de la Dirección de Investigación para la Salud por haberme otorgado la beca SALUD INVESTIGA “Dr. Abraam Sonis”, la que permitió costear gastos de cursado de la Maestría y otros insumos para la concreción de este Trabajo de Tesis.

A la Beca del Programa Estratégico de Formación de Recursos Humanos en Investigación y Desarrollo (PERHID), para finalización de Maestría, que me fuera otorgada por el Consejo Interuniversitario Nacional.

A mi Directora de Tesis, Prof. Dra. María Fernanda Simoniello, por confiar en mí cuando ni yo misma lo hacía. Por brindarme sus conocimientos, experiencia, motivación y apoyo constante, además de honrarme con su amistad.

A los docentes investigadores de la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL); por su cordialidad durante los días que frecuenté el laboratorio para la realización del trabajo. Especialmente va mi agradecimiento al Bioq. Raúl Grigolato, Bioq. Alicia Loteste, Mg. Adriana Paonessa, y Bioq. Carlina Colussi y a los demás integrantes del proyecto Dra. Mariana Cabagna y Lic. en Nutrición Emilia Leonarduzzi e Ivana Lunguni, que han acompañado las tomas de muestra a las localidades y también parte del procesamiento de los análisis.

A los pobladores de las localidades estudiadas que consintieron voluntariamente en donar las muestras biológicas para el estudio, ya que sin su participación no hubiese sido posible la realización de esta investigación.

A mis queridas compañeras de la Maestría con quienes compartí gratos momentos de estudio y esparcimiento e hicieron que no sintiera el cansancio de los viajes de Misiones a Santa Fe.

A mi hermana Malena y especialmente a mi tía - segunda madre - Rosa, por apoyarme siempre y no permitir que baje los brazos.

A la familia que formé con Luis, Luciano y Franco. Gracias a su amor y acompañamiento pude llegar hasta acá y cumplir mi objetivo en esta etapa de la vida.

Difusión de los resultados obtenidos derivados del Trabajo de Tesis

Poblaciones expuestas a Arsénico en agua de bebida y su relación con el daño oxidativo en el ADN. Populations exposed to arsenic in drinking water and its relation to oxidative damage in DNA. Quiroga, A M.; Leonarduzzi, E; Lunguni, I; Grigolato, R; Sigrist, M; Olmos, V; Cabagna-Zenklusen, M; Simoniello, M. F. Acta Toxicológica Argentina, ISSN 0327-9286 (on line) www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxi_arg.htm vol 26, 2018.

Evaluación de efectos producidos por la exposición a arsénico en agua de bebida en pobladores rurales de la provincia de Santa Fe utilizando el test de micronúcleos. Quiroga, Ana M.; Márquez, Evelyn N.; Grigolato, Raúl; Colussi, Carlina; Paonessa, Adriana; Loteste, Alicia; Simoniello, M. Fernanda. Acta Toxicológica Argentina, ISSN 0327-9286 (on line) www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxi_arg.htm. 2019.

Poblaciones rurales: evaluación integral de salud y estrategias de comunicación de riesgos. Rural populations: comprehensive health assessment and risk communication strategies. Quiroga, Ana M.; Mastandrea, Carlos; Cabagna-Zenklusen, Mariana; Simoniello, M. Fernanda. Acta Toxicológica Argentina (2019) 27 (Supl): 7-35. ISSN 1851-3743.

Evaluación de poblaciones rurales expuestas a arsénico en el agua de consumo en la Provincia de Santa Fe, Argentina. Estrategias de comunicación y prevención de riesgos. Ana María Quiroga, Emilia Leonarduzzi, Ivana Lunguni, Mirna Sigrist, Carlina Colussi, María Fernanda Simoniello. Rev. Salud Ambiental. 2020; 20(2):150-159.

INDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	14
1.1. Características químicas del As. Generalidades.	15
1.2. Situación mundial	16
1.3. Situación en Argentina	17
1.3.1. Situación en Santa Fe	19
1.3.2. Marco normativo provincial	21
1.4. Características toxicocinéticas del As	22
1.5. Mecanismos de toxicidad del As	23
1.6. Efectos sobre la salud	25
1.7. As y nutrición	28
1.8. Biomarcadores analizados	29
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo General	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Zona y tipo de estudio	43
3.2. Selección de la población y encuesta	43
3.2.1. Población que habita regiones con contenidos elevados de As en agua subterránea	46
3.2.2. Población que habita regiones con contenidos más bajos de As en agua subterránea	48
3.3. Estrategias de muestreo y detección de As en agua de bebida	50
3.4. Toma de muestras biológicas humanas	51
3.5. Biomarcadores analizados	52
3.5.1. Biomarcador de exposición - Determinación de la excreción de As en orina	52
3.5.2. Parámetros de daño genotóxico	53
3.5.2.1. Ensayo de viabilidad celular: Test del Azul Tripán (Mishell y Shiigi, 1980)	53
3.5.2.2. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa (EC) (Singh y col, 1988).	53
3.5.2.3. EC modificado para la detección de bases oxidadas con el uso de endonucleasas de reparación bacterianas: Sitios ENDO III (Collins y col., 1993)	56

3.5.2.4. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal (MNMB) (Titenko-Holland y col., 1998)	58
3.5.2.5. Determinación de otras anormalidades nucleares (AN) (Tolbert y col., 1992)	60
3.5.3. Parámetros de daño oxidativo	61
3.5.3.1. Determinación de la Actividad de Catalasa (CAT) (Beutler, 1982)	61
3.5.3.2. Determinación de Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico como medida de peroxidación lipídica (Beuge y Aust, 1978)	63
3.6. Instrumentos de recolección de datos nutricionales:	63
3.7. Procesamiento de datos y tratamiento estadístico	65
4. RESULTADOS	67
4.1. Descripción general de la población	67
4.1.1. Aspectos sociodemográficos	67
4.1.2. Descriptores de la población	68
4.1.3. Estado nutricional, parámetros bioquímicos y patologías asociadas	69
4.1.4. Consumo de alimentos y nutrientes	71
4.2. Valores de As en agua y análisis de su consumo	72
4.2.1. Valores de As en agua por departamento	72
4.2.2. Consumo de agua de bebida según encuesta	73
4.3. Valores de As en orina - Biomarcador de Exposición	74
4.3.1. Categorización de la población según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As	74
4.4. Georreferenciación de los participantes y antecedentes de cada localidad	75
Providencia	75
Humboldt	76
Santa Clara de Saguier	78
Presidente Roca	79
Lehmann	80
Nelson y Laguna Paiva	81
Candioti	82
4.5. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo	82
4.5.2. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As	83
Análisis de los Factores de Confusión para la Población General	86
4.5.3. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo según georreferenciación de los participantes	87
Análisis de los Factores de Confusión por Localidad	87

4.6. Comunicación de los resultados a la comunidad	103
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	105
5.1. Discusión	105
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXO I	128
ANEXO II	132

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABPF: Agarosa de bajo punto de fusión

AN: Anormalidades nucleares

APFN: Agarosa de punto de fusión normal

APHA: Asociación Americana de Salud Pública (American Public Health Association)

As: Arsénico

ATSDR: Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

BER: Sistemas de escisión y reparación de bases

BHT: Butilhidroxitolueno

BSA: Albúmina sérica bovina

CAA: Código Alimentario Argentino

CAT: Catalasa

CBN: Células binucleadas

CC: Cromatina condensada

CNL: Células de núcleo lobulado

CR: Cariorrexis

DBT: Diabetes

DMA III: Ácido dimetil arsenoso

DMA V: Arseniato de dimetilo o Ácido dimetil arsínico

DMSO: Dimetil sulfóxido

EC: Ensayo cometa

ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles

ECV: Enfermedad cardiovascular

ENDO III: Endonucleasa III

ENFR: Encuesta Nacional de Factores de Riesgo

ENRESS: Ente Regulador de Servicios Sanitarios

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FCBN: Frecuencia de células binucleadas

FCNL: Frecuencia de células de núcleo lobulado

FMN: Frecuencia de Micronúcleos

GAPA: Guías Alimentarias para la Población Argentina

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido o gamma-glutamilcisteinilglicina

GSSG: Glutation oxidado

HACRE: Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico

HTA: Hipertensión arterial

IARC: Agencia Internacional de investigación del cáncer (International Agency for Research on Cancer)

iAs: Arsénico inorgánico

IDEC: Índice de Daño Ensayo Cometa

IMC: Índice de masa corporal

INDEC: Índice Nacional Población, Hogares y Vivienda

K-S: Kolmogorov-Smirnov

K-W: Kruskal-Wallis

MDA: Malondialdehído

MMA III: Ácido monometil arsenoso

MMA V: Arseniato de metilo o Ácido monometil arsónico

MN: Micronúcleos

MNMB: Micronúcleos en mucosa bucal

MOA: Modos de acción

M-W: Mann-Whitney

NA: Naranja de acridina

NER: Sistemas de escisión y reparación de nucleótidos

oAs: Arsénico orgánico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Buffer fosfato salino

RL: Radicales libres

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

SAMCo: Sistema para la Atención Médica para la Comunidad

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Acido Tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico

USEPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)

RESUMEN

La presencia de arsénico (As) en el ambiente, es un problema de salud pública debido a que se trata de un evento de alta frecuencia, detectado en distintos países entre los que se encuentra Argentina. En particular, las aguas subterráneas de la provincia de Santa Fe, Argentina, contienen de modo natural As en diferentes concentraciones que en muchos casos superan los niveles guía recomendados por la OMS de hasta 10 µg/L. El cumplimiento de dicha recomendación en Argentina aún no se ha hecho efectivo, siendo tolerable hasta 50 µg/L. El As ha sido clasificado como un agente carcinogénico para humanos con base en estudios epidemiológicos que relacionan su ingestión en el agua de bebida con el desarrollo de cáncer. El objetivo fue evaluar el daño oxidativo y genotóxico y su relación con variables nutricionales en poblaciones de la provincia de Santa Fe, socioculturalmente similares que han sido expuestas al As a través del agua de bebida.

El trabajo incluyó 322 voluntarios que habitan la región centro de la provincia y que aceptaron participar mediante la firma del consentimiento informado. Como marcador de exposición se determinó As en orina; marcadores de daño genotóxico fueron el Ensayo Cometa (EC), la determinación de la frecuencia de micronúcleos (FMN) y de anormalidades nucleares (FAN), y como marcadores de daño oxidativo el EC modificado con Endonucleasa III, Sitios ENDO, la oxidación de lípidos mediante la determinación de Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad de la enzima antioxidante Catalasa (CAT). También se analizaron variables nutricionales y parámetros bioquímicos.

Se observó que el consumo actual de agua con contenidos variables de As resultó del 35% en el total de la población, mientras que un 43% fueron ex consumidores. El 22% restante consumía agua segura. Un 45% de la población analizada excretaba As a través de la orina en cantidades que están por encima del valor de referencia de 30 µg/g de creatinina urinaria.

Se observó daño oxidativo al ADN medido por un incremento significativo de los Sitios ENDO entre grupos: el que consume As por debajo de 50 µg/L ($p=0,006$), el que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura ($p=0,001$) y el que cocina y toma agua con contenidos variables de As ($p=0,001$); respecto al grupo que solo consume As por debajo de 10 µg/L. También se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L ($p=0,023$).

El daño oxidativo al ADN también se evidenció por el incremento estadísticamente significativo de TBARS entre los grupos: el que consume As por debajo de 50 µg/L ($p<0,001$), el que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura ($p<0,001$) y el que cocina y toma agua con contenidos variables de As ($p=0,001$); respecto al grupo que solo consume As por debajo de 10 µg/L. También se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L ($p<0,001$). Y el grupo que cocina y toma agua con contenidos variables de As también presentó

diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L ($p=0,003$).

Los resultados también mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p<0,05$) en la FMN de los expuestos (individuos que excretaban As en concentraciones superiores al valor de referencia) respecto a los no expuestos. La influencia de los factores de confusión como sexo, edad, enfermedades, hábito de fumar o beber alcohol, actividad física, consumo de medicamentos o suplementos dietarios, consumo diario de frutas, vegetales y proteínas animales y exposición laboral a plaguicidas fueron analizados para todos los participantes y por localidad.

Los resultados fueron comunicados a los participantes y al personal de salud para generar intervenciones sanitarias en las localidades estudiadas. La comunicación de estos hallazgos a las autoridades y al resto de las poblaciones rurales de la provincia podría colaborar en el manejo del riesgo.

ABSTRACT

The presence of arsenic (As) in the environment is a public health issue because is a highly frequent event detected in many countries, included Argentina. In particular, groundwaters in Santa Fe province, Argentina, had several natural As concentrations which in many cases surpass the recommended levels indicated by WHO up to 10 µg/L. The completion of such recommendation has not been yet effective, being tolerable up to 50 µg/L. As classified by the IARC as a carcinogenic agent for human beings, based on epidemiologic tests relating the ingestion by drinking water and cancer develop. The objective was to evaluate the oxidative and genotoxic damage and its relationship with nutritional variables in socioculturally similar populations of the province of Santa Fe that have been exposed to As through drinking water.

The work included 322 volunteers who live in the central region of the province and who agreed to participate by signing the informed consent. As a biomarker of exposure, As was determined in urine; genotoxic damage biomarkers were the Comet Assay (EC), the determination of the frequency of micronuclei (FMN) and nuclear abnormalities (FAN), and as markers of oxidative damage the EC modified with Endonuclease III, ENDO Sites, the oxidation of lipids by determining Reactive Substances with Thiobarbituric Acid (TBARS) and the activity of the antioxidant enzyme Catalase (CAT). Nutritional variables and biochemical parameters were also analyzed.

It was observed that the current consumption of water with variable As content was 35% in the total population, while 43% were former consumers. The remaining 22% consumed safe water. 45% of the analyzed population excrete As through the urine in amounts that are above the reference value of 30 µg/g of urinary creatinine.

Oxidative damage to DNA was observed, measured by a significant increase in ENDO Sites between groups: those who consume As below 50 µg/L ($p=0,006$), those who cook with well water but drink safe water ($p=0,001$), and those who cook and drink water with content. As variables ($p=0,001$); with respect to the group that only consumes As below 10 µg/L. Statistically significant differences were also observed when the group that cooks with well water but drinks safe water was compared with the group that consumes As below 50 µg/L ($p=0,023$).

Oxidative DNA damage was also evidenced by the statistically significant increase in TBARS between the groups: those who consume As below 50 µg/L ($p<0,001$), those who cook with well water but drink safe water ($p<0,001$), and those who cook and drink water with variable contents of As ($p<0,001$); with respect to the group that only consumes As below 10 µg/L. Statistically significant differences were also observed when the group that cooks with well water but drinks safe water was compared with the group that consumes As below 50 µg/L ($p<0,001$). And the group that cooks and drinks water with variable As content also presented statistically significant differences with the group that consumes As below 50 µg/L ($p=0,003$).

The results also showed a statistically significant increase ($p<0,05$) in the FMN of those exposed (individuals that excreted As in concentrations higher than the reference value) compared to those

not exposed. The influence of certain factors such as sex, age, diseases, smoking, drinking alcohol, fitness, drug use or dietary supplements, daily ingest of fruits, vegetables and animal proteins and workers exposed to pesticides were analysed for all participants and for each location.

Results were communicated to all participants and people working in health area to generate sanitary interventions in the analysed locations. The same communication to authorities and the rest of the rural locations might collaborate in the management of the risk.

Introducción

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha enfocado en evaluar la relación que existe entre enfermedad y ambiente. Fundamentalmente en la enfermedad que se puede prevenir, centrándose en los factores de riesgo ambientales, fomentando medidas de salud preventivas a través de políticas, estrategias, intervenciones, tecnologías y conocimientos disponibles. Los hallazgos confirman que el 23% de las muertes a nivel mundial y el 26% de las muertes de niños menores de cinco años se deben a factores ambientales modificables. Entre los factores se incluye el acceso al agua segura (OMS, 2016).

A este respecto, conviene diferenciar los conceptos de agua potable y agua segura. El concepto de agua potable incluye el cumplimiento de determinadas normas de calidad (por ejemplo, las del Código Alimentario Argentino (CAA) o las de la OMS, mientras que el concepto de agua segura implica el cumplimiento tanto con la calidad del agua como con la calidad del servicio, e incluye la concientización de la población (Cobertura + Cantidad + Calidad + Continuidad + Costo + Cultura hídrica) (OPS, 2007; Giraldo, 2003; INTI, 2015). Los lineamientos de la OMS indican que el agua de bebida segura no debe representar ningún riesgo para la salud en un tiempo de vida de consumo, incluyendo diferentes sensibilidades que pudieran ocurrir entre las distintas etapas de la vida (OMS, 2017).

Uno de los elementos tóxicos más abundantes en la corteza terrestre es el As, siendo su forma inorgánica la más nociva para la salud. La presencia de As en el agua representa un serio problema de salud pública de importancia a nivel mundial, debido a su poder carcinógeno y neurotóxico (García, 2011).

La presencia de As en el ambiente es un problema de salud pública debido a que se trata de un evento de alta frecuencia con un elevado impacto en las regiones más pobres (Litter, 2010) y en más de 226 millones de personas expuestas (Litter y col., 2019).

Estudios realizados en el norte de Chile han demostrado que la población indígena de América Latina puede haber sufrido arsenicismo hace 7000 años causado por una alta exposición a As de origen geogénico tanto a través del agua potable como de los alimentos (Bundschuh y col. 2012). Sin embargo, no fue hasta 1913 cuando se describieron los primeros casos de intoxicación humana relacionada con As en aguas subterráneas de la localidad de Bell Ville en la llanura Chaco-Pampeana en Argentina (Goyenechea, 1917). Hubo pocos estudios en la llanura Chaco-Pampeana en las décadas siguientes. Recién a finales de la década de 1950 y principios de la década de 1960 el problema del agua contaminada predominantemente por As geogénico se detectó en otros países de América Latina, es decir, en México y Chile. Sin embargo, a principios del siglo XXI, los hallazgos de altas concentraciones de As en recursos hídricos de países de América Latina fueron aumentando considerablemente. En los últimos años, se han detectado

altos niveles de As en el suelo y agua superficial en 15 de los 20 países de América Latina (Bundschuh y col. 2012). La Agencia Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) clasifica al As inorgánico (iAs) en el grupo A (carcinogénico en humanos) (USEPA, 1998). Por su parte, la Agencia Internacional sobre Investigaciones en Cáncer (IARC), lo incluyó en el grupo I como un agente carcinogénico para humanos con base en estudios epidemiológicos que relacionan su ingestión en el agua de bebida y el desarrollo de cáncer (IARC, 2018). El elemento figura en el primer lugar de la lista de contaminantes prioritarios publicada por la agencia dependiente del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (ATSDR, 2019).

1.1. Características químicas del As. Generalidades.

El As es un metaloide natural abundante en la corteza de la Tierra, ampliamente distribuido, con una concentración media de 2 mg/kg. Presente en cantidades ínfimas en todo tipo de rocas, suelos, agua y aire (García, 2011).

La toxicidad de los compuestos del As para los mamíferos depende de varios aspectos:

- De acuerdo a su estado de valencia:
 - As (-III) (Arseniuro)
 - As (0) (As metaloide, estado de oxidación 0)
 - As (+III) (estado trivalente, arsenitos)
 - As (+V) (estado pentavalente, arseniatos)
- De acuerdo a su forma química:
 - As inorgánico (iAs)
 - As orgánico (oAs)
- De acuerdo a su estado físico:
 - Gas
 - Solución
 - Polvo
- De acuerdo a factores:
 - Solubilidad
 - Tamaño de la partícula
 - Velocidad de absorción-eliminación
 - Presencia de impurezas.

Así, el As metaloide es naturalmente no tóxico debido a su insolubilidad en agua y fluidos orgánicos. La toxicidad del As (III) es varias veces mayor que la del As (V), debido a su mayor captación celular. En concentraciones intracelulares equivalentes, los compuestos de As (III) y As (V) son equipotentes (García, 2011).

Por otra parte, en relación con la forma química, el iAs es generalmente más tóxico que el oAs, aunque los estudios en animales han demostrado que los metil y fenil arseniatos (orgánicos) pueden producir efectos en la salud similares a los producidos por el iAs. El As, tanto en las aguas superficiales como en las aguas subterráneas, proviene de la disolución de minerales, la erosión y desintegración de rocas y la deposición atmosférica. Se lo puede encontrar tanto en su forma trivalente como en su forma pentavalente, según las condiciones del medio (García, 2011).

Varios trabajos indican que la especie principal presente en aguas de consumo humano de Argentina es As en su estado pentavalente. Estudios publicados muestran que sólo en algunas aguas superficiales de las provincias de San Juan, La Pampa y Neuquén, la especie predominante es As trivalente, mientras que, en aguas subterráneas de Buenos Aires, Córdoba, Tucumán y Santa Fe, la principal especie es la pentavalente (Figueiredo y col., 2010; O'Reilly y col., 2010).

1.2. Situación mundial

Globalmente, 120 países están afectados por la presencia de As en sus aguas subterráneas. Entre ellos, los que han sufrido los mayores impactos en la salud son los países del sudeste asiático: Bangladesh (Ganges-Brahmaputra-Meghna Delta), India (Bengala Occidental, Bihar, Assam, Jharkhand y Uttar Pradesh), Myanmar, Vietnam, Taiwán (Figura 1). Las concentraciones de As varían significativamente dependiendo de las características litológicas de los estratos geológicos y los sedimentos del acuífero (Nriagu y col., 2007; Bhattacharya y col., 2002).

En los últimos cincuenta años los niveles aceptables de As en el agua de bebida se han reducido desde 120 hasta 10 $\mu\text{g/L}$, valor recomendado por la OMS y adoptado en Estados Unidos, en Europa y en nuestro país, entre muchos otros (EPA 40 CFR, 2001).

En América Latina, los países afectados son Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Perú y Uruguay. Las áreas más críticas están en Argentina, Chile y México. Si consideramos el valor guía de 10 $\mu\text{g} / \text{L}$, adoptado por la mayoría de los países de América Latina, entonces el número de personas expuestas estimado sería alrededor de 14 millones de personas (Bundschuh y col., 2012).



Figura 1. Aguas subterráneas con elevadas concentraciones de As en una perspectiva global (adaptado de Nriagu y col., 2007)

1.3. Situación en Argentina

Según un estudio de revisión realizado por McClintock y col. (2011), en Argentina, alrededor de 4 millones de personas están expuestas a altos niveles de As a partir del agua (basado en el límite de $10 \mu\text{g/L}$), la mayor población expuesta en América Latina. Niveles elevados de As se han detectado en regiones de la Llanura Chaco-Pampeana, Cuyo, los Andes, ubicadas en el centro y noroeste del país, respectivamente (Figura 2). Se han identificado altos niveles de As en el agua potable ($>1000 \mu\text{g/L}$) en el centro de Argentina, en una alta proporción de pozos. Un informe publicado hace algunas décadas mostró que más del 82% de las muestras de agua excedió el estándar de agua potable de la OMS ($10 \mu\text{g/L}$) en la región Chaco-Pampeana (Nicolli y col., 1989). Diversas regiones del país han sido analizadas, mostrando en algunos casos modificaciones a lo largo del tiempo. En un estudio realizado en la región suroeste de la llanura pampeana se identificó en más de la mitad del terreno muestras de agua con niveles de As superiores a $50 \mu\text{g/L}$, que oscilaban entre 60 y $500 \mu\text{g/L}$ (Paoloni y col., 2005). O'Reilly y col., (2010) observaron en esa misma región valores entre 3 y $1326 \mu\text{g/L}$ con un elevado número de fuentes de agua con alto nivel de As en las zonas rurales, con escaso acceso a otras fuentes de agua segura. Los datos de distribución de As en agua del área de la Puna informaron que el 61% de los pozos contenía As en concentraciones mayores a $10 \mu\text{g/L}$ con el valor más alto de $2000 \mu\text{g/L}$ (Farías y col., 2008). Posteriormente, en una evaluación realizada en 6 pueblos diferentes de la región de la Puna se encontraron niveles elevados de As en agua de grifo, con un rango entre $3,5$ a $220 \mu\text{g/L}$ (Concha y col., 2010). En ese estudio también detectaron que las personas bebían agua de manantial con altos niveles de As ($322 \mu\text{g/L}$). El agua de río en la zona de la Puna también contiene altos niveles de As ($1000 \mu\text{g/L}$). Se observó una fluctuación significativa en los niveles de As (de 140 a $220 \mu\text{g/L}$) durante un período de 10 años en

la misma fuente en San Antonio de los Cobres, zona de la Puna (Concha y col., 2006). Además, se detectaron niveles extremadamente altos de As en las aguas termales de Pompeya (10000 µg/L) que libera As al río (Concha y col., 2010). Datos recientes en la provincia de San Juan (región de Cuyo) mostraron una concentración de As entre 9 y 357 µg/L (O'Reilly y col., 2010).

Más recientemente, un estudio multicéntrico financiado por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina, realizado entre 2016 y 2017, compiló los niveles de As en agua de 167 departamentos (32,5 % del país) de las 23 provincias argentinas y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Las concentraciones variaron desde no detectables hasta 2000 µg/L. Se determinó que la región más afectada es la llanura chaco-pampeana, en las partes central y noroeste del país (Córdoba, Santiago del Estero, Chaco, Salta, Tucumán, Santa Fe y La Pampa), cubriendo un área de alrededor de 10 millones de km². Esta región también está densamente poblada, con al menos el 20% de los habitantes con necesidades básicas insatisfechas.

El CAA propone dentro de su definición de agua segura, que no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Las recomendaciones de los niveles guía de As en Argentina hasta el año 2007 eran de 50 µg/L de As en el agua de bebida. Ese mismo año se estableció que dicho límite debía ser de 10 µg/L, fundado tanto en el carácter cancerígeno que posee el As inorgánico como en la ocurrencia de Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE) (CAA, actualizado 2012). El CAA estableció para aquellas regiones del país con suelos de alto contenido de As, un plazo de hasta 5 años para adecuarse a dicho valor. En 2012 (Resolución Conjunta SPRel N° 34/2012 y SAGyP N° 50/2012) se prorrogó el plazo de cinco años previsto para alcanzar el valor de 10 µg/L de As. Sin embargo, más allá de las normativas, gran cantidad de personas que habitan áreas rurales, continúan bebiendo agua subterránea con niveles variables de As.

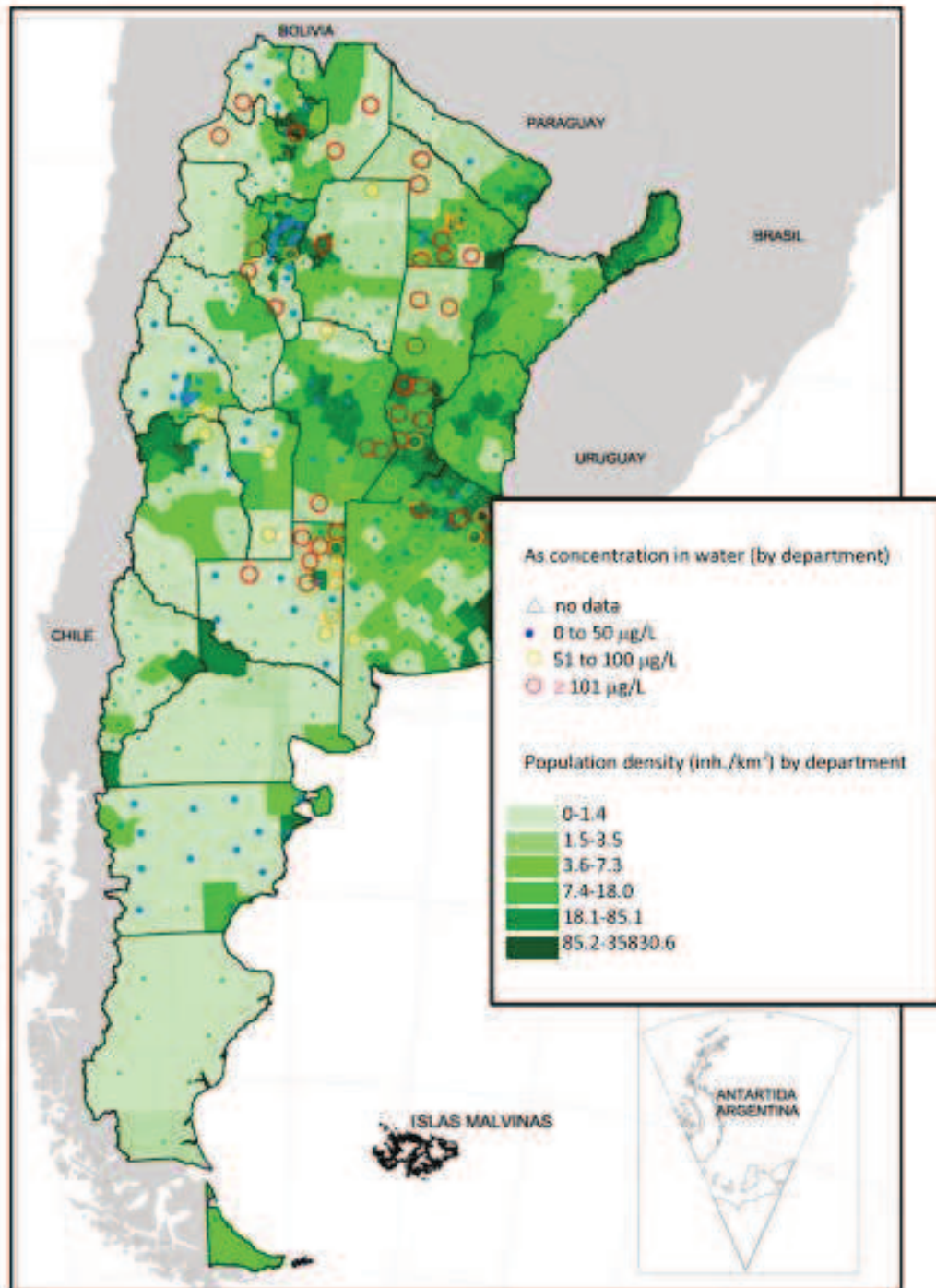


Figura 2. Representación de datos de concentración de As en agua y densidad de población para la República Argentina - Consejo Federal de Entidades de Servicios Sanitarios, 2018.

(Adaptado de Litter y col., 2019)

1.3.1. Situación en Santa Fe

Las aguas subterráneas de la provincia de Santa Fe contienen de modo natural As en diferentes concentraciones. En la Figura 3 se puede ver la distribución del As en la provincia de Santa Fe, basados en el contenido de As en sus acuíferos, se han caracterizado 3 áreas: una franja este,

próxima al río Paraná, con valores inferiores a 50 µg/L, una franja oeste con valores superiores a 100 µg/L, y una franja centro-sur con niveles intermedios de As. Las aguas subterráneas en la región occidental de la provincia de Santa Fe, contienen alta salinidad, lo que las hace no apropiadas para el consumo. Las aguas someras son sodio-bicarbonatadas, con As en altas concentraciones, hasta 0,78 mg/L, junto con algún contenido de flúor (Figueiredo y col., 2010).

En la franja oeste (donde se encuentran los departamentos de Las Colonias y Castellanos) se hace uso casi exclusivo de aguas subterráneas para el consumo humano y en la franja este (departamento La Capital) se hace uso preferencial de aguas superficiales para consumo humano (Corey y col., 2005). Según este informe del Ente Regulador de Servicios Sanitarios (ENRESS), del total de habitantes de la provincia que acceden a servicios centralizados de agua, un 10% consumían agua con contenidos de As por sobre 50 µg/L. En ese momento, se desconocía para el resto de los habitantes de la provincia que no estaban cubiertos por servicios de agua, cuantos consumían As en el agua, y en su informe declaraban que, este grupo aparentemente sería de riesgo, y la magnitud de dicho riesgo dependería del supuesto de que estén abasteciéndose de pozos propios y de su ubicación, esto es, de la franja este u oeste.

En otras estimaciones realizadas en esta provincia, el 26 % de la población vive en regiones cuya concentración de As en agua de bebida es superior a las recomendaciones de la OMS de 10 µg/L (CONAPRIS, 2006). Algunos sectores de los departamentos Castellanos y Las Colonias contienen concentraciones de As superiores a los niveles guía vigentes de 50 µg/L establecido por el CAA, con una población en su mayoría rural que carece de redes de distribución de agua potable (INDEC, 2010), mientras que en el Departamento La Capital, en el centro-este provincial, los valores de As se mantienen por debajo de dicho valor (Litter, 2010; Litter y col., 2019).

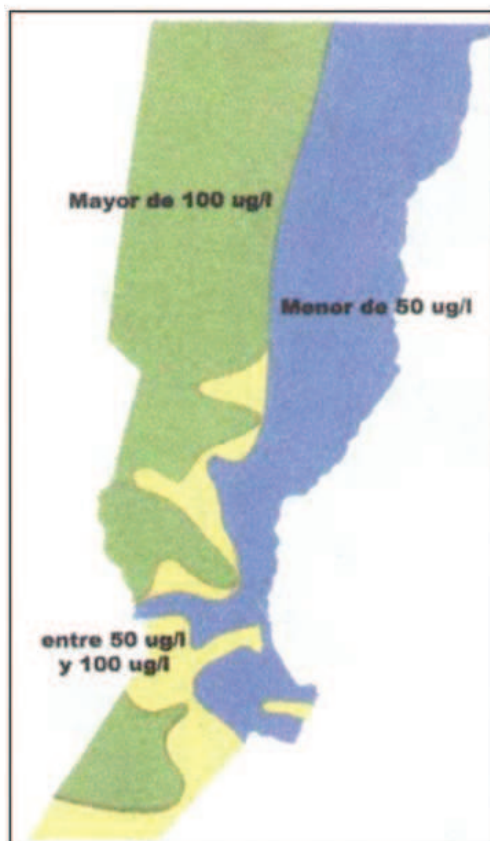


Figura 3. Mapa de situación del As en agua subterránea en la provincia de Santa Fe (Corey y col., 2005).

1.3.2. Marco normativo provincial

En Santa Fe, la Ley 11.220 del año 1994 estableció un límite obligatorio de 100 $\mu\text{g/L}$ y un límite recomendado de 50 $\mu\text{g/L}$; en la práctica, éste último es el valor exigido por el ENRESS (Litter y col., 2019). Esta ley dispone la regulación de la prestación del servicio y prevé los sistemas para la autorización de la provisión del servicio por los prestadores en todo el ámbito de la provincia de Santa Fe; establece las formas, modalidades, alcances y procedimientos para llevar a cabo la transformación del sector público de agua potable, desagües cloacales y saneamiento, y la privatización del servicio en el ámbito de la concesión, de acuerdo con lo prescripto por el artículo 30 de la ley 10.798 y demás disposiciones de la presente. Asimismo, prevé, un sistema para la preservación de los recursos naturales y el medio ambiente, y la creación de un organismo competente en la materia. Las finalidades de esta ley son:

- Garantizar el mantenimiento y propender a la rehabilitación, mejora y desarrollo del servicio en todo el ámbito de la provincia de Santa Fe.
- Establecer las normas que permitan asegurar niveles de calidad y eficiencia acordes con la naturaleza del servicio.

- Fijar un marco legal adecuado que permita conciliar un eficaz y efectivo suministro del servicio por parte de los prestadores, con el adecuado ejercicio de las facultades estatales relativas a la protección del interés sanitario, del bienestar de la población, y del medio ambiente y los recursos naturales en todo el ámbito de la provincia de Santa Fe.
- Proteger los derechos de los Usuarios y conciliarlos con la acción, derechos y atribuciones de las autoridades regulatorias y de los prestadores.
- Tutelar la salud pública, los recursos hídricos y el medio ambiente con los alcances definidos en el Título V de esta ley.

El ENRESS establece los prestadores por Localidad: Registro N° 333 Comuna de Providencia, N° 108 Cooperativa de Provisión de Agua Potable, Gas y Otros Servicios de Humboldt, N° 353 Comuna de Presidente Roca, N° 327 Cooperativa de Provisión de Obras, Servicios Públicos, Asistencia y Vivienda de Santa Clara de Saguier, N° 116 Cooperativa de Provisión de Agua de Laguna Paiva y N° 130 Cooperativa de Provisión de Agua y Otros Servicios Limitada de Nelson, no encontrándose en este anexo servicios habilitados para la localidad de Lehmann (ENRESS, 2020).

1.4. Características toxicocinéticas del As

El As y sus componentes se introducen al organismo por tres vías principales de exposición: la inhalatoria, la digestiva (o vía oral) y la dérmica (Galvao y Corey, 1987), siendo las dos primeras las más importantes. En la vía oral, el sistema gastrointestinal absorbe en promedio 80 % del As ingerido, aunque esto varía según las características del compuesto y factores propios del individuo. Por otro lado, se sabe que al aspirar polvo contaminado con As se absorbe hasta 50% de lo inhalado (Galvao y Corey, 1987), pero en lo que se refiere a la vía dérmica, ésta no ha sido bien caracterizada, la absorción es baja en comparación con las otras vías (ATSDR, 2014).

Una vez en el torrente sanguíneo el As se distribuye por todo el cuerpo a nivel celular y se incorpora en glóbulos blancos y glóbulos rojos (Wang y col., 1996; Winski y Carter, 1995). El arseniato As (V) se reduce a arsenito As (III), antes de que pueda ocurrir la metilación y los procesos de eliminación. Esta reacción que puede observarse en la Figura 4, requiere del glutatión y se obtiene como resultado metabolitos de As dimetilados (Vahter, Envall, 1983). Una parte del arsenito es metilado en el hígado por la transferencia enzimática del grupo metilo de la S-adenosilmetionina que forma el arseniato de metilo (MMA V) y el arseniato de dimetilo (DMA V) (Aposhian y col., 2004; Stýblo y col., 2002).



Figura 4. Metabolismo del As en mamíferos: reducción, metilación oxidativa, reducción. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína. (Aposhian y col., 2004)

El As es excretado principalmente por los riñones, la mayor parte del As urinario se presenta como metabolitos metilados. Sin embargo, la mayoría de los individuos expuestos lo excretan como una mezcla de As (III), As (V), MMA (V) y DMA (V), usualmente DMA la primera forma en la orina. Otras vías de eliminación menos importantes son las heces, donde se excretan pequeñas cantidades, la descamación de la piel y la incorporación a pelo y uñas, siendo estos dos últimos los principales depósitos de As, por ser tejidos ricos en queratina (Aposhian y col., 2004).

Derivado de lo anterior, la metilación fue considerada por muchos años como un mecanismo de biotransformación y detoxificación. Sin embargo, la evidencia reciente ha mostrado que las especies metiladas de As trivalente son más tóxicas que el iAs (Thomas y col., 2001). De hecho, se observan más efectos tóxicos en humanos que presentan una tasa de metilación más alta que aquellos que excretan menos especies metiladas y más iAs (García, 2011).

1.5. Mecanismos de toxicidad del As

Se sabe que el As interviene en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno constituyendo uno de los modos de acción más estudiado de su toxicidad en la actualidad. Las ERO formadas por As están involucradas en varios de los mecanismos propuestos incluyendo genotoxicidad, inhibición de la reparación del ADN, cambios en la transducción de señales y en la proliferación celular (Hughes y col, 2011). La producción de estas especies ha sido detectada mediante la medición de daño oxidativo en el ADN, peroxidación de lípidos y genes de respuesta al estrés, pérdida de las defensas antioxidantes (como el glutatión), e incluso inducción de proteínas *heat shock*. Por otra parte, aunque el As no es directamente mutagénico, es genotóxico, sus efectos inductores incluyen mutaciones por delección, daño oxidativo del ADN, roturas de la cadena de ADN, intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, aneuploidía, y micronúcleos (MN) (Basu y col, 2001; Rossman, 2003). Otros efectos del As relacionados con genotoxicidad incluyen la amplificación de genes e inestabilidad genómica (Rossman, 2003). Estos efectos genotóxicos se observan *in vitro* en células de mamífero e *in vivo* en animales de laboratorio y seres humanos (Basu y col, 2001; Rossman, 2003). En su revisión, Gentry y col.

(2010) destacan el papel de la inhibición de la reparación del ADN generado por el As como un modo de acción de su efecto cancerígeno.

Los datos de expresión génica *in vitro* disponibles, junto con información sobre el metabolismo y la unión a proteínas de compuestos de As, apoya un modo de acción para la carcinogenicidad del As inorgánico que implica la superposición de interacciones directas altamente específicas con proteínas críticas, como las que participan en la reparación del ADN, superpuestos con un antecedente de estrés químico, incluida la proteotoxicidad y depleción de sulfhidrilos no proteicos. Se ha sugerido que el componente dosis-respuesta de la evaluación del riesgo de cáncer podría basarse en la cuantificación de “endpoints” moleculares o bioindicadores de respuesta, seleccionados en base a su asociación con eventos precursores de tumorigénesis. A partir de los datos existentes sobre los efectos celulares del As, parece que los eventos clave en la carcinogénesis incluyen la inhibición de la reparación del ADN en condiciones de estrés oxidativo, inflamación y señalización proliferativa, conduciendo a una situación en la que la célula ya no es capaz de mantener la integridad de su ADN antes de la división (Figura 5).

El As interfiere en la reparación del ADN, afectando enzimas de los sistemas de escisión y reparación de nucleótidos (NER) y de bases (BER). El sistema NER interviene reparando grandes daños en la doble hélice del ADN y el sistema BER interviene reparando el daño provocado por pequeñas roturas de la cadena simple de ADN. Una revisión reciente destaca el rol de este mecanismo en la carcinogénesis producida por el As, principalmente a través de la inhibición de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1, que participa en la reparación del daño al ADN de la célula (Olmos y Ridolfi, 2018).

También se ha evaluado la capacidad de las células expuestas a proliferar a partir de estímulos mitógenos o regeneración compensatoria debido a la toxicidad celular (Cohen y Ellwein, 1990) lo que podría explicar una de las características distintivas de la toxicidad del As en los seres humanos como es la hiperqueratosis. Sumado a todo esto, se ha vinculado a mecanismos epigenéticos como la metilación alterada del ADN, que tendría también vínculo con la toxicidad del As y su carcinogenicidad. La alteración de la metilación del ADN produce cambios en la expresión de los genes. Está descrito que el As induce tanto hipo como hipermetilación del ADN. Estos cambios epigenéticos pueden producir activación de oncogenes o silenciamiento de genes supresores de tumores. Uno de los ejemplos más descritos es la hipermetilación del gen p53, codificante de una proteína supresora de tumores, la cual tiene un rol en la regulación del ciclo celular. Los mecanismos por los cuales el As produce los cambios en la metilación del ADN no están claros. La hipometilación podría deberse a la inhibición de las ADN metiltransferasas, a la competencia (entre metiltransferasas) por la S-adenosilmetionina (SAM), involucrada también en el metabolismo del As, o a la depleción de SAM por deficiencias nutricionales (Hughes y col. 2011; Olmos y Ridolfi, 2018).

Pilsner y col (2007, 2009, 2011) en varios estudios realizados en Bangladesh con adultos expuestos a As en el agua de bebida, observaron su efecto sobre la metilación del ADN en linfocitos de sangre periférica.

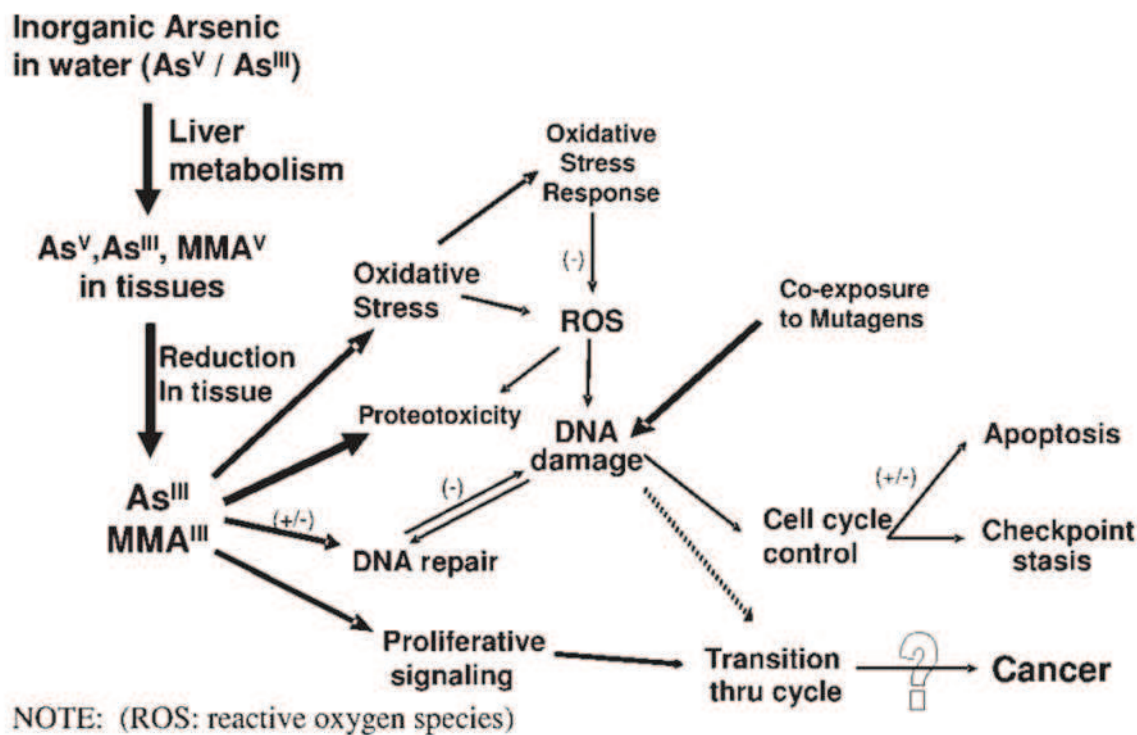


Figura 5. Relaciones entre diferentes elementos en un modo de acción para la carcinogenicidad del arsénico inorgánico (Gentry y col., 2010).

1.6. Efectos sobre la salud

Las concentraciones de As que se encuentran naturalmente en las aguas subterráneas no producen intoxicaciones agudas. Sin embargo, pueden producir intoxicaciones crónicas debido a la ingesta, durante períodos de tiempo prolongados (años), de pequeñas cantidades de As a través del agua y de alimentos cultivados o cocinados con esa agua, provocando efectos sobre la salud. Estos efectos sobre la salud se consideran actualmente dentro del término Arsenicosis, patología que incluye una serie de manifestaciones clínicas causadas por esa exposición prolongada al As (RSA Grupo Ad-Hoc “Arsénico en agua”, 2018).

Específicamente vinculado a As en alimentos, Sigrist y col. (2016) realizaron determinaciones del contenido de As total en muestras de alimentos seleccionados de Argentina (carne de res, pollo, pescado, leche, queso, huevo, arroz, productos a base de arroz, harina de trigo, harina de maíz, avena, cereales para el desayuno, legumbres y patatas) y estimaron sus contribuciones a la ingesta

dietética de iAs. Las mayores concentraciones de As total (en $\mu\text{g}/\text{kg}$) se encontraron en pescado (152–439), arroz (87–316) y productos a base de arroz (52–201). La contribución a la ingesta de iAs se calculó a partir del contenido medio de iAs de cada alimento (calculado aplicando factores de conversión a los datos de As total) y el consumo medio por día. Los principales contribuyentes a la ingesta de iAs fueron la harina de trigo, incluida su proporción en los productos a base de harina (panes, pastas y galletas), seguidos del arroz; ambos alimentos representan cerca del 53% y el 17% de la ingesta, respectivamente. La ingesta dietética de iAs, estimada en $10,7 \mu\text{g}/\text{día}$ fue significativamente menor que la del agua potable en vastas regiones de Argentina.

Diferentes estudios demostraron que la ingestión de As ha sido definitivamente vinculada a aumento de la incidencia de cáncer en pulmón, vejiga, piel, riñón, hígado, y potencialmente de próstata. Además, existe una serie de efectos no cancerosos que están vinculados a la exposición en el agua de bebida, incluyendo lesiones en la piel, enfermedad cardiovascular, efectos neurológicos, e incluso diabetes (NRC, 1999, 2001; ATSDR, 2007).

El engrosamiento palmo-plantar, la hiperqueratosis, el aumento de la pigmentación de la piel y el desarrollo de cáncer de piel, pulmón y vejiga son los problemas de salud más frecuentemente reportados en la literatura (Hopenhayn-Rich y col., 1996; Besuschio y col., 1980). El iAs presenta un efecto inhibitorio sobre la hematopoyesis (Guha Mazumder y col., 1998), produciendo anemia de tipo hipoplástico (Roy y Saha, 2002). También se lo asocia con neurotoxicidad, debido a que produce una disminución en la velocidad de conducción periférica.

En Argentina, desde el comienzo del siglo XX, el conjunto de síntomas y signos asociados al consumo de agua o comida contaminada con As ha sido denominado hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) (Ayerza, 1917), el cual se desarrolla progresivamente y el tiempo en que tarda en manifestarse es variable y está relacionado con el estado de salud de la persona, la sensibilidad individual, la presencia de factores genéticos (polimorfismo en los genes codificantes de enzimas vinculadas al metabolismo del As), el estado nutricional, sexo, edad, la ingesta diaria, la concentración de As en el agua de consumo, y el tiempo de exposición (Figura 6). Es posible que los hábitos y costumbres alimentarias de las diferentes poblaciones, como el grado de conocimiento e información del problema sean variables importantes que sea necesario observar debido a que podrían ser fundamentales en la evolución de la cronicidad del HACRE (García, 2011).

Se pueden reconocer cuatro etapas en el desarrollo del HACRE (comúnmente denominado esquema de Levell y Clarke): Período Prepatogénico: las poblaciones están expuestas a concentraciones elevadas de iAs en el agua de consumo diario. Período Preclínico: el paciente no muestra síntomas, pero el As puede ser detectado en muestras de tejidos y de orina. Período Clínico: aparecen las manifestaciones en la piel. La OMS estima que esta etapa requiere una exposición al As de 5 a 10 años. Período de Complicaciones: síntomas clínicos más pronunciados y afectación de los órganos internos; desarrollo de tumores o cánceres que afectan la piel u otros

órganos. En los períodos preclínico y clínico, si el paciente reemplaza la fuente de agua de bebida por otra que esté libre de As, su recuperación es casi completa. En el último período, las manifestaciones no cancerosas pueden ser reversibles, pero cuando aparecen las manifestaciones cancerosas, la única medida beneficiosa es el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno para reducir las secuelas y mejorar la calidad de vida (García, 2011).

Los niños son más susceptibles que los adultos a los efectos adversos del As (y otros tóxicos), y se ha observado que las enfermedades dermatológicas aparecen más rápidamente en ellos. Se ha descrito que la exposición crónica al As a través del agua de bebida produce alteraciones en el desarrollo neurológico y cognitivo de los niños las cuales incluyen la afectación del coeficiente intelectual a escala completa, alteraciones en la memoria y la atención. También se ha asociado la exposición crónica al As con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y de polineuropatías símil síndrome de Guillan Barré (Olmos y Ridolfi, 2018).

Por otra parte, varios estudios epidemiológicos han informado que la exposición a iAs a una temprana edad resulta en una mayor susceptibilidad a cáncer en la edad adulta (Smith y col., 2006; Yuan y col., 2010). A partir de esta evidencia y los resultados de su modelo de As transplacental, Waalkes y sus colegas (Tokar y col., 2010) llevaron a cabo estudio en ratones expuestos a arsenito en agua de bebida (6- 24 ppm). La exposición se inició antes de la cría (en los padres), durante el embarazo, la lactancia y después del destete hasta la edad adulta. En crías de ambos sexos, se desarrollaron adenocarcinomas de pulmón relacionados con la dosis, carcinomas hepatocelulares y tumores suprarrenales. Los tumores de la vesícula biliar se detectaron en los machos y tumores uterinos en las hembras.

Una particularidad de la carcinogénesis del As es que, si bien el iAs es carcinógeno para humanos, no se ha logrado reproducir este efecto en muchas especies animales, por lo cual, resulta difícil encontrar modelos experimentales animales que permitan investigar los mecanismos de la carcinogénesis en humanos. Mucha de la información disponible en ese aspecto proviene de estudios en seres humanos (RSA, Grupo Ad-Hoc “Arsénico en agua”, 2018).

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de investigar poblaciones que han estado expuestas durante generaciones a As en agua de bebida.

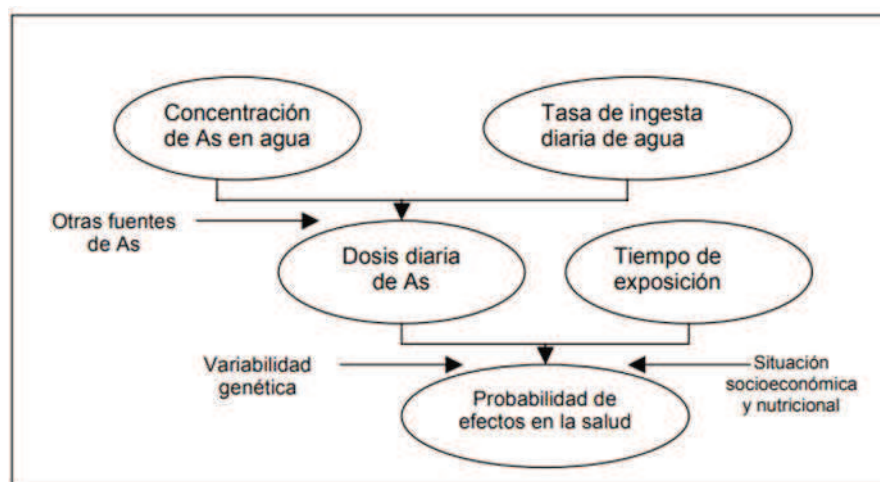


Figura 6. Determinantes de los efectos en la salud derivados de la presencia de Arsénico en el agua de bebida (García, 2011)

1.7. As y nutrición

En un estudio donde se evaluó el efecto de la dieta sobre el metabolismo del As midiendo la ingesta dietética y los patrones de metilación del As urinario en una población expuesta de Estados Unidos, los hallazgos son consistentes con la teoría de que las personas con dietas deficientes en proteínas y otros nutrientes son más susceptibles que otras al cáncer causado por As (Steinmaus y col, 2005).

El estado nutricional de una persona también puede jugar un papel importante en la prevención de los efectos negativos del As en la salud. En ese sentido existen investigaciones que sugieren que una dieta rica en selenio y en otros antioxidantes, como la vitamina E, ayuda a promover la metilación del As, lo cual aumenta su excreción del cuerpo (Verret et al. 2005). Los donadores del grupo metilo, como el folato, pueden también ayudar en el metabolismo del As y en su excreción en seres humanos (Rossman, 2007). Otras investigaciones sugieren que los niveles plasmáticos de alfa-tocoferol podrían modificar el riesgo de carcinoma urotelial relacionado con el As (Chung, 2011).

En un grupo de individuos expuestos a As que desarrollaron lesiones en la piel, se encontró que la deficiencia de folato, la hiperhomocisteinemia, la creatinina urinaria baja, y la hipometilación del ADN eran factores de riesgo para las lesiones cutáneas inducidas por el As (Pilsner et al., 2009). Pilsner y sus colegas sugirieron que la hipermetilación del ADN se asocia con un aumento de la exposición al As y que podría ser una respuesta de adaptación ya que la hipometilación del ADN se asocia con el riesgo de desarrollar lesiones cutáneas. Este mismo grupo informó que el selenio en plasma se asocia inversamente con la metilación del ADN genómico. Además, el selenio puede reducir el As en el organismo.

En Argentina, a esta problemática hay que sumarle una situación alimentaria en crisis, que ha ido cambiando a lo largo de los años, donde se destaca un aumento progresivo en la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) asociadas a una inadecuada selección de alimentos, entre ellos una baja ingesta de frutas y verduras como se ha puesto de manifiesto en el documento de las Guías Alimentarias para la Población Argentina (GAPA, 2016).

Por lo tanto, es necesario buscar nuevas alternativas para afrontar esta situación. Un estudio realizado por Curry y col. (2000) sobre agua, saneamiento y salud, propone un régimen de tratamiento basado, en una primera etapa, en la eliminación del consumo de agua con As y posteriormente, enfatiza en la administración de una dieta rica en proteínas de origen animal, para ayudar en el proceso de metilación del iAs en hígado, mejorando así su excreción. Sin embargo, como ya fue analizado previamente, el incremento de la metilación no siempre implica una disminución del efecto tóxico.

1.8. Biomarcadores analizados

El biomonitoreo puede ser utilizado como una herramienta de vigilancia, para ayudar a interpretar un problema clínico o para evaluar y controlar una determinada exposición. A los fines de ser útiles en epidemiología, estos eventos mensurables deberían representar solo un cambio subclínico que podría llevar más tarde a una enfermedad con expresión clínica (Grandjean, 1995). El biomonitoreo se realiza a través de la evaluación de distintos biomarcadores.

Los biomarcadores representan cambios en un organismo o en la célula que pueden ser medidos en diferentes sistemas biológicos y permiten establecer el riesgo potencial de la exposición a un determinado agente físico, químico o biológico (xenobiótico). Pueden clasificarse atendiendo a tres categorías:

- Biomarcadores de exposición: son los que señalan la presencia de una sustancia exógena o sus metabolitos en un organismo o el producto de una interacción entre un xenobiótico y alguna de las moléculas o célula blanco. Un xenobiótico en tejidos o fluidos es señal que el organismo tuvo contacto con el mismo, es decir, estuvo expuesto a él (Casarett y Doull, 2005).
- Biomarcadores de efecto: se definen como cualquier alteración bioquímica, fisiológica, genética o de otro tipo dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede reconocerse como un deterioro de la salud o enfermedad establecida o potencial (Casarett y Doull, 2005).
- Biomarcadores de susceptibilidad: son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica (Arango, 2011).

En el presente trabajo de tesis se ha seleccionado como biomarcador de exposición la excreción urinaria de As en las poblaciones estudiadas, junto con un grupo de ensayos que evalúan cambios bioquímicos, genotóxicos y de estrés oxidativo como biomarcadores de efecto, que permiten evaluar cambios en este escenario ambiental.

La concentración de As total en orina ha sido utilizada como un indicador de la exposición reciente a As debido a que la orina es la principal vía de excreción para la mayoría de las especies arsenicales. La vida media del iAs en humanos es de alrededor de 4 días. Las concentraciones de As urinario se correlacionan con la ingesta de As en el agua de bebida (García, 2011).

Ciertos xenobióticos como el As, pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que, a largo plazo, causan trastornos en la salud. Dentro de los biomarcadores de efecto, el ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales es una metodología sensible, rápida, simple y visual utilizada para analizar rupturas en la molécula de ADN de simple o doble cadena, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Singh y col., 1988; 1996).

Las células en estudio se inmovilizan en una capa delgada de agarosa sobre un portaobjetos, luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas, se retiran dejando el ADN super-enrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina de ADN produce el desenrollamiento de los bucles y la posterior electroforesis permite a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza por microscopía de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se asemejan a la de un cometa, y el contenido relativo de ADN en la cola es proporcional a la frecuencia de las roturas (Figura 7).

Aunque los glóbulos blancos no son representativos de todas las células del cuerpo, y en particular, no son las células diana para el cáncer; en la mayoría de los estudios se emplean leucocitos. Debido a que circulan por todo el organismo, su estado celular, nuclear y metabólico (incluyendo el ADN) refleja la exposición total del cuerpo (Collins y col, 2008).

La mayoría de las investigaciones que involucran lesiones oxidativas del ADN y su reparación se centraron en las roturas de la cadena de ADN. La reparación del ADN que contiene bases oxidadas, se realiza, predominantemente, por el camino que involucra la escisión de bases, iniciado por ADN glicosilasas. Existen endonucleasas bacterianas de reparación que se incorporan en un protocolo de EC modificado. Por consiguiente, de existir bases dañadas reconocidas por la endonucleasa específica, la misma no solo reconoce dichos sitios, sino que produce los cortes en la cadena de ADN, lo cual se traduce en un incremento en número de fragmentos de ADN; efecto que será observado en la práctica como una mayor densidad (mayor

momento) de la cola del nucleóide o a una mayor longitud de la misma dada por una mayor migración de fragmentos de menor tamaño.

La Endonucleasa III (ENDO), actúa en condiciones fisiológicas como glicosilasa, reconoce y elimina una variedad de pirimidinas oxidadas en el ADN, provocando una ruptura de simple cadena (Dusinska y Collins, 1996). Por lo tanto, con ENDO es posible evaluar la presencia de pirimidinas oxidadas, lo que refleja el daño causado por las especies reactivas del oxígeno en el ADN (Collins y Azqueta, 2012), aumentando así considerablemente la sensibilidad del ensayo.

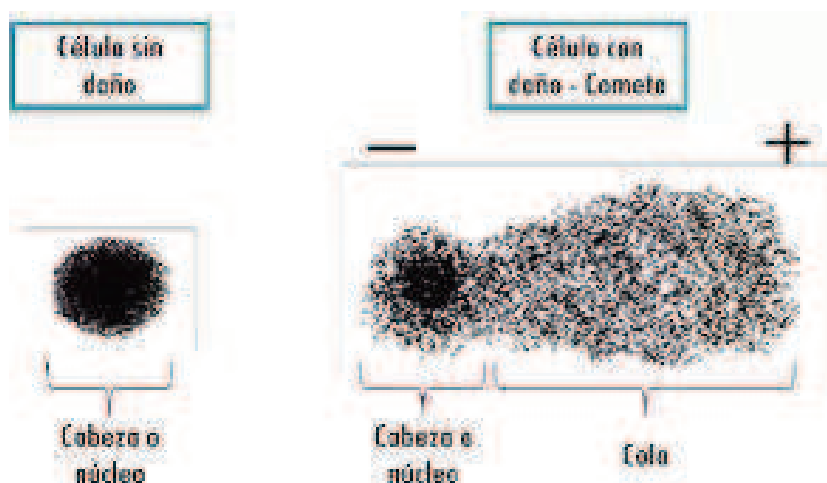


Figura 7. Ensayo Cometa: imagen de una célula con y sin daño al ADN

Otro de los biomarcadores de efecto ampliamente utilizado para la detección de inestabilidad genómica es el ensayo de micronúcleos (MN). Esta técnica se basa en analizar la presencia de macrolesiones a nivel de la molécula de ADN donde el material genético desprendido da origen a pequeños núcleos denominados MN. Los MN se originan principalmente de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátides acéntricos o cromosomas enteros que no logran ser incluidos en los núcleos hijos a la finalización de la telofase durante la mitosis, porque no se adhieren correctamente al eje durante el proceso de segregación en anafase (Fenech y col., 2011). Estos MNs, a nivel microscópico, son detectados en células en interfase celular como pequeñas porciones de material extranuclear, en otras palabras no contenido en el núcleo celular, y siempre rodeados por membrana nuclear. El MN debe ser considerado como marcador o indicador indirecto de daño cromosómico. El mismo puede originarse por una o varias rupturas de la molécula de ADN la cual alcanza su máximo grado de compactación de la cromatina, que como sabemos acontece durante la metafase mitótica, dando lugar a la formación de uno o a varios fragmento(s) cromosómicos acéntrico(s) (efecto clastogénico) o pueden estar formados por cromátides enteras o por un cromosoma completo el cual no migró normalmente durante la

anafase-telofase celular por alteraciones acontecidas en el aparato mitótico (efecto aneugénico) (Figura 8).

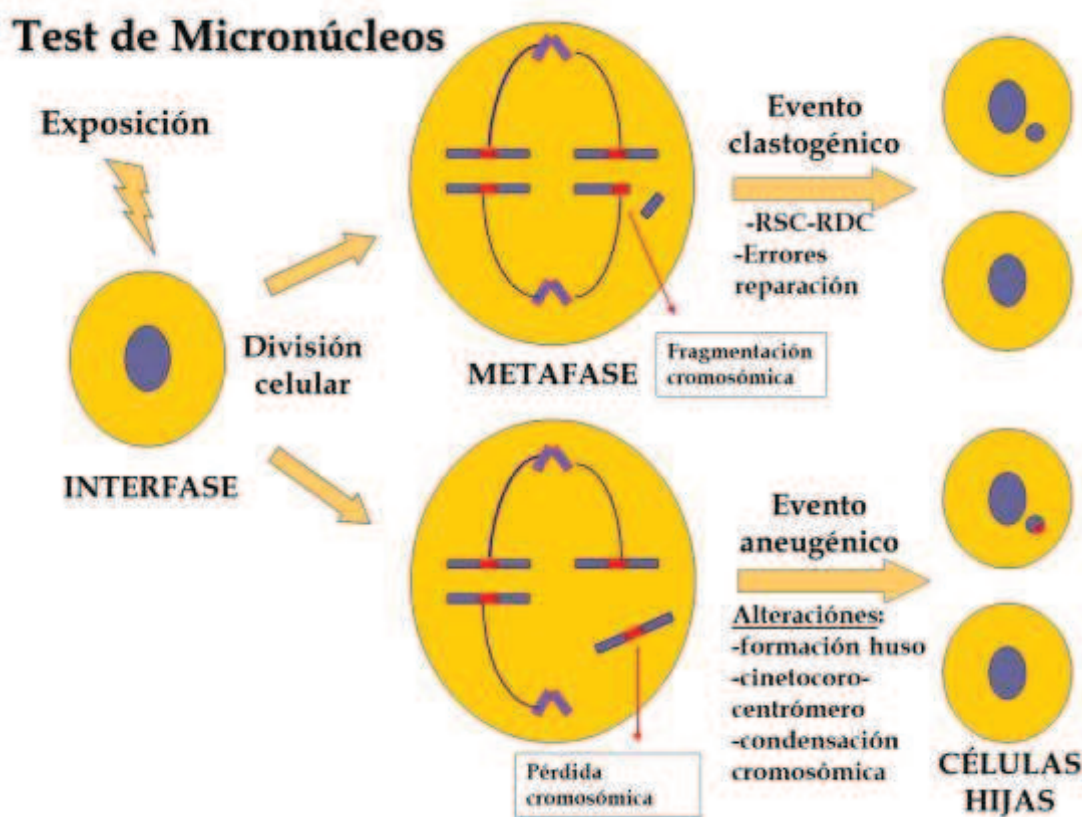


Figura 8. Formación de micronúcleos por eventos clastogénicos o aneugénicos. Curso de Doctorado Toxicología Genética, UNL Presentación Dra. Poletta. Santa Fe, 2012.

Los criterios establecidos y mundialmente aceptados para identificar un MN en una célula interfásica son los propuestos por Tolbert y col. (1991) y reconsiderados por Fenech (2000).

Particularmente, el ensayo de micronúcleos en mucosa bucal (MNMB) es un biomarcador de efecto que permite valorar procesos aneugénicos o clastogénicos. Por su ubicación, los epitelios están en contacto directo con contaminantes presente en el aire y el agua, así como agentes tóxicos ingeridos y/o con sus metabolitos.

Además, otra característica que impulsa a utilizar este tejido como muestra de estudio, es su capacidad especial proliferativa, lo que permite que la población celular se mantenga constante; no obstante, esta particularidad lo vuelve más vulnerable a lesiones producidas en el ADN. La mucosa bucal es un epitelio escamoso estratificado que como puede visualizarse en la Figura 9, consta de cuatro capas distintas: El estrato córneo, o la capa celular queratinizada, que recubre la cavidad oral y comprende las células que se desprenden como resultado del desgaste del tejido superficial. El estrato granuloso, o la capa de células granulares. El estrato espinoso, o la

capa de células espinosas que contiene poblaciones de células apoptóticas y necróticas. El estrato germinativo que contiene células basales que se dividen activamente y a la células madres basales, que dan origen a la progenie que diferencia y mantiene este perfil, la estructura y la integridad de la mucosa bucal (Thomas y col., 2009).

Estas capas comienzan a exfoliarse a medida que alcanzan la superficie, por lo que, el daño genético que se detecta es el que ha ocurrido en las capas basales. La rápida renovación de los tejidos epiteliales hace que el máximo índice de formación de MN aparezca entre 1 y 3 semanas después de la exposición al agente genotóxico. Este será el tiempo necesario para que las células migren desde las capas basales del epitelio hasta la superficie (Titenko-Holland y col. 1998). La mayoría de los estudios concluyen que, después del cese del tratamiento o de la exposición, los valores de MN disminuyen (Holland y col., 2008).

Aproximadamente el 60 % del total de la superficie de revestimiento oral es epitelio no queratinizado, lo que favorece la absorción de colorantes y facilita a la vez la observación e identificación de características morfológicas del núcleo y la membrana celular a través del microscopio (Squier y Kremer, 2001).

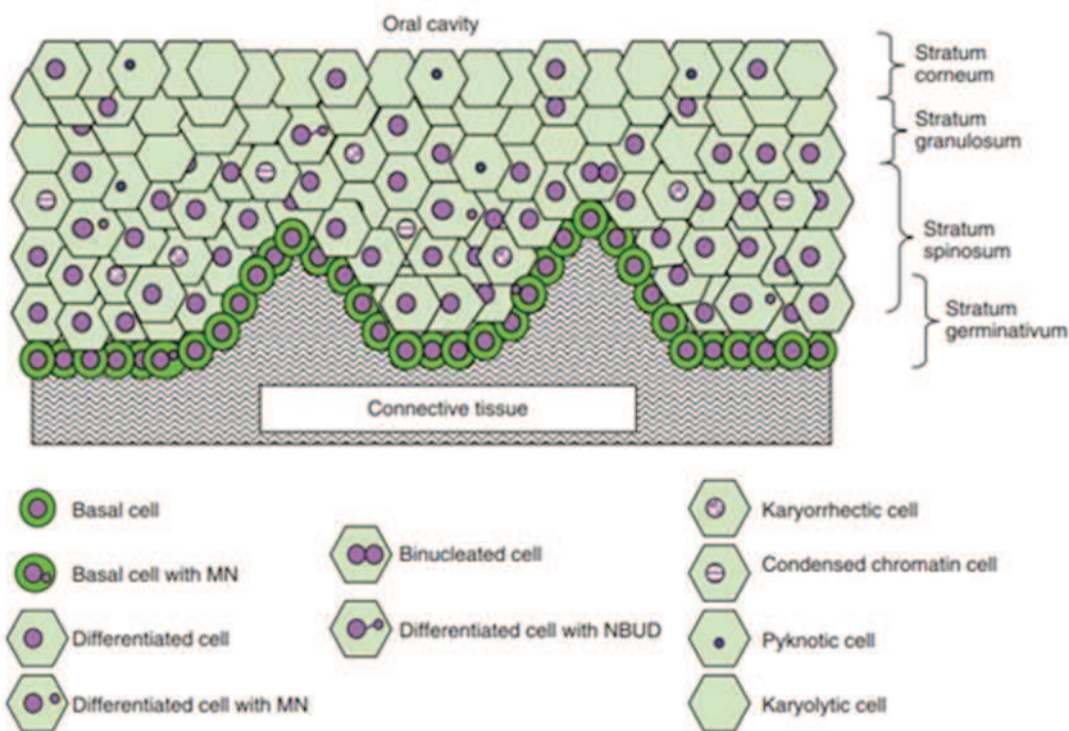


Figura 9. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal normal (Thomas y col., 2009)

Además de los MN en células exfoliadas, Tolbert y col. (1991) describen otras anomalías nucleares (AN), las que además de ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, son indicadoras de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular. Estas anomalías se pueden distinguir de células normales por sus alteraciones ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo, entre ellas se encuentran la cromatina condensada, cariorrexis, núcleo picnótico, cariólisis, células con núcleo lobulado también llamado prolongación nuclear, “bud cell” o “broken eggs” y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (Figura 10).

Los tipos de células con sus correspondientes AN se describen a continuación:

- Células con cromatina condensada (CC): estas células tienen núcleos intensamente teñidos, con regiones condensadas o cromatina agregada exhibiendo un patrón nuclear moteado o estriado. Cuando la condensación es extensa da la apariencia de un núcleo fragmentado. Las células con CC pueden estar atravesando etapas tempranas de apoptosis, aunque esto no ha sido demostrado de manera concluyente.
- Células cariorréticas (CR): Las células cariorréticas tienen núcleos que se caracterizan porque la agregación de la cromatina nuclear es más extensa en relación con las células de cromatina condensada. Tienen un patrón nuclear densamente moteado indicativo de fragmentación nuclear que conduce a la eventual desintegración del núcleo. Estas células pueden estar atravesando una etapa tardía de apoptosis, pero esto no ha sido probado de manera concluyente. Algunas veces parecen tener estructuras similares a los MN, pero estas no deben ser contabilizadas como MN en el ensayo ya que su origen es incierto.
- Células con núcleo picnótico (NP): estas células se caracterizan por tener un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear uniforme e intensamente teñido. El diámetro nuclear es generalmente de 1/3 a 2/3 de un núcleo en las células diferenciadas normales. Pueden representar un mecanismo de desintegración nuclear y muerte celular que es distinto del proceso que conduce a la cromatina condensada y cariorrética.
- Células cariolíticas (CL): estas células están completamente vacías de ADN y por tanto parecen no tener núcleo. Representan una fase muy avanzada en el proceso de muerte celular.
- Células con núcleo lobulado (CNL): el núcleo presenta una constricción en un extremo, indicativo de un proceso de eliminación de material nuclear por gemación. El lóbulo o brote nuclear está unido al núcleo, presenta sus mismas características morfológicas y de tinción pero el tamaño es de 1/2 a 1/4 del núcleo principal. Algunos investigadores consideran a las prolongaciones nucleares en linfocitos como indicadores de genotoxicidad, sin embargo, en células exfoliadas no es claro ya que frecuentemente en diversos procesos de salud y enfermedad aparecen con mayor frecuencia células con MN en comparación a las CNL. Entonces, se puede asumir que las células con NL, no están asociadas a eventos genotóxicos, clastogénicos o aneuploidogénicos, pero tal vez sí a

procesos degenerativos en la primera capa de células epiteliales (estrato germinativo) (Thomas y col., 2009; Tolbert y col., 1991).

- Células binucleadas (CBN): son células que contienen dos núcleos principales, usualmente los núcleos están muy próximos e incluso podrían hacer contacto, ambos con morfología tinción similar a la observada en células normales. Su presencia es probablemente indicativa de fallas en la citocinesis después de la última división nuclear en la capa celular basal. Se ha demostrado que la no disyunción cromosómica se produce con una frecuencia más alta en células binucleadas que no logran completar la citocinesis. Este mecanismo se cree es un punto de control de citocinesis para células aneuploides binucleadas.

La presencia de CBN no parece implicar una interacción directa con el ADN, sino que involucra la interferencia con los hechos ocurridos a finales de la división celular. Se piensa que es un evento que tiene lugar en dos etapas, en primer lugar ocurre la mitosis que dará origen a dos núcleos, pero el citoplasma no se divide. En consecuencia, se forma una célula binucleada que será eliminada si pertenece a un epitelio de revestimiento. Pero si este fenómeno ocurre en una célula del epitelio basal o pertenece a otro tejido, ambos núcleos de la célula binucleada entrarán en mitosis al mismo tiempo, entonces cuando las membranas nucleares se desintegren, simultáneamente los cromosomas de ambos núcleos quedaran incluidos en el mismo huso y serán arrastrados juntos, así que en el momento en que la mitosis esté completa, habrá dos células con doble material genético cada una o bien, una célula tetraploide, si se repite el fenómeno de interrupción de la citocinesis (Shi y King, 2005; Thomas y col., 2009; Tolbert y col., 1991).

Bajo ciertas condiciones patológicas o de exposición se observa alta frecuencia de células con AN. Es importante mencionar, que también se observan en procesos de envejecimiento como lo describe Thomas (2008) en donde los MN, CNL y CBN están elevados en individuos con edades entre 64 a 75 años.

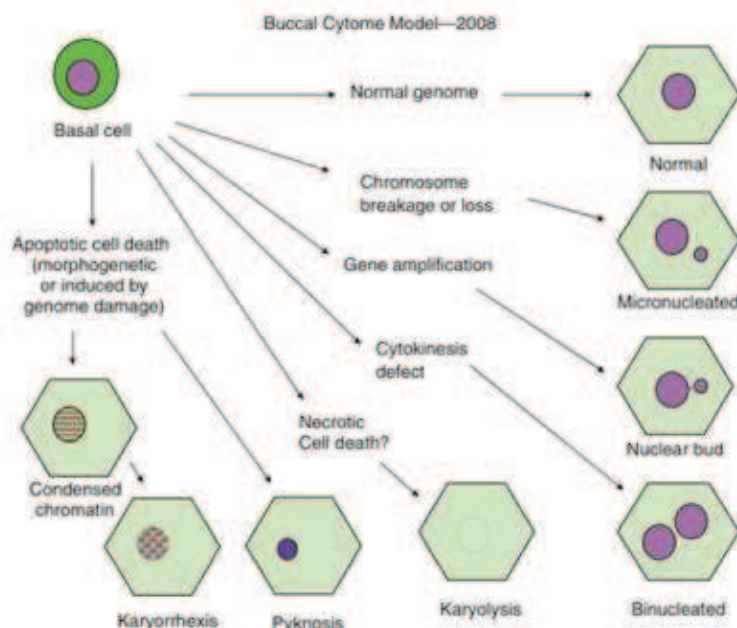


Figura 10. Representación esquemática de las diversas anomalías nucleares (Thomas y col., 2009)

Por todo lo dicho, el epitelio oral es un tejido ideal para aplicar la técnica de MN y poder detectar AN sin necesidad de cultivos celulares, lo que representa una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos en poblaciones de alto riesgo (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013). En el presente trabajo se contabilizaron las frecuencias de MN, CBN y CNL en mucosa bucal como una medida de la exposición a As en agua de bebida y/o en alimentos contaminados.

Los radicales libres (RL) son especies químicas que tienen un electrón desapareado en sus orbitales externos. Los electrones desapareados son altamente reactivos y “atacan” y alteran a las moléculas adyacentes, tanto orgánicas como inorgánicas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos), muchas de las cuales son componentes esenciales de membranas y núcleos celulares. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son un tipo de RL derivados del oxígeno, producidas normalmente en las células durante la respiración mitocondrial y degradadas y eliminadas por los sistemas de defensa celular (Robbins y Cotran, 2015).

Dentro de las ERO se incluyen radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aniones superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales son indispensables para mantener la homeostasis celular, para combatir las infecciones (Babior, 1978) y en los últimos años se ha evidenciado su papel en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento que están involucrados en la regulación proliferativa (Finkel, 1998).

El equilibrio de óxido-reducción intracelular supone la presencia de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de destruir o neutralizar las ERO. Se conoce como estrés oxidativo al desbalance entre las ERO y los mecanismos antioxidantes. Este desbalance puede ser producido por la acción de alguna noxa que estimule la producción de ERO o genere destrucción o consumo de los antioxidantes (Andresen y col., 2006).

Las ERO pueden ser generadas tanto por factores endógenos del metabolismo celular como por agentes exógenos. En ese sentido el As puede ocasionar desbalances en diferentes vías bioquímicas, en el estado normal redox y causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes celulares, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.

Los RL son intrínsecamente inestables y, en general, se descomponen espontáneamente. Por otra parte, las células han desarrollado diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a fin de eliminar RL y minimizar la lesión.

Los antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que, a su vez, reaccionan con los radicales libres. Los más importantes miembros de las defensas antioxidantes enzimáticas son superóxido dismutasa (SOD) que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) que descomponen el peróxido de hidrógeno y lo convierten en agua (Pérez Gastell y Pérez de Alejo, 2000).

Los no enzimáticos pueden a su vez clasificarse en endógenos y exógenos: ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros.

El GSH, además de captar el peróxido de hidrógeno como sustrato de la GSH-Px, también capta al oxígeno singlete y al hidroxilo. Los estresores oxidativos, pueden disminuir el contenido de GSH y cambiar el balance dinámico entre GSH y su forma oxidada GSSG.

Como biomarcadores de capacidad antioxidante frecuentemente se utilizan las mediciones de la actividad de las enzimas SOD y CAT, debido a que un cambio en las mismas reflejan eventos que pueden conducir a un estado de estrés oxidativo (Pérez Gastell y Pérez de Alejo, 2000).

La CAT es una de las enzimas más eficientes conocidas hasta el momento, no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración (catalizando su conversión en H_2O y O_2). Presenta actividad peroxidasa.

La peroxidación de lípidos es probablemente el proceso inducido por radicales libres más investigado, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical

hidroxilo (Reilly y Bulkley, 1990; Jerlick y col., 2000).

Las reacciones en cadena que ocurren durante la oxidación de los lípidos conducen a la formación de hidroperóxidos, los cuales se descomponen en muchos productos secundarios como aldehídos y cetonas. Dentro de los aldehídos formados se encuentra el malondialdehído (MDA). El ácido tiobarbitúrico (TBA) se une al MDA dando un compuesto coloreado que constituye una medida indirecta de la lipoperoxidación de las membranas provocada por los RL. La sensibilidad de la medición de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) lo ha hecho el ensayo de elección para el screening o monitoreo de la peroxidación lipídica, y además, un indicador importante de estrés oxidativo (de Zwart y col., 1999).

En distintos lugares del mundo, se han realizado estudios que utilizan biomarcadores y anomalías preclínicas como criterios de valoración para evaluar la susceptibilidad al As relacionada a factores genéticos, nutricionales y estilo de vida.

El planteo de este trabajo de Tesis sobre cómo el consumo de agua con contenidos de As superiores a 10 µg/L, valor establecido por la OMS, influye en la salud de las personas, se relaciona con daño oxidativo y genotóxico y puede estar afectado por variables nutricionales; se abordó a partir de la evaluación de los distintos biomarcadores de exposición y efecto mencionados, de la medición de parámetros bioquímicos, nutricionales y antropométricos y de las encuestas que permitieron conocer datos personales, laborales y hábitos higiénico-dietéticos de los participantes.

El ser humano no es un ser aislado, sino que se encuentra inmerso en un medio con el cual interacciona de múltiples maneras. En la interacción con estos ambientes participan distintos factores: físicos, químicos, biológicos y psicosociales. Todos estos factores ambientales tienen gran repercusión sobre la salud de las poblaciones, constituyendo una serie de interacciones complejas entre las características individuales, los factores sociales y económicos y los entornos físicos que, al actuar de manera combinada, influyen sobre los niveles de salud de los individuos y las comunidades.

Un principio básico en epidemiología es que la enfermedad no es un evento azaroso, sino que cada individuo de una población posee un conjunto único de características y de patrones de exposición (factores de riesgo) que determinan su susceptibilidad a la enfermedad (Rodríguez, 2021).

Por ello, en esta Tesis, se abordó la exposición a As teniendo en cuenta los factores mencionados que fueron considerados “descriptores de la población” y luego analizados, dentro de los factores de confusión, como posibles determinantes de riesgo o de protección. Además se tuvo en cuenta que en los entornos rurales de la provincia de Santa Fe, las posibilidades tanto

de acceso como la adhesión a utilizar nuevas fuentes de agua tratada (osmosis inversa) son factores a considerar.

Estos factores pueden diferir de una localidad a otra, lo que justificó que en la región se reiniciaran estudios con el fin de dilucidar la multiplicidad de eventos y los posibles efectos en la salud que se relacionan con el As en el agua de bebida, con el fin de proporcionar información para la prevención, evaluación de riesgos, y posibilidades de intervención.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el daño oxidativo y genotóxico y su relación con variables nutricionales en poblaciones de la provincia de Santa Fe, socioculturalmente similares que han sido expuestas al arsénico (As) a través del agua de bebida.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la exposición a As a partir de datos de concentración en agua de bebida, excreción en orina de los participantes y los datos declarados en las encuestas respecto al tipo de agua consumida.
- Identificar variables socio-demográficas, de salud, laborales y nutricionales, valorando además el estado nutricional de los pobladores mediante índice de masa corporal.
- Evaluar el daño oxidativo a través de: la determinación de la actividad de la enzima antioxidante Catalasa (CAT) y la peroxidación lipídica determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Determinar las bases pirimidínicas oxidadas mediante la aplicación del Ensayo Cometa (EC) en sangre periférica modificado por el agregado de la enzima Endonucleasa III (Sitios ENDO).
- Determinar los posibles efectos aneugénicos o clastogénicos evaluando la frecuencia de MN en epitelio bucal (MNMB) y la citotoxicidad por medio del recuento de otras anormalidades nucleares (AN).
- Integrar los resultados de exposición y de daño con las covariables tenidas en cuenta en la anamnesis de las personas incluidas en el estudio, los parámetros bioquímico-clínicos analizados y las variables nutricionales. Considerando aquellos que actúen como factores de confusión y/o como variables clínicas.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona y tipo de estudio

Se planeó un estudio de tipo ecológico (incluyendo los departamentos de la región centro de la provincia de Santa Fe) y transversal (evaluación de exposición y efectos mediante biomarcadores).

En el trabajo se propuso la identificación de regiones con alta exposición a As, a partir de datos de concentraciones del metaloide en agua de bebida organizados por departamentos, y su distribución espacial. Se analizó la exposición a partir de resultados de excreción de As en orina de los participantes.

Las muestras para el estudio se tomaron en dos etapas: entre los meses de julio y agosto de 2016 procedentes de las localidades de Candiotti y Providencia incluidas en un Estudio Multicéntrico de As (2016-2017) dentro del Programa de becas SALUD INVESTIGA “Dr. Abraam Sonis”, otorgada por el Ministerio de Salud de la Nación. Las restantes muestras se tomaron entre marzo y octubre de 2018 en el marco del Proyecto Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTEI) 2010-097-16 “Evaluación integral de salud en poblaciones rurales expuestas a arsénico en agua de bebida” y Proyecto CAI+D 2016: 50120150100161LI “Evaluación de efectos sinérgicos entre plaguicidas y arsénico y su relación con daño genotóxico” otorgado por la Secretaría de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional del Litoral.

3.2. Selección de la población y encuesta

Las personas incluidas, fueron hombres y mujeres mayores de 18 años, habitantes de las localidades de Providencia, Humboldt, Presidente Roca, Santa Clara de Sagüer, Lehmann, Nelson, Laguna Paiva y Candiotti. A las personas que aceptaron participar mediante la firma del consentimiento informado, se les realizaron las determinaciones bioquímicas, biomarcadores de exposición a As y de genotoxicidad.

En función de las disposiciones vigentes para el agua de bebida en la provincia de Santa Fe, se incluyeron personas que habitan regiones con contenidos elevados de As en agua subterránea (mayores a 50 µg/L) y personas que habitan regiones con contenidos más bajos de As en agua subterránea (menores a 50 µg/L), además de una población control perteneciente a la localidad de Candiotti con tenores de As en agua de bebida por debajo del valor guía que establece la OMS (menor a 10 µg/L).

Un procedimiento imprescindible en las investigaciones con seres humanos lo constituye el otorgamiento del consentimiento informado por parte de los participantes para su inclusión en el estudio (Declaración de Helsinki, 2000).

En todas las localidades, en una primera instancia se tomó contacto con las autoridades del Poder Ejecutivo (presidente comunal y sus comisiones), con las Autoridades Educativas (directores y docentes de los establecimientos escolares de Educación Inicial y Media) y los Equipos de Salud (médicos, enfermeros, asistentes sociales, bioquímicos, etc.) a quienes se les explicó los objetivos de la investigación y se acordaron reuniones para convocar a los pobladores a participar. En cada una de las localidades seleccionadas, a través de dichas Instituciones y utilizando medios impresos, radiales e incluso televisivos, se invitó a los pobladores a una reunión en la cual se explicaron los objetivos del estudio, criterios de inclusión y exclusión y modalidad de devolución de los resultados. Se entregó una hoja de información con datos de contacto para posteriores consultas y se concertó la fecha de la toma de muestra en los efectores de Salud de cada localidad (Hospital o Servicio de Atención Médica para la Comunidad - SAMCo). También se visitaron las escuelas primarias y/o secundarias para dialogar con los alumnos sobre el As y sus consecuencias en la salud (Figura 11).



Figura 11. Izquierda: Localidad Providencia, primera reunión con Presidente Comunal, Médicos, Bioquímica, Asistente Social, Directoras de escuela primaria y secundaria, Jefe de Nodo Salud. Derecha: Charla en Escuela primaria de Providencia, primera entrega de tríptico sobre As

Los criterios de inclusión fueron: residir en la zona de estudio, tener más de 18 años, aceptar participar y firmar el consentimiento informado. Los de exclusión fueron: haber tenido cirugías en un lapso menor a seis semanas previas, quimioterapia o radioterapia sistémica en curso, enfermedades víricas recientes o presentar algún trastorno que comprometa la capacidad de dar consentimiento informado. También se excluyeron del estudio mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

Consentimiento informado: El proceso de consentimiento informado tiene por finalidad invitar a una persona a participar de una investigación, brindándole la información necesaria, de manera clara y comprensible para que pueda tomar una decisión libre y voluntaria sobre su participación (Dirección de Investigación en Salud, Ministerio de Salud Argentina). El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos deben describirse claramente y ser justificados en un protocolo de investigación (Declaración de Helsinki, 2013). En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado según las normas del Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (ANEXO I). A cada uno de los participantes se le asignó un código alfanumérico que fue utilizado tanto para la encuesta como para las muestras biológicas de sangre, orina y mucosa bucal. Además, se le solicitó el DNI para luego informar a cada participante los resultados obtenidos de los parámetros bioquímicos y en el caso de ser necesario realizar las consultas médicas pertinentes. Los informes bioquímicos, fueron encabezados por la combinación del código y del DNI de modo que pudieran retirar los resultados en cada una de las instituciones públicas de salud que participaron activamente del proyecto.

Encuesta a los participantes: Se realizó una encuesta (ANEXO II) validada previamente a su implementación con otras personas de similares condiciones sociales y económicas que la población de estudio, para ajustar aspectos referidos a la comprensión de las preguntas, adecuación del lenguaje y duración (Figura 12). La misma permitió recabar información sobre datos demográficos, estilo de vida, datos laborales, antecedentes de salud y datos nutricionales. Algunas de las variables incluidas en las encuestas sirvieron para caracterizar a la población estudiada y como covariables para el ajuste de los modelos estadísticos. Se mencionan como covariables de ajuste, para el control en la clasificación y variabilidad: sexo, edad, máximo nivel de escolaridad alcanzado, lugar de residencia y de trabajo, entre otros. Además la entrevista indagó sobre condiciones de salud, con énfasis en signos, síntomas y patologías asociadas a la exposición a As.



Figura 12. Realización de la encuesta a los participantes

Georreferenciación: La georreferenciación es un aspecto fundamental en el análisis de datos geoespaciales, pues es la base para la correcta localización de la información de mapa y, por ende, de la adecuada fusión y comparación de datos procedentes de diferentes sensores en diferentes localizaciones espaciales y temporales. En nuestro caso se realizó por el método de puntos de control utilizando la herramienta “Google Earth” a efectos de posicionar en las localidades seleccionadas para el estudio, los valores de As en agua de los pozos domiciliarios o perforaciones de toma de agua además de los valores de As en orina de los participantes que residían en esos mismos puntos.

En la práctica, durante la Encuesta se pidió a los participantes que ubicaran y marcaran su domicilio o pozo en un mapa impreso de su localidad obtenido con la aplicación de uso libre “Google Maps”. A partir de esos puntos se confeccionaron los mapas con los datos georreferenciados para cada pueblo.

3.2.1. Población que habita regiones con contenidos elevados de As en agua subterránea

Este grupo estuvo conformado por personas, pertenecientes a cinco localidades: Providencia, Humboldt, Presidente Roca, Santa Clara de Sagüier y Lehmann pertenecientes a los departamentos Castellanos y Las Colonias (Figura 13).

-Providencia:

La localidad de Providencia se encuentra en el departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe, República Argentina, a 100 km al noroeste de la capital provincial y a 70 km al norte de la ciudad de Esperanza (Santa Fe), cabecera del departamento Las Colonias. Este distrito comprende una superficie de 20100 ha, de las cuales 108 ha pertenecen a la extensión de la

zona urbana. Una superficie de 4998 ha están destinadas a la ganadería, 2998 ha a la producción de forrajes, 2000 ha representan campo natural que en muchos casos es destinado a pastoreo y 9996 ha comprenden la superficie utilizada para agricultura. Los diferentes lotes se encuentran comunicados por una red de caminos rurales, cuya extensión es de 296 km. Según el último censo nacional la población es de 899 habitantes, 432 hombres y 467 mujeres (INDEC, 2010). La densidad de la población del municipio de Providencia es de 4,5 hab./km². Su altitud es de 46 msnm en la zona urbana. Coordenadas geográficas: Latitud: -30.9835, Longitud: -61.0225, Latitud: 30° 59' 1" Sur, Longitud: 61° 1' 21" Oeste (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-providencia-s.html>).

-Humboldt:

Humboldt está ubicada en el centro del departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe, a 61,5 km de la capital provincial. La localidad se ubica sobre la llanura pampeana, a una altitud de 50 msnm, Su superficie total es de 240 km², mientras que su tejido urbano abarca 1,7 km². Población actual 4815 habitantes: 2376 varones y 2439 mujeres (Censo Nacional año 2010). Densidad de la población del municipio de Humboldt es de 19,9 hab./km². Coordenadas geográficas: Latitud: -31.4, Longitud: -61.0819, Latitud: 31° 24' 0" Sur, Longitud: 61° 4' 55" Oeste Sus principales actividades económicas son la agricultura y la ganadería (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-humboldt-s.html>).

-Santa Clara de Sagüier:

Santa Clara de Sagüier se encuentra en el departamento Castellanos, provincia de Santa Fe, Argentina, ubicado a 132 km de la capital provincial, fundada el 7 de noviembre de 1883, con la creación de la comuna el 8 de enero de 1912. Tiene una población total, estimada de 2393 habitantes según el Censo del 2010 (Hombres: 1159, Mujeres: 1233). La densidad de la población del municipio de Santa Clara de Sagüier es de 15,0 hab./km². Su altitud es de 116 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.3381, Longitud: -61.8202, Latitud: 31° 20' 17" Sur, Longitud: 61° 49' 13" Oeste. La agricultura es su principal actividad económica. (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-santa-clara-de-sagüier.html>).

-Presidente Roca:

Presidente Roca es una localidad argentina ubicada en el departamento Castellanos de la provincia de Santa Fe, se encuentra sobre la Ruta Provincial 13, 14 km al Oeste de Rafaela, Capital del Departamento Castellanos.

Fue fundada en 1882. En 1897 se creó la comuna y 4 años más tarde se aprobó el trazado. Cuenta con 1046 habitantes (INDEC, 2010). Su altitud es de 106 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.2119, Longitud: -61.6139, Latitud: 31° 12' 43" Sur, Longitud: 61° 36' 50" Oeste. Además de la agricultura y ganadería como principal actividad económica, la localidad es un sitio ideal para la promoción del turismo rural, tanto por sus trabajos tradicionales como por el

contacto con muchas de las especies típicas de la fauna del espinal (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-presidente-roca.html>).

-Lehmann:

Lehmann es una comuna localizada en el departamento Castellanos, provincia de Santa Fe, Argentina, a 110 km de la capital provincial y a 15 km de la ciudad de Rafaela. La población es de 3031 Habitantes (Hombres: 1509, Mujeres: 1522) según el último censo nacional (INDEC, 2010). La altitud de Lehmann es de 86 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.2119, Longitud: -61.6139, Latitud: 31° 12' 43" Sur, Longitud: 61° 36' 50" Oeste (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-lehmann.html>)

3.2.2. Población que habita regiones con contenidos más bajos de As en agua subterránea

Se invitó a participar a los habitantes de tres localidades pertenecientes al departamento La Capital: Nelson, Laguna Paiva y Candiotti (Figura 13).

-Nelson:

Nelson es una localidad argentina del departamento La Capital en la provincia de Santa Fe, a 42 km al norte de su cabecera y capital provincial, Santa Fe de la Vera Cruz. Los pueblos Manuel Gálvez y Delicias comenzaron a transitar la última década del siglo XIX, acompañados por el factor de progreso que fue la llegada del ferrocarril y con un crecimiento poblacional que obligó a la organización institucional de ambos pueblos. La compañía francesa del ferrocarril construyó una estación de cuarta clase en el km 43. La nueva estación, que en un primer momento llevó el nombre de Manuel Gálvez, se llamó con posterioridad a 1907, Nelson. Actualmente, su economía está vinculada a la industria frigorífica. Nelson tiene una población de 4716 habitantes, de los cuales 2332 son hombres y 2384 son mujeres. La densidad de la población es de 65,5 hab./km². Su altitud es de 36 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.2653, Longitud: -60.7628, Latitud: 31° 15' 55" Sur, Longitud: 60° 45' 46" Oeste (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-nelson-s.html>).

-Laguna Paiva:

Laguna Paiva es una localidad que se encuentra ubicada en el departamento La Capital, provincia de Santa Fe, a 40 km al norte de la ciudad de Santa Fe. En esta pequeña ciudad tuvo su asiento una de las más grandes instalaciones del Ferrocarril General Belgrano en el año 1906, que fuera privatizado en los años 1990. La ciudad de Laguna Paiva es atravesada de sur a norte por las vías del Ferrocarril C. Gral. Belgrano. La misma es de traza irregular y se extiende a ambos lados del ferrocarril, con mayor desarrollo al oeste de las vías. La actividad económica más importante de Laguna Paiva abarca varios aspectos. Su principal fuente de trabajo es Provisión Siderúrgica y Electromécanica S.A. perteneciente al grupo EMEPA. La ciudad de

Laguna Paiva es cabecera del municipio del mismo nombre, que abarca una extensión de 134 km². Laguna Paiva tiene una población de 12443 Habitantes (Hombres: 5943, Mujeres: 6500). La densidad de población es de 88,8 Hab. por Km². Su altitud es de 16 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.3036, Longitud: -60.6602, Latitud: 31° 18' 13" Sur, Longitud: 60° 39' 37" Oeste (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-laguna-paiva.html>).

Ambas localidades del departamento La Capital, de la Provincia de Santa Fe, distantes una de la otra por escasos 10 Km, fueron sede de Estaciones de Ferrocarril cuando la fuerza movilizadora estaba basada en el vapor y su cercanía a cursos de agua superficiales, potenciaron su crecimiento.

-Candioti:

Candioti es una localidad argentina del departamento La Capital en la provincia de Santa Fe. Se ubica en el km 495 de la RN 11, encontrándose a 32 km de la capital provincial, Santa Fe de la Vera Cruz.

Candioti tiene una población de 1045 Habitantes (Hombres : 533, Mujeres : 512). Su altitud es de 23 msnm. Coordenadas geográficas: Latitud: -31.4, Longitud: -60.75, Latitud: 31° 24' 0" Sur, Longitud: 60° 45' 0" Oeste (<https://www.municipalidad-argentina.com.ar/municipalidad-candioti.html>).

Los datos demográficos se obtuvieron del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC, 2010).

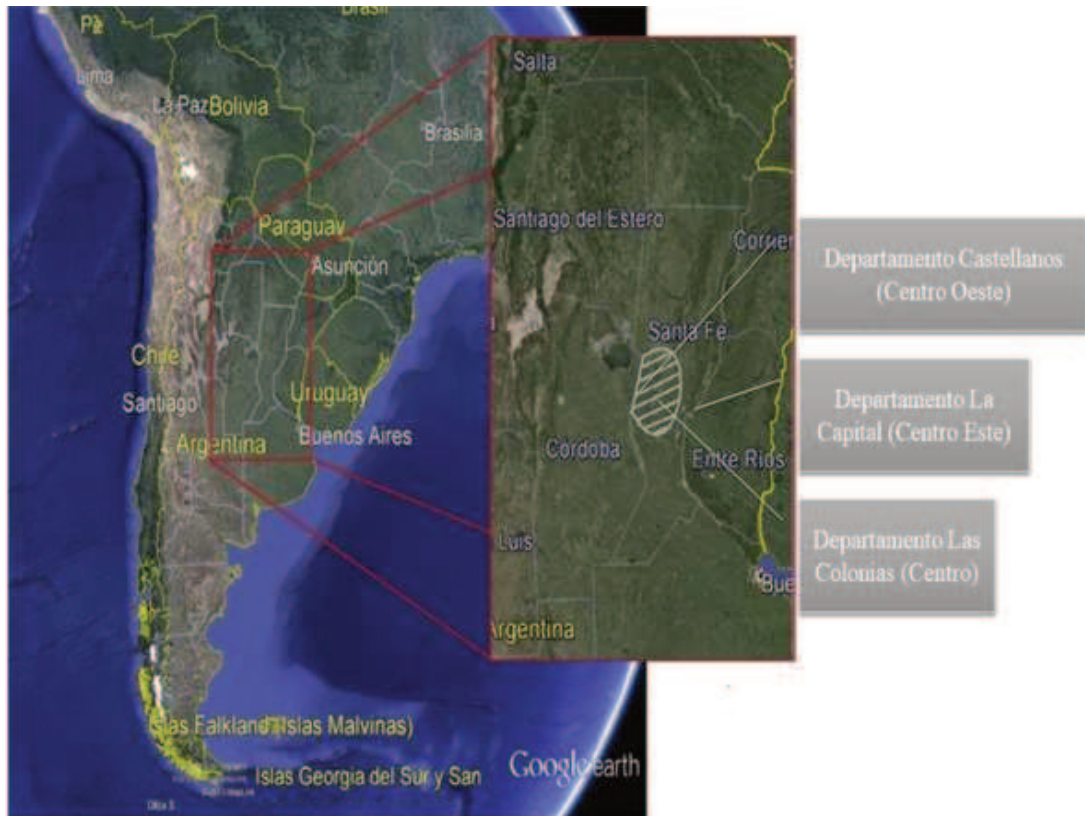


Figura 13. Localización del área de estudio

3.3. Estrategias de muestreo y detección de As en agua de bebida

Las muestras de agua para consumo humano, fueron tomadas en los pozos, que sirven como fuente de provisión de agua subterránea en las distintas localidades y/o en las etapas de pre-tratamiento y pos-tratamiento de potabilización, en distintos domicilios particulares (Figura 14) y siguiendo las normas de la APHA (2007). La metodología de recolección se realizó según las recomendaciones de Sigrist y col. (2011): las muestras provenientes de pozos se recolectaron en envases de polipropileno de 200 ml desde el primer grifo del tubo de extracción, después de hacer la limpieza del grifo y la purga del tubo durante 10 min. Las mismas se conservaron mediante acidificación con 2 ml de HCl concentrado y enfriadas a 4 °C hasta su análisis.

Las localidades de Nelson, Laguna Paiva y Candiotti no poseen pozos domiciliarios ya que toda la población cuenta con agua tratada de red. En el caso de la localidad de Humboldt, existe una prohibición, que data de más de 30 años, de tener activos los pozos de agua subterránea; sin embargo aún existen algunos pozos en zonas rurales que son utilizados para consumo. En las localidades de Providencia, Santa Clara de Sagüier, Presidente Roca y Lehmann existen pozos domiciliarios activos en algunos hogares.



Figura 14. Toma de muestra de agua subterránea

Las muestras de agua fueron remitidas al Laboratorio PRINARC, Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (FIQ-UNL), Santa Fe, donde se realizaron las determinaciones de As total utilizando espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros e inyección en flujo. Los límites de detección y de cuantificación fueron de 0,6 $\mu\text{g/L}$ y 2,0 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Los resultados obtenidos del análisis del material de referencia certificado NIST 1643e para As inorgánico total fue de $60,7 \pm 2,6 \mu\text{g/L}$ (nivel de confianza del 95%). Los resultados de As se expresaron como **$\mu\text{g/L}$ de As en agua.**

3.4. Toma de muestras biológicas humanas

Se solicitó a las personas que aceptaron participar, que concurrieran al centro de salud de cada localidad, en el horario previamente asignado, con una muestra de la primera orina de la mañana en un frasco estéril que se les había entregado previamente.

Los alimentos de origen marino contaminados con As pueden influenciar las mediciones del As total urinario y llevar a diagnósticos erróneos (García, 2011). Por tanto se pidió a los participantes que no consumieran pescado ni otros alimentos de origen marino dentro de los 3 días anteriores a la toma de muestra.

En el centro de salud se procedió a la obtención de las muestras de sangre y epitelio bucal (Figura 15). La extracción de sangre periférica se realizó por punción venosa y estuvo a cargo de profesionales acreditados para dicho proceso. La muestra se dividió en alícuotas. Una alícuota con heparina como anticoagulante, se destinó a la realización del EC dentro de las 12 horas posteriores a su extracción. Otra alícuota con el mismo anticoagulante, fue centrifugada, y los glóbulos rojos fueron lavados tres veces con solución fisiológica (NaCl 0,9 %), y se reservó a -80°C para la determinación de estrés oxidativo. Las restantes se emplearon en la determinación

de las variables bioquímicas: hemograma, glucemia, uremia, uricemia, trigliceridemia, colesterolemia y creatininemia que fueron realizadas utilizando un autoanalizador marca Targa®. Para la obtención de muestras epiteliales de descamación de la mucosa bucal, se raspó el interior de ambos lados de la mejilla del dador con un cepillo dental pequeño, que fue colocado posteriormente en un tubo cónico conteniendo 3 ml de buffer.

Estos tubos con código alfanumérico, coincidente con el asignado en las encuestas, fueron transportados en recipientes debidamente refrigerados para ser procesados también dentro de las 12 horas post extracción y minimizando de este modo la proliferación bacteriana.

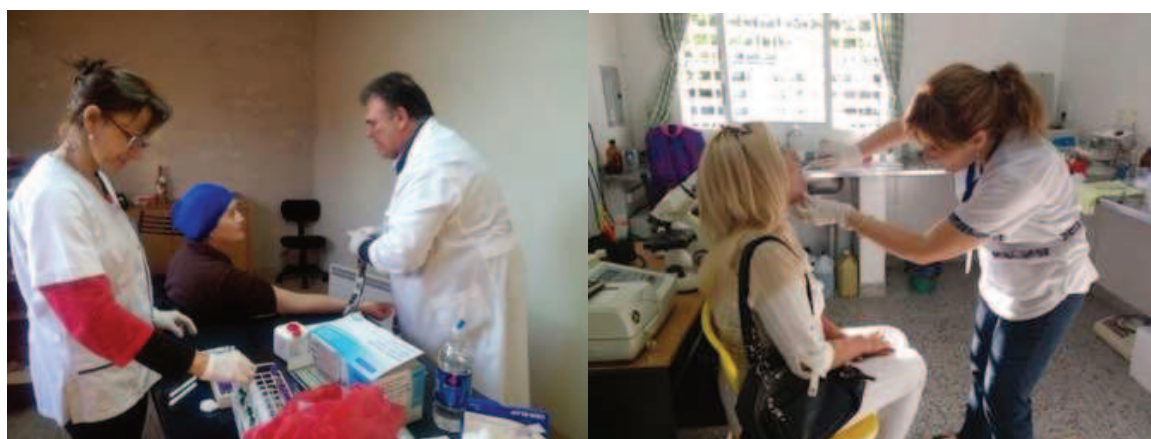


Figura 15. Toma de muestras de sangre y mucosa bucal

3.5. Biomarcadores analizados

3.5.1. Biomarcador de exposición - Determinación de la excreción de As en orina

Las muestras de orina de los participantes de Humboldt, Santa Clara de Saguier, Presidente Roca, Lehmann, Nelson y Laguna Paiva fueron remitidas al Laboratorio PRINARC, FIQ-UNL donde se realizaron las determinaciones de As total utilizando espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros e inyección en flujo con las mismas características descriptas previamente para las muestras de agua.

Las muestras, correspondientes a las localidades de Candiotti y Providencia, que formaron parte de un estudio multicéntrico de As, fueron procesadas en el Laboratorio CENATOXA, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Como una manera de compensar el efecto de la dilución en la medición, se relacionó la concentración de As con la de creatinina. Los resultados de As en orina se expresaron como **µg de As/g de creatinina urinaria**.

Se consideraron expuestas las personas que excretaban más de 30 µg As/g de creatinina en orina tomando como guía los valores de referencia de As total urinario en poblaciones no expuestas profesionalmente (Navoni y col., 2004).

3.5.2. Parámetros de daño genotóxico

3.5.2.1. Ensayo de viabilidad celular: Test del Azul Tripán (Mishell y Shiigi, 1980)

- **Fundamento:**

La determinación de la viabilidad celular previo al EC o a cualquiera de sus modificaciones es una recomendación indispensable realizada por Singh y col. (2000).

El azul tripán, una diamina derivada de la toluidina, es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla. En las células viables no se incorpora el azul tripán, mientras que el colorante atraviesa fácilmente la membrana de las células muertas. Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio y pueden contabilizarse fácilmente utilizando una cámara de Neubauer.

- **Preparación del colorante:**

Azul tripán 0,4% (peso/volumen) en PBS 7,4.

- **Metodología:**

Mezclar 0,2 ml de suspensión celular con 0,2 ml de azul tripán. Poner una gota de la mezcla entre porta y cubre. Contar 100 células (teñidas y no teñidas). Luego, calcular el porcentaje de viabilidad.

La viabilidad debe ser superior al 90 % para que las células analizadas puedan ser utilizadas luego durante el EC.

3.5.2.2. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa (EC) (Singh y col, 1988)

- **Fundamento:**

Las células están embebidas en una capa delgada de agarosa en un portaobjetos y luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas se eliminan, dejando el ADN super-enrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina de ADN y posterior electroforesis causa el desenrollamiento de los bucles de ADN y permite a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza generalmente por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se parecen a cometas, y el contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las roturas.

- Reactivos y soluciones:

Agarosa de punto fusión normal (APFN) (80°C) al 1 %

Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) (37°C) al 1%

Solución de lisis stock: 2,5 M NaCl +100 mM Na₂EDTA +10 mM Tris ajustar pH 10 con NaOH

Solución de lisis de trabajo: 40 ml de solución stock + 5 ml dimetil sulfóxido (DMSO) + 400 µl tritón. Preparar inmediatamente antes de su uso. Refrigerar a 4-10 °C, 30-60 min antes de usar

Soluciones stock de electroforesis: A) 10 N NaOH; B) 200 mM Na₂EDTA, pH 10

Buffer de electroforesis final: 30 ml solución A + 5 ml solución B + H₂O csp 1 litro de buffer de electroforesis, pH>13.

Buffer de neutralización: 0,4 M Tris. Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado.

Solución de Tinción: Solución madre de naranja de acridina (NA): 10 mg/ml en PBS 7,4.

Solución de trabajo de NA = 10 µl Sn. Madre + 990 µl PBS 7,4.

- Metodología:

Preparación de los portaobjetos:

Se prepara una solución de APFN al 1% en agua destilada. Se disuelve por calentamiento, colocándola en microondas 2 min. a potencia media. Inmediatamente y sin que se enfríe, se sumergen los portaobjetos en la agarosa, se retiran, se limpia la parte posterior y se dejan gelificar en posición horizontal unos minutos. Luego se secan en estufa a 50 °C durante 30 min.

Así los portaobjetos pueden guardarse a temperatura ambiente en desecador.

Observación: Se deben emplear portaobjetos esmerilados limpios y desengrasados.

Procesamiento de las muestras:

Se diluyeron 50 µl de la sangre heparinizada en 200 µl de la solución de ABPF a 37°C (10.000 células aproximadamente). Con esta mezcla se prepararon dos portaobjetos, de este modo, cada muestra se procesó por duplicado. En cada preparado se colocó un cubreobjetos y una vez gelificados (10 min. a 4 °C), se procedió a retirar el cubreobjetos.

Lisis:

A partir de esta etapa todos los pasos se realizaron a 4°C y en oscuridad. Los portaobjetos se colocaron en solución de lisis de trabajo fría en recipientes coplin como mínimo 24 hs.

Desenrollamiento del ADN:

Se retiraron los preparados de la solución de lisis y se colocaron en una cuba horizontal en baño de hielo que contenía el buffer de electroforesis a 4°C, por 20 min. para que se lleve a cabo el desenrollamiento (*unwinding*) del ADN.

Electroforesis:

Se realizó la corrida electroforética a 0,90 V/cm (300 mA) durante 20 min. Empleando el mismo buffer de electroforesis a pH alcalino (≥ 13).

Neutralización:

Se retiraron cuidadosamente los portaobjetos de la cuba y se realizaron tres lavados con buffer de neutralización (pH 7,5) a intervalos de 5 min. Se escurrieron los preparados y deshidrataron durante 5 min. en alcohol etílico, se conservaron en lugar seco hasta el momento de la tinción.

Tinción con Naranja de Acridina:

Los preparados se tiñeron en el momento de la lectura con 30 μ l de la solución de trabajo de NA. La observación de los mismos se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss standard 25 equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm. y objetivo de 400X).

Controles:

En todas las corridas se incluyó:

a) Control Negativo: se mezcló 900 μ l de buffer PBS y 100 μ l de sangre periférica heparinizada (de donante sano y no expuesto a genotóxicos conocidos), se incubó a 37 °C por una hora, se centrifugó y con 50 μ l del sedimento se realizaron los preparados por duplicado de la manera descripta previamente,

b) Control Positivo (con H₂O₂ 1mM): se mezcló 800 μ l de buffer PBS, 100 μ l de sangre periférica heparinizada (de donante sano y no expuesto a genotóxicos conocidos), y 50 μ l de H₂O₂ 1 mM, se incubó a 37 °C por una hora, se centrifugó y con 50 μ l del sedimento se realizaron los preparados por duplicado de la manera descripta anteriormente.

Cálculos y expresión de los resultados:

Se cuantificaron 100 células por muestra, 50 en cada réplica. Se determinó la cantidad de células en cada nivel de daño (Gedik y col., 1992). Así se consideraron:

nivel 0= sin daño, sin migración de fragmentos (sin cola);

nivel 1= daño leve (cola de longitud menor al diámetro del nucleoide);

nivel 2= daño moderado (longitud de la cola mayor al diámetro de un nucleoide pero menor al diámetro de dos);

nivel 3= daño alto (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres) y

nivel 4= daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides).

A medida que aumenta la longitud de la cola y por ende la cantidad de ADN en la misma, el nucleoide (“cabeza del cometa”) va perdiendo intensidad y tamaño (Figura 16). Se calcula el Índice de daño EC (IDEC). Los resultados se expresan como:

IDEC= $n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4$, donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño.

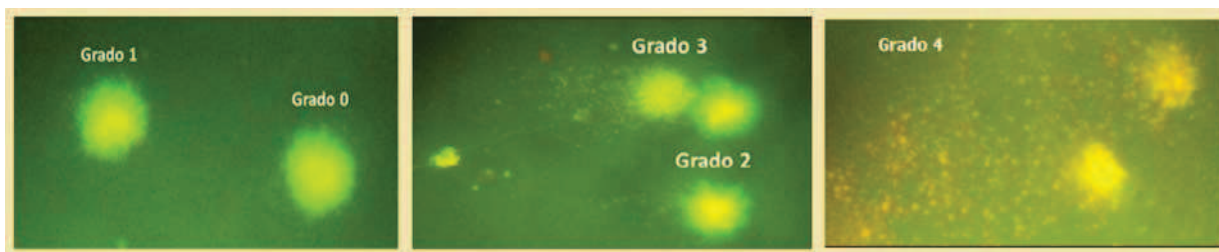


Figura 16. EC: Niveles de daño celular de acuerdo a la longitud de la cola de los cometas. Microscopía de fluorescencia con tinción de naranja de acridina

3.5.2.3. EC modificado para la detección de bases oxidadas con el uso de endonucleasas de reparación bacterianas: Sitios ENDO III (Collins y col., 1993)

- Fundamento:

Para evaluar la presencia de lesiones oxidativas en el ADN se ha propuesto un modelo enzimático que puede ser usado en la versión alcalina del EC. Las células expuestas se lisan de la forma habitual, se incuban los nucleoides resultantes con la enzima endonucleasa (ENDO III) y luego se continúa con el EC previamente descrito. La existencia de pirimidinas oxidadas será proporcional a la diferencia entre el preparado con enzima y el que sólo utiliza el buffer de la enzima.

- Reactivos y soluciones:

Agarosa de punto fusión normal (APFN) (80°C) al 1 %

Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) (37°C) al 1%

Buffer de reacción de la enzima ENDO III: 40 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM Na₂EDTA; 0,2 mg/ml Albúmina Sérica Bovina (BSA), se ajusta a pH 8 con KOH.

Solución de la enzima para el ensayo: 1/3000 con el buffer de reacción de la enzima, conservar a -80 °C

- Metodología:

Se colocaron las células en los portaobjetos como fue previamente descrito (3.5.2.2) y luego de la lisis los preparados se lavaron 3 veces por 5 min con buffer PBS a 4 °C y se secaron cuidadosamente con papel absorbente. Por cada muestra se realizaron dos preparados, a uno se le agregó 40 µl de buffer de reacción de la enzima y al otro 40 µl de la dilución de la enzima (1/3000), se incubaron con cubreobjetos en cámara húmeda: 30 min a 37°C y luego de retirados los cubreobjetos, se continuó con los pasos de desenrollamiento del ADN, electroforesis, neutralización y tinción procediendo con la técnica de EC de la manera tradicional (Figura 17).

- Cálculos y expresión de los resultados:

Se determinó el IDEC o el IDEC-ENDO según se tratara del preparado que sólo se agregó buffer o el que se agregó la dilución de la enzima. Los sitios ENDO se obtuvieron por la sustracción del ID con enzima menos el ID sin enzima

IDEC-ENDO – IDEC = Sitios ENDO

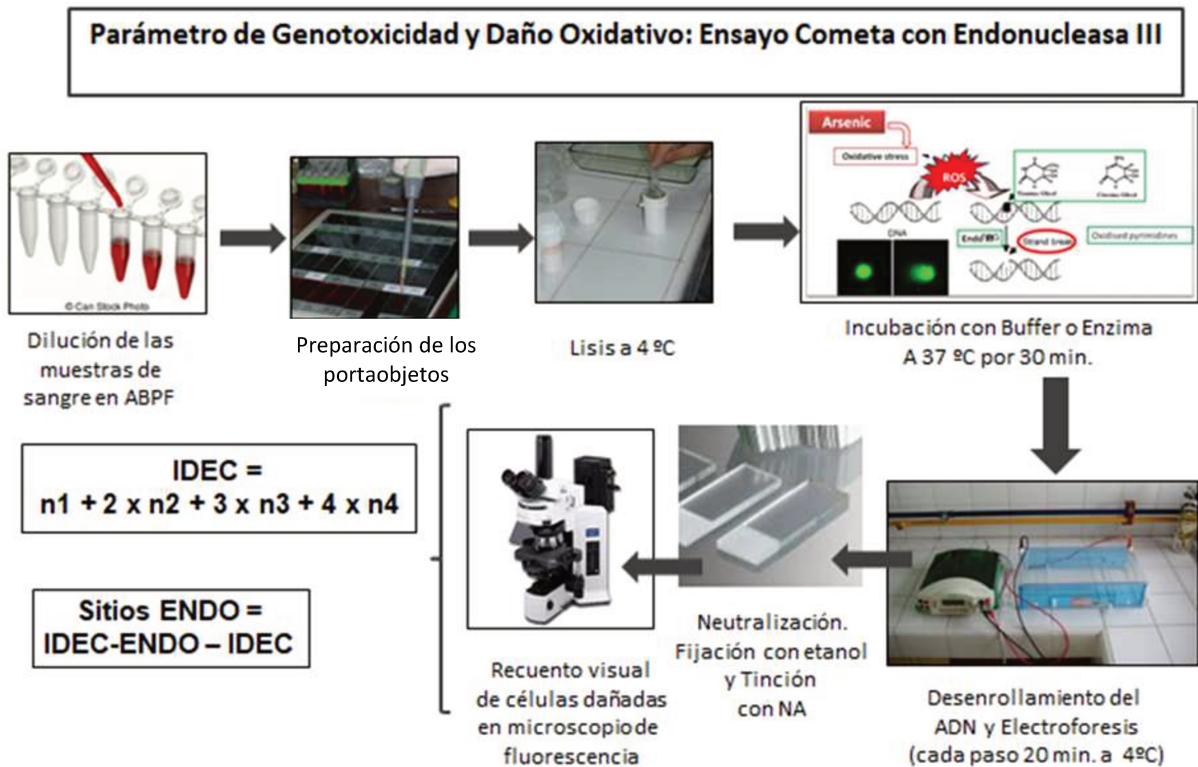


Figura 17. Procedimiento para la realización del Ensayo Cometa (EC) modificado con Endonucleasa en leucocitos de sangre periférica

3.5.2.4. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal (MNMB) (Titenko-Holland y col., 1998)

- **Fundamento:**

Los MN se originan durante la división celular. El material genético contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera equivocada debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN. Los MN se pueden generar de manera espontánea o como respuesta a la acción de agentes aneugénicos y/o clastogénicos, que generan la pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, que no se incorporan correctamente al núcleo de la célula hija. Esto puede ser visualizado como una masa de cromatina, que tiene la forma de un núcleo pequeño, y que aparece cerca del núcleo principal.

- **Reactivos y soluciones:**

Buffer celular: 0,1M Na₂EDTA, 0,01 Tris-HCl y 0,02M NaCl, pH 7

Solución de tinción: Solución de trabajo de NA 100 µg/ml

- Metodología:

Las células obtenidas de ambas mejillas se lavaron tres veces con 3 ml del buffer, homogeneizando con vortex suavemente en cada paso y seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Luego de la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0,2 ml de la solución buffer. Se homogeneizaron nuevamente las células y se montaron sobre portaobjetos precalentados en estufa (a 50°C), luego se secaron en estufa a 37 °C. Se realizaron 4 portaobjetos por cada muestra. Una vez secos se fijaron en metanol 80% frío por 30 min. y se secaron nuevamente.

Las muestras se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss standard 25 equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm. y objetivo de 400X), coloreadas previamente con la solución de tinción de NA (Figura 18).

- Cálculos y expresión de los resultados:

Se contaron un total de 2000 células por cada donante, aproximadamente 500 de cada porta. Sólo se analizaron células que no se encontraron superpuestas o dobladas y que poseían el núcleo intacto. Aquellas células que estaban atravesando un proceso de degeneración como cariorrexis o cariólisis y/o fragmentación nuclear no se incluyeron. La frecuencia de MNMB se expresó como:

Frecuencia de micronúcleos **FMN: N° de células con MN/1000 células analizadas.**

Para la identificación de los MN se tuvieron en cuenta los criterios de Tolbert y col. (1991) y Fenech (2000) (Figura 19):

- 1) debían tener un tamaño menor a 1/3 del núcleo principal y estar en el mismo plano focal,
- 2) tener morfología redondeada o levemente ovalada
- 3) mostrar menor o la misma intensidad en la coloración que el núcleo principal
- 4) no ser refringentes
- 5) estar separados del núcleo principal o si sus bordes se tocan, que sean totalmente distinguibles y
- 6) no existir más de 6 MNs en una misma célula.

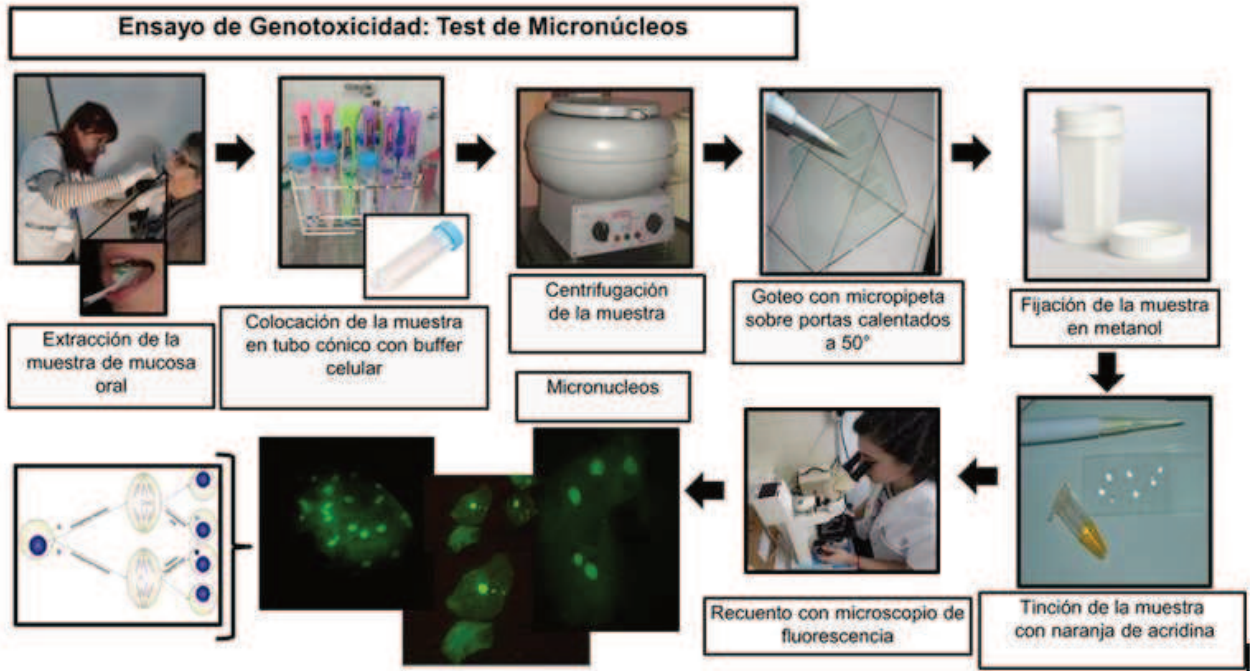


Figura 18. Procedimiento para la determinación de la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal

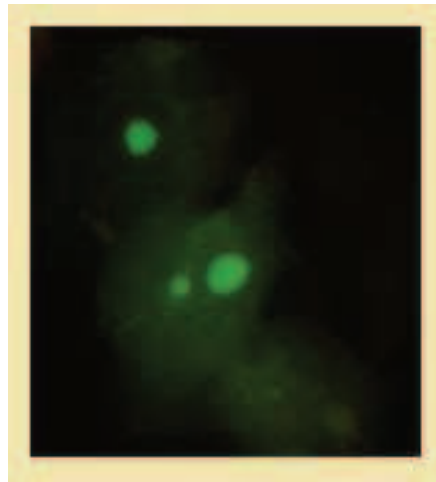


Figura 19. Células de mucosa bucal con micronúcleos (MN). Microscopía de fluorescencia con coloración de naranja de acridina

3.5.2.5. Determinación de otras anomalías nucleares (AN) (Tolbert y col., 1992)

- Fundamento:

Las AN, además de ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, son indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular.

Las células binucleadas (CBN) son células que contienen dos núcleos en vez de uno. Su presencia indica defectos en la citocinesis después de la última división nuclear en la capa celular basal. Los núcleos usualmente están muy cerca uno del otro y puede que se toquen. Generalmente tienen morfología muy similar a los observados en células normales. Las células con núcleo lobulado (CNL) contienen núcleos con una aparente constricción aguda en un extremo del mismo que sugiere un proceso de gemación. Son biomarcadores de daño al ADN al igual que los MN. El brote nuclear y el núcleo generalmente están muy cerca y parecen estar unidos entre sí, tienen la misma morfología y propiedades de tinción; sin embargo, su diámetro puede oscilar entre la mitad y la cuarta parte del núcleo principal (Thomas y col., 2009).

- Reactivos, soluciones y Metodología:

Desarrollados en el apartado 3.5.2.4.

- Cálculos y expresión de los resultados:

Se tuvieron en cuenta los mismos criterios de selección (Tolbert y col., 1991) y recuento celular que en el ensayo de MN. Los resultados se expresaron como:

Frecuencia de células binucleadas **FCBN: N° de CBN contadas/ 1000 células analizadas.**

Frecuencia de células con núcleo lobulado **FCNL: N° de CNL contadas/1000 células analizadas.** (Figura 20).

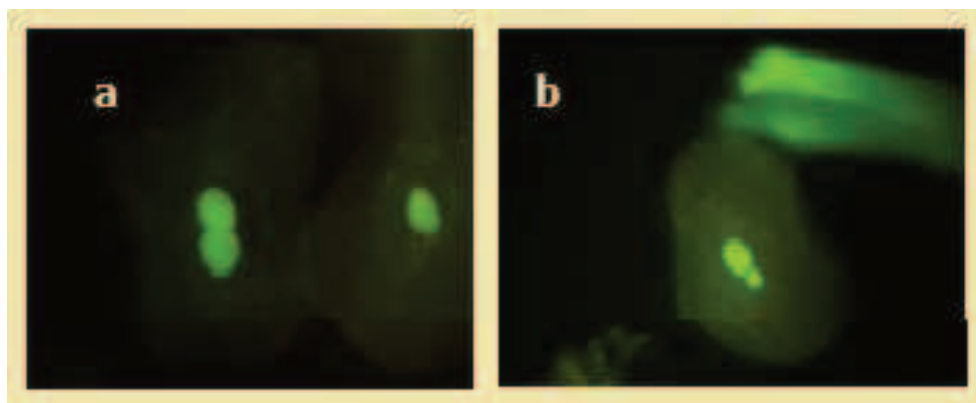


Figura 20. Células de mucosa bucal: a) Células binucleadas (CBN) y b) Células con núcleo lobulado (CNL). Microscopía de fluorescencia con coloración de naranja de acridina

3.5.3. Parámetros de daño oxidativo

3.5.3.1. Determinación de la Actividad de Catalasa (CAT) (Beutler, 1982)

- Fundamento

La enzima CAT captura el H_2O_2 antes de que pueda reaccionar dentro de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. La reacción de CAT es una reacción de primer orden: la concentración de la enzima es proporcional a la actividad enzimática y los resultados pueden ser reportados tanto en actividad como en concentración. El procedimiento consiste en determinar la disminución de H_2O_2 contenido en buffer de fosfatos en presencia de una dilución de eritrocitos a 240 nm a 25 °C por 60 segundos.

- Reactivos y soluciones

Buffer para CAT pH 8,00: Tris base 1 M, EDTA 5 mM

Medio de reacción: 45 ml de solución de H_2O_2 10mM + 2,5ml buffer CAT pH 8,00 + 2 ml de agua destilada.

- Dilución de las muestras:

Hemolizado de eritrocitos al 1%: previo a realizar las determinaciones homogeneizar 10 μ l de eritrocitos lavados en 1000 μ l de agua mili Q fría.

- Metodología:

Se realizó en microplaca de 96 pocillos para UV, utilizando el lector Synergy HTX, equipado con el software 3.02.1 y se calibró la reacción a 30°C. En tres pocillos se colocaron 10 μ l de muestra diluida (triplicado) y luego se agregó a todos los pocillos 290 μ l del medio de reacción con el inyector del equipo. Para la lectura del blanco se agregó 10 μ l del buffer para CAT pH 8,00 + 290 μ l de medio de reacción. Se realizaron las lecturas a 240nm, durante 3 min cada 15 segundos, controlando mediante el software que la reacción sea lineal y decreciente.. De cada pocillo se obtuvo también el paso de luz en cm.

- Cálculos y expresión de los resultados:

La unidad de CAT es la cantidad de enzimas que degrada 1 μ M de H_2O_2 por minuto por cada mg de proteína. Para los eritrocitos, se consideró que la proteína está representada de forma mayoritaria por la hemoglobina. La actividad específica se obtuvo mediante el producto del promedio del Λ absorbancia minuto^{-1} por la dilución siendo inversamente proporcional al coeficiente de extinción molar de la molécula de H_2O_2 ($0,071 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), al volumen de la muestra y al contenido de Hemoglobina de la muestra

Los resultados se expresaron como **kU de CAT por g⁻¹ de Hb.**

3.5.3.2. Determinación de Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico como medida de peroxidación lipídica (Beuge y Aust, 1978)

- Fundamento:

El malondialdehído (MDA) forma un 1,2 aducto con el ácido tiobarbitúrico (TBA), lo que produce MDA:TBA (1:2) una base de Schiff color rosa fluorescente, que puede ser medida por espectrofotometría a 535 nm. Las sustancias reactivas al TBA (TBARS) se generan a partir de la oxidación enzimática del ácido araquidónico, y también como producto final de la degradación oxidativa de algunos ácidos grasos poliinsaturados que poseen tres o más dobles enlaces. Por lo tanto, constituyen una medida indirecta de la lipoperoxidación de las membranas provocada por los radicales libres.

- Reactivos y soluciones:

Solución de trabajo: 15% TCA, 0.375 % TBA y 0.25 mol/l HCl

Solución de Butilhidroxitolueno (BHT): 680 μ M en etanol

- Dilución de las muestras:

50 μ l de eritrocitos lavados, se mezclaron con 200 μ l agua mili Q fría, homogeneizando posteriormente la mezcla.

- Metodología:

Se mezclaron 250 μ l de la muestra diluida + 25 μ l de solución de BHT + 1 ml de solución de trabajo. La mezcla se calentó por 45 min en baño seco a 92 °C. Posteriormente se enfrió en baño de hielo para detener la reacción. Los flóculos precipitados se removieron por centrifugación a 10.000 g por 10 minutos. La absorbancia de la muestra se determinó a 535 nm contra blanco de reactivos utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Jenway®, Geneva. Para evitar las interferencias, se usaron tubos libres de hierro y agua desionizada para el ensayo.

- Cálculos y expresión de los resultados:

La concentración de TBARS fue calculada usando el coeficiente de extinción: $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

. Los resultados se expresaron como **nmol de TBARS por g⁻¹ Hb.**

3.6. Instrumentos de recolección de datos nutricionales:

Se aplicó un cuestionario previamente validado, (ANEXO II) administrado por entrevista personal a los voluntarios que consistió en:

-Encuesta de Hábitos Alimentarios: se utilizó para obtener datos de los hábitos higiénico dietarios de los voluntarios.

-Cuestionario de Frecuencia Alimentaria cualitativo: se utilizó para conocer la frecuencia de consumo de los alimentos por parte de los voluntarios y de esta forma evaluar si existe disminución de consumo de algún grupo de alimentos que aporte un nutriente específico, si existen excesos o adecuación de la dieta. Además, aportó información acerca de los hábitos alimentarios. Se prestó especial atención a aquellos alimentos que son las principales fuentes de micronutrientes antioxidantes (frutas y verduras) y las fuentes de agua para bebida y cocción de alimentos.

-Mediciones antropométricas:

- Peso:

Para llevar a cabo esta medición se solicitó a los sujetos que se descalcen y mantengan solo la ropa liviana. Se indicó que se ubiquen en el centro de la balanza, sin que el cuerpo entre en contacto con objetos aledaños. Una vez adoptada la posición referida se efectuó la lectura en Kg en balanza de pie (De Girolami, 2003) (Figura 21).

- Talla:

Para efectuar la medición se solicitó a los sujetos que estuvieran descalzos. Se indicó que se paren en el centro de la balanza, de espaldas a la misma, con los talones unidos tocando la superficie vertical. Se verificó que la cara posterior de los glúteos y la parte superior de la espalda estuvieran apoyadas en el estadiómetro. Para lograr que el vértex sea el punto más alto del cráneo se aseguró que el margen inferior de la órbita ocular estuviera alineado horizontalmente con la protuberancia cartilaginosa de la oreja. Se solicitó a los sujetos inspirar y mantener la inspiración, y se colocó la escuadra del estadiómetro sobre el vértex. En ese momento se realizó la lectura en centímetros (De Girolami, 2003).

- Circunferencia de la cintura umbilical:

Se solicitó a los sujetos que se coloquen de pie, con el torso desnudo y los brazos relajados al costado del cuerpo. La medición se realizó rodeando con la cinta métrica la zona de la medición a la altura del ombligo. La lectura se expresó en centímetros al final de una espiración normal (De Girolami, 2003).



Figura 21. Mediciones antropométricas realizadas a los participantes por las Licenciadas en Nutrición que participaron del proyecto

3.7. Procesamiento de datos y tratamiento estadístico

Con los datos obtenidos de las entrevistas y las variables de laboratorio se elaboró una base de datos en el programa Excel (Microsoft Office) que se empleó para migrar al software estadístico y confeccionar tablas y gráficos.

Para determinar normalidad se utilizó el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (K-S). Se confrontaron los resultados utilizando los test paramétricos T de Student o Anova según correspondiera. Mientras que para los no paramétricos se utilizaron los test de Mann Whitney (M-W) y Kruskal Wallis (K-W). El nivel de significación elegido fue de 0,05. El software empleado, SPSS 17.0 para Windows.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Descripción general de la población

4.1.1. Aspectos sociodemográficos

Se incluyeron en el estudio un total de 322 personas que cumplían los criterios de inclusión, residentes de las distintas localidades. Departamento Las Colonias: Providencia (n=43), Humboldt (n=40); Departamento Castellanos: Santa Clara de Sagüier (n=60), Presidente Roca (n=34) y Lehmann (n= 37); Departamento La Capital: Nelson (n= 46), Laguna Paiva (n=48) y Candiotti (n=14). El promedio de edad de la muestra fue de 45,6 años, siendo la mayoría de sexo femenino (73%) y con una actividad laboral preferentemente de tipo urbano (83%). Estas características así como el nivel de escolaridad están expresadas en la Tabla 1 para la población general y en la Tabla 2 desagregadas por localidad.

TABLA 1. Características sociodemográficas de la población general (n=322)

VARIABLES	n	%
Sexo		
Femenino	235	73%
Masculino	87	27%
Escolaridad		
Primaria	122	38%
Secundaria	100	31%
Terciario/Universitario	100	31%
Actividad laboral		
Rural	54	17%
Urbana	268	83%

TABLA 2. Características sociodemográficas por localidad (n= 322)

Variables	Providencia (n=43)	Humboldt (n=40)	Roca (n=34)	Santa Clara de Saguier (n=60)	Lehmann (n=37)	Nelson (n=46)	Laguna Paiva (n=48)	Candioti (n=14)
Edad (promedio)	51,1	43,1	39	48,4	41	48,3	44	46,9
Sexo (%)								
Femenino	79%	68%	65%	80%	65%	76%	79%	64%
Masculino	21%	32%	35%	20%	35%	24%	21%	36%
Escolaridad (%)								
Primaria	58%	30%	38%	37%	54%	39%	15%	36%
Secundaria	23%	48%	32%	25%	24%	33%	36%	36%
Terciaria/Univ.	19%	22%	30%	38%	22%	28%	49%	28%
Activ. Laboral (%)								
Rural	19%	22%	29%	15%	32%	9%	2%	7%
Urbana	81%	78%	71%	85%	68%	91%	98%	93%

4.1.2. Descriptores de la población

Los siguientes datos personales, laborales, patologías, hábitos y estilo de vida; fueron considerados para caracterizar a la población de estudio y posteriormente analizados como posibles factores de confusión para los biomarcadores de exposición y efecto analizados en relación al As.

TABLA 3. Descriptores de la población por localidad (n=322)

Descriptores		Pr n=43	H n=40	SC n=60	R n=34	L n=37	N n=46	PA n=48	C n=14
Edad	< 45 a	37%	60%	43%	74%	57%	39%	58%	50%
	> 45 a	63%	40%	57%	26%	43%	61%	42%	50%
DBT	Si	16%	8%	7%	3%	3%	11%	8%	14%
	No	84%	92%	93%	97%	97%	89%	92%	86%
ECV	Si	42%	5%	12%	3%	8%	15%	8%	14%
	No	58%	95%	88%	97%	92%	85%	92%	86%
HTA	Si	35%	13%	18%	12%	14%	35%	19%	21%
	No	65%	87%	82%	88%	86%	65%	81%	79%
Cáncer	Si	7%	2%	8%	6%	0%	2%	4%	14%
	No	93%	98%	92%	94%	100%	98%	96%	86%
Fuma	Si	12%	8%	15%	6%	16%	24%	19%	7%
	No	88%	92%	85%	94%	84%	76%	81%	93%
Consumo diario Alcohol	Si	7%	18%	7%	15%	11%	11%	2%	0%
	No	93%	82%	93%	85%	89%	89%	98%	100%
Actividad Física	Si	65%	73%	68%	68%	62%	43%	69%	36%
	No	35%	27%	32%	32%	38%	57%	31%	64%
Consumo Medicamentos	Si	60%	43%	42%	38%	35%	28%	48%	36%
	No	40%	57%	58%	62%	65%	72%	52%	64%
Suplementos	Si	12%	18%	18%	9%	8%	4%	17%	14%
	No	88%	82%	82%	91%	92%	96%	83%	86%
Consumo diario frutas y vegetales	Si	51%	87%	82%	85%	54%	70%	77%	100%
	No	49%	13%	18%	15%	46%	30%	23%	0%
Consumo diario proteínas animal	Si	86%	98%	98%	97%	95	89%	96%	100%
	No	14%	2%	2%	3%	5	11%	4%	0%
Exposición Laboral Plaguicidas	Si	47%	32%	13%	26%	22	4%	0%	0%
	No	53%	68%	87%	74%	78	96%	100%	100%

Pr: Providencia, H: Humboldt, SC: Santa Clara, R: Presidente Roca, L: Lehmann, N: Nelson, PA: Laguna Paiva, C: Candiotti

4.1.3. Estado nutricional, parámetros bioquímicos y patologías asociadas

Al analizar la prevalencia de patologías asociadas al estado nutricional a partir de las encuestas, los entrevistados declararon hipertensión arterial (HTA): 23%, enfermedad cardiovascular (ECV): 16% y diabetes (DBT): 10%. Sumado a esto, el 20 % de los pacientes tenía diagnóstico de

hipotiroidismo, un 4% de distintas enfermedades autoinmunes y un 5 % cáncer. Al indagar sobre el uso de fármacos un 55% de los participantes declaró consumir algún tipo de medicamento. Los fármacos consumidos con mayor frecuencia fueron: antihipertensivos, antiarrítmicos, hipoglucemiantes orales, Levotiroxina, psicofármacos (dentro de este grupo ansiolíticos y antidepresivos), drogas antiinflamatorias no esteroideas e inhibidores de la bomba de protones (protectores gástricos).

En cuanto a las mediciones de peso y talla y su relación con el IMC, se observó que un 32% presentaba normopeso, 4% bajo peso y un 64% presentaba algún grado de exceso de peso (Figura 22).

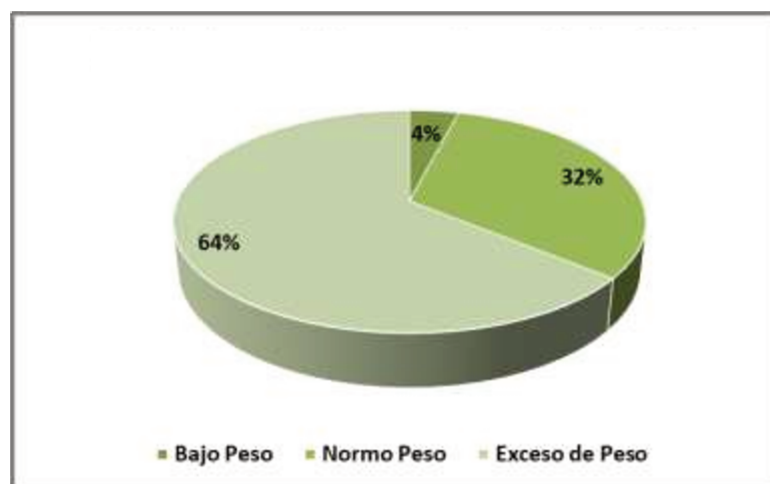


Figura 22. Valoración del estado nutricional según Índice de Masa Corporal (IMC) (n=322)

Se analizaron los parámetros bioquímicos que pueden estar asociados a alteraciones en el peso corporal (glucemia, colesterolemia, trigliceridemia), indicándose en la Figura 23 los porcentajes de participantes que presentaron valores superiores a los de referencia. No se detectaron cambios significativos a nivel hematológico (hemograma) ni en los demás parámetros bioquímicos analizados (uricemia, uremia, creatininemia).

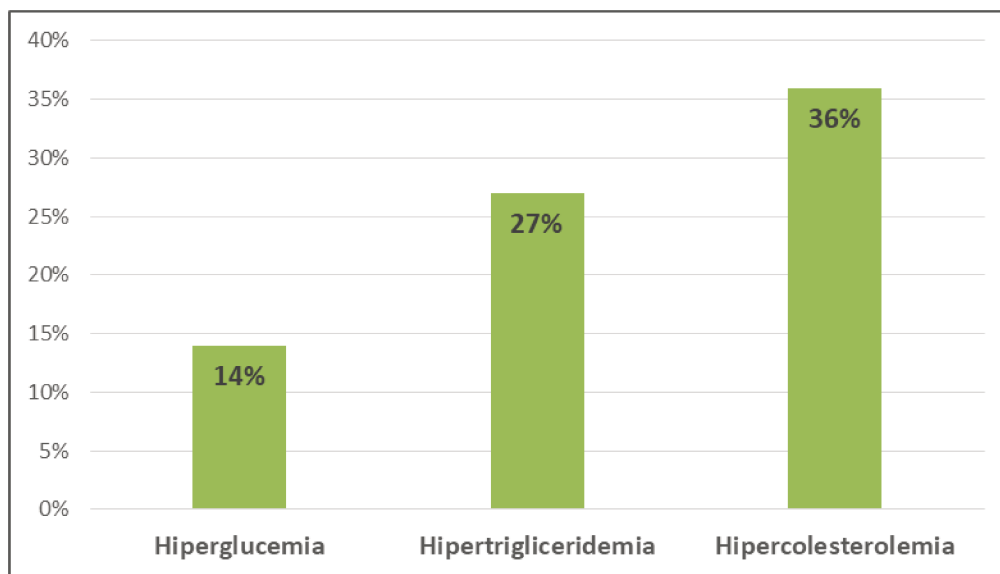


Figura 23. Parámetros bioquímicos alterados más relevantes (n=322)

4.1.4. Consumo de alimentos y nutrientes

En las encuestas los participantes respondieron un cuestionario de frecuencia de consumo cualitativo que se utilizó para indagar acerca de la frecuencia de consumo de proteínas de origen animal, y antioxidantes en frutas y hortalizas. Los vegetales se clasifican según la cantidad de glúcidos en: Grupo A: contienen menos de un 5 % de hidratos de carbono (acelga, apio, espinaca, berenjena, coliflor, lechuga y rábano); Grupo B: contienen de un 5 a un 10 % de hidratos de carbono (alcachofa, guisante, cebolla, nabo, puerro, zanahoria y remolacha) y Grupo C: contienen más del 10 % de hidratos de carbono (papa y mandioca).

De la valoración nutricional por medio de los datos obtenidos se observó un bajo consumo diario de frutas y hortalizas, y un elevado consumo de proteínas de origen animal con frecuencia diaria, con predominio del consumo de carnes rojas (Tabla 4).

TABLA 4. Frecuencia de consumo de alimentos fuentes de antioxidantes y proteínas (n= 322)

Alimento	Consumo diario %
Carnes	62%
Frutas A	41%
Vegetales A	37%
Vegetales B	36%
Quesos	34%
Leche	31%

Frutas B	30%
Vegetales C	21%
Yogurt	9%
Huevo	8%

4.2. Valores de As en agua y análisis de su consumo

4.2.1. Valores de As en agua por departamento

Se analizaron 60 muestras de agua subterránea. Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para las localidades del Departamento Castellanos (Centro-Oeste de la provincia) estuvieron dentro del rango de 14 a 128 $\mu\text{g/L}$, en el Departamento Las Colonias (Centro de la provincia) entre 10 y 161 $\mu\text{g/L}$ y en el Departamento La Capital (Centro-Este de la provincia) desde ND a 43 $\mu\text{g/L}$ (Figura 24).

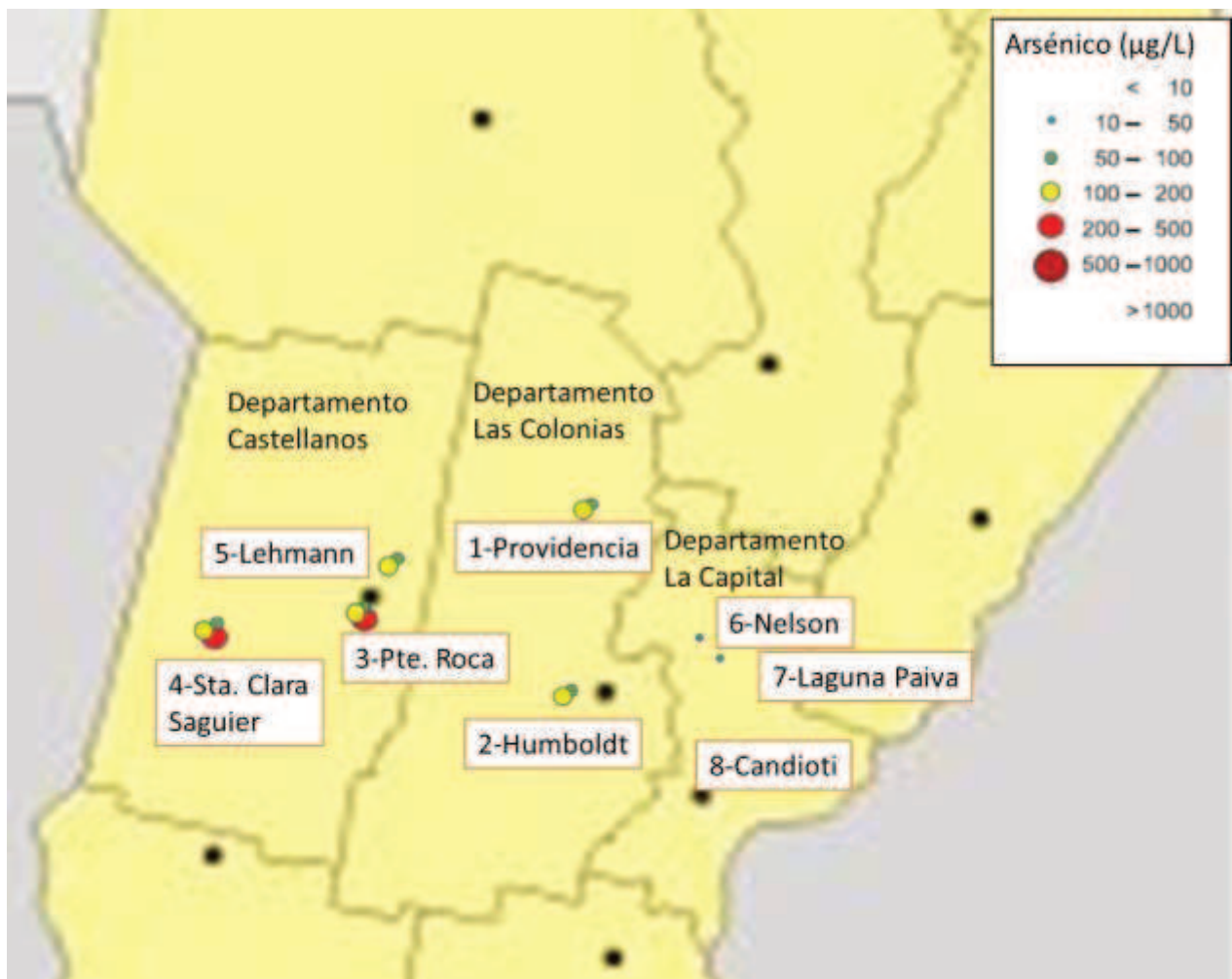


Figura 24. Contenido de As en las muestras de agua subterránea y su localización por departamento

4.2.2. Consumo de agua de bebida según encuesta

Al analizar la respuesta de los participantes respecto a consumir agua de pozo (con cantidades variables de As) o agua segura, se obtuvo una primera aproximación sobre la ingesta de As a través del agua de bebida en las localidades de los departamentos Castellanos y Las Colonias (Figura 25). Sin embargo, en el departamento La Capital, las tres localidades estudiadas tenían acceso a redes de distribución de agua potable. Además, no se encontraron pozos domiciliarios en Nelson, Laguna Paiva ni Candiotti.

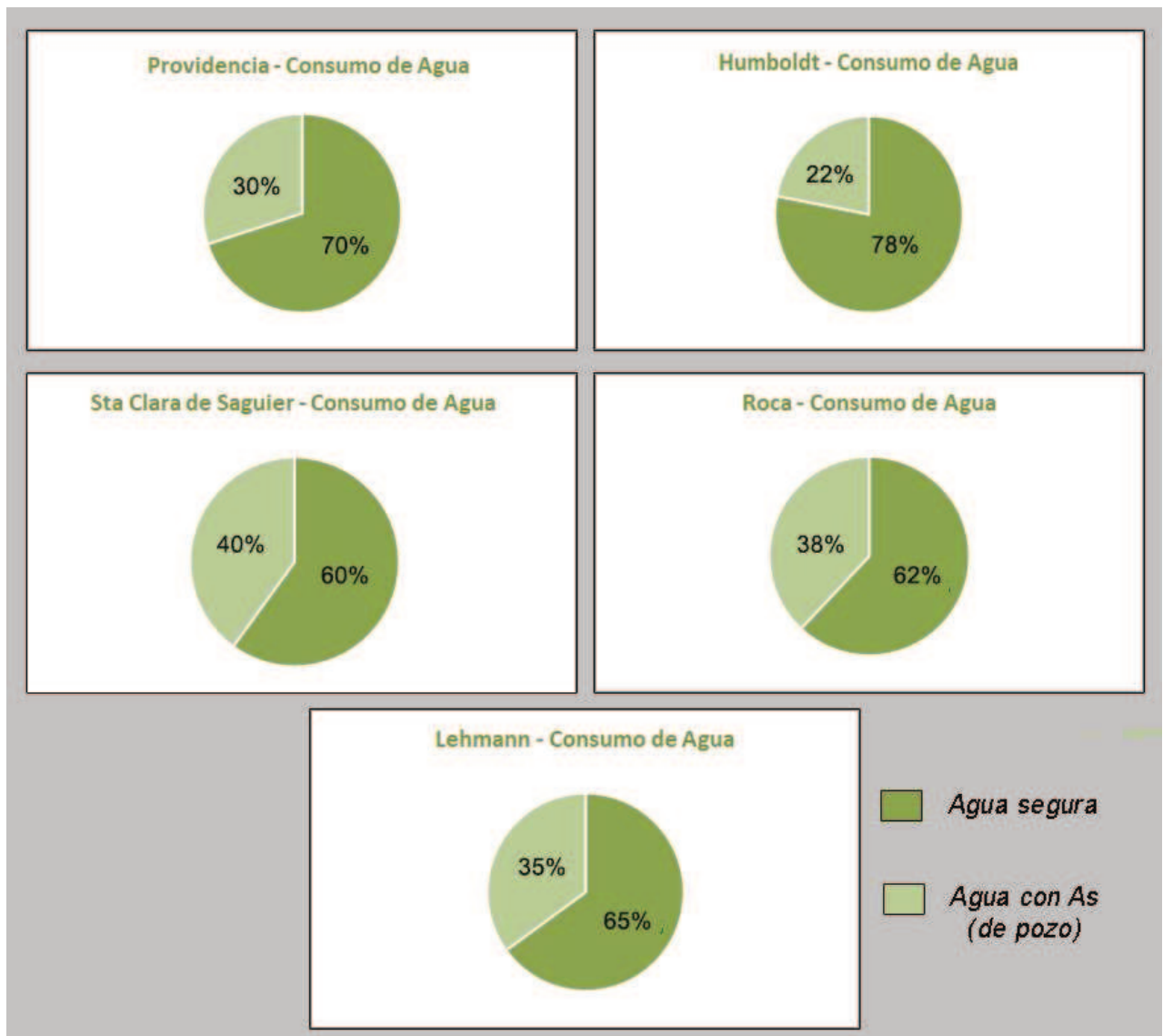


Figura 25. Tipo de agua consumida en las localidades de los departamentos Castellanos y Las Colonias según datos declarados en las encuestas

Al indagar sobre el agua que utilizaban para beber, se pudo observar que el consumo actual de agua con contenidos variables de As, al momento de realizar las entrevistas, resultó del 35% en el total de la población, mientras que un 43% fueron ex consumidores. El 22% restante consumía agua segura.

4.3. Valores de As en orina - Biomarcador de Exposición

Se determinó la concentración de As en orina analizando una submuestra (n=150), número que corresponde a los participantes del estudio que aportaron la muestra de primer orina de la mañana para la determinación. A partir de estos datos se consideraron expuestas actualmente las personas que excretaban más de 30 μg As/g de creatinina en orina con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados con un rango entre no detectable (ND) y 30 μg As/g de creatinina en orina se consideraron no expuestos. El 45% de los participantes estaban actualmente expuestos (rango 30,1 a 328 μg As/g de creatinina en orina). En la figura 26 se muestran los valores medios de excreción de As en orina por localidad.

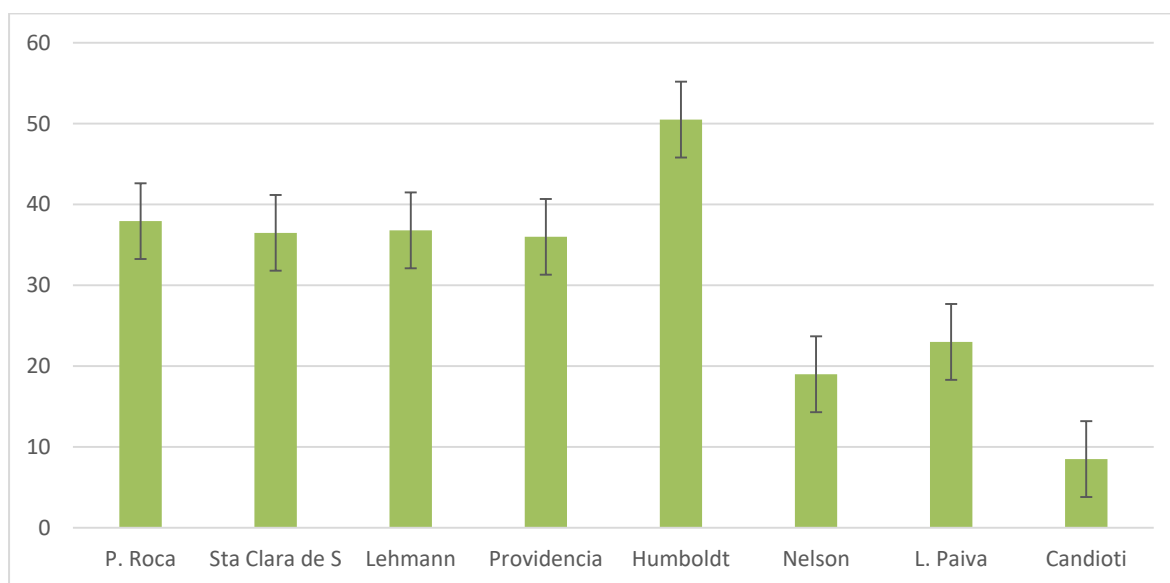


Figura 26. Concentración media de As urinario de cada localidad ($\mu\text{g}/\text{g}$ creatinina urinaria) – n=150

4.3.1. Categorización de la población según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As

La categorización de la población (n=322) se realizó teniendo en cuenta la excreción actual de As en orina y lo manifestado por los participantes en las encuestas; no solo respecto al agua de bebida sino también al agua utilizada para cocción de alimentos y preparación de infusiones (mate, café, té, etc.)

Esto generó cuatro categorías:

Grupo 1: Control. Excreción actual de As en orina por debajo de 30 $\mu\text{g As/g}$ de creatinina y consumo actual y previo de agua segura (As menor a 10 $\mu\text{g/L}$) exclusivamente (n=14).

Grupo 2: Excreción actual de As en orina por debajo de 30 $\mu\text{g As/g}$ de creatinina y consumo actual y previo de agua segura (As menor a 50 $\mu\text{g/L}$) exclusivamente (n=144).

Grupo 3: Excreción actual de As en orina superior a 30 $\mu\text{g As/g}$ de creatinina o consumo de agua segura para beber pero no para la cocción de los alimentos (expuesto a concentraciones variables de As) (n=90).

Grupo 4: Excreción actual de As en orina superior a 30 $\mu\text{g As/g}$ de creatinina o consumo de agua de pozo para beber y para la cocción de los alimentos (expuesto a concentraciones variables de As) (n=74).

4.4. Georreferenciación de los participantes y antecedentes de cada localidad

Providencia

Desde el año 2006 la localidad cuenta con una planta potabilizadora que mediante osmosis inversa permite minimizar el contenido de As para consumo humano. Sin embargo, en el momento en que se realizó el muestreo, carecía de una red de distribución, ya que solo existía una única canilla, ubicada en la plaza central “Domingo Faustino Sarmiento”. En la actualidad, Providencia consiguió la ampliación de la red de distribución de 1700 metros de cañería (Ministerio de Infraestructura y Transporte Gestión 2016-2019. Gobierno de Santa Fe).

Los informes entregados por la Comuna que pertenecen al mes de mayo de 2012 muestran para el pozo de ingreso a la planta valores de 210 $\mu\text{g/L}$ y para el agua de la canilla pública en agosto de 2013 el resultado fue 50 $\mu\text{g/L}$ de As. En el informe del 27 de abril de 2016 el grifo público contenía 3 $\mu\text{g/L}$ de As.

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Providencia estuvieron dentro del rango de 10 a 34,9 $\mu\text{g/L}$ (Figura 27).



Figura 27. Providencia - Georreferenciación de los participantes con valores de As en agua y en orina (https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1FY_Y0WAoQGaEMqOomHp3tRKM1afdIpkO&usp=sharing)

Humboldt

El 8 de agosto de 2009 se inauguró oficialmente la Planta de Osmosis Inversa para la localidad de Humboldt la cual mejoró la calidad de agua para la población, adaptándose a los parámetros exigidos por el ENRESS. Dicha obra fue gestionada y ejecutada en forma conjunta por la Cooperativa y la Comuna de Humboldt mediante un subsidio, lo cual es reflejo del esfuerzo compartido por ambas entidades.

En el mes de junio de 2010 se comenzaron los trabajos de colocación de cañería, refuerzo de agua potable en calle Las Heras y Dr. S. Viani hasta calle López, lo que mejoró la presión en todo este sector. La obra se pudo realizar sin costo alguno extra, ya que la Cooperativa cobra con las tarifas del servicio de agua potable un ítem "Fondo para Obras" y lo que se recauda es utilizado para realizar estas obras especiales que benefician a toda la comunidad. La misma se realizó con personal y maquinarias de la Cooperativa y fue culminada en octubre de 2011.

En el año 2015, con el objetivo de optimizar la demanda y mejorar aún más la calidad de agua, la Cooperativa adquiere la segunda Planta de Osmosis Inversa para la localidad, la que se puso en funcionamiento el día 17 de marzo de 2017.

Según el informe obtenido por la Cooperativa de Provisión de agua potable de Humboldt, los resultados del contenido de As previo el ingreso a la planta, para los Pozos 1, 2, 4, 5 y 11 fueron 74, 77, 93, 77 y 65 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (agosto, 2017). Para los pozos 6 y 7, también previo al ingreso a la planta fueron de 110 y 101 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (septiembre, 2017). En fecha 19 de diciembre de 2017, el contenido de As detectado luego del tratamiento fue de 38 $\mu\text{g/L}$.

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Humboldt estuvieron dentro del rango de 53 a 161 $\mu\text{g/L}$. (Figura 28).



Figura 28. Humboldt - Georreferenciación de los participantes con valores de As en agua y en orina

(https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1P1bDCKYtTW6xvgTghdsFvDPr_Q-b7vp5&usp=sharing)

Santa Clara de Saguier

La Comuna cedió en comodato a la Cooperativa de Provisión de Obras y Servicios Públicos y Vivienda de Santa Clara de Saguier la planta de potabilización de agua mediante la tecnología de osmosis inversa. Dicha Cooperativa es la encargada desde noviembre de 2005 de proveer agua potable a la localidad. La misma se distribuye en bidones a domicilio o en la sede de la Cooperativa, con un costo por litro, siguiendo requisitos de control de calidad y servicio de acuerdo a normas vigentes dictadas por el ENRESS.

El informe obtenido del análisis pretratamiento, realizado en agosto de 2017 del Pozo 1 (sur oeste) arrojó un resultado de 25 µg/L de As y el mismo resultado para el Pozo 2 (noreste). En fecha 30 de mayo de 2018, en la canilla de la planta, luego del tratamiento se detectó un valor de 5 µg/L de As.

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Sta. Clara de Saguier estuvieron dentro del rango de 14 a 128 µg/L. (Figura 29).



Figura 29. Santa Clara de Saguier - Georreferenciación de los participantes con valores de As en agua y en orina (https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1uh_tZQx5Kava8fE1B2pLO_wnbAOE6IPC&usp=sharing)

Presidente Roca

En 2011 se inauguró la planta de agua potable. Incluyó la colocación de un tanque elevado; una red de distribución de aproximadamente 10 mil metros de cañería de PVC, y 155 conexiones domiciliarias con medidor incluido en una extensión que abarca no sólo al casco urbano, sino también a un asentamiento ubicado a 3700 metros denominado Estación Roca.

Los análisis del 20 de diciembre de 2017 muestran que el agua de la red para consumo humano contenía 25 µg/L de As y la mezcla de alimentación a la planta 410 µg/L de As. En el informe del 5 de enero de 2018 el resultado del agua de red fue de 50 µg/L de As, y el informe del 5 de marzo del mismo año, muestra como resultados de As para el Pozo 1: 160 µg/L y para el Pozo 3: 180 µg/L.

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Pte. Roca estuvieron dentro del rango de 14 a 113 µg/L. (Figura 30).



Figura 30. Presidente Roca - Georreferenciación de los participantes con valores de As en agua y en orina (<https://www.google.com/maps/d/edit?mid=160cqjZ-98wasf1FXNqHjBdciMclxp4up&usp=sharing>)

Lehmann

La planta de osmosis inversa fue inaugurada en 2012 y cuenta con un sistema de distribución domiciliaria.

Los análisis de agua pre-tratamiento entregado por la Comuna, con fecha diciembre de 2017 muestran que para los Pozos 1, 2 y 3 los resultados fueron 72, 98 y 112 $\mu\text{g/L}$ de As respectivamente y los valores detectados en la red de distribución fueron de 24 y 21 $\mu\text{g/L}$ de As para los meses de enero y febrero de 2018. Mientras que, en junio de 2018, los mismos pozos arrojaron valores de 75, 93 y 126 $\mu\text{g/L}$ de As con un valor en la red de 22 $\mu\text{g/L}$ de As.

En la figura 31 se muestra el registro de estas mediciones desde marzo de 2017 a septiembre de 2020.



Figura 31. Lehmann: Concentración de As en agua potable ($\mu\text{g/L}$) - Registro de mediciones desde marzo/2017 a septiembre/2020 (foto proporcionada por el Ing. Eduardo Alasia).

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Lehmann estuvieron dentro del rango de 53 a 68 $\mu\text{g/L}$. (Figura 32).



Figura 32. Lehmann - Georreferenciación de los participantes con valores de As en agua y en orina
(<https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1u17lq0QcYzRl9Hk47uPNZXkmWHT1zFC8&usp=sharing>)

Nelson y Laguna Paiva

En la actualidad, ambas localidades cuentan con planta potabilizadora de agua con distribución domiciliar en todo el ejido urbano. Los resultados del análisis fisicoquímico de potabilidad del agua entregados por la Municipalidad dan cuenta de valores que en febrero de 2017 oscilaban entre 20 y 30 µg/L de As. En noviembre el valor en agua de red fue de 15 µg/L de As sin utilizar ningún tratamiento específico para la remoción del metaloide.

Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua para la localidad de Nelson estuvieron dentro del rango de 10 a 32 µg/L. Por otra parte, para la localidad de Laguna Paiva fueron de 10 a 43 µg/L.

Candioti

En esta localidad el agua de red sólo recibe tratamiento de cloración. La determinación de As realizada durante este trabajo de Tesis en el agua que alimenta la red de distribución domiciliar dio como resultado 6,8 µg/L. Los otros pozos de agua subterránea que posee la Comuna destinados a riego dieron como resultado 28,4 µg/L y 36 µg/L, no existiendo pozos domiciliarios en esta localidad.

4.5. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo

Se analizaron los biomarcadores de daño genotóxico y oxidativo teniendo en cuenta la excreción de As urinario, el consumo actual de As en el agua declarado en las encuestas, y la georreferenciación de los participantes.

4.5.1. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo según excreción de As en orina

En la Tabla 5 se expresan las medias de los distintos biomarcadores de daño genotóxico y oxidativo analizados en los 150 pobladores que aportaron la muestra de primer orina de la mañana para la determinación de As. Según la categorización considerando la excreción de As en orina, se generaron dos grupos: actualmente Expuestos: >30 µg As/g de creatinina y actualmente No Expuestos: ≤ 30 µg As/g de creatinina.

Se observó que, en este subgrupo de participantes (n= 150), la variable IDEC sigue una distribución normal (prueba de K-S $p>0,05$), al ser analizada por medio de una prueba T no mostró diferencias significativas entre los grupos de expuestos y no expuestos, ($p>0,05$). La variable Sitios ENDO no presenta una distribución normal (K-S, $p<0,05$). La misma no mostró diferencias estadísticamente significativas (test de M-W, $p>0,05$) al compararse ambos grupos.

Las FMN, FCBN y FCNL tampoco siguen una distribución normal (K-S, $p<0,05$). En la figura 33 se puede observar que el recuento de MN/1000 cel en el grupo de actualmente Expuestos ($0,60 \pm 0,07$) presentó un incremento estadísticamente significativo respecto a los actualmente No Expuestos ($0,31 \pm 0,05$) (test de M-W, $p=0,014$). Las variables FCBN y FCNL no presentaron diferencias significativas entre los participantes que excretaban concentraciones de As por encima o por debajo del valor de corte establecido (test de M-W, $p>0,05$).

Se evaluó la distribución normal de los parámetros de daño oxidativo TBARS y CAT (K-S, $p<0,001$ y $p=0,006$ respectivamente). Ambos biomarcadores no presentaron diferencias significativas entre actualmente Expuestos y No Expuestos (test de M-W, $p>0,05$).

Al considerar los factores de confusión para Expuestos y No Expuestos, no se obtuvieron diferencias significativas (Mann-Whitney, $p>0,05$ para todos los factores analizados).

Tabla 5. Biomarcadores de daño genotóxico y oxidativo (media \pm EE) según excreción de As en orina (n=150)

Excreción de As en orina	IDEC	Sitios ENDO	CBN/ 1000 cel	CNL/ 1000 cel	TBARS nmol/g Hb	CAT U/mg Hb
No Expuesto \leq 30 μ g As/g de creatinina (n= 83)	145,77 \pm 4,3	45,89 \pm 4,7	2,20 \pm 0,25	0,21 \pm 0,06	498,8 \pm 29,7	36,7 \pm 2,2
Expuesto > 30 μ g As/g de creatinina (n=67)	148,34 \pm 5,1	47,23 \pm 5,1	2,45 \pm 0,31	0,49 \pm 0,17	676,4 \pm 100,4	37,4 \pm 2,8

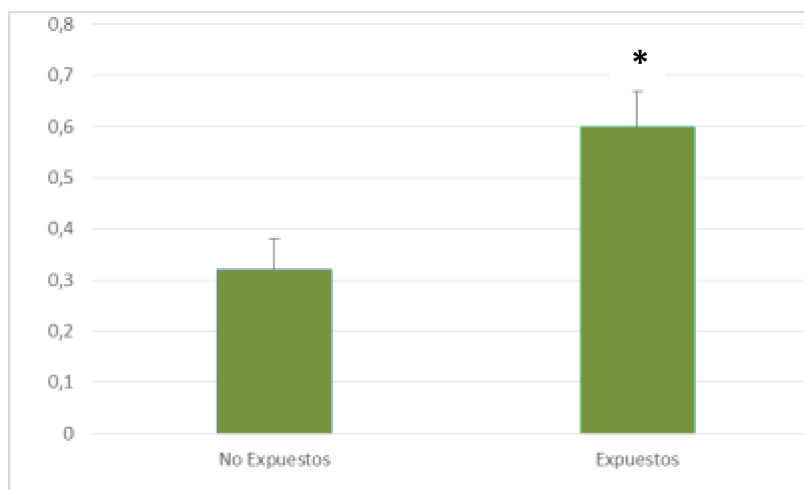


Figura 33. Daño genotóxico – Frecuencia de Micronucleos (FMN) según excreción de As en orina – *p=0,014 (n=150)

4.5.2. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As

En la Tabla 6 se expresan las medias de IDEC, MN, CBN, CNL y CAT analizados según las categorías de exposición obtenidas (Grupos 1, 2, 3 y 4).

Se observó que la variable IDEC (que sigue una distribución normal según la prueba de K-S $p > 0,05$), al ser analizada por medio de un ANOVA no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p > 0,05$).

Los demás biomarcadores analizados (MN, CBN, CNL, TBARS y CAT) no siguen una distribución normal (K-S, $p < 0,05$ en todos los casos).

En la figura 34 se pueden observar los resultados de la variable Sitios ENDO que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos analizados (test de K-W, $p = 0,001$). Al analizar los grupos de a pares, Sitios ENDO mostró un incremento estadísticamente significativo (test de M-W, $p = 0,006$) al comparar el grupo 2 que consume As por debajo de 50 μ g/L (Sitios ENDO: 36,34 \pm 2,9) con respecto al grupo 1 que consume As por debajo de 10 μ g/L (Sitios ENDO: 14,57 \pm 2,4). También se observó un incremento significativo (test de M-W,

$p=0,001$), al comparar el grupo 3 que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura (Sitios ENDO: $51,58 \pm 4,7$) con relación al grupo 1 (control) y entre el grupo 4 que cocina y toma agua con contenidos variables de As (Sitios ENDO: $43,85 \pm 4,0$) y el grupo 1 (test de M-W, $p=0,001$). Por otra parte, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 3 que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura y el grupo 2 que consume As por debajo de $50 \mu\text{g/L}$ (test de M-W, $p=0,023$). El grupo 4 que cocina y toma agua con contenidos variables de As no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo 2 (M-W, $p>0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre consumir As solamente en el agua utilizada para cocinar pero beber agua segura (grupo 3) respecto al grupo 4 que bebe y cocina con agua de pozo (test de M-W, $p>0,05$).

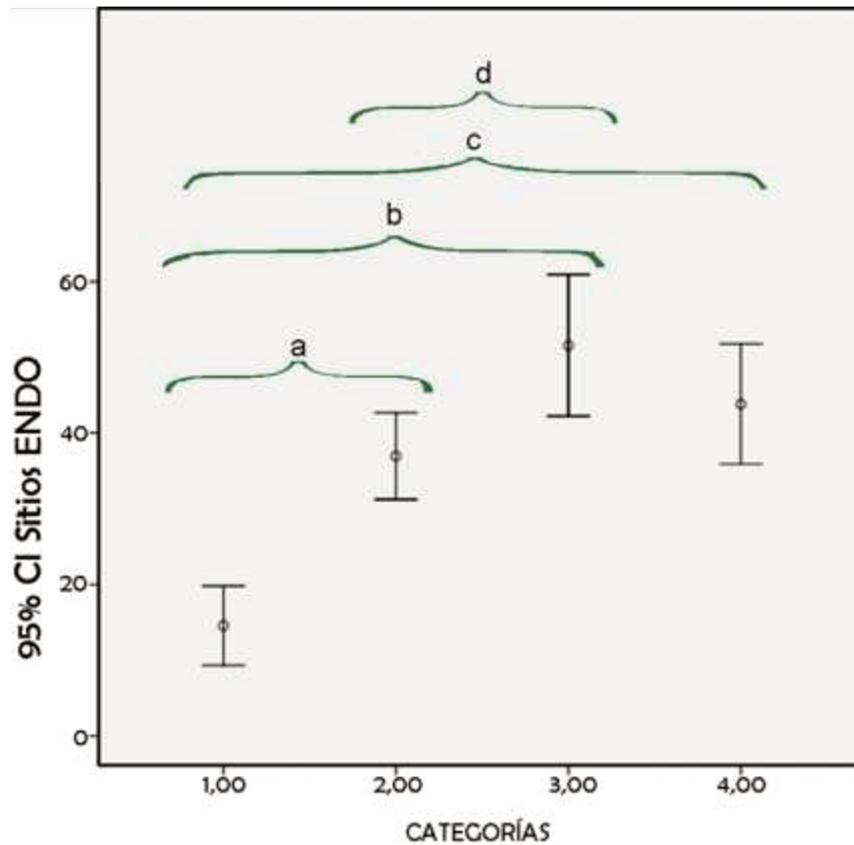


Figura 34. Gráfico comparativo de Sitios ENDO (K-W, $p=0,001$) para las cuatro categorías según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As: Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 y Grupo 4. (M-W, ^a $p=0,006$; ^b $p=0,001$; ^c $p=0,001$; ^d $p=0,023$) - $n=322$

Al evaluar la FMN en la mucosa oral de los pobladores categorizados en estos cuatro grupos, los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre ellos (test de K-W, $p>0,05$). Por otra parte, al analizar FCBN y FCNL en la mucosa oral en los grupos 2, 3 y 4 a quienes se

les había determinado este marcador, los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre dichos grupos (test de K-W, $p > 0,05$ en ambos casos) para ninguno de estos dos parámetros (Tabla 6).

Los valores de daño oxidativo TBARS y CAT fueron analizados a través de un test de K-W. TBARS mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p < 0,001$) (Figura 35).

Al analizar de a pares, TBARS mostró un incremento estadísticamente significativo (test de M-W, $p < 0,001$) al comparar el grupo 2 que consume As por debajo de $50 \mu\text{g/L}$ (TBARS: $455,2 \pm 46,1$ nmol/g Hb) con respecto al grupo 1 que consume As por debajo de $10 \mu\text{g/L}$ (TBARS: $115,27 \pm 8,8$ nmol/g Hb). También se observó un incremento significativo (test de M-W, $p < 0,001$) entre el grupo 3 que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura (TBARS: $623,5 \pm 41,6$ nmol/g Hb) y el grupo 1 (control) y entre el grupo 4 que cocina y toma agua con contenidos variables de As (TBARS: $557,9 \pm 40,1$ nmol/g Hb) y el grupo 1 o control (test de M-W, $p = 0,001$).

Por otra parte, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 3 que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura respecto al grupo 2 que consume As por debajo de $50 \mu\text{g/L}$ (test de M-W, $p < 0,001$). El grupo 4 que cocina y toma agua con contenidos variables de As también mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo 2 (prueba de M-W, $p = 0,003$). No existen diferencias entre consumir As solamente en el agua utilizada para cocinar pero beber agua segura (grupo 3) respecto al grupo 4 que bebe y cocina con agua de pozo (test de M-W, $p > 0,05$).

CAT no mostró diferencias significativas (test de K-W, $p > 0,05$) entre los cuatro grupos categorizados según consumo individual de As en el agua (Tabla 6)

Tabla 6. Valores de IDEC, MN, CBN, CNL y CAT (media \pm EE) analizados según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As - $n=322$

Categorías	IDEC	MN/ 1000 cel	CBN/ 1000 cel	CNL/ 1000 cel	CAT U/mg Hb
Grupo 1 (n=14)	144,86 \pm 8,5	0,29 \pm 0,1	-----	-----	42,6 \pm 4,4
Grupo 2 (n=144)	145,30 \pm 2,6	0,36 \pm 0,05	2,06 \pm 0,15	0,27 \pm 0,05	38,5 \pm 1,2
Grupo 3 (n=90)	149,79 \pm 4,8	0,44 \pm 0,13	2,39 \pm 0,21	0,39 \pm 0,13	44,8 \pm 2,9
Grupo 4 (n=74)	149,20 \pm 4,2	0,71 \pm 0,14	2,78 \pm 0,32	0,35 \pm 0,14	36,7 \pm 2,5

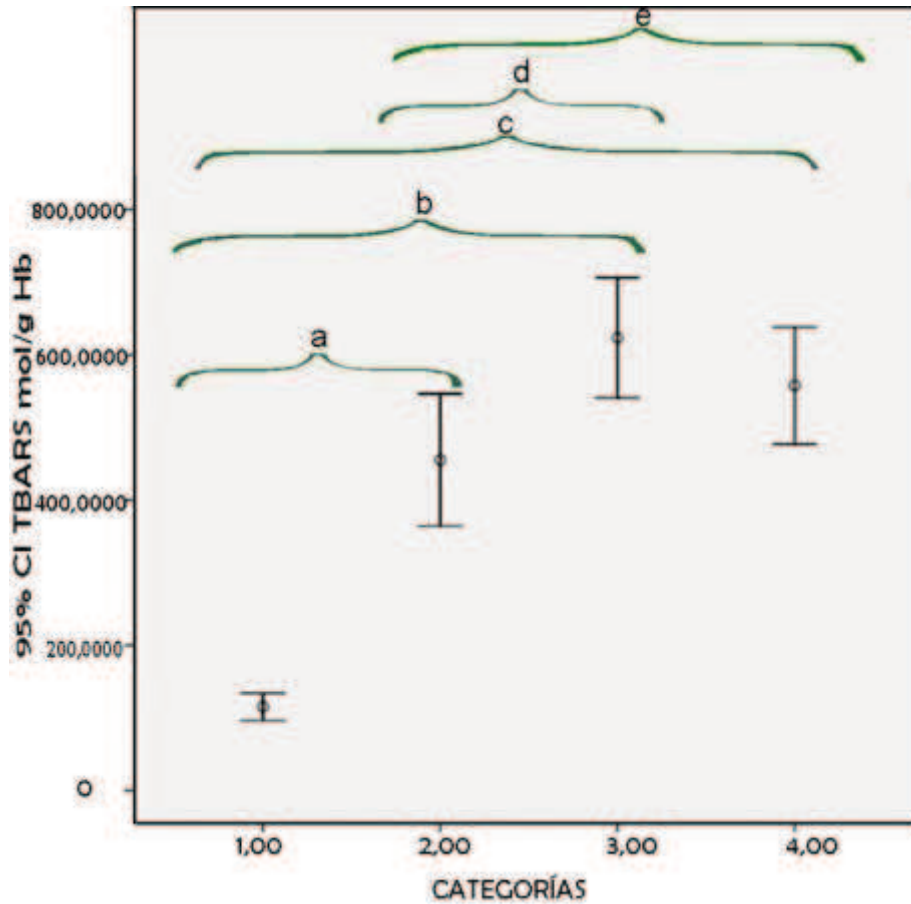


Figura 35. Gráfico comparativo de TBARS (K-W, $p < 0,001$) para las cuatro categorías según excreción y consumo de agua con contenidos variables de As: Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 y Grupo 4. (M-W, ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,001$; ^c $p < 0,001$; ^d $p < 0,001$; ^e $p = 0,003$) - $n = 322$

Análisis de los Factores de Confusión para la Población General

Se evaluaron todos los biomarcadores considerando factores de confusión vinculados con variables sociodemográficas (sexo, edad), variables vinculadas con el estado de salud (DBT, ECV, HTA, cáncer, consumo de medicamentos y de suplementos dietarios), hábitos (tabáquico, consumo diario de alcohol, actividad física), variables nutricionales (consumo diario de frutas y vegetales, consumo diario de proteínas de origen animal) y exposición laboral a plaguicidas. Para los 322 participantes, cuando se consideraron estos factores se obtuvieron diferencias significativas para el hábito de fumar como factor de CBN/1000 cel. ($p = 0,039$) y para consumo diario de alcohol en las variables CBN/1000 cel. ($p = 0,05$) y CAT ($p = 0,05$). El consumo de medicamentos y la exposición laboral a plaguicidas fueron factores que modificaron de forma significativa los resultados de CAT ($p = 0,028$ y $p = 0,002$; respectivamente). El EC mostró diferencias significativas cuando se utilizó el consumo diario de frutas y vegetales como factor ($p = 0,014$). Los demás factores no mostraron diferencias significativas para cada uno de los biomarcadores analizados ($p > 0,05$).

4.5.3. Parámetros de daño genotóxico y oxidativo según georreferenciación de los participantes

En función de los resultados obtenidos en los apartados 4.5.1 y 4.5.2, se analizaron los valores de cada biomarcador considerando la localización geográfica de los participantes (n=322). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

La variable IDEC al ser analizada por medio de un ANOVA mostró diferencias significativas entre las ocho localidades estudiadas ($p < 0,001$).

Los demás biomarcadores de daño genotóxico: Sitios ENDO, FMN, FCBN y FCNL, así como los de estrés oxidativo TBARS y CAT; al ser analizados por medio de una prueba de K-W presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) considerando “localidad” como factor.

Tabla 7. Biomarcadores de daño genotóxico y oxidativo (media \pm EE) analizados por localidad (n=322)

Localidad	IDEC	Sitios ENDO	MN/ 1000 cel	CBN/ 1000 cel	CNL/ 1000 cel	TBARS nmol/g Hb	CAT U/mg Hb
Providencia (n=43)	160 \pm 5,3	74,76 \pm 6,7	0,83 \pm 0,15	-----	-----	534,9 \pm 35,5	27,6 \pm 1,1
Humboldt (n=40)	144,08 \pm 6,1	52,79 \pm 6,4	0,59 \pm 0,24	3,41 \pm 0,37	0,89 \pm 0,28	571,9 \pm 160,9	26,5 \pm 2,3
Sta. Clara de Saguier (n=60)	161,13 \pm 5,8	36,41 \pm 4,8	0,14 \pm 0,04	1,91 \pm 0,21	0,06 \pm 0,04	855,3 \pm 42,4	60,4 \pm 3,6
P. Roca (n=34)	145 \pm 7,2	47,97 \pm 6,6	1,21 \pm 0,18	2,06 \pm 0,25	0,38 \pm 0,09	342,6 \pm 35,1	46,5 \pm 3,9
Lehmann (n=37)	119,94 \pm 3,8	30,69 \pm 4,9	0,44 \pm 0,09	3,44 \pm 0,37	0,14 \pm 0,05	584,4 \pm 59,5	30,4 \pm 1,5
Nelson (n=46)	154 \pm 3,6	38,14 \pm 4,6	0,59 \pm 0,10	2,26 \pm 0,26	0,57 \pm 0,11	347,6 \pm 20,5	42 \pm 1,8
Laguna Paiva (n=48)	140,77 \pm 4,0	25,11 \pm 3,3	0,06 \pm 0,04	1,21 \pm 0,16	0,01 \pm 0,001	345,5 \pm 17,1	36,9 \pm 1,7
Candioti (n=14)	144,86 \pm 8,5	14,57 \pm 2,4	0,29 \pm 0,1	-----	-----	115,27 \pm 8,8	42,6 \pm 4,4

Análisis de los Factores de Confusión por Localidad

En las Tablas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se presenta el análisis de los factores de confusión para todos los biomarcadores medidos en las ocho localidades estudiadas.

En la localidad de Providencia se pudo analizar la excreción urinaria de As para todos los participantes (n=43), por lo tanto, fue posible incluir este biomarcador al análisis de los factores de confusión. Por otra parte, en esta misma localidad y en Candioti, no se realizaron los recuentos de CBN ni CNL en mucosa bucal, biomarcadores que sí fueron incluidos en las otras seis localidades estudiadas.

Providencia

Tabla 8. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Providencia

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p As (µg/g Creat)	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (34) Masculino (9)	0,288	0,507	0,022*	0,473	0,033*	0,114
Edad	< 45 a (16) > 45 a (27)	0,128	0,199	0,781	0,505	0,917	0,430
DBT	Si (7) No (36)	1,000	0,773	0,929	0,805	0,319	0,826
ECV	Si (18) No (25)	0,228	0,329	0,571	0,768	0,276	0,617
HTA	Si (15) No (28)	0,076	0,065	0,889	0,339	0,575	0,669
Cáncer	Si (3) No (40)	a	a	a	a	a	a
Fuma	Si (5) No (38)	0,061	0,107	0,918	0,129	0,923	0,954
Consumo diario Alcohol	Si (3) No (40)	a	a	a	a	a	a
Actividad Física	Si (28) No (15)	0,008*	0,017*	0,082	0,909	0,948	0,072
Consumo Medicamentos	Si (26) No (17)	0,022*	0,045*	0,902	0,747	0,224	0,798
Suplementos	Si (5) No (38)	0,515	0,353	0,317	0,320	0,764	0,797
Consumo diario frutas y vegetales	Si (22) No (21)	0,877	0,649	0,650	0,593	0,190	0,465
Consumo diario proteínas animal	Si (37) No (6)	0,488	0,769	0,083	0,551	0,028*	0,829
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (20) No (23)	0,147	0,361	0,336	0,643	0,752	0,172

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<4, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

Al analizar los resultados para los que se encontró diferencias significativas en el análisis de los factores de confusión planteados, se pudo observar que para MN dio como resultado para las mujeres $0,98 \pm 0,17$ y para los hombres $0,28 \pm 0,12$ mientras que los resultados de TBARS para el sexo femenino fue de $575,1 \pm 41,7$ nmol/g Hb y $405,1 \pm 56,8$ nmol/g Hb para el sexo masculino. Los resultados de EC y de Sitios Endo para los que no realizan actividad física fue de $178,30 \pm 7,9$ y de $52,76 \pm 7,9$, respectivamente y para los que si la realizan $150,16 \pm 6,6$ para EC y $86,66 \pm 6,6$ para el daño oxidativo al ADN. Para este último biomarcador se observaron diferencias significativas si consume medicamentos ($85,56 \pm 8,8$) respecto a los que no los consumen ($56,78 \pm 8,5$). Además, TBARS mostró diferencias significativas con el consumo diario de proteínas de origen animal (si: $793,9 \pm 137,1$; no: $492,1 \pm 30,1$).

Humboldt

Tabla 9. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Humboldt

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (27) Masculino (13)	0,193	0,551	0,100	0,161	0,223	0,634	0,718
Edad	< 45 a (24) > 45 a (16)	0,041*	0,384	0,857	0,214	0,653	0,167	0,109
DBT	Si (3) No (37)	a	a	a	a	a	a	a
ECV	Si (2) No (38)	a	a	a	a	a	a	a
HTA	Si (5) No (35)	0,822	0,293	0,750	0,255	0,842	0,854	0,474
Cáncer	Si (1) No (39)	a	a	a	a	a	a	a
Fuma	Si (3) No (37)	a	a	a	a	a	a	a
Consumo diario Alcohol	Si (7) No (33)	0,901	0,340	0,544	0,894	0,632	0,581	0,789
Actividad Física	Si (29) No (11)	0,256	0,720	0,286	0,712	0,053	0,026*	0,062
Consumo Medicamentos	Si (17) No (23)	0,924	0,046*	0,122	0,642	0,156	0,538	0,331
Suplementos	Si (7) No (33)	0,915	0,812	0,136	0,675	0,663	0,682	0,466
Consumo diario frutas y vegetales	Si (35) No (5)	0,474	0,571	0,192	0,540	0,469	0,047*	0,023*
Consumo diario proteínas animal	Si (39) No (1)	a	a	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (13) No (27)	0,563	0,704	1,000	0,726	0,870	0,378	0,740

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<4, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

Los resultados de EC para los menores de 45 años fueron $128,81 \pm 8,2$ y $154,25 \pm 8,2$ para los mayores. La actividad física fue un factor que modificó significativamente los resultados de la oxidación de los lípidos dando $1150,8 \pm 54,0$ nmol/g Hb para los que no realizan deportes y $352,9 \pm 62,5$ nmol/g Hb para los que si los practican. Consumo de medicamentos también influyó significativamente en los resultados de Sitios Endo ($44,30 \pm 8,0$ para los que no consumen, $65,00 \pm 10,0$ para los que consumen). El consumo diario de frutas y vegetales modificó los resultados de TBARS (no: $847,4 \pm 211,0$ nmol/g Hb; si: $533,0 \pm 181,1$ nmol/g Hb) y de CAT (no: $40,2 \pm 5,7$ U/mg Hb; si: $25,1 \pm 2,3$ U/mg Hb).

Santa Clara de Saguier

Tabla 10. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Santa Clara de Saguier

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (48) Masculino (12)	0,577	0,487	0,175	0,917	0,435	0,177	0,007*
Edad	< 45 a (26) > 45 a (34)	0,575	0,754	0,057	0,834	0,795	0,438	0,239
DBT	Si (4) No (56)	a	a	a	a	a	a	a
ECV	Si (7) No (53)	0,086	0,841	0,851	0,969	0,500	0,588	0,049*
HTA	Si (11) No (49)	0,904	0,333	0,255	0,035*	0,454	0,307	0,211
Cáncer	Si (5) No (55)	0,143	0,933	1,000	0,952	0,577	0,014*	0,415
Fuma	Si (9) No (51)	0,269	0,558	0,735	0,069	0,435	0,315	0,656
Consumo diario Alcohol	Si (4) No (56)	a	a	a	a	a	a	a
Actividad Física	Si (41) No (19)	0,193	0,879	0,892	0,576	0,926	0,395	0,843
Consumo Medicamentos	Si (25) No (35)	0,980	0,903	0,519	0,425	0,826	0,669	0,449
Suplementos	Si (11) No (49)	0,365	0,456	0,104	0,663	0,406	0,486	0,172
Consumo diario frutas y vegetales	Si (49) No (11)	0,527	0,836	0,417	0,867	0,406	0,225	0,218
Consumo diario proteínas animal	Si (59) No (1)	a	a	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (8) No (52)	0,079	0,034*	0,315	0,668	0,537	0,223	0,037*

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<6, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

El sexo fue un factor que arrojó resultados estadísticamente significativos para CAT (Mujeres: $65,4 \pm 3,9$ U/mg Hb; Hombres: $41,1 \pm 6,2$ U/mg Hb) como también lo fue ECV para el mismo biomarcador (si: $63,7 \pm 3,8$ U/mg Hb; no: $40,2 \pm 8,2$ U/mg Hb). CBN se vio modificado por HTA (si: $2,11 \pm 0,24$ /1000 cel; no: $1,00 \pm 0,29$ /1000 cel). Además, los resultados de TBARS fueron diferentes estadísticamente en los participantes con cáncer ($882,7 \pm 43,7$ nmol/g Hb vs. $559,5 \pm 93,3$ nmol/g Hb). La exposición laboral a plaguicidas modificó significativamente los resultados de Sitios Endo (Si: $40,23 \pm 5,3$; No: $13,42 \pm 6,1$) y de CAT (si: $60,6 \pm 4,6$ U/mg Hb; no: $43,1 \pm 6,3$ U/mg Hb).

Presidente Roca

Tabla 11. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Presidente Roca

Factor	N	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (22) Masculino (12)	0,101	0,109	0,247	0,254	1,000	0,072	0,008*
Edad	< 45 a (25) > 45 a (9)	0,283	0,029*	0,169	0,720	0,833	0,359	0,770
DBT	Si (1) No (33)	a	a	a	a	a	a	a
ECV	Si (1) No (33)	a	a	a	a	a	a	a
HTA	Si (4) No (30)	0,957	0,016*	0,422	0,219	0,564	0,200	0,630
Cáncer	Si (2) No (32)	a	a	a	a	a	a	a
Fuma	Si (2) No (32)	a	a	a	a	a	a	a
Consumo diario Alcohol	Si (5) No (29)	0,543	0,451	0,632	0,150	0,861	0,512	0,049*
Actividad Física	Si (23) No (11)	0,397	0,101	0,188	0,452	0,467	0,294	0,811
Consumo Medicamentos	Si (13) No (21)	0,547	0,790	0,349	0,320	0,610	0,958	0,086
Suplementos	Si (3) No (31)	a	a	a	a	a	a	a
Consumo diario frutas y vegetales	Si (29) No (5)	0,044*	0,543	0,391	0,471	0,431	0,610	0,576
Consumo diario proteínas animal	Si (33) No (1)	a	a	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (9) No (25)	0,446	0,105	0,613	0,675	0,944	0,143	0,984

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<4, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

En la Localidad de Presidente Roca, se hallaron diferencias estadísticamente significativas para las mujeres ($53,9 \pm 4,9$ U/mg Hb) respecto a los hombres ($34,1 \pm 4,4$ U/mg Hb) en CAT. Del mismo modo, la edad modificó los resultados de Sitios Endo ($40,28 \pm 6,8$ para los más jóvenes y $69,3 \pm 14,4$ para los mayores de 45 años). Este mismo biomarcador se modificó en presencia de HTA (si: $98,50 \pm 26,4$; no: $41,23 \pm 5,7$).

CAT se vio modificada ante el consumo diario de alcohol (si: $49,5 \pm 4,3$ U/mg Hb; no: $31,9 \pm 6,1$ U/mg Hb). El EC mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizó exposición laboral a plaguicidas como factor (si: $151,34 \pm 7,5$; no: $108,20 \pm 16,6$).

Lehmann

Tabla 12. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Lehmann

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (24) Masculino (13)	0,323	0,733	0,182	0,838	0,055	0,143	0,016*
Edad	< 45 a (21) > 45 a (16)	0,085	0,751	0,077	0,781	0,198	0,759	0,270
DBT	Si (1) No (36)	a	a	a	a	a	a	a
ECV	Si (3) No (34)	a	a	a	a	a	a	a
HTA	Si (5) No (32)	0,156	0,153	0,533	0,130	0,290	0,625	0,328
Cáncer	Si (0) No (37)	a	a	a	a	a	a	a
Fuma	Si (6) No (31)	0,899	0,483	0,320	0,376	0,359	0,084	0,711
Consumo diario Alcohol	Si (4) No (33)	0,236	0,701	0,275	0,137	0,427	0,525	0,961
Actividad Física	Si (23) No (14)	0,072	0,200	0,426	0,934	0,250	0,491	0,900
Consumo Medicamentos	Si (13) No (24)	0,843	0,384	0,258	0,471	0,243	0,949	0,445
Suplementos	Si (3) No (34)	a	a	a	a	a	a	a
Consumo diario frutas y vegetales	Si (20) No (17)	0,350	0,921	0,014*	0,961	0,154	0,855	0,563
Consumo diario proteínas animal	Si (35) No (2)	a	a	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (8) No (29)	0,970	0,937	0,678	0,615	0,518	0,631	0,161

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<4, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

Los resultados de CAT muestran para las mujeres un resultado de $33,5 \pm 2,0$ U/mg Hb y $26,1 \pm 1,2$ U/mg Hb para los hombres. Mientras que los MN se vieron influenciados por el consumo diario de frutas y vegetales (si: $0,25 \pm 0,08$; no: $0,69 \pm 0,14$).

Nelson

Tabla 13. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Nelson

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (35) Masculino (11)	0,047*	0,458	0,910	0,030*	0,006*	0,046*	0,004*
Edad	< 45 a (18) > 45 a (28)	0,639	0,858	0,692	0,432	0,884	0,068	0,761
DBT	Si (5) No (41)	0,210	0,970	0,877	0,203	0,415	0,004*	0,764
ECV	Si (7) No (39)	0,359	0,494	0,209	0,058	0,052	0,164	0,056
HTA	Si (16) No (30)	0,791	0,931	0,960	0,367	0,421	0,019*	0,712
Cáncer	Si (1) No (45)	a	a	a	A	a	a	a
Fuma	Si (11) No (35)	0,652	0,056	0,045*	0,132	0,033*	0,347	0,139
Consumo diario Alcohol	Si (5) No (41)	0,724	0,838	0,877	0,203	0,677	0,427	0,012*
Actividad Física	Si (20) No (26)	0,478	0,767	0,653	0,955	0,425	0,626	0,298
Consumo Medicamentos	Si (13) No (33)	0,845	0,501	0,611	0,154	0,266	0,006*	0,373
Suplementos	Si (2) No (44)	a	a	a	a	a	a	a
Consumo diario frutas y vegetales	Si (32) No (14)	0,333	0,867	1,000	0,291	0,554	0,073	0,756
Consumo diario proteínas animal	Si (41) No (5)	0,297	0,739	0,164	0,123	0,677	0,427	0,958
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (2) No (44)	a	a	a	a	a	a	a

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<5, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

Los resultados obtenidos para EC considerando el factor sexo arrojaron como resultados $150,05 \pm 3,6$ (mujeres-M-) y $172,00 \pm 7,9$ (hombres-H-). También mostraron diferencias significativas CBN (M: $2,57 \pm 0,30$; H: $1,44 \pm 0,29$), CNL (M: $0,71 \pm 0,11$; H: $0,11 \pm 0,10$), TBARS (M: $371,2 \pm 24,0$ nmol/g Hb; H: $269,1 \pm 34,1$ nmol/g Hb) y CAT (M: $45,1 \pm 2,1$ U/mg Hb; H: $34,8 \pm 1,8$ U/mg Hb).

Los pacientes con DBT mostraron diferencias estadísticamente significativas para TBARS ($366,3 \pm 21,1$ nmol/g Hb) respecto a los que no tenían la patología ($199,3 \pm 23,2$ nmol/g Hb). Lo mismo aconteció para los que tenían HTA ($380,9 \pm 24,9$ nmol/g Hb) y los que no ($286,2 \pm 31,2$ nmol/g Hb).

El hábito de fumar modificó los resultados de MN ($0,70 \pm 0,11$) y CNL ($0,69 \pm 0,12$) respecto a los que no fuman ($0,23 \pm 0,12$ y $0,18 \pm 0,11$, respectivamente). Mientras que el hábito de consumir alcohol diariamente modificó los resultados de CAT (si: $31,7 \pm 2,7$ U/mg Hb; no: $43,9 \pm 1,9$ U/mg Hb).

El consumo de medicamentos fue un factor significativo en los resultados de TBARS obteniéndose $443,2 \pm 38,2$ nmol/g Hb para los participantes que no consumían y $313,0 \pm 22,8$ nmol/g Hb para los que reciben algún tratamiento farmacológico.

Laguna Paiva

Tabla 14. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Laguna Paiva

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p CBN/1000 cel	Valor de p CNL/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (38) Masculino (10)	0,745	0,515	0,624	0,150	1,000	0,001*	0,002*
Edad	< 45 a (28) > 45 a (20)	0,518	0,525	0,145	0,768	1,000	0,060	0,149
DBT	Si (4) No (44)	a	a	a	a	a	a	a
ECV	Si (4) No (44)	a	a	a	a	a	a	a
HTA	Si (9) No (39)	0,882	0,050*	0,389	0,544	1,000	0,741	0,905
Cáncer	Si (2) No (46)	a	a	a	a	a	a	a
Fuma	Si (9) No (39)	0,533	0,860	0,030*	0,821	1,000	0,099	0,989
Consumo diario Alcohol	Si (1) No (47)	a	a	a	a	a	a	a
Actividad Física	Si (33) No (15)	0,112	0,591	0,914	0,633	1,000	0,833	0,868
Consumo Medicamentos	Si (23) No (25)	0,550	0,063	0,466	0,947	1,000	0,358	0,059
Suplementos	Si (8) No (4)	0,419	0,977	0,423	0,813	1,000	0,956	0,361
Consumo diario frutas y vegetales	Si (37) No (11)	0,413	0,597	0,635	0,609	1,000	0,002*	0,650
Consumo diario proteínas animal	Si (46) No (2)	a	a	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (0) No (48)	a	a	a	a	a	a	a

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<5, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para TBARS (M: $376,3 \pm 17,6$ nmol/g Hb; H: $235,1 \pm 23,1$ nmol/g Hb) y CAT (M: $39,3 \pm 1,9$ U/mg Hb; H: $28,7 \pm 1,9$ U/mg Hb) cuando se consideró el factor Sexo.

Los pacientes con HTA mostraron diferencias levemente significativas en Sitios Endo ($36,88 \pm 7,9$) respecto a los que no padecen HTA ($22,31 \pm 3,5$).

Los participantes que tenían el hábito de fumar mostraron resultados significativamente mayores para MN ($0,28 \pm 0,22$) respecto a los que no fuman ($0,013 \pm 0,01$).

Además, los participantes que no consumían frutas y vegetales de forma diaria mostraron diferencias significativas en TBARS ($443,8 \pm 30,0$ nmol/g Hb) respecto a los que si consumían ($314,8 \pm 17,7$ nmol/g Hb).

Candiotti

Tabla 15. Análisis de los factores de confusión de la localidad de Candiotti

Factor	n	Valor de p IDEC	Valor de p Sitios ENDO	Valor de p MN/1000 cel	Valor de p TBARS nmol/g Hb	Valor de p CAT U/mg Hb
Sexo	Femenino (9) Masculino (5)	0,795	0,245	0,725	0,223	0,243
Edad	< 45 a (7) > 45 a (7)	0,588	0,325	0,445	0,065	0,114
DBT	Si (0) No (14)	a	a	a	a	a
ECV	Si (0) No (14)	a	a	a	a	a
HTA	Si (2) No (12)	a	a	a	a	a
Cáncer	Si (1) No (13)	a	a	a	a	a
Fuma	Si (1) No (12)	a	a	a	a	a
Consumo diario Alcohol	Si (1) No (47)	a	a	a	a	a
Actividad Física	Si (8) No (6)	0,153	0,341	0,414	0,083	0,168
Consumo Medicamentos	Si (3) No (11)	a	a	a	a	a
Suplementos	Si (1) No (13)	a	a	a	a	a
Consumo diario frutas y vegetales	Si (12) No (2)	a	a	a	a	a
Consumo diario proteínas animal	Si (12) No (2)	a	a	a	a	a
Exposición Laboral Plaguicidas	Si (4) No (10)	a	a	a	a	a

*p<0.05: diferencia estadísticamente significativa

a: n<5, no es posible realizar el análisis cuando un grupo es 10 % o menos del otro

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los factores investigados para la localidad de Candiotti.

4.6. Comunicación de los resultados a la comunidad

Los resultados obtenidos fueron presentados a los participantes del estudio a través de reuniones en las que intervinieron todos los actores sociales involucrados (gobierno, salud y educación). Se elaboraron diversos materiales audiovisuales que contienen aspectos vinculados a la exposición a As en agua de bebida y sus consecuencias en la salud, recomendaciones para el consumo de agua y recomendaciones nutricionales que fueron presentados y explicados a los asistentes a estas reuniones de devolución de resultados en cada localidad.

Los informes individuales de análisis bioquímico-clínicos fueron entregados a los participantes a través del personal de los SAMCo, mientras que un Informe Integral de Salud fue elaborado para cada localidad y entregado al Presidente Comunal, al Centro de Salud y a las escuelas.

Además, se difundió el trabajo realizado a través de la página web del ENRESS (ENRESS, 2020b).

Por último, se está elaborando material didáctico para trabajar estos contenidos en las escuelas rurales de la provincia de Santa Fe (Proyecto ASACTEI-Gobierno de Santa Fe Comunicación de la Ciencia CC-2018-015 y Proyecto Extensión Social PEIS-UNL 19-16).

Discusión de Resultados y Conclusiones

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1. Discusión

El agua subterránea poco profunda, que presenta una alta concentración de As, es el único recurso disponible como agua de bebida durante todo el año para la mayoría de las poblaciones rurales de esta región santafesina (Litter y col., 2019). Los resultados obtenidos de As total en las muestras de agua expresados en intervalos de concentración por Departamento, son coincidentes con los reportados en Litter y col. (2019) donde fueron recopilados los datos disponibles de las concentraciones de As en los acuíferos de la provincia de Santa Fe, caracterizados y divididos en tres áreas: una franja oriental cerca del río Paraná, con valores inferiores a 50 µg/L, una franja occidental con valores superiores a 100 µg/L y una franja central-sur con niveles intermedios.

Según los resultados obtenidos en esta Tesis, el subgrupo de participantes que consume agua segura, en su mayoría, pertenece a las tres localidades del Departamento La Capital y a la zona urbana de la localidad de Humboldt, Departamento Las Colonias, donde el sistema de distribución de agua segura abarca toda la zona urbana y es poco frecuente encontrar pozos de extracción de agua subterránea. El subgrupo de los participantes expuestos a contenidos variables de As está formado por pobladores de la zona rural de Humboldt, de la localidad de Providencia y de las tres localidades del Departamento Castellanos, donde la distribución de agua segura en cada domicilio no siempre incluye toda la zona urbana, y además, siguen existiendo los pozos domiciliarios para extraer agua subterránea. A esto se suma que, en numerosos casos, los pobladores desconocen el riesgo de consumir el agua de pozo para la cocción de alimentos y la preparación de infusiones.

Las características organolépticas de las aguas arsenicales no son generalmente desagradables. Esto hace que las personas que tienen un pozo domiciliario a disposición prefieran consumirla aunque tengan acceso al agua segura debido a que el agua proveniente de osmosis inversa con agregado posterior de cloro no resulta tan aceptada. En ese sentido al indagar en las entrevistas sobre el agua que utilizaban para consumir, se pudo observar que un 43% fueron ex consumidores de agua con contenidos variables de As, es decir no la bebían actualmente, pero sí lo hicieron durante un periodo importante de su vida, lo que podría considerarse un riesgo para la salud, debido a que una de las características del HACRE o de las comorbilidades asociadas al consumo de agua con As, es el tiempo de exposición (CONAPRIS, 2006). Los efectos tóxicos pueden observarse tardíamente, el comienzo de los síntomas puede ocurrir entre los 9 y 12 años de exposición continua y las lesiones malignizarse a los 50 años (Enríquez, 1988).

Al analizar la prevalencia de patologías asociadas al estado nutricional en la población estudiada, se observaron valores inferiores a los descriptos en la 3ª Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (3ªENFR, 2013), donde la prevalencia de HTA representó el 34%, seguido de hipercolesterolemia (30%), mientras que habría coincidencia con la prevalencia de DBT (10%).

Respecto al porcentaje de individuos que presentaron glucemia, colesterolemia y trigliceridemia elevados respecto a los valores de referencia, estos datos podrían estar relacionados con el tipo de alimentación, donde predomina un consumo diario de carnes, sobre todo cuando estas no son magras. Al analizar esos parámetros y el porcentaje de la población que presentó valores por encima del intervalo de referencia, se deduce un desconocimiento respecto a la prevalencia de dislipemias; ya que sólo el 23 % había reconocido este problema de salud previo al resultado de laboratorio. Es necesario considerar que, en cuatro de las ocho localidades incluidas, los centros de salud no tienen laboratorios bioquímicos en sus instalaciones, por lo que deben concurrir a un centro de mayor complejidad en otra ciudad para poder realizar estos análisis bioquímico-clínicos.

En cuanto a las mediciones de peso y talla y su relación con el IMC, al comparar estos resultados con los de la 3ª ENFR (2013), realizada en personas mayores de 18 años residentes de la República Argentina, en ambos casos, prevalece la malnutrición por exceso, siendo este un fenómeno mundial que no ha mostrado signos de retroceso a pesar de ser, en gran parte, prevenible.

Al indagar sobre el consumo de alimentos, a partir de la aplicación de un cuestionario de frecuencia alimentaria a todos los participantes, se pudo observar que los alimentos más consumidos a diario fueron las carnes, seguido de frutas y vegetales. Pou y col. (2014), en un estudio realizado en la provincia vecina de Córdoba, caracterizó los patrones alimentarios de la región y determinó en uno de ellos (Patrón Cono Sur) el consumo frecuente de carnes rojas y vegetales amiláceos y la baja frecuencia de consumo de frutas y vegetales no amiláceos, situación que concuerda con lo hallado en este trabajo de Tesis.

En un estudio realizado por Sigrist y col. (2016) se determinó As total en muestras de alimentos seleccionadas de Argentina estimando su contribución a la ingesta dietética de iAs. El estudio concluyó que la ingesta de iAs estimada a partir de alimentos debe ser significativamente más baja que los niveles obtenidos al beber agua. Al analizar los resultados de excreción en los participantes que presentaron niveles de As en orina por encima de los valores de referencia, habiendo declarado en la entrevista no haber consumido agua con As ni consumirla en la actualidad; se puso en evidencia una ingesta de As no registrada como tal. Del análisis de las encuestas se observó que, en estos casos, el agua arsenical ingerida provenía de la cocción de

alimentos (hervido) sopas, caldos, guisos u otras, y a preparaciones como té, café, mate o jugos diluidos. Es decir, existía un consumo indirecto de As que los individuos no estaban percibiendo. La cocción en agua conteniendo As puede incrementar el contenido de iAs en los alimentos que previamente no lo contenían (Díaz y col., 2004).

El As absorbido se excreta principalmente en la orina. La vida media biológica del iAs ingerido es de alrededor de 10 horas, y 50 a 80% se excretan en unos tres días. El As urinario es considerado el mejor indicador de exposición actual o reciente (Casarett y Doull, 2001). El As urinario se ha utilizado como marcador de exposición en estudios epidemiológicos en toda América Latina (Díaz-Barriga y col., 1993; Gonsebatt y col., 1997; Navoni y col., 2006 a, b). La concentración de As en orina se considera una buena medida de la exposición reciente al As y se usa comúnmente para monitorear la exposición en entornos ambientales y ocupacionales (Biggs y col., 1997). En la exposición crónica, el As urinario alcanza un nivel estable y se correlaciona bien con la concentración en agua. Junto con la relativa facilidad de recolección no invasiva de la muestra, esto hace que la orina sea una medida conveniente de exposición (McClintock y col., 2011).

En la submuestra poblacional analizada en esta Tesis, donde se midió la concentración de As en orina tomándose como valor de corte los 30 $\mu\text{g As/g}$ de creatinina urinaria para considerar a una persona como expuesta, se vio que el 45% de los participantes entraba en esa categoría. Sin embargo, no se pudieron analizar correlaciones entre el contenido de As en agua subterránea por localidad y los valores de excreción de As en orina, debido a que muchos de los participantes realizan un consumo mixto, es decir tanto agua de pozo como agua segura. Si bien la contribución más significativa en la ingesta de As corresponde al consumo de agua, desconocemos el volumen de agua de pozo que los participantes ingieren por día. Es posible que esta cantidad sea inferior comparada con el agua utilizada en la preparación de alimentos. Al analizar el porcentaje de participantes que presentaron niveles de As en orina por encima de los valores de referencia, habiendo declarado en la entrevista no haber bebido agua de pozo ni beberla en la actualidad; se pone en evidencia un consumo de As no registrado como tal. Del análisis de las encuestas surgió que, en estos casos, la utilización del agua arsenical provenía de la cocción de alimentos (hervidos o guisados) y preparación de infusiones o jugos diluidos.

Olmos y Ridolfi (2018) en su trabajo de revisión aseguran que si bien el hidroarsenicismo es una enfermedad que presenta sintomatología característica, para la mayoría de los efectos tóxicos que produce el As aún no se conoce en detalle el mecanismo de acción tóxica. Los mecanismos moleculares de acción del arsenito (unión a grupos sulfhidrilos) y del arseniato (sustitución del fosfato) están bien identificados, sin embargo, las consecuencias a nivel subcelular, celular, tisular y orgánico de esos mecanismos todavía presentan muchos interrogantes. Los compuestos

arsenicales trivalentes son genotóxicos más potentes que los pentavalentes. El mecanismo molecular más relacionado con este daño es la producción de estrés oxidativo (Liu y col. 2001, Faita y col. 2013). Específicamente, el daño oxidativo al ADN revelado por el EC modificado por la presencia de enzimas específicas origina roturas en la cadena de ADN que pueden ser visualizadas en el microscopio (Collins, 1997). El As, productor de estrés oxidativo podría generar este tipo de lesiones como resultado de su interacción con la molécula de ADN. Esto se puso de manifiesto en los resultados obtenidos para sitios ENDO, que mostraron incrementos significativos entre los grupos: el que consume As por debajo de 50 µg/L, el que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura y el que cocina y toma agua con contenidos variables de As; respecto al grupo que solo consume As por debajo de 10 µg/L. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en los sitios ENDO cuando se comparó el grupo que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L. Este parámetro es la diferencia entre los valores de IDEC-ENDO e IDEC y fue recomendado por Collins (2008) para mejorar la sensibilidad del EC. No es sorprendente que el daño oxidativo al ADN haya sido identificado como un índice útil de estrés oxidativo, y como un posible indicador de riesgo de cáncer (Collins, 2009).

Sólo en combinación con otros agentes que dañan el ADN como la luz ultravioleta, la radiación ionizante, los agentes alquilantes, deficiencias nutricionales, entre otros, el As es capaz, incluso a bajas dosis, de potenciar el daño genotóxico de estos agentes. Es por ello que se piensa que el As tiene un papel de promotor en el desarrollo de cáncer (Gonsebatt, 2012).

Previamente había sido demostrado que, personas expuestas a As presentaron un aumento significativo de indicadores de estrés oxidativo tales como la inducción de lipoperóxidos en el suero (Tapio y Grosche, 2006). El presente trabajo coincide con estas publicaciones al evidenciar un incremento estadísticamente significativo de TBARS entre los grupos: el que consume As por debajo de 50 µg/L, el que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura y el que cocina y toma agua con contenidos variables de As; respecto al grupo que solo consume As por debajo de 10 µg/L. También se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo que cocina con agua de pozo pero bebe agua segura con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L. Y el grupo que cocina y toma agua con contenidos variables de As también presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo que consume As por debajo de 50 µg/L.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas para sitios ENDO ni TBARS entre los grupos que consumían As solamente en el agua utilizada para cocinar, pero bebían agua segura respecto a los que beben y cocinan con agua de pozo. Esto pone de manifiesto que la contribución a la ingesta del agua empleada en la preparación de alimentos o infusiones es un

factor importante a considerar. Como ya se ha mencionado previamente, a través del diálogo con los pobladores de estas localidades, se pudo deducir que en muchos casos desconocen el riesgo de utilizar agua con As para la cocción y/o preparación de estas infusiones. Fundamentalmente, la preparación de mate se realiza con agua de pozo, ya que mantiene por más tiempo el sabor mientras que el agua de osmosis inversa no le aporta las mismas características organolépticas.

Al evaluar la FMN, FCBN y FCNL en la mucosa oral de los pobladores categorizados en cuatro grupos, de acuerdo a la excreción de As en orina y al consumo individual de As en el agua declarado en las entrevistas; los resultados mostraron que no había diferencias significativas. CAT tampoco mostró diferencias entre los cuatro grupos categorizados de esta manera.

Al analizar al subgrupo de participantes de quienes se obtuvo el valor de excreción de As urinario, quedó evidenciada una exposición reciente. En este caso los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ni para sitios Endo ni para TBARS. Esto podría evidenciar que el daño oxidativo, tanto al ADN como a las membranas lipídicas, no se relacionaría con la exposición reciente sino con la historicidad de su consumo.

En cambio, sí se observó un incremento en la FMN de la población expuesta respecto a la no expuesta según valores de As urinario. Los MN se pueden generar de manera espontánea o como respuesta a la acción de agentes aneugénicos y/o clastogénicos, que generan la pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos se originan a partir de células epiteliales (Rosin, 1992). Por lo tanto, se podría decir que las células epiteliales orales representan un sitio de destino preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que ingresan al cuerpo por inhalación e ingestión (Holland y col., 2008). Los resultados obtenidos por la medición de la FMN permiten detectar cambios tempranos que podrían estar evidenciando el efecto del As antes que se instaure una enfermedad clínica, de modo tal de poder intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

En el estudio realizado en Chile por Martínez y col. (2005) para determinar el riesgo genotóxico asociado a la exposición ambiental a As se empleó la frecuencia de MN en células bucales como biomarcador de efecto. Los individuos expuestos pertenecían a Antofagasta (región norte de Chile) donde las concentraciones de As en agua de bebida superaban 75 veces el nivel máximo recomendado por la OMS de 10 µg/L. Los resultados citogenéticos indicaron que, aunque la FMN en mucosa bucal fue mayor en expuestos que en controles, este incremento no alcanzó significación estadística. Resultados controversiales también fueron encontrados en el estudio piloto realizado por Hick y col. (2007) que analizó el impacto subclínico sobre la salud que resulta de la exposición al As en el agua de bebida, en dos grupos de individuos, uno de la provincia de

Santiago del Estero (La Firmeza, Santos Lugares y Urutaú, con un n = 20) y el otro de la provincia de Santa Fe (Providencia, con un n = 20). La evaluación incluyó las determinaciones de índice mitótico (IM), cinética de proliferación celular (CPC), MNMB, frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y EC. Los resultados obtenidos mostraron una disminución estadísticamente significativa en el IM y un incremento en la frecuencia de MN para el grupo de Santiago del Estero, mientras que, en el grupo de la provincia de Santa Fe, los valores no se diferenciaron de los presentados por el grupo control.

En otro trabajo que incluyó a mujeres adultas y niños de las comunidades de Durango y Guanajuato (México), expuestos a As y flúor (F) en concentraciones superiores al límite máximo permitido (1,5 mg/L para F y 25 µg/L para As) en agua para consumo humano se evaluó daño genotóxico en las personas adultas por MNMB y el coeficiente intelectual en los niños por prueba beta III. Se pudo corroborar que los niveles de F y As fueron aproximadamente el doble de lo permitido por las normas mexicanas. Los niños expuestos crónicamente mostraron un coeficiente intelectual menor a la media nacional y la presencia de MN superó más de tres veces el valor de referencia (Lozano Guzmán y col., 2016).

Bolognesi y col. (2015) concluyeron que se evidencia una potencial utilidad del ensayo de MNMB en el pre cribado y seguimiento de lesiones orales precancerosas. Se observó un aumento significativo de MN en los pacientes en comparación con los controles para los subgrupos de cáncer oral y de cuello. El metaanálisis de los estudios disponibles sobre otros tumores indicó que la frecuencia de MN en las células bucales podría reflejar la inestabilidad cromosómica de otros órganos. Por lo tanto, la disponibilidad de las células epiteliales hace de este ensayo un excelente biomarcador para el efecto producido por el As ingerido pero requiere ser complementado por otros marcadores para poder discernir con claridad los resultados obtenidos.

Entre múltiples factores posibles de considerar para los resultados de los distintos biomarcadores incluidos en esta Tesis (EC, Sitios ENDO, MN, CBN, CNL, TBARS y CAT) se evaluaron Sexo, Edad, DBT, ECV, HTA, Cáncer, Hábito de Fumar, Consumo diario de alcohol, Actividad física, Consumo de medicamentos, Suplementos, Consumo diario de frutas y vegetales, Consumo diario de proteínas animales, Exposición laboral a plaguicidas, tanto para el total de participantes (n=322) como para cada localidad; considerando que cada sitio geográfico puede presentar características o hábitos diferentes que podrían influir en los resultados. Cuando se consideraron los factores de confusión para los 322 participantes, se obtuvieron diferencias significativas para el hábito de fumar como factor de FCBN y para consumo diario de alcohol en las variables FCBN y CAT. Esto podría explicarse considerando que, la mucosa bucal es la vía de ingreso para ambas sustancias, y por otra parte, CAT es una enzima que también interviene en determinadas situaciones en los procesos de metabolización del etanol.

El consumo de medicamentos y la exposición laboral a plaguicidas fueron factores que modificaron de forma significativa los resultados de CAT. Es importante considerar que determinadas patologías o exposición a fármacos también podrían vincularse con sobrecarga oxidante, en la que CAT puede actuar como enzima antioxidante. Evaluaciones previas, realizadas en poblaciones rurales de la provincia de Santa Fe mostraron un aumento significativo en los niveles de TBARS en los aplicadores (expuestos directos) a plaguicidas. Mientras que la actividad de CAT disminuyó en toda las personas expuestas tanto aplicadores como no aplicadores (Simoniello y col., 2010). En nuestro estudio, si bien se vio que la proporción de participantes que realizan trabajo rural y declaran aplicar plaguicidas (expuestos laboralmente a plaguicidas) es del 17%, hay que tener en cuenta también la cercanía de las viviendas a la zona de cultivo. Entre 2014 y 2015 se llevó a cabo otro trabajo en tres localidades rurales de la región Centro de la provincia de Santa Fe (Departamentos Las Colonias y La Capital) de elevada actividad agrícola-ganadera: La Pelada, Santo Domingo y Gobernador Candioti. En el mismo, se analizaron residuos de plaguicidas en matrices ambientales y en muestras sanguíneas humanas. De las muestras de sangre analizadas un 62% contenía al menos un residuo de plaguicida. Además, del total de las muestras que presentaron residuos de plaguicidas en plasma sanguíneo, el 94% de las personas vivían entre 0-500 metros de distancia a los campos cultivados. En estas personas aproximadamente un 40% presentó valores de daño genotóxico medido por medio del EC y EC modificado por la enzima ENDO (Dechiara y col, 2020). Estos antecedentes de trabajos realizados en la misma zona de nuestro estudio explican la importancia de considerar la exposición a plaguicidas tanto laboral como ambiental como un factor de confusión para los diferentes marcadores de daño analizados en esta Tesis.

Al analizar la influencia de los factores de confusión sobre los biomarcadores por localidad, se observó que la edad modificaba IDEC y Sitios ENDO, encontrándose incrementos estadísticamente significativos en los participantes mayores de 45 años de Humboldt y Presidente Roca. El efecto de la edad sobre el EC ha sido evaluado, en distintos estudios de biomonitorio dando resultados contradictorios. En general, la edad del individuo parece tener poco efecto sobre el nivel basal medio de daño en el ADN (Möller y col., 2000). La inestabilidad cromosómica espontánea que se observa al avanzar la edad se asocia con la acumulación de daño al ADN debido a un deterioro progresivo de la capacidad general de reparación y al aumento de radicales libres altamente reactivos en las células (Bolognesi y col., 1999).

El sexo fue un factor que mostró diferencias en casi todos los marcadores analizados, es así que presentaron diferencias significativas el IDEC, la FMN, CBN y CNL, como también los marcadores de daño oxidativo TBARS y CAT en al menos una localidad. En una reseña que incluyó 2131 individuos, Bonassi y col. (1995) confirmaron la influencia del sexo en la frecuencia

de MN. Se encontró que la FMN en mujeres era un 20-30% más alta que en los hombres. Este comportamiento fue atribuido a eventos aneuploidogénicos que involucran al cromosoma X. Con la edad la proporción de células con falta de cromosomas del grupo C aumenta en las mujeres, lo que afecta significativamente la frecuencia de formación espontánea de MN (da Silva y col., 2003). Además, es necesario considerar que la susceptibilidad de las mujeres puede explicarse por las diferencias hormonales y de las vías de metabolización, como también en muchos casos, por los cambios producidos por embarazo, lactancia o menopausia. Para los efectos producidos por los tóxicos ambientales en las mujeres, se suma la necesidad de considerar las posibles consecuencias en la descendencia (Martino Durussel, 2017). En nuestro estudio, CAT fue el parámetro influenciado por el factor sexo en cinco de las siete localidades estudiadas. En todos los casos los valores de CAT para las mujeres fueron significativamente mayores que para hombres.

El consumo diario de alcohol fue un factor que modificó los valores de CAT en dos localidades, comportamiento que, como ya se ha comentado, es predecible si tenemos en cuenta que se trata de un sistema enzimático que participa en la oxidación del etanol (Goodman y Gilman, 2018).

El hábito de fumar produjo incrementos significativos en los valores de MN y CNL en mucosa bucal en las localidades de Nelson y Laguna Paiva, donde las concentraciones de As en agua fueron inferiores a 50 µg/L. En varios estudios donde se analizaron como factores los estilos de vida sobre la frecuencia de MNMB, fue difícil distinguir el efecto del alcohol del de fumar. Ni el consumo frecuente de alcohol o el hábito de fumar por sí solo, aumentan la FMN en las células bucales, pero un efecto sinérgico del tabaquismo y el alcohol fue evidente en el trabajo de Stich y col. (1983), donde se observó un incremento de hasta 5,5 veces respecto de los controles.

Cuando se analizó el factor actividad física se observó que las variables que evalúan fracturas en el ADN (IDEC) y los productos de la oxidación de lípidos (TBARS) eran significativamente menores en quienes realizaban algún tipo de actividad física por más de 3 horas a la semana, en dos localidades. También el daño oxidativo medido por los sitios ENDO se vio influenciado por la realización de actividad física, pero en este caso los valores fueron superiores en el grupo que realizaba ejercicios en forma regular en la localidad de Providencia. Se considera que el ejercicio promueve la buena salud y el bienestar, pero el ejercicio intenso se asocia con estrés oxidativo reflejado por niveles más altos de daño oxidativo al ADN y peroxidación lipídica (Möller y col., 2000).

Al analizar el consumo de medicamentos por localidad se tuvo en cuenta para categorizar a los grupos, quiénes consumían al menos un fármaco diariamente. En ese sentido la localidad de Providencia fue la que manifestó el mayor porcentaje (60%) de participantes que sí consumían,

respecto al total. En dicha localidad la ingesta de fármacos incrementó significativamente los valores de EC y el daño oxidativo al ADN. Este último biomarcador también presentó una media significativamente mayor en los pobladores de la localidad de Humboldt que consumían fármacos con frecuencia diaria.

La ingesta diaria de frutas y vegetales en las localidades de Humboldt y Laguna Paiva disminuyó significativamente los parámetros de daño oxidativo TBARS y CAT. La FMN también se vio influenciada por este hábito alimentario en la localidad de Lehmann.

El consumo diario de proteínas de origen animal sólo pudo ser considerado como factor en la localidad de Providencia donde afectó significativamente la oxidación de lípidos, probablemente vinculado con los procesos utilizados para la cocción de carnes rojas. En las demás localidades no se pudo analizar su influencia por ser el grupo de “no consumidores diarios” muy pequeño respecto al de “consumidores” (menor al 10%).

En un estudio se evaluó el efecto de la dieta sobre el metabolismo del As, midiendo la ingesta dietética y los patrones de metilación del As urinario en una población expuesta de Estados Unidos. Los hallazgos fueron consistentes con la teoría que propone que las personas con dietas deficitarias en proteínas, entre otros nutrientes, son más susceptibles que otras de padecer cáncer causado por As (Steinmaus y col., 2005). Además, el estado nutricional de una persona también puede jugar un papel importante en la prevención de otros efectos negativos del As en la salud. En ese sentido, se ha sugerido que, una dieta rica en selenio y en otros antioxidantes (como la vitamina E) ayuda a promover la metilación del As, lo cual aumenta su excreción (Verret y col., 2005). Los donadores del grupo metilo, como el folato, pueden también ayudar en el metabolismo del As y en su excreción en seres humanos (Rossman, 2007).

El iAs ingerido se metaboliza a los compuestos metilados MMA y DMA. La metilación tiene un papel importante en la toxicidad del arsénico porque el metabolito trivalente monometilado [MMA (III)] es altamente tóxico. Basu y col. (2011) estudiaron patrones de metilación y factores nutricionales en 405 personas seleccionadas de una población expuesta al As en el oeste de Bengala, India. Se evaluaron asociaciones de creatinina urinaria y factores nutricionales (a partir de datos obtenidos de la ingesta dietética y medición de micronutrientes en sangre) con metabolitos de As en orina (% iAs, % MMA y % DMA). Los resultados obtenidos mostraron que, aquellos participantes con las concentraciones de creatinina urinaria más altas tenían mayor proporción de DMA en comparación con los que presentaban una creatinina baja. La ingesta de grasa animal presentó una fuerte correlación positiva con el porcentaje de MMA. Por último, niveles séricos bajos de selenio y folato también se asociaron con un aumento del porcentaje de MMA.

Más allá de las normativas vigentes en Argentina, gran cantidad de personas que habitan áreas rurales de la zona estudiada, continúan bebiendo agua subterránea con niveles variables de As. Sumado a esto, en Argentina se ha detectado un bajo consumo de frutas y verduras respecto a las recomendaciones (GAPA, 2016). De la valoración nutricional realizada en esta Tesis por medio de los datos obtenidos en las entrevistas, se pudo concluir que los participantes no cumplen los requerimientos de micronutrientes antioxidantes (frutas y hortalizas), observándose un elevado consumo de proteínas de origen animal con frecuencia diaria, donde predomina el consumo de carnes.

Es necesario buscar nuevas alternativas para afrontar la situación que se plantea. Un estudio realizado por Curry y col. (2000), sobre agua, saneamiento y salud, propone un régimen de tratamiento basado, en una primera etapa, en la eliminación del consumo de agua con As y posteriormente, enfatiza en la administración de una dieta rica en proteínas de origen animal, para ayudar en el proceso de metilación del iAs en hígado, mejorando así su excreción.

A partir de la caracterización de estas poblaciones rurales de la provincia de Santa Fe, por medio de los datos obtenidos en las encuestas, el consumo de agua y alimentos, las variables bioquímicas, la excreción de As y los marcadores de genotoxicidad, este trabajo pretendió realizar la vigilancia sanitaria de la exposición al As en agua de bebida y así poder brindar recomendaciones para mejorar la calidad de vida y los hábitos alimentarios de los habitantes de la zona.

Trabajar con las personas mediante educación y concientización en conjunto con las autoridades locales, sería un gran aporte para mejorar la situación en poblaciones expuestas (Pérez y Deogracias, 2015). Díaz Barriga (1996) resalta, además, el derecho de las comunidades expuestas a saber acerca de su situación, de la problemática y de sus riesgos, por lo cual es fundamental informar y educar, para que puedan ser parte de los planes de resolución de los problemas. Ambos autores coinciden en la importancia que debe darse a la educación a la hora de plantear posibles soluciones.

5.2. Conclusiones

A partir de los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis de Maestría, se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

- A excepción de la localidad de Candiotti, las concentraciones de As en aguas subterráneas de las localidades en estudio son superiores a las recomendadas por la OMS, estos resultados coinciden con datos de investigaciones previas en la provincia de Santa Fe.
- Los participantes del estudio habitan en localidades que disponen de planta de tratamiento para abatir el As en el agua, pero un elevado porcentaje sigue consumiendo agua de pozo para la cocción de alimentos y preparación de infusiones. Esto provoca la exposición a concentraciones variables de As.
- Un 45% de la población analizada excreta As a través de la orina en cantidades que están por encima del valor de referencia, lo que indica una ingesta indirecta de As no percibida como tal.
- Los resultados bioquímicos muestran elevadas concentraciones de lípidos en sangre que podrían estar vinculados con la dieta rica en carnes poco magras y lácteos. No se detectan cambios a nivel hematológico ni de otros parámetros bioquímicos. La ingesta de frutas y hortalizas, fuente de micronutrientes antioxidantes, es insuficiente.
- El consumo de agua con As está relacionado con un incremento en el daño oxidativo tanto en el ADN como en las membranas lipídicas medido por los sitios ENDO y TBARS respectivamente.
- Los resultados obtenidos por la medición de la FMN permiten detectar cambios tempranos que podrían estar evidenciando el efecto del As sobre el ADN antes que se instaure una enfermedad clínica, de modo tal de poder intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Recomendaciones que surgen del Trabajo de Tesis:

- Es de interés realizar la comunicación de los riesgos que implica consumir agua con As a la población estudiada, al resto de poblaciones rurales, a los educadores y a las autoridades sanitarias de la provincia; además de pautas alimentarias saludables que contribuyan a mejorar el estilo de vida de los habitantes.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 3° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades no Transmisibles (3°ENFR). Estrategia Nacional de Prevención y Control de Enfermedades No Transmisibles. INDEC, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Bs As. Argentina. [actualizado en 2013; citado el 25 de enero de 2020]. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt2015_09_04_encuesta_nacional_factores_riesgo.pdf
- Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro*. Method. Enzymol. 105: 121-126.
- Andresen, H. M.; Regueira H. T. y Leighton, F. (2006). *Estrés oxidativo en el paciente crítico*. Revista médica de Chile. 134 (5): 649-656.
- Aposhian, H.V.; Zakharyan, R.A.; Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A.; Wollenberg, M.L. (2004). *A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 198: 327–335. doi:10.1016/j.taap.2003.10.027.
- Arango, S.S. (2011). *Biomarcador para la evaluación de riesgo en la salud humana*. Rev. Fac. Nac. Salud Pública. 30: 75-82.
- ATSDR (2007). Toxicological Profile for Arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- ATSDR (2014). Public Health Statement: Arsenic [WWW Document]. URL <http://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=18&tid=3>
- ATSDR (2019). Substance Priority List, [en línea]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (Consulta: 19 de noviembre de 2020).
- Ayerza, A. (1917). *Arsenicismo regional endémico (keratodermia y melanodermia combinadas)*. Bol Acad Med. 2–3: 11–24.
- Babior, B.M. (1978). *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes*. N Engl J Med. 298: 721-728.
- Basu, A.; Mahata, J.; Gupta, S. & Giri, A. K. (2001). *Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 488(2): 171- 194.
- Basu, A.; Mitra, S.; Chung, J.; Guha Mazumder, D.N.; Ghosh, N.; Kalman, D.; von Ehrenstein, O.S.; Steinmaus, C.; Liaw, J. and Smith, A.H. (2011). *Creatinine, Diet, Micronutrients, and Arsenic Methylation in West Bengal, India*. Environmental Health Perspectives. 119: 1308-13.
- Besuschio, S.; Desanzo, A.; Perez, A.; Croci, M. (1980). *Epidemiological associations between arsenic and cancer in Argentina*. Biol. Trace Elem. Res. 2, 41–55.

- Beuge, J.A. y Aust S.D. (1978). *Microsomal lipid peroxidation. Method. Enzymol.* 52: 302–10.
- Beutler, E., 1982. Catalase, in: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods.* Grune and Stratton Inc., New York. 105-106.
- Bhattacharya, P.; Frisbie, S.H.; Smith, E.; Naidu R.; Jacks G.; Sarkar B. (2002). *Arsenic in the environment: a global perspective.* Sarkar, B. (Ed.) *Heavy Metals in the Environment.* Marcel Dekker, New York. 145–215.
- 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.* *Mutation Research.* 386:185-95.
- Bolognesi, C.; Bonassi, S.; Knasmueller, S.; Fenech, M.; Bruzzone, M.; Lando, C.; Ceppi, M. (2015). Review. *Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis.* *Mutation Research.* 766: 20-31.
- Bolognesi, C.; Lando, C.; Forni, A.; Landini, E.; Scarpato, R.; Migliore, L. y Bonassi, S. (1999). *Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes.* *Age Ageing* 28: 393–397.
- Bonassi, S.; Bolognesi, C. y Abbondandolo, A. y col. (1995). *Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature.* *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*4: 671–679.
- Bundschuh, J.; Litter, M. I.; Parvez, F.; Román-Ross, G.; Nicolli, H. B.; Jean, J. S.; ... & Toujaguez, R. (2012). *One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries.* *Science of the Total Environment.* 429: 2-35.
- Casarett y Doull. (2001). *Manual de Toxicología. 5ta. Edición. La ciencia básica de los tóxicos.* (Klaassen, C.D.; Watkins, J.B.). México. McGraw-Hill Interamericana.
- Casarett y Doull. (2005). *Fundamentos de Toxicología.* (Klaassen, C.D.; Watkins, J.B.) McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.
- Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. [actualizado en 2012; citado el 12 de junio de 2019] Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf.
- Cohen, S.M. & Ellwein, L.B. (1990). *Cell proliferation in carcinogenesis.* *Science.* 249(4972): 1007-1011.
- Collins, A.; Dušinská, M.; Franklin, M.; Somorovská, M.; Petrovská, H.; Duthie, S.; Vaughan, N. (1997). *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications.* *Environmental and molecular mutagenesis.* 30(2): 139-46.
- Collins, A.R. (2009). Review. *Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay.* *Mutation Research.* 681: 24–32.

- Collins, A.R. y Azqueta, A. (2012). *DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay*. *Mutat Res.* 1;736(1-2):122-9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.005. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21459100.
- Collins, A.R.; Duthie, S.J. y Dobson V.L. (1993). *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA*. *Carcinogenesis*. 14: 1733–1735.
- Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C. y Stetina, R. (2008). Review. *The comet assay: topical issues*. *Mutagen*. 23: 143–151.
- CONAPRIS (Ministerio de Salud de la Nación). UNIDA (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación). ATA (Asociación Toxicológica Argentina). (2006). *Epidemiología del Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico en la República Argentina: Estudio colaborativo multicéntrico*. Buenos Aires. p. 200.
- Consejo Federal de Entidades de Servicios Sanitarios, 2018. *La disminución del arsénico en el agua, un desafío*. http://www.cofes.org.ar/descargas/info_sector/Arsenico/Disminucion_del_Arsenico_Un_desafio.pdf, Accessed date: May 2018.
- Corey, G.; Tomasini, R.; Pagura, J. (2005). *Estudio Epidemiológico de la Exposición al Arsénico a través del Consumo de Agua*. Provincia de Santa Fe, República Argentina. Gobierno de Santa Fe - ENRESS . ISBN 987-23193-0-8.
- Curry, A.; Carrin, G. y Bartram, J. *Towards an assessment of the socioeconomic impact of arsenic poisoning in Bangladesh*. [actualizado en 2000; citado el 12 de febrero de 2020] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66326/1/WHO_SDE_WSH_00.4.pdf.
- Da Silva, J.; Erdtmann, B.; Pêgas Henriques, J.A. (2003). *Genética Toxicológica. Cap: Biomonitorização do Dano Genético em Humanos*. Editora Alcance. Porto Alegre.
- De Girolami, D.H. (2003). *Fundamentos de valoración nutricional y composición corporal*. El Ateneo.
- de Zwart, L.L.; Meerman, J.H.; Commandeur, J.N. & Vermeulen, N.P. (1999). *Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(1): 202-226.
- Dechiara, M.P.; Marino, D.J.G.; Simoniello, M.F. (2020). *Desequilibrios Ambientales. Acerca de problemáticas diversas que amenazan calidad de vida y salud humana*. Cap. 1: Evaluación ambiental de biocidas y su relación con el daño genético en tres localidades rurales de la provincia de Santa Fe. Compilado por Sabatier, M.A. 1a ed. Centro de Estudios Interdisciplinarios de la Universidad Nacional de Rosario.

- Díaz Barriga, F. (1996). *Los residuos peligrosos en México. Evaluación del riesgo para la salud*. Salud pública de México, 38(4):280-91. [actualizado en 1996; citado el 5 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5936>.
- Díaz, O.P.; Leyton, I.; Muñoz, O.; Núñez, N.; Devesa, V.; Súñer, M. A.; Vélez, D.; Montoro, R. (2004). *Contribution of water, bread and vegetables (raw and cooked) to dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of Northern Chile*. J. Agric. Food Chem. 52: 1773-1779.
- Díaz-Barriga, F.; Santos, M.A.; Mejía, J.J.; Batres, L.; Yáñez, L.; Carrizales, L.; Vera, E.; Del Razo, L.M.; Cebrián, M.E. (1993). *Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, Mexico*. Environ Res. 62(2): 242-50.
- Dusinska, M. & Collins, A. (1996). *Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay*. ATLA. Alternatives to laboratory animals. 24(3): 405-411.
- ENRESS, 2020a.
<http://www.enress.gov.ar/wp-content/uploads/2020/07/Prestadores22072020.pdf>.
- ENRESS, 2020b.
<http://www.enress.gov.ar/bertoglio-participo-de-una-evaluacion-sobre-poblaciones-expuestas-a-arsenico/>
- Enríquez, A; De la Vega, C; Valenzuela, A; Enacan, A y Molina, A. (1988). *Diagnóstico de la Zona Endémica de Hidroarsenicismo Crónico en la Provincia del Chaco*. Curso de Administración Hospitalaria- II Nivel- Colegio Médico Resistencia. Chaco.
- EPA 40 CFR Parts 9, 141 and 142, [WH–FRL–6934–9] RIN 2040–AB75, Federal Register / Vol. 66, No. 14 / Monday, January 22, 2001 / Rules and Regulations. 6976-7066.
- Faita, F.; Cori, L.; Bianchi, F.; Andreassi, M.G. (2013). *Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies*. Int J Environ Res Public Health. 10(4): 1527-46.
- Fenech, M. (2000). *The in vitro micronucleus technique*. Mutation Research 455:81–95.
- Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A.T.; Surralles, J.; Crott, J.W.; Parry, J.; Thomas, P. (2011). *Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells*. Mutagen. 26: 125- 132.
- Figueiredo, B.R.; Litter, M.I.; Silva, C.R.; Mañay, N.; Londono, S.C.; Rojas, A.M.; Garzón, C.; Tosiani, T.; Di Giulio, G.M.; De Capitani, E.M.; dos Anjos, J.Â.S.A.; Angélica, R.S.; Morita, M.C.; Paoliello, M.M.B.; Cunha, F.G.; Sakuma, A.M; Licht, O.A. (2010). *Medical Geology Studies in South America*. En: Selinus, O.; Finkelman, R.B.; Centeno, J.A. (Eds.) *Medical Geology: A Regional Synthesis*, Book Series International Year of Planet Earth, Springer, Netherlands. 79-106.

- Finkel, T. (1998). *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol.10: 248-53.
- Galvao, L.A.; Corey, G. (1987). Serie Vigilancia 3. Arsénico.
- García S.I. (2011). *Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico Hacre: Módulo de capacitación*. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las intoxicaciones. 1ª Ed. 60 p. ISBN 978-950-38-0108-7.
- Gedik, C.M.; Ewen, S.W.B.; Collins, A.R. (1992). *Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells*. Int J Radiat Biol 62:313-320.
- Gentry, P.R.; McDonald, T.B.; Sullivan, D.E.; Shipp, A.M.; Yager, J.W. & Clewell, H.J. (2010). *Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity*. Environmental and molecular mutagenesis. 51(1): 1-14.
- Giraldo, B. (2003). *La fórmula del agua segura*. pp. 10-14; [en línea]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/039412/039412.htm>. (Consulta: junio de 2018).
- Gonsebatt, M.E. (2012). *Arsénico y salud*. Revista Ciencia e Investigación, Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. Tomo 62 N°3: 27-37.
- Gonsebatt, M.E.; Vega, L.; Salazar, A.M.; Montero, R.; Guzmán, P.; Blas, J.; Del Razo, L.M.; Garcia-Vargas, G.; Albores, A.; Cebrián, M.E.; Kelsh, M.; Ostrosky-Wegman, P. (1997). *Cytogenetic effects in human exposure to arsenic*. Mutation Research. 386: 219-228.
- Goodman & Gilman. (2018). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 13ª Edición. (Brunton L. Laurence). Editorial McGraw-Hill.
- Goyenechea M. *Sobre la nueva enfermedad descubierta en Bell-Ville*. Rev. Med. Rosario 1917;7:485.
- Grandjean, P. (1995). *Biomarkers in Epidemiology*. Clin. Chem. 41/12: 1800-1803.
- Guha Mazumder, D.N.; Das Gupta, J.; Santra, A.; Pal, A.; Ghose, A.; Sarkar, S. (1998). *Chronic Arsenic Toxicity in West Bengal--the Worst Calamity in the World*. J Indian Med Assoc, 96 (1): 4–7, 18.
- Hick, A.S.; Paczkowski, M.G.; Gadano, A.B. & Carballo, M.A. (2007). *Biomarcadores de Genotoxicidad en Individuos Expuestos al Arsénico*. Latin American Journal of Pharmacy 26(5): 691-9.
- Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S.; Fenech, M. (2008). *Review: The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps*. Mutation Research. 659: 93–108.

- Hopenhayn-Rich, C.; Biggs, M.L.; Fuchs, A.; Bergoglio, R.; Tello, E.E.; Nicolli, H.; Smith, A.H. 1996. *Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina*. *Epidemiology*, 7 (2): 117-124.
- Hughes, M.F.; Beck, B.D.; Chen, Y.; Lewis, A.S. & Thomas, D.J. (2011). *Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective*. *Toxicological Sciences*, 123(2): 305-332.
- INDEC, 2010. Índice Nacional Población, Hogares y Vivienda [actualizado en 2010; citado el 12 de enero de 2020] Disponible en: [https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/111720/\(subtema\)/93664](https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/111720/(subtema)/93664).
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. volume 100 C. A review of human carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Lyon (Francia).
- INTI Diseño industrial. (2015). Agua segura, un acercamiento al producto; [en línea]. Disponible en: http://www.inti.gob.ar/prodiseno/pdf/agua_segura_block.pdf. (Consulta: junio de 2018).
- Jerlick, A.; Pitt, A. R.; Schaur, R. J.y Spickett, C. M. (2000). *Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS*. *Free Radicals Biological Medicine*. 28 (5): 673-82.
- Litter, M.I. (2010). *La problemática del arsénico en la Argentina: el HACRE*. *Rev. Soc. Argent. Endocrinol. Ginecol. Reprod. (SAEGRE)*. 17: 5-10.
- Litter, M.I.; Ingallinella, A.M.; Olmos, V.; Savio, M.; Difeo, G.; Botto, L.; Farfán Torres, E.M.; Taylor, S.; Frangie, S.; Herkovits, J.; Schalamuk, I.; González, M.J.; Berardozzi, E.; García Einschlag, F.S.; Bhattacharya, P.; Ahmado, A. (2019). *Arsenic in Argentina: Occurrence, human health, legislation and determination*. *Science of the Total Environment*. 676: 756–766.
- 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(4): 1643-8.
- Lozano Guzmán, E.; Bocanegra Salazar, M.; Cervantes Flores, M.; Rocha Amador, D.; Moreno Cruz, F.J.; López Guzmán, O. D. (2016). *Evaluación de daño genotóxico y neurotóxico en población expuesta a Fluor y Arsénico*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 47 (2): 45-50.
- Martínez, V.; Creusa, A.; Venegas, W.; Arroyo, A.; Beck, J.P.; Gebel, T.W.; Surralles, J.; Marcos, R. (2005). *Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile*. *Toxicology Letters*. 155: 319–327.

- Martino Durussel, G. (2017). *Evaluación del daño genético producido por exposición ambiental a plaguicidas en mujeres de edad fértil de la Provincia de Santa Fe*. Tesis de Maestría. Revista FABICIB. 21: 239-242.
- McClintock, T.R.; Chen, Y.; Bundschuh, J.; Oliver, J.T.; Navoni, J.; Olmos, V.; Villaamil Lepori, E.; Ahsan, H.; Parvez, F. (2011). *Review: Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects*. Science of The Total Environment. 429 (2012): 76-91.
- (Ministerio de Infraestructura y Transporte Gestión 2016-2019. Gobierno de Santa Fe) (<https://www.santafe.gob.ar/index.php/web/content/download/256352/1349699/>).
- Ministerio de Salud de la Nación. Guías Alimentarias para la Población Argentina (GAPA), 2016. [actualizado en 2016; citado el 12 de enero de 2020] Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000817cnt201604_Guia_Alimentaria_completa_web.pdf.
- Mishell, B.B.; Shiigi, S.M. (1980). *In Selected Methods in Cellular Immunology*; Freeman and Co.: San Francisco. 1619.
- Möller, P.; Knudsen, L.E.; Loft, S.; Wallin, H. (2000). *The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9: 1005-1015.
- Navoni, J.A.; El Kassis, Y.; Piñeiro, A.E.; Sosa, G.; Pandolfo, M.; Kuprewicz, A.; López, C.M.; Villaamil Lepori, E.C.; Roses, O.E. *Valores de referencia de Arsénico total urinario en poblaciones no expuestas profesionalmente*. XXIV Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, III Jornadas Rioplatenses de Toxicología, Asociación toxicológica Argentina - Sociedad Uruguaya de Toxicología y Ecotoxicología. Buenos Aires, Argentina. 22 al 24 de setiembre de 2004.
- Navoni J, González Cid M, Olivera M, Tschambler J, Bovi Mitre G, Larripa I, Villaamil Lépori, E. (2006b). *Daño al ADN asociado al contenido de arsénico urinario en una población de jóvenes expuesta al arsénico por el agua de bebida*. Acta Toxicol Argent. 14(sup):48–51.
- NRC. (2001). *Arsenic in Drinking Water. Update to the 1999 Arsenic in Drinking Water Report*. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.RC. (1999). *Arsenic in Drinking Water*. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Nriagu, J.O.; Bhattacharya, P.; Mukherjee, A.B.; Bundschuh, J.; Zevenhoven, R.; Loeppert, R.H. (2007). *Arsenic in soil and groundwater: an overview*. En: Bhattacharya, P., Mukherjee, A.B., Bundschuh, J., Zevenhoven, R., Loeppert, R.H. (Eds.) *Arsenic in Soil and Groundwater Environment: Biogeochemical Interactions, Health Effects and*

- Remediation. Trace Metals and other Contaminants in the Environment 9. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 3-60.
- Olmos, V. y Ridolfi, A.S. REVISIÓN (2018). *Hidroarsenicismo: mecanismos de acción asociados a la toxicidad del arsénico*. Acta Toxicol. Argent. (2018) 26 (1): 32-44.
 - O'Reilly, J.; Watts, M.J.; Shaw, R.A.; Marcilla, A.L.; Ward, N.I. (2010). *Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina*. Environ Geochem Health. 32 (6): 491- 515.
 - Organización Panamericana de la Salud, (2007). Guía para mejorar la calidad del agua ámbito rural y pequeñas ciudades Agua segura bvsde.ops.pdf; <http://www.bvsde.paho.org/tecapro/documentos/agua/guiacalidadaguarural.pdf>. Acceso 28 de junio de 2018.
 - Pautas generales para la obtención del consentimiento informado para participar de una investigación. Dirección de Investigación en Salud, Ministerio de Salud Argentina.
 - Pérez, M.; Deogracias, O. (2015). *Agua para el Consumo Humano en México*. [actualizado en 2015; citado el 5 de febrero de 2020]. Disponible en: http://www.colsan.edu.mx/investigacion/pays/archivo/El_agua_para_consumo_humano_Mexico-2015-07.pdf.
 - Pérez Gastell, P. L. y Pérez de Alejo, J. L. (2000). *Métodos para medir el daño oxidativo*. Revista Cubana de Medicina Militar. 29 (3): 192-198.
 - Pilsner, J.R., Hall, M.N., Liu, X., Ahsan, H., Ilievski, V., Slavkovich, V. & Gamble, M. V. (2011). *Associations of plasma selenium with arsenic and genomic methylation of leukocyte DNA in Bangladesh*. Environmental health perspectives. 119(1): 113.
 - Pilsner, J.R.; Liu, X.; Ahsan, H.; Ilievski, V.; Slavkovich, V.; Levy, D. & Gamble, M.V. (2007). *Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults*. The American journal of clinical nutrition, 86(4): 1179-1186.
 - Pilsner, J.R.; Liu, X.; Ahsan, H.; Ilievski, V.; Slavkovich, V.; Levy, D. & Gamble, M.V. (2009). *Folate deficiency, hyperhomocysteinemia, low urinary creatinine, and hypomethylation of leukocyte DNA are risk factors for arsenic-induced skin lesions*. Environmental health perspectives. 117(2): 254.
 - Pou, S.A.; Niclis, C.; Aballay, L.R.; Tumas, N.; Román, M.D.; Muñoz, S.E.; Díaz, M.P. (2014). *Cáncer y su asociación con patrones alimentarios en Córdoba (Argentina)*. Nutrición Hospitalaria. 29(3): 618-628.
 - Reilly, P. M. y Bulkley, G. B. (1990). *Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites*. British Journal of Surgery. 77(12): 1323-1324.
 - Robbins y Cotran, (2015). *“Patología Estructural y Funcional”*, 9º Edición (Kumar, V.; Abbas A.K.; Aster, J.C.) Elsevier Saunders.

- Rodríguez, H. (2021). *Efectos del ambiente sobre la salud humana y animal. Factores determinantes de salud.* (Rodríguez, H.A.; Rodríguez, L.) Desarrollo Sostenible en el centro norte de la provincia de Santa Fe. Tomo 3 Ambiente (pp. 176-177). Santa Fe: Ediciones UNL. 978-987-749-281-1.
- Rosin, M.P. (1992). *The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anticlastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents.* Mutat. Res. 267: 265-276.
- Rossman T. *Arsenic.* (2007). In: Rom W and Markowitz S eds. Environmental and Occupational Medicine, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1006-17.
- Rossman, T.G. (2003). *Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 533(1): 37-65.
- Roy, P.; Saha, A. (2002). *Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen.* Current Science. 82 (1): 38-45.
- RSA Grupo Ad-Hoc “Arsénico en agua” Informe final, Red de seguridad alimentaria. (2018). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. ISSN 2618-2785.
- Schmid, W. (1975). *The micronucleus test.* Mutat. Res. 31(1): 9-15.
- Shi, Q. y King, R. W. (2005). *Chromosome non disjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines.* Nature, 437(7061):1038-42.
- Sigrist, M.; Albertengo, A.; Beldoménico, H.; Tudino, M. (2011). *Determination of As(III) and total inorganic As in water samples using an on-line solid phase extraction and flow injection hydride generation atomic spectrometry.* J. Hazard. Mater. 188: 311-8.
- Sigrist, M.; Hilbe, N.; Brusa, L.; Campagnoli, D.; & Beldoménico, H. (2016). *Total arsenic in selected food samples from Argentina: estimation of their contribution to inorganic arsenic dietary intake.* Food Chemistry: 210, 96-101.
- Simoniello, M.F. (2011). *Exposición ocupacional a los Agroquímicos. Evaluación del Daño Genético y su relación con procesos de Estrés Oxidativo.* Tesis doctoral Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
- Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Mastandrea, C.; Grigolato, R.A.; Paonessa, A.M and Carballo, M.A. (2010). *Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population.* Biomarkers. 15(1): 52-60.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells.* Exp. Cell. Res. 175, 1: 184-191.

- Singh, N.P. (1996). *Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: Principles and Methodology*. In: GP Pfeifer (Ed.): Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations Plenum Press, New York, pp 3-24.
- Smith, A.H.; Marshall, G.; Yuan, Y.; Ferreccio, C.; Liaw, J.; von Ehrenstein, O. & Selvin, S. (2006). *Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood*. Environmental health perspectives. 1293-1296.
- Squier, C.A.; Kremer, M.J. *Biology of Oral Mucosa and Esophagus*. (2001). Journal of the National Cancer Institute Monographs. 29: 7-15.
- Steinmaus, C.; Carrigan, K.; Kalman, D.; Atallah, R.; Yuan, Y.; Smith, A.H. (2005). *Dietary intake and arsenic methylation in a US population*. Environmental health perspectives. 113:1153.
- Stich, H.F. y Rosin, M.P. (1983). *Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells*. Int. J. Cancer. 31: 305-308.
- Stýblo, M.; Drobná, 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 Supl 5: 767-771.
- Tapio, S.; Grosche, B. (2006). *Arsenic in the aetiology of cancer*. Mutat. Res. 612: 215-246.
- Thomas D.J.; Styblo, M. & Lin, S. (2001). *The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 176: 127–144.
- Thomas, P.; Harvey, S.; Gruner, T. & Fenech, M. (2008). *The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls*. Mutat. Res. 638(1-2): 37-47.
- Thomas, P.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S.; Fenech, M. (2009). *Buccal micronucleus cytome assay*. Nature Publishing Group. 4 (6): 825-837.
- Titenko-Holland, N.; Jacob, R.A.; Shang, N.; Balaraman, A. y 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.; Windham, G.; Kolachana, P.; Reinisch, F.; Parvatham, S.; Osorio, A.M. & Smith, M.T. (1998). *Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 388(1): 85-95.

- Tokar, E.J.; Diwan, B.A.; Ward, J.M.; Delker, D.A. & Waalkes, M.P. (2010). *Carcinogenic effects of whole life exposure to inorganic arsenic in CD1 mice*. Toxicological Sciences, kfq315.
- Tolbert, P.E.; Shy, C.M. & Allen, J.W. (1991). *Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users*. Am. J. Epidemiol. 134(8): 840-50.
- Tolbert, P. E.; Shy, C. M. & Allen, J. W. (1992) *Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development*. Mutat. Res. 271(1): 69-77.
- Torres-Bugarín, O.; Ramos-Ibarra, M.L. (2013). *Utilidad de la prueba e micronúcleos y anomalías nucleares en células de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico*. Int. J. Morphol. 31(2): 650-657.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1998). Arsenic, inorganic (CASRN 7440-38-2). [en línea]. Integrated Risk Information System (IRIS) U.S. Environmental Protection Agency Chemical, Assessment Summary, National Center for Environmental Assessment. Disponible en: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0278_summary.pdf. (Consulta: noviembre 2017).
- Vahter, M.; Envall, J. (1983). *In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits*. Environ. Res. 32: 14-24.
- Verret, W.J.; Chen, Y.; Ahmed, A.; Islam, T.; Parvez, F.; Kibriya, M.G.; Ahsan, H. (2005). *A randomized, double-blind placebo-controlled trial evaluating the effects of vitamin E and selenium on arsenic-induced skin lesions in Bangladesh*. Journal of Occupational and Environmental Medicine. 47:1026-35.
- Wang, Z.; Dey, S.; Rosen, B.P.; Rossman, T.G. (1996). *Efflux-mediated resistance to arsenicals in arsenic-resistant and -hypersensitive Chinese hamster cells*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 137: 112–119. doi:10.1006/taap.1996.0062.
- Winski, S.L.; Carter, D.E. (1995). *Interactions of rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite*. J. Toxicol. Environ. Health 46: 379–397. doi:10.1080/15287399509532043.
- World Health Organization (WHO). (2016). *Preventing disease through healthy environments. A global assessment of the burden of disease from environmental risks*. Prüss-Ustün, A. ; Wolf, J; Corvalán, C.; Bos, R and Neira, M. Printed by the WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. p 176.
- World Health Organization (WHO). (2017). Guidelines for Drinking-water Quality. 4th ed., Suiza; [en línea]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf?sequence=1>. (Consulta: junio de 2018).

- Yuan, Y.; Marshall, G.; Ferreccio, C.; Steinmaus, C.; Liaw, J.; Bates, M. & Smith, A.H. (2010). *Kidney cancer mortality: fifty-year latency patterns related to arsenic exposure. Epidemiology*, 21(1): 103-108.

ANEXO I

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA EL PACIENTE

1) Consentimiento Informado

Fecha:.....

2) Introducción:

Lo invitamos a participar en forma voluntaria del presente estudio realizado por la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioq. Legal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) bajo la Dirección de la Prof. Dra. María Fernanda Simoniello.

3) Justificación y Objetivos de la Investigación:

El objetivo de este trabajo es utilizar un conjunto de marcadores de exposición, bioquímicos, nutricionales y de efecto en la salud de un grupo de personas de la región Centro de la Provincia de Santa Fe que se caracteriza por tener arsénico en el agua subterránea. Con el fin de evaluar las posibles acciones a desarrollar en el área de salud.

Metodología empleada

- a. Se desea que la población muestreada viva actualmente en localidades rurales de la Provincia de Santa Fe, sea de ambos sexos y mayores de 18 años de edad.
- b. La participación tendrá una duración de 15 a 20 minutos para la toma de muestra (orina, sangre y células bucales), medir su talla/peso y para responder a una encuesta.

4) Procedimientos y su propósito:

- a. Entrevista: Se realizará una entrevista, previa asignación de un código alfa numérico en la que se consignarán edad, sexo, hábitos nutricionales y consumo de agua, educación, salud y aspectos laborales.
- b. Muestras para el laboratorio: Se obtendrá sangre por punción venosa y células bucales. El material será conservado en tubos preparados especialmente y marcados con código alfa numérico y serán refrigerados hasta su procesamiento. Esto no generará riesgos para su salud.
- c. Concluido el estudio las muestras serán destruidas en un plazo no mayor a 30 días. No se harán estudios posteriores con las muestras.
- d. Si por motivos personales el invitado no acepta participar, no será incluido ya que es absolutamente voluntario.
- e. Los participantes serán informados de los resultados bioquímicos utilizando el nro. de DNI. Serán entregados en forma individual y personal en el SAMCo local.

- 5) Beneficios derivados del estudio:** No existen beneficios personales por la participación en este estudio, pero si beneficios para la sociedad en cuanto al cuidado de la salud.
- 6)** Se le entregará información respecto al consumo de agua con arsénico y sus efectos en la salud.
- 7)** Contactos para responder cualquier duda o pregunta, en caso de ser necesario:
- a. Investigador Dra. SIMONIELLO, MARIA FERNANDA. Dirección: Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, FBCB, CU, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Correo electrónico: fersimoniello@yahoo.com.ar. Teléfono:+54-342-4575216 int.155.
- b. Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación. Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- 8)** Proporcionar información sobre el manejo de los resultados al finalizar el ensayo clínico.
Los resultados del presente estudio podrán ser publicados en revistas y eventos científicos, pero en ningún momento se darán a conocer datos personales de los participantes.
El grupo de trabajo se compromete a transmitir a la población incluida en este estudio los resultados en forma grupal y las perspectivas o acciones recomendadas que surjan del mismo.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA COMITÉ DE ETICA DE LA UNIVERSIDAD

Fecha y Hora:.....

Yo DNI N°:.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información verbal y escrita sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera y sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

Firma del participante.....

Nombre en imprenta del participante:

Le he explicado este proyecto al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él comprende la información descrita en este documento y accede a participar en forma voluntaria.

Nombre y Firma del Investigador/a.....

N° Caso: N.....

Fecha:...../...../2018

ANEXO II

ENCUESTA

PARTE A:

Le pedimos que comience a contestar esta encuesta. Debe completar donde hay puntos o marcar la opción donde hay cuadritos. En el caso de surgir algún tipo de duda o inconveniente, no dude en consultarnos.

Datos personales:

Nombre y la inicial del apellido:

DNI.....

Sexo: Masculino Femenino Edad:años

Años que vive en Localidad:.....años Lugar de Nacimiento:

Nivel máximo de escolaridad: Primaria Secundaria Terciario o Universitario

Actividad Laboral:Años en la actividad:.....

Trabajo anterior:

En el caso que realice actividades agrícolas y/o jardinería:

¿Utiliza algún producto para los cultivos? Si No Nombre del producto:
.....

¿Lo aplica usted mismo? Si No ¿De qué manera lo hace?.....

¿Realiza ejercicio físico?: Si No ¿Cuál?.....

Tiempo por semana: 1 hora o menos 2 a 3 horas más de 3 horas semanales

¿Fuma? Si No ¿Hace cuánto?.....años. Cantidad de cigarrillos por día:
.....

¿Toma alguna medicación? Si No ¿Cual/ es?

¿Toma suplementos vitamínicos o minerales? Si No ¿Cuál/es?
.....

Otra?.....

¿Padece alguna de estas enfermedades?

- Diabetes Si No
- Problemas cardíacos Si No
- Cáncer Si No
- Hipertensión arterial Si No
- Colesterol alto Si No
- Enfermedades autoinmune Si No (lupus, artritis reumatoidea, etc)
- Tiroides (hiper o hipotiroidismo) Si No
- ¿Presenta cambios en la coloración de la orina? Si No
- ¿Tuvo resfríos, gripe o fiebre en las últimas semanas? Si No
- ¿Presenta alguna lesión o manchas en la piel? Si No

¿Dónde tiene la lesión de piel?

Nombre algunas características de su lesión (color, forma, tamaño, etc.).....

¿Realizó alguna consulta médica? Si No

¿Realiza tratamiento por la lesión? Si No

PARTE B

Cuestionario de hábitos Higiénico-Dietéticos:

El agua que utiliza para beber frecuentemente:

¿Es agua tratada? Si No ¿Es agua de pozo? Si No Ambas?

Tiempo en años que consume agua tratada:años

El agua de Pozo ¿para qué la utiliza o utilizaba? :

- Para riego de huerta
- Para bañarse o higienizarse
- Para cocción y preparaciones de alimentos como hervido, té, café, mate, hielo, jugos, sopas, guisos

Cuestionario de frecuencia alimentaria:

Marque con una CRUZ la cantidad de veces aproximadas, que usted consume cada uno de los alimentos que aparecen en la lista. (Ante cualquier inconveniente no dude en consultar)

Alimento	Diario	4-6 veces por semana	2-3 veces por semana	1 vez por semana	< 1 vez por semana/ nunca
Leche					
Yogurt					
Quesos					
Huevo					
Carnes (Vacuna, porcina, pescado, pollo)					
Vísceras (hígado, riñón, corazón, mondongo, lengua, seso, etc.)					
Embutidos y fiambres (chorizo, morcilla, salchichas, salame, mortadela, jamón, panceta, etc.)					
Vegetales A (acelga, apio, berenjena, brócoli, coliflor, espárrago, espinaca, lechuga, repollo, tomate, zapallito, repollitos de Bruselas)					
Vegetales B (ají, ajo, alcaucil, arvejas frescas, calabaza, cebolla, chauchas, puerro, remolacha, zanahoria, zapallo)					
Vegetales C (papa, batata, choclo)					
Frutas A (ananá, ciruela, durazno, damasco, frutilla,					

quinoto, limón, melón, mamón, mandarina, manzana, mango, naranja, pera, pomelo, sandía)					
Frutas B (banana, higo, uva)					
Fideos / arroz / pastas					
Pan					
Legumbres (garbanzo, lentejas, porotos, soja)					
Productos de panadería (tortas, facturas, galletas, bizcochos)					
Aceite					
Manteca / crema de leche					
Azúcar					
Agua embotellada					
Cerveza, vino, fernet, gancia whisky					
Gaseosas o jugos embotellados					
Agua de pozo					

Las Licenciadas en Nutrición le tomaran estas medidas para luego poder calcular Índice de Masa Corporal (IMC), Riesgo cardiovascular (RCV) y contextura

Datos antropométricos:

Peso:Kg

Talla:cm

Circunferencia de cintura:cm

IMC:
RCV asociado:

PARTE C

Por último, ¿puede indicarnos donde está su vivienda?

