



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN, EFECTO Y
SUSCEPTIBILIDAD PARA EVALUAR RIESGOS EN SALUD POR EXPOSICIÓN A
FLUORURO Y ARSÉNICO EN POBLACIÓN INFANTIL DEL ESTADO DE
ZACATECAS**

PRESENTA:

MÓNICA IMELDA MARTÍNEZ ACUÑA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

ASESORES:

DR. JORGE ALEJANDRO ALEGRÍA TORRES

Dr. Humberto Reyes Hernández

20 de Enero del 2017

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN COLABORACIÓN CON:

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Universidad Autónoma de Zacatecas

Universidad del Centro de México

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

CON FINANCIAMIENTO DE:

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)

A TRAVÉS DE LOS PROYECTOS DENOMINADOS:

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EVALUAR RIESGOS EN SALUD POR HIDROARSENICISMO EN POBLACIÓN DEL ESTADO DE ZACATECAS (ZAC-2011-C01- 170692)

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE VARIANTES POLIMÓRFICAS ASOCIADAS A LA EXPOSICIÓN A FLÚOR EN POBLACIÓN INFANTIL EXPUESTA A HIDROFLUOROSIS ENDÉMICA (234310)

AGRADEZCO A CONACYT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 166130

**EI DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

Dedicatoria

A mi amada hija Valeria Carolina.

A mis padres Ricardo e Imelda, sin ellos, nada.

A mi compañero, amigo y esposo Gustavo.

A mi querida María Dolores.

Agradecimientos Académicos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo incondicional de mis asesores, el Dr. José de Jesús Mejía Saavedra, gracias a ese compromiso tan fuerte con el trabajo bien hecho, por su diligencia y por dejarme seguir sus pasos en el ámbito académico, al Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres por brindarme su tiempo, sus conocimientos y un espacio en el Laboratorio (LIMON), y al Dr. Humberto Reyes Hernández por ayudarme a crecer como profesionista.

A la Dra. Ma. de la Luz Del Razo Jiménez por su invaluable regalo de la confianza y por su asesoría y colaboración indispensables para lograr los objetivos de este trabajo.

A mis maestros del Posgrado en Ciencias Ambientales (PMPCA), en especial a la Dra. Ana Cristina Cubillas Tejeda y al Dr Fernando Díaz Barriga por la formación académica que recibí en las aulas.

A la Maestra Leticia Carrizales Yáñez, por el apoyo en el trabajo de laboratorio.

Índice

Resumen	1
Capítulo I	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis de investigación	3
Justificación	4
Capítulo II	
Introducción	5
Capítulo III	
Antecedentes	7
Descripción del sitio de estudio	7
Origen del arsénico y fluoruro en el agua subterránea	7
Rutas de exposición para arsénico y fluoruro	9
Niveles de seguridad para el agua de bebida	9
Presencia de arsénico y fluoruro en agua del estado de Zacatecas	10
Perfil toxicológico del arsénico y fluoruro	11
Absorción	11
Distribución	11
Metabolismo	12
Excreción	14
Efectos adversos del arsénico y fluoruro	14
Efectos por la co-exposición a arsénico y fluoruro.	19
Población Infantil	20

Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad	20
ncADNmt y longitud telomérica como blancos celulares	21
ncADNmt y longitud telomérica asociados con exposición a arsénico	26
Susceptibilidad individual a la exposición a arsénico	28
Capítulo IV	
Metodología	30
Muestreo ambiental	30
Análisis de arsénico y fluoruro	31
Control de calidad	33
Estimación del riesgo en salud	33
Análisis dosis-respuesta	34
Estimación de la exposición	34
Caracterización del riesgo	36
Evaluación del riesgo en salud	37
Selección de la población de estudio	37
Monitoreo biológico	38
Muestras de orina	38
Muestras de sangre	39
Evaluación de especies arsenicales y fluoruro en orina	40
Discriminación alélica de las variantes polimórficas M287T	41
Determinación del número de copias de ADNmt y la longitud telomérica	42
Tratamiento estadístico de los datos	44
Capítulo V	
Resultados	45
Arsénico y fluoruro en agua	45
Estimación de la exposición y caracterización del riesgo	45

Población Infantil	49
Concentración de AsT y F⁻ en orina	53
Análisis de la asociación entre los biomarcadores de exposición y efecto	56
Posibles escenarios de co-exposición	58
Estudio de la prevalencia del polimorfismo M287T en el gen As3MT en la población infantil	61
Capítulo VI	
Discusión	63
Capítulo VII	
Conclusiones	72
Perspectivas	72
Bibliografía	73
Anexo 1.	
Artículo “Preliminary human health risk assessment of arsenic and fluoride in tap water from Zacatecas, México.”	85
Anexo 2.	
Borrador artículo “Mitochondrial DNA copy number and Telomere length in Mexican Children from Zacatecas, co-exposed to Inorganic Arsenic and Fluoride.”	98
Anexo 3. Aval del comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Zacatecas para el proyecto.	108
Anexo 4. Permisos de la Secretaria de Educación pública para realizar el estudio	109

Resumen

El estado de Zacatecas se encuentra en la región centro-norte de México, donde el agua subterránea contiene elevadas cantidades de arsénico inorgánico (iAs) y fluoruro (F^-) de manera natural. Para estimar el riesgo en salud por la exposición humana a estos contaminantes, se analizaron muestras de agua del grifo de algunas zonas del estado. El 90% de las muestras superó los niveles de arsénico (As) de 0.01 mg/L establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el 43% excedió el límite establecido por la NOM-127-SSA11 de 0.025 mg/L. Cuarenta y tres por ciento de las muestras tuvieron niveles de F^- por encima del límite mexicano de regulación de 1.5 mg/L (NOM-127-SSA1). Se utilizó la metodología para la evaluación de riesgos en salud de la OMS y la EPA, estimamos que el 80% de los habitantes de los sitios estudiados podrían estar expuestos a niveles de As superiores a los recomendados por la EPA y la OMS, el 22% podría estar expuesto a niveles de F^- superiores a los recomendados por la EPA, y el 16% de la población local puede estar en riesgo de sufrir fluorosis dental. Posteriormente se seleccionaron dos escuelas de dos comunidades con concentraciones en agua de grifo superiores a los 100 $\mu\text{g/L}$ de As y 1.5 mg/L de F^- (Ojo de agua y Ojocaliente, Zacatecas) para realizar la evaluación de riesgo en salud en la población infantil. Se ha sugerido que las variaciones en el ADN mitocondrial y la función del telómero están implicadas en la patogénesis de enfermedades complejas. La exposición al iAs y al F^- es un importante problema de salud pública en el mundo. Los niños son un grupo de riesgo susceptible de sufrir efectos adversos por estos contaminantes inorgánicos. La co-exposición podría inducir efectos más fuertes que los ya informados para cada contaminante. Por lo tanto, en este estudio se utilizó el número de copias de ADN mitocondrial (ncADNmt) y longitud telomérica como biomarcadores de efecto para evaluar la co-exposición a iAs y F^- en población infantil y como biomarcador de susceptibilidad la variante polimórfica M287T del gen de la As3MT, una enzima clave en el metabolismo del As.

La media geométrica del AsT urinario (Σ (iAs, MAs, DMAs) fue de 38.95 ng/mL y 72.08 ng/mL ($p < 0.001$); Mientras que la media geométrica de F^- urinario fue de 1.51 $\mu\text{g/mL}$ y 3.13 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$) en Ojo de Agua y Ojocaliente, respectivamente. La media de ncADNmt fue de 4.27 y 2.8 ($p < 0.001$) y la media de la longitud telomérica fue de 0.092 y 0.104 ($p = 0.61$) en Ojo de

Agua y Ojocaliente, respectivamente. Después de ajustar por edad, índice de masa corporal y género, el arsénico urinario total se asoció negativamente con ncADNmt ($\beta = -0.36$, $p = 0.02$, IC95% -0.67 a -0.052) y la interacción de la coexposición a iAs y F^- se asoció negativamente con ncADNmt ($\beta = -0.079$, $p = 0.02$, IC95% -0.146 a -0.013), por otro lado, la longitud telomérica se asoció negativamente con iAs ($\beta = -0,807$, $p=0.029$, CI95% -1.523 a -0.091) y positivamente con F^- ($\beta = 1.262$, $p = 0.03$, CI95% 0.114 a 2.411) en el grupo de exposición alta a F^- . Se encontró una prevalencia del 10% del genotipo polimorfismo M287T en el gen de la As3MT. Se estimó que la población que tiene un nivel de exposición alto (>p50) para AsT presenta un riesgo de sufrir alteraciones en la mitocondria (OR = 4.5 IC%95 (1.21-18.3) $p= 0.021$), en adición, los individuos con una mayor proporción de MAs en relación a DMAs en el perfil urinario de excreción, tienen un riesgo mayor de sufrir alteraciones en el ncADNmt (OR = 3.45 IC%95 (1.02 – 12.4) $p = 0.023$). Este estudio fue un primer acercamiento para determinar un efecto temprano asociado con la co-exposición a iAs y F^- en población infantil.

Capítulo I

Objetivo general

Evaluar el riesgo en salud en población infantil expuesta a arsénico y fluoruro mediante biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad.

Objetivos específicos

Estimar el riesgo en salud por la presencia de arsénico y fluoruro en agua de grifo en comunidades del estado de Zacatecas.

Evaluar la exposición a arsénico y fluoruro en población infantil en dos comunidades del estado de Zacatecas.

Evaluar la estabilidad genómica determinando la longitud del telómero y el número de copias de ADN mitocondrial.

Determinar la prevalencia del polimorfismo M287T (rs111191439) en el gen As3MT en la población de estudio.

Establecer las posibles asociaciones entre los biomarcadores de exposición, de efecto y el polimorfismo genético como marcadores de susceptibilidad.

Hipótesis de investigación

La exposición crónica a arsénico induce efectos moleculares como son alteraciones en la longitud telomérica y el número de copias de ADN mitocondrial, estos efectos pueden ser

alterados por la co-exposición a fluoruro; y la prevalencia del polimorfismo $rs111191439$ en el gen $As3MT$ podría ser un factor de susceptibilidad.

Justificación

Todos los seres humanos tienen el derecho fundamental a gozar del grado máximo de salud que se pueda lograr, sin distinción de raza, religión, ideología política, condición económica o social como lo establece la Organización Mundial de la Salud en su documento constitutivo (WHO, 2006a). En el 2010 los 192 miembros de las Naciones Unidas firmaron una resolución donde se declara el acceso al agua potable como un derecho humano. En este contexto, México al igual que otros países en el mundo, ha enfrentado diversos costos en la salud de sus pobladores relacionados con la calidad del agua. La presencia de arsénico inorgánico (iAs) es una de las principales amenazas, solo superada por el riesgo de contaminación biológica de las fuentes de agua, por otro lado, se ha reportado la concurrencia de iAs y F⁻ en agua subterránea (Wyatt et al., 1998; Del Razo et al., 1993), asociándose ésta a diversos riesgos a la salud de la población expuesta.

Según informes publicados por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (Leal-Ascencio, 2006) se tiene evidencia de la presencia de pozos de baja calidad en el sistema de abastecimiento de agua potable de algunas zonas del estado de Zacatecas. Este informe es uno de los pocos datos publicados en la zona, a la par de la falta de información de las concentraciones ambientales, no existen estudios relacionados con la exposición a estos contaminantes en población ambientalmente expuesta en el estado y tampoco se cuenta con información sobre los posibles efectos a nivel molecular que pudieran estar sufriendo dichas poblaciones.

Por otro lado, es necesario realizar estudios sobre la vulnerabilidad genética en la población infantil de la zona, ya que, con la información generada por los mismos, se pueden implementar planes de intervención que nos permitan prevenir los posibles efectos en salud a mediano y largo plazo, disminuyendo los costos humanos y económicos asociados a dichos efectos.

Capítulo II

Introducción

La presencia de iAs y F^- en el agua de consumo humano es considerada un problema de salud ambiental a nivel mundial. En el estado mexicano de Zacatecas, localizado en la parte central del país, se tienen diversos reportes de estos elementos en varios acuíferos que son utilizados para consumo humano (Leal-Ascencio, 2006; Ortega, 2009; Vega, 2002). El clima, la falta de ordenamiento en el crecimiento de las zonas poblacionales, la sobreexplotación de los acuíferos y la sequía son algunos de los factores que agravan el problema (Herrera-Toledo, 2012). La población infantil es particularmente vulnerable, por que el organismo está en desarrollo, la dosis de exposición es más grande que la que reciben comparativamente los adultos tomando en consideración el tamaño y peso de su cuerpo y sus hábitos de juego, lo que aumenta, en conjunto con factores genéticos, la probabilidad de que en una etapa más tardía se desarrolle una enfermedad relacionada con dicha exposición (Ilizaliturri et al., 2009). Diversas enfermedades han sido asociadas a la exposición al iAs , la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer)(IARC, 2011) lo clasifica en la categoría 1 como un carcinogénico; a su vez, se ha relacionado con padecimientos como la diabetes mellitus tipo II, hiperqueratosis, y con efectos en el sistema nervioso central y cardiovascular (ATSDR, 2007b; Del Razo et al., 2011; Wang et al., 2014). La exposición a F^- , se ha asociado con efectos en el sistema nervioso central y en la fertilidad masculina (Choi et al., 2012; Rocha-Amador et al., 2007) así como fluorosis dental y esquelética (ATSDR, 2003b).

La mitocondria y el telómero son sitios particularmente sensibles a la acción de los contaminantes, la mitocondria, un organelo celular está presente en las células de los mamíferos y cumple un papel crucial produciendo la energía necesaria para el funcionamiento de la célula mediante la respiración anaeróbica, por otro lado el telómero es una secuencia en tándem, repetitiva, se encuentra al final del ADN, en los extremos de los cromosomas, en cada ciclo

celular, la secuencia del telómero se acorta con cada división, hasta llegar a la senescencia de la célula, asociándose el acortamiento del telómero con el envejecimiento celular. Sin embargo, si el telómero no se acorta, la célula puede llegar a eternizarse. Las alteraciones en la mitocondria y en la longitud telomérica se han asociado con varias enfermedades crónicas y cáncer (Gao et al. 2015). Tanto el número de copias de ADN mitocondrial (cpADNmit) como la longitud telomérica son candidatos a utilizarse como biomarcadores de efecto temprano por la exposición crónica a iAs y F⁻.

En el contexto de la evaluación de los riesgos ambientales para la salud humana, es importante disminuir la incertidumbre al momento de definir los riesgos, por lo que Díaz-Barriga y colaboradores proponen el uso de biomarcadores en metodologías adaptadas para las condiciones de países como México. Esto representa una herramienta valiosa para generar información que facilite a los tomadores de decisiones la gestión de recursos, así como la justificación de programas de intervención (Díaz Barriga, 1999; Ilizaliturri et al., 2009), por lo que el objetivo de este trabajo es estudiar el número de copias de ADN mitocondrial y la longitud telomérica en niños expuestos a iAs y F⁻ en el agua de bebida como un posible biomarcador de efecto temprano a la par de analizar la prevalencia del polimorfismo M287T del gen As3MT como un posible biomarcador de susceptibilidad individual.

Capítulo III

Antecedentes

Descripción del sitio de estudio

Zacatecas se encuentra dentro de la franja central del país, cuenta con una superficie territorial de 74,502 km², equivalentes al 3.7% de la superficie total del país y ocupa el octavo lugar nacional en cuanto a su extensión. La altitud promedio es de 2,100 metros sobre el nivel medio del mar y 2,420 metros en la ciudad capital. Su territorio se localiza entre los paralelos de 21° y 25° de latitud norte; y entre los meridianos de 101° y 104° de longitud oeste. Sus límites son muy irregulares, colindando al noroeste con Durango, al norte con Coahuila, al este con Nuevo León y San Luis Potosí, al sureste con Aguascalientes, al sur con Jalisco y al suroeste con Nayarit, en su mayoría tiene un suelo rico en minerales como la arsenopirita, fluorita y fluoroapatita con actividad geotérmica en el sur del estado, el clima predominante es semidesértico, por otro lado la mayoría de sus acuíferos se consideran sobreexplotados (CONAGUA, 2015; Leal-Ascencio, 2006; Mojarro-Davila et al., 2013; Padilla-Reyes et al., 2012).

El estado de Zacatecas queda comprendido en cuatro células de planeación cuya periferia se liga con los límites naturales de las subregiones hidrológicas; Ríos Presidio-San Pedro que ocupa una mínima porción del estado con 2,801.569 km² en la parte centro oeste; Lerma-Santiago con 24,439.379 km² en el sur y suroeste del estado; Ríos Nazas-Aguanaval con 17,601.896 km², en la parte norte y noreste del estado; El Salado en la porción noreste, centro este y sureste de Zacatecas con 29,825.818 km² (GODEZAC, 2011).

Origen del arsénico y fluoruro en el agua subterránea

El iAs y el F^- son elementos que de manera natural están presentes en la corteza terrestre, por diversos procesos geoquímicos, como la lixiviación llegan a cuerpos de agua subterránea,

también puede llegar a cuerpos de agua superficiales por la deposición de partículas suspendidas o por escorrentías, así como por el uso de productos que los contengan(ATSDR, 2007a; ATSDR, 2003a).

En el caso del iAs, las concentraciones más altas se encuentran en las aguas subterráneas como consecuencia de la fuerte influencia de las interacciones agua-roca y las condiciones físicas y geoquímicas en acuíferos para la movilización y su acumulación, principalmente en acuíferos compuestos de rocas o sedimentos enriquecidos con minerales de sulfuro, recubiertos con oxihidróxido de hierro (FeOOH), donde el iAs se moviliza en poros en condiciones reductoras y en zonas áridas con altas tasas de evaporación aumentando su concentración en aguas subterráneas.

Los compuestos de iAs, pueden tener estados de oxidación diferentes con un rango de números de oxidación entre -3 a $+5$. Algunos compuestos son completamente solubles en agua como por ejemplo el tricloruro de arsénico, arsenito sódico y arseniato sódico. En las soluciones acuosas pueden ocurrir cambios en el estado de valencia dependiendo del pH de la solución. El iAs es particularmente móvil a valores de pH que se encuentran típicamente en las aguas subterráneas (pH, 6.5 a 8.5) bajo condiciones tanto oxidantes como reductoras. El iAs puede cambiar su forma por reacción con oxígeno u otras moléculas presentes en el aire, agua o suelo, o por la acción de bacterias que viven en el suelo o en el sedimento, reacciona fotoquímicamente con complejos acuosos de Fe^{3+} que producen radicales libres, como el OH^{\cdot} , capaces de oxidar a numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos pudiendo contribuir al ciclo del As en el agua natural que contiene carbono orgánico. El iAs está presente en el orden de trazas en aguas de diferente procedencia: el agua de mar contiene generalmente de 0.006 a 0.03 mg/L mientras que el agua de río desde niveles no detectables hasta 0.23 mg/L (ATSDR, 2007a; ATSDR, 2007b).

La presencia de F^- en el agua subterránea se ha relacionado con la disolución de fluorita presente en el suelo, así como la presencia de litio, cloro, cesio, bromo y aguas de origen geotérmico (Ortega, 2009); las concentraciones de F^- en el agua subterránea generalmente están en el intervalo de 0.020 a 1.50 mg/L, siendo más altos que en agua superficial debido a que están más

relacionados con la composición de las rocas que rodean a los acuíferos. El agua subterránea proveniente de rocas granulares, basálticas, dolomitas contienen F^- , encontrándose las concentraciones más altas de F^- en aguas alcalinas con altos contenidos de sodio y potasio (ATSDR, 2003a).

Rutas de exposición para iAs y F^-

La principal ruta de exposición es el agua de bebida extraída de pozos excavados en zonas con sedimentos ricos en iAs y F^- . Otras posibles rutas de exposición son la ingesta de alimentos como arroz y mariscos, el suelo y polvo en zonas mineras, el uso de productos de aseo dental fluorados, el consumo de sal fluorada.

La preparación de alimentos con agua contaminada aumenta la concentración de estos elementos en un 10% a 30% para la mayoría de los alimentos, y de 200 a 250% para legumbres y granos, que absorben casi toda el agua de cocción. Además, la irrigación de cultivos con estas aguas puede aumentar sustancialmente el contenido de arsénico en el arroz y verduras, los alimentos de origen marino contribuyen a la exposición a arsénico teniendo los crustáceos y peces marinos comestibles las concentraciones más altas de arsénico (0.001 a 0.090 mg/g). Sin embargo, el arsénico presente en este tipo de alimentos es arsénico orgánico, que es considerado de poca o nula toxicidad (ATSDR, 2003a; ATSDR, 2007b; Grimaldo et al., 1995).

Niveles de seguridad para el agua de bebida

El agua para consumo humano debe ser potable, para esto debe cumplir ciertos parámetros, en lo concerniente a los niveles de los elementos estudiados en este trabajo, la normatividad mexicana e internacional establecen límites permitidos de 0.025 mg/L (SSA, 2000) y 0.01 mg/L (EPA, 2002;WHO, 2011) para el As, mientras que para el F^- 1.5 mg/L (SSA, 2000; WHO, 2004) y 0.7 mg/L (CDC, 2015), respectivamente.

Presencia de arsénico y fluoruro en agua del estado de Zacatecas

El iAs y el F⁻ son elementos que de manera natural se encuentran presentes en la corteza terrestre. Cuando se disuelven, por la erosión de los depósitos naturales, en cuerpos de agua destinados para uso humano, pueden representar un riesgo en salud dependiendo de la cantidad en la que se encuentren (Huang et al., 2015; Merola et al., 2015). El estado de Zacatecas se localiza en la parte central de México, una zona geológica en la que se han reportado concentraciones de iAs y F⁻ en los acuíferos granulares y aluviales de la región (Leal-Ascencio, 2006; Ortega, 2009; Vega, 2002), en niveles superiores a los límites recomendados por organizaciones nacionales e internacionales (0.01 mg/L (EPA, 2002; WHO, 2011) y 0.025 mg/L (SSA, 2000) para As; 0.7 mg/L (CDC, 2015) y 1.5 mg/L para F⁻ (SSA 2000; WHO, 2004) (tabla 1).

Tabla 1. Antecedentes de la concentración de iAs y F⁻ en la zona de Guadalupe, Zacatecas

Localidad	Contaminante	Resultados	Referencia
Guadalupe, Zacatecas		80% pozos arriba de 0.025	
	iAs	mg/L	(Leal-Ascencio, 2006)
	F ⁻	40% de pozos > 1.5 mg/L	
	iAs	0.04 - 0.27 mg/L	(González-Dávila, 2011)
	F ⁻	1.28- 2.85 mg/L	
	iAs	0.016 - 0.3 mg/L	(Padilla-Reyes et al., 2012)
	F ⁻	1.28 -3.2 mg/L	

Estudios realizados en la zona San Ramón-Ojo de Agua, la cual se incluye en este trabajo. Los valores corresponden al porcentaje de pozos que superaron la guía ambiental vigente en México en los años de publicación, así como el intervalo de concentraciones para las muestras de agua de pozos utilizados para el suministro del agua de consumo humano, respectivamente.

En México se estima que un 4% de la población nacional se encuentra expuesta a altas concentraciones de iAs (McClintock et al., 2012), mientras que varios autores reportan también exposición a F⁻ en diversos estados del centro del país (González-Horta et al., 2015; Grimaldo et al., 1995; Irigoyen-Camacho et al., 2016; Jarquín-Yañez et al., 2015), principalmente en las

regiones con climas desérticos o semidesérticos y en acuíferos sobreexplotados, donde comúnmente existe, además, altas probabilidades de exposición a ambos contaminantes (González-Horta et al., 2015) por lo que se ha recomendado realizar una vigilancia continua en dichas zonas (Armienta et al., 2013; CONAGUA, 2015).

Perfil toxicológico del iAs y F⁻

Absorción

Las principales vías de entrada del iAs al organismo son el tracto gastrointestinal y el respiratorio. La absorción por vía dérmica es baja, sólo alcanza el 2%, mientras que al ingerir agua con iAs este se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal siendo alrededor de 70-90% el iAs disuelto (ATSDR, 2003; Singh et al., 2011). En el caso del trióxido de arsénico que es ligeramente soluble en agua, la absorción gastrointestinal es más lenta y depende del tamaño de partícula y del pH del jugo gástrico. Los compuestos orgánicos de arsénico contenidos en los productos del mar, se absorben rápidamente después de la ingestión.

El F⁻ es muy electronegativo, en medios ácidos se transforma en ácido fluorhídrico (HF) como en el estómago humano, donde se absorbe alrededor del 40% en esta forma, mientras que 45% del F⁻ se absorbe en el intestino y es menos dependiente del pH, siendo un proceso mediado por acarreadores, se transporta a través de las membranas biológicas fácilmente, siendo el HF más permeable que el F⁻ (ATSDR, 2003a; Barbier et al., 2010; He et al., 1998).

Distribución

Después de la absorción, el iAs se distribuye rápidamente por la sangre. Como consecuencia del intercambio fácil de número de oxidación del iAs (trivalente en pentavalente y viceversa), el reparto en los tejidos es algo similar para las diferentes formas químicas. El arsénico se localiza inicialmente en la sangre unido a globulinas, redistribuyéndose a las 24 horas a hígado,

pulmones, intestinos y bazo. Pequeñas cantidades atraviesan barrera hematoencefálica. Se deposita en pelo y uñas, favorecido por el alto contenido en grupos -SH de éstos. También se deposita en pequeñas cantidades en hueso, en donde puede permanecer años (ATSDR 2003).

Por otro lado el F^- , después de la absorción se distribuye igualmente en la sangre y en el cuerpo, almacenándose principalmente en zonas ricas en calcio, como en los dientes y huesos presentándose en los niños un almacenamiento del 80 al 90% del F-absorbido, mientras que en adultos solo se retiene alrededor del 60% (ATSDR, 2003a; Barbier et al., 2010;He et al., 1998).

Metabolismo

Se considera que la principal respuesta del organismo la biotransformación de iAs mediante mecanismos de metilación aunque en la actualidad se sabe que es más bien un proceso de bioactivación, pues las especies metiladas trivalentes son más tóxicas (Aposhian et al. 2004; ATSDR 2007b; Jha et al. 2013; Naujokas et al. 2013).

Aunque el mecanismo no está bien establecido, se propone que en general intervienen dos procesos:

a) Reacciones de reducción que convierten el As^{5+} en As^{3+} y,

Reacciones de metilación oxidativa que transforman el As^{3+} en especies metiladas las cuales se pueden ver en la figura 1. La metilación del iAs requiere primero de una reducción del As^{5+} a As^{3+} ; enseguida, la adición del primer grupo metilo para obtener ácido monometil-arsónico (MAs); seguida por una segunda reducción de MAs^{5+} a MAs^{3+} previa a la segunda metilación, lo que produce el ácido dimetil-arsínico (DMAs). La enzima arsénico metil transferasa (As3MT) es muy importante en la vía de la metilación de las especies de arsénico en el humano ya que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al arsénico trivalente (Agusa et al. 2011; Ding et al. 2012). Se ha propuesto a la S-adenosilmetionina como donador de los grupos metilo y al glutatión reducido (GSH) como principal agente reductor y transportador de arsenicales (figura 2).

Varios factores pueden influir en la capacidad de metilación del iAs, entre ellos, la dosis y el tiempo de exposición, una dieta alta en metionina y proteínas, así como el probable

polimorfismo genético de las enzimas metilantes. Se ha encontrado un incremento significativo en la cantidad de MAs y una disminución en el contenido de DMAs que son excretados en la orina de individuos que han estado expuestos crónicamente a concentraciones altas de iAs en el agua de bebida(ATSDR, 2007b; Aposhian et al., 2004).

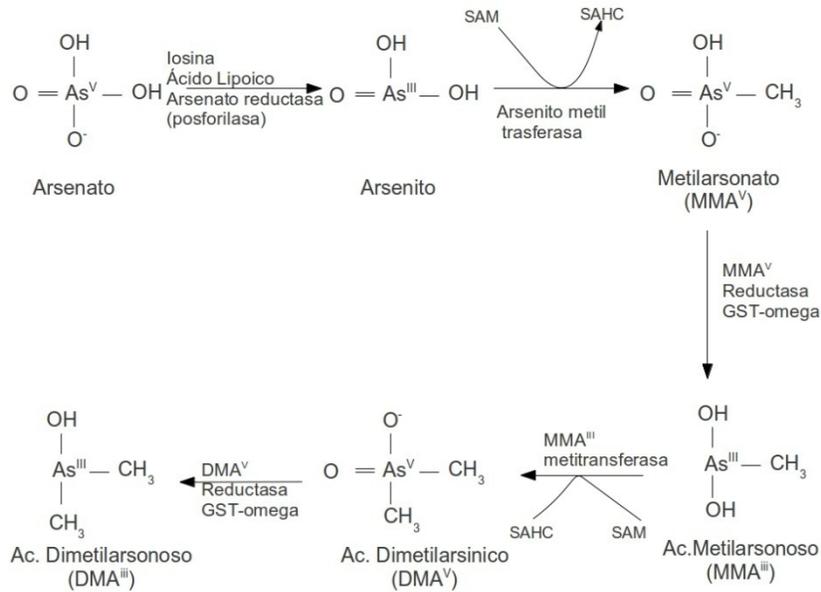


Fig. 1. Biotransformación del arsénico inorgánico en mamíferos, adaptado de Aposhian et al., 2004.

La vida media del iAs en sangre es alrededor de 2 horas y la de los metabolitos metilados es de 5 a 20 horas. La vida media de otros arsenicales orgánicos provenientes de la dieta, como la arsenocolina es de 4 a 6 horas. El depósito en pelo comienza en las dos semanas de la exposición y se fija durante años(ATSDR, 2007b).

En el caso del F^- se forman complejos inorgánicos con iones metálicos que tienen un posible rol en procesos biológicos y en la toxicodinamia del F^- , se combina con el calcio para formar esferas iónicas con el calcio permitiéndole pasar fácilmente la membrana celular, cuando se combina con aluminio y berilio, estos compuestos inorgánicos tienen interacción con sistemas enzimáticos como la GTP asa y ATP asa, además que sea ha reportado que presentan una

interacción con proteínas estructurales tales como la actina y la troponina. Por otro lado, se ha demostrado que los residuos de aminoácidos tienen un papel determinante para establecer los puentes de hidrogeno entre el F⁻ y algunas hemoproteínas, como la mioglobina (Barbier et al., 2010).

Excreción

La excreción del iAs absorbido se realiza principalmente por la orina. Sólo se excreta una pequeña cantidad en las heces, sudor y células de descamación. Mas del 50% del arsénico excretado en la orina humana es arsénico dimetilado (DMAs), el 25% es monometilado (MAs) y el resto es iAs. En el hombre se ha determinado la vida media biológica del arsénico después de la inyección intravenosa de iAs³⁺ marcado radiactivamente a pacientes con cáncer terminal, la excreción tiene lugar en tres fases, con vidas medias de alrededor de 1, 3.5 y 8 días, respectivamente(ATSDR, 2007b).

El F⁻ es eliminado principalmente por la vía urinaria, la eliminación aumenta cuando el pH de la orina es alcalino y disminuye cuando es ácido. Diversos factores afectan el pH de la orina y por consiguiente la eliminación de F⁻, como el consumo de ciertos alimentos, fármacos etc.(ATSDR,2003b).

Efectos adversos del As y F⁻

Los efectos adversos del arsénico son complejos, pues dependen de la vía de exposición, del estado de oxidación y de la forma química (orgánica e inorgánica) del compuesto. El iAs es el responsable de la mayoría de los casos de intoxicación en humanos. En cuanto a las especies oxidadas, generalmente las sales inorgánicas de As³⁺ son más tóxicas que las de As⁵⁺ y la solubilidad de los compuestos de iAs está relacionada con su toxicidad. El mecanismo más importante que se ha postulado para explicar la toxicidad de los arsenicales trivalentes es a

través de su afinidad por los grupos sulfhídrido de las proteínas. Las enzimas son un afectadas si el grupo –SH está ubicado en un sitio crítico para su actividad(ATSDR, 2007a).

Tanto el iAs^{3+} como el iAs^{5+} son tóxicos, pero por distintos mecanismos. El iAs^{5+} compete con el fósforo inorgánico en la producción de ATP, desacoplando la fosforilación oxidativa al formar un éster inestable de arseniato, lo cual se hidroliza espontáneamente (arsenólisis). En algunas reacciones enzimáticas el iAs^{5+} también puede unirse al fosfato de piridoxal e inhibir las reacciones que dependen de él, como la síntesis de dopamina y serotonina. Por otro lado, el iAs^{3+} interactúa con los grupos tiol, por lo que puede ser directamente tóxico al bloquear grupos sulfhidrilos esenciales de proteínas y enzimas. Este tipo de unión puede perturbar la función de enzimas del metabolismo de carbohidratos, como las deshidrogenasas y del metabolismo lipídico, la unión a los grupos sulfhidrido libres de las proteínas de membrana induce alteraciones en los mecanismos de transmisión de señales. Dentro de la célula, el iAs^{3+} altera la organización de los elementos del citoesqueleto; inhibe la glutatión reductasa y disminuye el nivel intracelular de glutatión reducido, alterando el equilibrio redox que protege a la célula del daño que producen las especies reactivas de oxígeno (ROS) (figura 2).

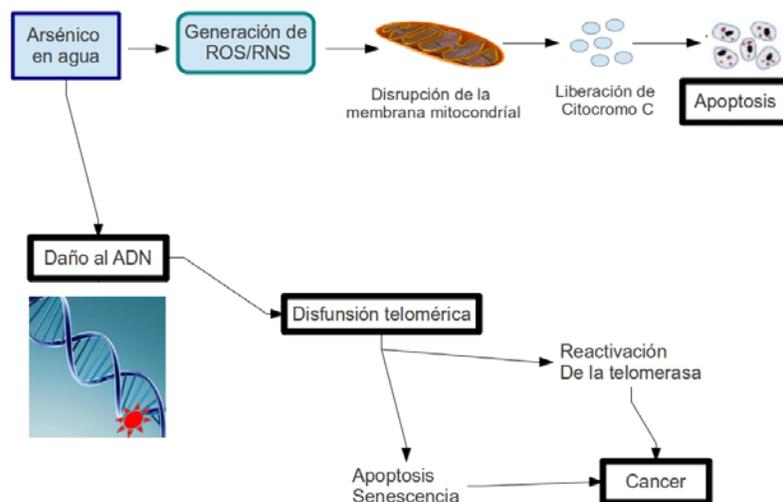


Figura 2. Mecanismos propuestos de acción del arsénico a nivel celular. Se pueden observar los posibles marcadores biológicos. Adaptado de Bhattacharjee et al., 2013.

Además del estrés oxidativo por depleción de glutatión, el iAs^{3+} aumenta los niveles de peróxido de hidrógeno al activar la NADPH oxidasa en neuronas y células musculares lisas vasculares. El daño al ADN y la apoptosis están relacionados a esta producción de peróxido de hidrógeno y a la inducción de óxido nítrico. El daño al ADN está mediado por las especies metiladas MMA y DMA a través de la producción de radicales libres(ATSDR, 2007a; Naujokas et al., 2013;Xie et al., 2010).A nivel cerebral, la exposición al iAs^{3+} induce cambios en los niveles y funciones de los neurotransmisores, lo que explicaría los desórdenes de comportamiento. El estrés sostenido llevaría a las células a una respuesta que alteraría los patrones de expresión de genes, lo que parece modular la capacidad de las células para responder y producir agentes como las citoquinas. Esta respuesta desordenada y caótica del estado rédox, de la regulación de la transcripción, y de la capacidad de reparación del ADN, sería el mecanismo propuesto en la producción de tumores(ATSDR, 2007a; Lee et al. 2011).El iAs produce intoxicación por combinación con los grupos sulfhidrilo de las enzimas, interfiriendo de esta manera con el metabolismo celular al desacoplar la fosforilación oxidativa. Como pertenece al mismo grupo que el fosforo, lo sustituye en el proceso de formación de ATP, y debido a que el compuesto resultante es inestable logrando un efecto desacoplante muy efectivo, provocando así su acción neurotóxica y carcinogénica (interferencia con la síntesis de ADN), un resumen de todo esto se muestra en la figura 3.

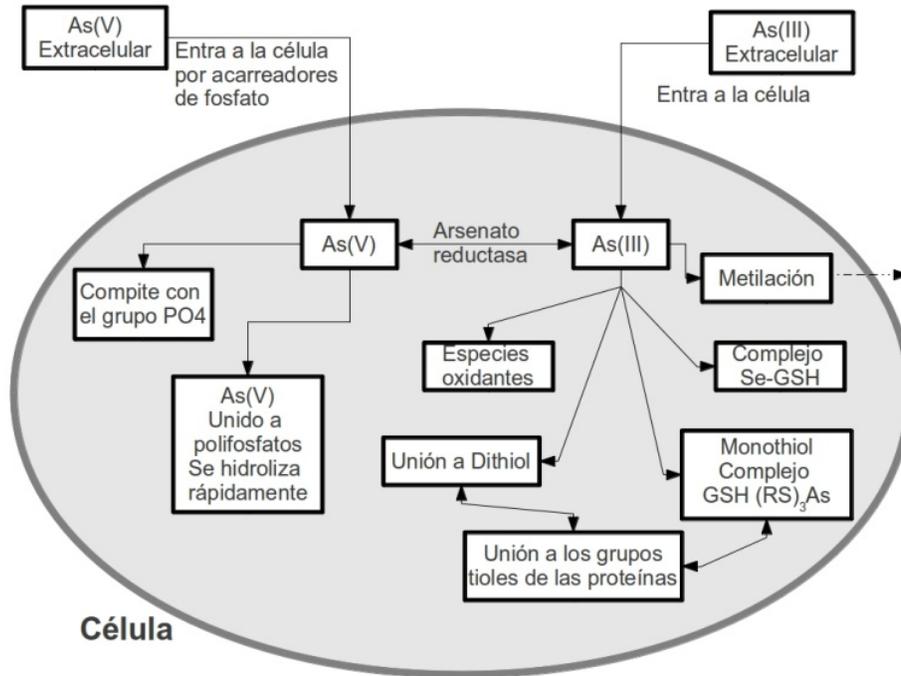


Figura 3. Interacción de las especies de arsénico en la célula. Adaptado de Aposhian et al. 2004.

Se ha reportado que la exposición crónica al F^- provoca daños en a nivel estructural y en el funcionamiento y el metabolismo de diversos tejidos, inhibiendo la secreción y síntesis de proteínas, de manera general, el F^- altera a la célula en diversas formas, en el estado redox alterando la respiración celular al disminuir la producción de ATP, así mismo altera la permeabilidad y el potencial de membrana e incrementa la generación de ROS, también se ha asociado a la necrosis y apoptosis celular, altera la secreción y el tráfico vesicular. Existen evidencias que la exposición a F^- puede afectar a las proteínas transportadoras, como las transportadoras de calcio y fosfatos, glucosa, Na^+/K^+ ATPasa, así como también se le ha asociado a efectos transcripcionales. En cuanto a efectos inmunológicos, se ha reportado una implicación del F^- en la respuesta inflamatoria, en la migración celular al igual que en el ciclo y la proliferación celular (ATSDR 2003b; Barbier et al., 2010) En la figura 4 se resumen de manera general los efectos asociados a la exposición crónica a F^- en células humanas.

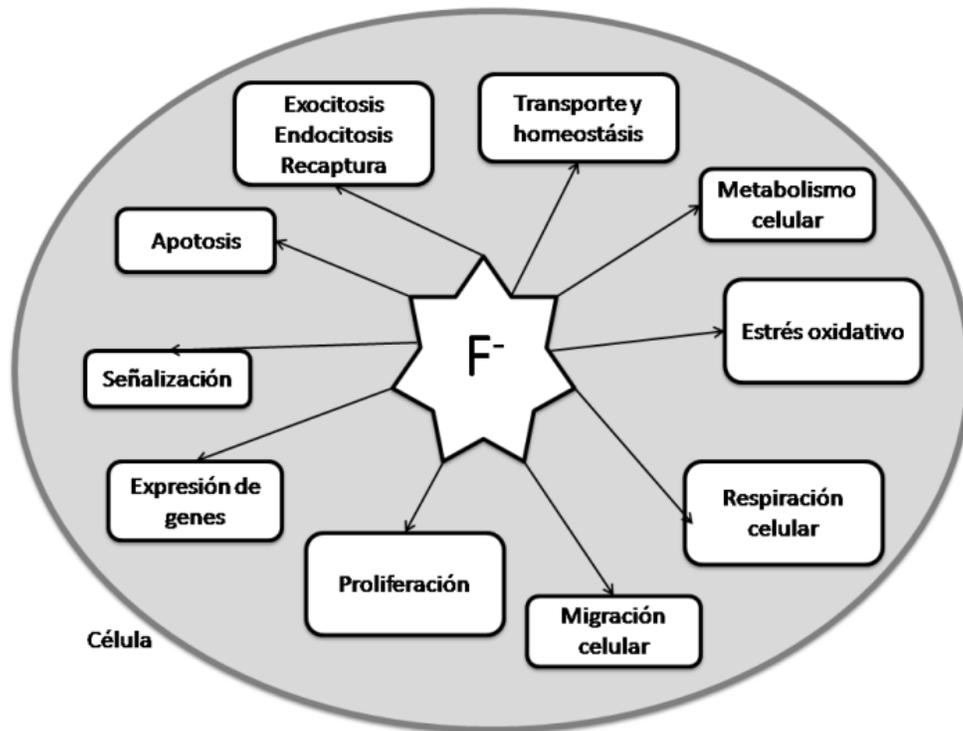


Figura 4. Alteraciones en la célula por la exposición crónica a fluoruro. Adaptado de Barbier et al., 2010

Son varios los efectos en la salud humana que han sido asociados con la exposición crónica a iAsy F⁻ en agua de bebida(ATSDR,2003a,2007b). El iAs es clasificado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC 2011) como un potente carcinogénico en la categoría 1, además se ha asociado con efectos adversos en los sistemas nervioso central y cardiovascular (Kurzius-Spencer et al., 2015; McClintock et al., 2012; Tsuji et al., 2014;Tyler & Allan, 2014), padecimientos como la diabetes mellitus (Martin et al., 2015; Wang et al., 2014) , mientras que en individuos crónicamente expuestos a concentraciones iAs mayores a 0.5 mg/día se ha reportado arsenicosis (WHO, 2006b).Por otro lado, se ha reportado que el F⁻ tiene efectos en el sistema nervioso central y en el sistema reproductivo masculino (Choi et al. 2012;Lu et al., 2000; Rocha-Amador et al., 2007; Zhang et al. 2015). En personas expuestas a concentraciones mayores a 1.5 mg/L de F⁻ en agua subterránea se presentó fluorosis dental y en algunos casos esquelética (Rango et al., 2014). En población infantil expuesta a F⁻, se ha asociado una

disminución de la respuesta inmune y efectos neurológicos tales como la disminución del coeficiente intelectual (Lu et al. 2000; Rocha-Amador et al., 2007). En la tabla 2 se muestra un resumen de los valores guía existentes para iAs y F^- .

Tabla 2. Valores guía para diversos efectos en salud por la exposición a arsénico y fluoruro.

Compuesto	Estimación del riesgo en salud	Valor Guía	Definición	Valor	Unidades	Efecto crítico	Organismo
Arsénico	No cancerígeno	NOAEL	No Observación de Efecto Adverso	0.0008	mg/kg-día	Hiperpigmentación, keratosis y posibles complicaciones vasculares	US,EPA
	No cancerígeno	LOAEL	Nivel Bajo Observación de Efecto Adverso	0.014	mg/kg-día	Hiperpigmentación, keratosis y posibles complicaciones vasculares	US,EPA
	No cancerígeno	RfD	Dosis de Referencia	0.0003	mg/kg-día	Hiperpigmentación, keratosis y posibles complicaciones vasculares	US,EPA
	No cancerígeno	MRLs	Nivel de Riesgo Mínimo	0.0003	mg/kg-día	Hiperpigmentación, keratosis y posibles complicaciones vasculares	ATSDR
	Cancerígeno	CSF	Factor para Cáncer	1.5	mg/kg-día	Cáncer	US,EPA
Fluoruro	No cancerígeno	NOAEL	No Observación de Efecto Adverso	0.06	mg/kg-día	Fluorosis Dental	US,EPA
	No cancerígeno	LOAEL	Nivel Bajo de Observación de Efecto Adverso	2	ppm	Fluorosis dental	US,EPA
	No cancerígeno	RfD	Dosis de Referencia	0.06	mg/kg-día	Fluorosis dental	US,EPA
	No cancerígeno	MRLs	Nivel de Riesgo Mínimo	0.05	mg/kg-día	Fluorosis dental	ATSDR
	Cancerígeno	CSF	Factor para Cáncer	NA	NA	Cáncer	NA

(ATSDR,2003b, 2005, 2007a; IRIS 1987, 1988)

Efectos por la co-exposición a iAs y F^-

Actualmente solo existe información limitada al respecto, sin embargo, se han reportado efectos antagónicos, sinérgicos y efectos independientes por la exposición simultánea a ambos contaminantes, por lo es necesaria mayor investigación en esta área para obtener evidencia más concluyente (Barbier et al., 2010).

Población infantil

La mayoría de las rutas de exposición para los niños son las mismas que las de los adultos, sin embargo, los niños pueden correr un riesgo de exposición mayor debido a sus hábitos de juego, al estadio de desarrollo de su organismo y a que las dosis de exposición son más altas que en los adultos, ya que su talla y peso son menores. Se considera que los niños representan una población vulnerable (Ilizaliturri et al., 2009), en adición, la desnutrición infantil podría considerarse también como un factor de vulnerabilidad, ya que los mecanismos de defensa del organismo pudieran no estar en buenas condiciones por la falta de nutrimentos, por ejemplo, en el caso de la exposición a iAs, se sabe que la deficiencia de folatos en la dieta, disminuye el metabolismo de iAs (Ghose et al., 2014) y en el caso de la exposición a F⁻, la incidencia de fluorosis dental aumenta en estados de desnutrición (Irigoyen-Camacho et al., 2016). Cuando se estudió la asociación entre el peso corporal y la exposición postnatal a iAs se encontró una disminución del mismo en niñas, no así en el grupo de los niños (Saha et al., 2012).

Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad

Un biomarcador se define como "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y se asocia con la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante" (McCarthy & Shugart, 1990). En este sentido se distinguen tres tipos de biomarcadores; de exposición si estos nos permiten evaluar los niveles internos de As y F⁻ en el organismo, de susceptibilidad, si son marcadores genéticos que intervienen en la variabilidad individual o bien, de efecto si nos permiten evaluar la respuesta biológica. Por ejemplo la presencia de arsenicales o F⁻ en orina es un biomarcador de exposición (Marchiset-Ferlay et al., 2012; Meza et al., 2004). La recolección de orina de 24 horas no resulta ser una prueba de fácil obtención, sin embargo, la recolección de una muestra de orina espontánea o puntual es más utilizada en diversos estudios por su relativa facilidad y su representatividad, sin embargo, al trabajar con muestras espontáneas, una de las desventajas

ocurre en la variación por efecto de dilución dependiendo del estado de hidratación de los participantes, la ingesta de líquidos, actividad física entre otros por lo que ajustan estos valores ya sea por el valor de excreción de creatinina o bien por la densidad de la misma orina. En cuanto a los biomarcadores de efecto se eligen dependiendo del daño al que se busca dirigir la investigación. En este trabajo se escogieron como biomarcadores de efecto temprano dos tipos de ensayos a nivel molecular, la evaluación de la longitud telomérica y el número de réplicas de ADN mitocondrial.

La respuesta biológica a la exposición a diversos tóxicos ambientales difiere entre individuos debido a diversos factores, entre ellos destacan las posibles variaciones genéticas. Existe evidencia, por ejemplo, que mutaciones o una diferencia en un par de bases en un sitio específico de un gen, conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) puede llevar a diferencias en la capacidad de metabolizar los tóxicos, lo que puede hacer a ciertas poblaciones o individuos más susceptibles de sufrir los efectos adversos asociados a dichas exposiciones. Estos SNPs son candidatos a ser utilizados como biomarcadores de susceptibilidad, en este trabajo se estudió al polimorfismo M287T del gen de la As3MT, como biomarcador de susceptibilidad.

ncADNmt y longitud telomérica como blancos celulares

La mitocondria es un organelo que ocupa una parte importante del espacio citoplasmático de las células eucariotas, cumple un papel crucial ya que provee la energía necesaria para el funcionamiento de la célula mediante la respiración, también está relacionada con la regulación de la muerte celular programada conocida como apoptosis (Loeffler & Kroemer 2000; Susin et al., 1998), y la homeostasis del calcio (Chan, 2006). El número de mitocondrias presentes en cada célula es variable, se sabe por ejemplo que en células del hígado existen entre 1000 a 2000 mitocondrias, las cuales ocupan cerca de una quinta parte del volumen celular. La función principal de la mitocondria es metabolizar la glucosa a piruvato y oxidarlo mediante moléculas

de O_2 a CO_2 y H_2O , generando moléculas de ATP, es decir, energía para la célula. Su forma es generalmente representada como ovalada, tiene un diámetro de 0.5 a 1 μm , siempre se encuentra en movimiento, fusionándose con otras y cambiando de forma, se mueve libremente o bien se une a los microtúbulos celulares; sin embargo, en algunos tipos de células forma filamentos o cadenas, en otras se acumula en alguna posición donde provee directamente ATP a sitios con alta demanda de energía, como por ejemplo en las miofibrillas en las células del músculo cardíaco o en la cola de los espermatozoides. Las mitocondrias están compuestas por una membrana externa y una interna, y dos compartimentos internos. La membrana interna es altamente especializada, ahí se encuentran las enzimas de la cadena respiratoria esenciales para el proceso de la fosforilación oxidativa. Tanto el piruvato como los ácidos grasos pueden ser utilizados como sustrato en la mitocondria, el piruvato proviene de azúcares como la glucosa, mientras que los ácidos grasos de las grasas, ambos son transportados a través de la membrana interna y son convertidos a acetil CoA por las enzimas localizadas en la matriz mitocondrial. Los grupos acetilo de la acetil CoA son oxidados en el ciclo del ácido cítrico, convirtiendo los átomos de carbono en CO_2 , el cual es un producto de desecho. La oxidación genera electrones que son acarreados por moléculas como NADH y $FADH_2$ a la membrana interna por la cadena transportadora de electrones, los electrones que se pierden del NADH y del $FADH_2$ regeneran al NAD^+ y FAD lo que es necesario para continuar el metabolismo oxidativo (Alberts et al., 2008).

El genoma mitocondrial humano, es relativamente pequeño, el ADN mitocondrial tiene varias diferencias en relación al ADN nuclear, por ejemplo, los genes están muy cercanos en la secuencia, haciéndolo muy compacto, así como también tiene un uso muy relajado de codones, ya que la síntesis de una proteína está asociada a uno o a 6 codones; así como diferencias entre el código mitocondrial con el código universal, ya que 4 de los 64 codones tiene diferentes significados en relación a los mismos codones en otros genomas, es circular y no cuenta con la protección de las histonas, además no tiene todos los mecanismos de reparación del ADN nuclear (Liu et al. 2005; Partridge et al. 2007), como se mencionó anteriormente, en la cadena respiratoria se utilizan moléculas de oxígeno, el cual es un gas con alta afinidad por los

electrones, por lo cual tiende a formar radicales superóxidos, es por esto, que, a lo largo del proceso biológico de transporte de electrones, se encuentran mecanismos que previenen que electrones altamente energéticos, salgan de la cadena; sin embargo, en algunas ocasiones estos mecanismos son insuficientes. La célula cuenta con sistemas para disminuir el daño por la presencia de superóxidos y otras ROS tales como la enzima superóxido dismutasa y la enzima catalasa o la glutatión peroxidasa; sin embargo, en células normales, el ADN mitocondrial tiene diez veces más nucleótidos anormales que el ADN nuclear. Este hecho en adición a la disminución de la eficiencia mitocondrial en personas adultas, ha llevado a formular la hipótesis de un “ciclo vicioso”, la cual intenta explicar el envejecimiento celular, basándose en el daño que producen las mutaciones al acumularse en el ADN mitocondrial en las células de los tejidos somáticos, lo que lleva a una tasa acelerada de errores de oxidación en dichos tejidos. Este ciclo continua hasta que la mitocondria produce muchos productos de oxidación lo que provoca que el organismo decaiga en edades adultas (Alberts et al., 2008).

El ADN mitocondrial es una cadena doble circular de 16,569 bp que codifica 37 genes, 13 mRNAs, 2 rRNAs, y 22 tRNAs, tiene regularmente miles de copias de ADN mitocondrial por célula, siendo el número exacto regulado por factores asociados a cada tipo de células. El ADNmt se acopla en complejos de 2 a 10 moléculas en lo que se conoce como nucleoides asociados a la membrana interna; sin embargo, se desconoce cuántas copias de ADN mitocondrial hay por mitocondria ya que este organelo como se describió anteriormente tiene un comportamiento muy dinámico, dividiéndose o uniéndose con otras mitocondrias (Shadel, 2008).

La mitocondria representa un blanco terapéutico o de toxicidad que puede ser usado como biomarcador, en parte porque es susceptible de sufrir los efectos tóxicos de xenobióticos que alteren su homeostasia de diversas formas, como por ejemplo, producir mayor cantidad de ROS, sufrir alteraciones en la actividad de las enzimas involucradas en la respiración celular y por otro lado, estas alteraciones se han asociado a enfermedades causadas por el malfuncionamiento de

este organelo, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y patologías asociadas al envejecimiento (Shadel, 2008). Por ejemplo, un incremento o aumento en contenido de ADNmt se ha asociado con varios tipos de cáncer, siendo un biomarcador potencial para predecir el riesgo y el pronóstico de la enfermedad para pacientes con cáncer (Bao et al., 2016).

El telómero es una secuencia de ADN especializada que se encuentra al final de los cromosomas, de las células eucariotas, contiene secuencias repetidas de nucleótidos que permiten que el final de los cromosomas sea eficientemente replicado, también tiene una función protectora del ADN de posibles defectos. En la replicación se producen fragmentos de Okazaki, el cual es un problema cuando se alcanza el final lineal de un cromosoma ya que no hay lugar para producir el primer de RNA mensajero necesario para empezar el último fragmento de Okazaki, esto se resuelve en las células eucariotas al añadir la secuencia de nucleótidos al final del cromosoma, lo que anteriormente mencionamos como telómeros. En células humanas la secuencia repetitiva es GGGTTA, y se repite miles de veces al final de cada telómero. Ésta secuencia es reconocida por la telomerasa, una enzima que lo repone esta secuencia cada vez que la célula se divide. La telomerasa reconoce una secuencia existente en el ADN del telómero y usando un templado de RNA sintetiza nuevas copias de la secuencia repetida en dirección 5' a 3'.

La porción enzimática de la telomerasa asemeja a una transcriptasa inversa, la enzima que sintetiza el ADN usando un templado de ARN. Después de la extensión de la cadena principal de ADN por la telomerasa, la replicación del final del cromosoma puede ser completada por la ADN polimerasa tradicional, al usar esta extensión como la base para sintetizar la cadena complementaria. El objetivo de este mecanismo es asegurarse que el final 3' sea más largo que el 5' para el cual esta pareado, dejando una protuberancia dejando un extremo de una sola hebra sobresaliente. Esta protuberancia al final forma un rizo (t-loop) de secuencias repetidas, la cual provee al final de los cromosomas una estructura única que lo protege de la acción

degradativa de enzimas y ayuda a distinguir claramente el final del cromosoma de cualquier rompimiento que sufra la molécula de ADN, permitiendo que esta sea reparada rápidamente. En células somáticas humanas, el número de repeticiones del telómero se ha propuesto como un mecanismo para prevenir la proliferación ilimitada de las células en tejidos maduros. La telomerasa es muy activa en células de tejidos que son reemplazados a lo largo de la vida, como la piel, mientras que, en otros, la actividad disminuye para que los cromosomas no se dupliquen. Cada célula pierde entre 100 y 200 nucleótidos de cada telómero cada vez que se divide y en tejidos donde la telomerasa no es muy activa los telómeros se van acortando en cada división celular, recordando además que la telomerasa provee de una capa protectora de proteínas al final del cromosoma, al faltar esta también, el final del cromosoma empieza a deteriorarse, lo que llevaría a que el extremo final del cromosoma se dañe lo cual activaría al arresto en el ciclo celular dependiente de p53. En teoría esto protegería de una proliferación celular incontrolada en tejidos somáticos, lo que evitaría el cáncer, por ejemplo. Por otro lado, si se mantiene la función de la telomerasa, se observa un efecto proliferativo celular, como en células cancerígenas (Alberts et al., 2008).

Las alteraciones en la longitud telomérica se han asociado con enfermedades crónicas y con el cáncer. Existen reportes de que un acortamiento en la longitud telomérica conduce a una inestabilidad cromosómica, así como un alargamiento del telómero se asocia con una proliferación incontrolada, lo que sugiere que la función de los telómeros está implicada en la patogénesis de muchos tumores malignos (Gao et al., 2015). La disminución en la longitud telomérica está asociada al envejecimiento y este proceso se puede acelerar por el aumento del estrés oxidativo y por la inflamación. En la literatura, hay cada vez mayor evidencia que la exposición a sustancias tóxicas está asociada a la longitud telomérica (Zhang et al., 2013).

ncADNmt y longitud telomérica asociados con exposición a arsénico

Diversos estudios se han realizado buscando conocer los efectos del iAs en los blancos celulares, en este caso, sus efectos en el número de copias relativas de DNA mitocondrial y en la longitud telomérica. Estudios realizados en células de Hamster expuestas a 1 µg/mL de arsenito de sodio encontraron una disminución significativa en el número de copias de ADN mitocondrial en comparación a las no expuestas (Partridge et al., 2007), en poblaciones humanas se han realizado diversos estudios. En la tabla 3 se muestra un resumen de estos en población ambientalmente expuesta, sobre todo a iAs en agua de bebida. Se puede observar que son poblaciones de adultos, en su mayoría del género femenino, y que se determinó, tanto para las copias relativas de ADN mitocondrial como para la longitud telomérica un aumento relativo para las poblaciones con mayores niveles de exposición. En otro sentido, cuando se ha analizado la utilidad como biomarcador predictivo en pacientes con la enfermedad de Brown (un tipo de cáncer de piel *in situ* relacionado con la exposición a iAs) en pacientes crónicamente expuestos a iAs, se encontró un aumento en el número de copias de ADN mitocondrial, a la par de una sobreexpresión de la biogénesis mitocondrial (Lee et al., 2011).

El daño a la mitocondria es crucial en la mutagenicidad provocada por el iAs, este daño mitocondrial puede conducir a la liberación de aniones superóxido, que a su vez reaccionan con el óxido nítrico para producir peroxinitritos altamente reactivos. Se ha asociado el daño al ADNMT con el desarrollo de células cancerígenas (Lee & Ho, 1994; Lee et al., 2015).

Por otro lado, se ha reportado que el F⁻ puede alterar la respiración celular y los niveles de glutatión, lo que resulta en una producción excesiva de ROS en la mitocondria. En humanos, se ha reportado que el F⁻ altera la actividad de la mitocondria en tejidos blandos como el hígado, el riñón, cerebro, pulmones y los testículos (Barbier et al., 2010)

Tabla 3. Longitud telomérica relativa y número de copias relativas de ADN mitocondrial y su asociación con la exposición a arsénico en poblaciones humanas.

Autor	Población	Exposición As total en orina Med (min-máx) µg/L	Biomarcador	Método	Efecto observado	LT o ncADNmt Med (Percentil 5-95)
(Li et al. 2012)	161 adultos con alta exposición 41 adultos con baja exposición Andes, Argentina.	230 (10-1251) µg/L	Telómero	qPCR	Elongación	LT 0.37 (0.18-0.67) β= 0.65x 10 ⁻⁴ (0.03x10 ⁻⁴ a 1.3 x 10 ⁻⁴) p = 0.04
(Ameer et al. 2016)	264 adultos (89% mujeres) con alta exposición en Andes, Argentina	196 (21-537) µg/L	Telómero	qPCR	Elongación	Andes LT 0.43 (0.030-0.58) β=0.0075, p = 0.029
	169 adultos (75% mujeres) con baja exposición en Chaco, Argentina	80 (15-1637) µg/L	cnDNAm	qPCR	Aumento	Chaco LT 1.10 (0.73-1.7) β=0.016, p=0.0066 Andes ncADNmt 0.57 (0.33-1.00) β = 0.027 por 100µg/L, p = 0.0085; Chaco ncADNmt 0.84 (0.44-1.50) β = 0.025, p = 0.24

La exposición a iAs altera la homeostasis del telómero, se ha reportado una asociación en el aumento de la longitud telomérica y un aumento de riesgo de sufrir lesiones de piel (OR 13.75, IC95%(5.66-33.41) p<0.0001) (Chatterjee et al., 2014). Además, se ha reportado que el F⁻ tiene efectos en el ciclo celular, incrementando la proliferación celular en tejido óseo en concentraciones altas (Barbier et al., 2010). De esta manera, tanto el ncADNmt como la longitud telomérica son candidatos a ser biomarcadores de efecto temprano asociados a la exposición crónica a iAs y F⁻.

Susceptibilidad individual a la exposición a iAs

Los cambios producidos en el organismo por la exposición al iAs varían entre cada individuo, debido a factores genéticos, metabólicos, dieta, estado de salud, género y otros. Estos factores pueden tener importantes implicaciones en la evaluación del riesgo por la exposición al iAs. En cuanto a los factores genéticos se sabe que hay un alto grado de variación interindividual en el metabolismo del iAs, esto asociado a variantes polimórficas de diferentes genes relacionados con el metabolismo del iAs. Uno de los polimorfismos más comunes en el gen de la As3MT, enzima limitante en la biotransformación del iAs, es el denominado M287T que sustituye a un grupo de tionina por una metionina. Estos pequeños cambios en una base en el triplete de un locus específico del gen se denominan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's). La prevalencia reportada para el M287T es del 10 % a nivel mundial, semejante a la reportada en México. Este SNP se ha asociado a diferencias en la capacidad de metilación y a la susceptibilidad individual al As, al estudiar sus variantes polimórficas se encontró una correlación entre ellos y el perfil de excreción urinaria de los metabolitos del iAs en población crónicamente expuesta (Del Razo et al. 2011; Meza et al. 2004).

En la tabla 4 se muestra un resumen de algunos estudios de asociación entre el riesgo por exposición a iAs y algunos SNPs. Existen reportes de que las variantes polimórficas del genAs3MT tiene influencia sobre la susceptibilidad individual de sufrir lesiones premalignas en la piel y por lo tanto podrían incrementar el riesgo a otros efectos en salud relacionados a la exposición al iAs(Del Razo et al., 2011; Martin et al., 2015 Valenzuela et al., 2009).

Tabla 4. Polimorfismos de un solo nucleótido en el gen As3MT asociados al metabolismo de Arsénico.

Autor	Polimorfismo	Población	Nivel de exposición	Resultados
Drobná et al. 2013	M287T	255 adultos. Durango, México	48 µg/L en agua	Mayor producción de DMAs (III). Asociación con mayor riesgo de Diabetes
	G4965C		48 µg/L en agua	Mayor producción de DMAs (III). Asociación con mayor riesgo de Diabetes
Wood et al. 2006	M287T	120 muestras (60 americanos-africanos, 60 americanos-caucásicos)		Mayor riesgo de Citotoxicidad y genotoxicidad que el gen silvestre.
Meza et al. 2004	30585	135 individuos. Sonora México	43 µg/L en agua	Asociación entre la relación DMAs/MAs en niños
Engström et al. 2007	G12390C, C14215T, y G35991A	147 indígenas. Argentina	200 µg/L en agua	Asociado con un menor porcentaje de MAs y más DMAs
Gomez-Rubio et al. 2012	7388 y M287T	746 individuos. Norte de México	200 µg/L en orina	Asociados con la eficiencia en la metilación de iAs.
Sampayo-Reyes et al. 2010	M287T	93 individuos. Norte de México	16-45 µg/L en agua	Asociado con daño al ADN.

En el presente trabajo se analizaron los genotipos del polimorfismo M287T (rs 111191439) en el gen As3MT.

Capítulo IV

Metodología

Muestreo ambiental

Primeramente, se hizo un muestreo no probabilístico por conveniencia, en las ciudades de Jerez, Villanueva, Jalpa, Ojocaliente, las comunidades de Huanusco y El Visitador, además de la zona que surte los pozos del sistema San Ramón y La Fé en la zona conurbada Zacatecas-Guadalupe (figura 5). Se tomaron 42 muestras de agua de grifo de escuelas de educación primaria, se dio preferencia a grifos que estaban en funcionamiento y que eran accesibles a los niños, como bebederos o que se encontraban en el patio de juegos. Las muestras se tomaron con el consentimiento de los directivos de las escuelas.

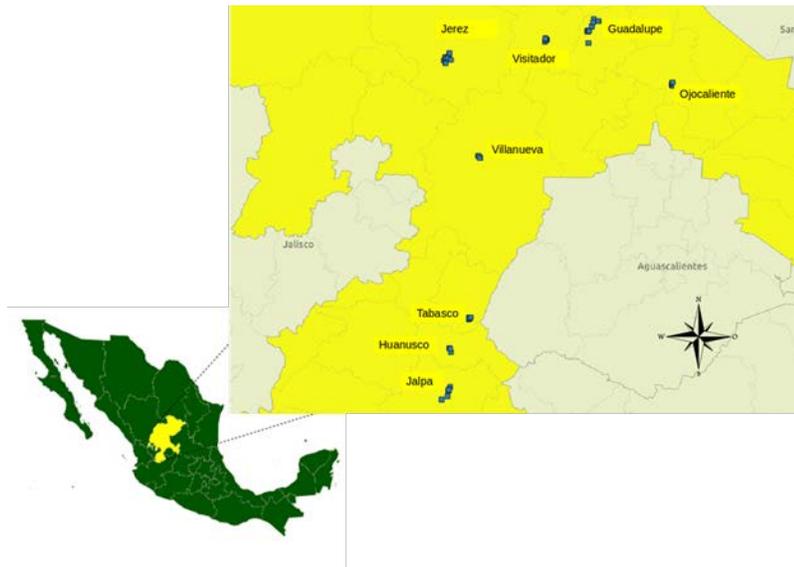


Figura 5. Ubicación del estado de Zacatecas a $25^{\circ} 07'$ sur de latitud norte, al este $100^{\circ} 43'$; oeste $104^{\circ} 22'$ de longitud oeste. Los puntos representan el sitio exacto de la toma de agua, todas de lugares de acceso público.

El clima de la región de estudio es semi-seco, con alrededor de 450 mm de precipitación al año y temperaturas medias anuales de entre 20 y 15°C (INEGI, 2010).

La recolección de las muestras de agua se realizó según lo establecido en la NOM-230-SSA1-2002(SSA, 2002). Las muestras se colectaron directamente del grifo depositando un volumen de 1000 mL de agua en un envase de polipropileno nuevo previamente enjuagado con agua desionizada y debidamente etiquetado, se mantuvieron a 4°C hasta su análisis.

El muestreo ambiental se realizó en los meses de estiaje ya que es cuando los pozos presentan sus niveles más bajos además que los niños consumen más agua por las temperaturas elevadas que se presenta en el estado esto para estudiar el escenario de máximo riesgo, a partir de esta información, se eligieron dos escuelas con niveles superiores a 0.100 mg/L de As en agua de grifo.

Análisis de arsénico y fluoruro

Se acidificaron las muestras con HNO₃ ajustando el pH <2 esto para preservarlas el mayor tiempo posible hasta su análisis. Después de acidificar la muestra se almacenó a 4°C para evitar la alteración del volumen por evaporación y al abrigo de la luz para evitar actividad microbiana y reacciones químicas indeseables. El análisis elemental de diversas matrices como el agua requiere de la digestión previa de la muestra por lo que se utilizó el método de digestión asistida por calentamiento con radiación de microondas usando frascos cerrados. La digestión húmeda con ácido nítrico se realizó a fin de asegurar la oxidación de la materia orgánica y disolución de las sales de arsénico resultantes, así como para minimizar interferencias, utilizando para este fin un horno de microondas marca Milestone Ethos One ®. Para realizar la digestión ácida se tomaron 45 mL de cada muestra de agua, posteriormente se añadió un volumen de 5 mL de ácido nítrico concentrado obteniendo así un volumen final de 50 mL, las alícuotas se depositaron en vasos de teflón para digerirlas en el microondas siguiendo el método de la EPA (EPA, 2007); posteriormente se realizó una pre reducción, ya que la eficiencia de la reacción para

generación de hidruros depende del estado de oxidación del analito, por lo general la mejor reacción procede de los estados de oxidación inferiores. El método requiere que todos los compuestos inorgánicos se encuentren como As^{3+} . Para asegurar que el analito está en el estado de oxidación más bajo se tomaron 20 mL de muestra de agua y se agregaron a un tubo cónico de 50 mL con micropipeta, posteriormente se añadieron 2 mL de una solución reductora de yoduro de potasio (KI) en ácido ascórbico al 5%, después se añadieron 6 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl), finalmente se aforaron con agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 50 mL. Todas las muestras se agitaron y se dejaron reposar 20 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación se llevó a cabo en un equipo de espectroscopia óptica de emisión atómica acoplado a una fuente de ionización de plasma ICP-OES acoplado a un generador de hidruros basándonos en el método 200.7-1 de la EPA (EPA, 1994). El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptica (OES) constituye el equipo de ICP-OES. En esta técnica, la muestra líquida entra de forma continua y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos, en este caso el arsénico, son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características, en nuestro caso de estudio, dos líneas de átomo, localizadas en el UV lejano ($As\ I\ 188,979$ y $As\ I\ 193,969$ nm, respectivamente), la primera de las cuales no presenta prácticamente interferencias espectrales. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático y mediante la integración del área bajo la curva correspondiente a cada línea espectral, la concentración de arsénico soluble presente en agua.

El análisis de F^- se realizó siguiendo la normatividad mexicana mediante el método descrito en la NMX-AA-077-SCFI-2001 (SCFI, 2001). La concentración de F^- se determinó potenciométricamente usando un electrodo selectivo de ión específico para F^- en conjunción con un electrodo de referencia de calomel y un potenciómetro que contaba con una escala expandida en milivoltios que proporciona una concentración directa en la escala del ión F^- . El

electrodo de F⁻ tiene una membrana cristalina de fluoruro de lantano, (LaF₃). El mecanismo del desarrollo de un potencial sensible al F⁻ a través de la membrana es el siguiente: la ionización crea una carga en la superficie de la membrana, en las dos interfaces. La magnitud de la carga depende de la concentración de F⁻ en la disolución. Así, el lado de la membrana que encuentra una concentración de ión F⁻ más baja se vuelve positivo con respecto a la otra superficie; es esta diferencia de carga la que proporciona una medida de la diferencia de concentración de F⁻ en las dos disoluciones. El único ión que interfiere directamente con las medidas de F⁻ es el ion hidróxilo y esta interferencia empieza a ser importante a valores de pH superiores a ocho. A pH menores a cinco, los iones hidrógeno también interfieren en las determinaciones de F⁻ total; en este caso se forma F⁻ de hidrógeno no disociado frente al cual el electrodo no tiene respuesta.

Control de calidad

Para el control de calidad se usó el estándar de referencia NIST 1640 Elementos traza en agua natural con una concentración de arsénico $\pm 26.67 \pm 0.41 \mu\text{g/L}$ obteniéndose un recobro del 85%, el límite de detección del método fué de $2.2 \mu\text{g/L}$, y el límite de cuantificación de $2.75 \mu\text{g/L}$. Para determinar el recobro para el método de F⁻ se utilizó la solución estándar NIST[®] 3183 de agua (1000 mg/L dilución 1:1000), obteniéndose un recobro del 97%.

Estimación del riesgo en salud

Se siguió la metodología de evaluación de riesgos en salud propuesta por Díaz Barriga (Díaz Barriga, 1999) ya que es la que mejor se ajusta a las condiciones del área estudiada (Ilizaliturri et al., 2009), en conjunto con la metodología de estimación de riesgos en salud por modelos probabilísticos propuesta por la EPA (EPA, 2001). Estas metodologías marcan que es posible estimar el riesgo en salud tanto para riesgos no cancerígenos como para el riesgo cancerígeno siempre y cuando se cuente con los valores guía para el contaminante en estudio.

Análisis dosis-respuesta

Para iniciar a estimar el riesgo en salud, es necesario considerar los valores guía de existentes en la literatura para cada uno de los contaminantes (Díaz Barriga, 1999). Los valores guía para iAs y F⁻, entendidos como dosis específicas para cada uno de ellos, propuestos por la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR) y la US,EPA se resumen en la tabla 1 (ATSDR 2003b, 2005, 2007a; IRIS 1987, 1988). Los valores guía que se tomaron para el cálculo de las dosis de exposición para cada contaminante, fueron las dosis de referencia listadas en el Sistema Integral de información de Riesgo (Díaz Barriga, 1999; IRIS 1987,1988) de la EPA. En cuanto a los valores guía para estimar el riesgo en salud cancerígeno, en la actualidad solo se cuenta con el factor de riesgo cancerígeno para iAs, mientras que en el caso del F⁻, aún no se cuenta con valor guía para este fin (IRIS 1987,1988)debido a que la IARC no lo ha clasificado como un agente carcinogénico, estos valores se aprecian en la tabla 1.

Estimación de la exposición

La exposición crónica al iAs y al F⁻ es principalmente debida al consumo de agua contaminada. Esto debido a que se encuentra disponible para la población de manera permanente mientras residen en la zona (Armienta et al., 2013; Bundschuh et al., 2012;Huang et al., 2015; McClintock et al., 2012). Para estimar la dosis de exposición diaria (ADD) se utilizó la siguiente fórmula (Díaz Barriga, 1999).

$$Dosis\ de\ exposición\ (mg/kg/día) = \left(\frac{(Concentración\ ambiental \times Tasa\ de\ ingesta)}{Peso\ corporal} \right) \times Factor\ de\ exposición$$

La concentración ambiental está expresada en mg/L, la tasa de ingesta en litros por día y el peso corporal en Kg. Como factor de exposición se consideró la unidad asumiendo una temporalidad permanente de la ruta de exposición y una biodisponibilidad máxima (Díaz Barriga, 1999). La concentración media de iAs y F⁻ encontrada en las muestras se usó para estimar la dosis de exposición, el valor promedio de 0.875 litros se consideró para la tasa de ingesta y el peso corporal promedio fue de 33.8 kg, estos valores corresponden a la población infantil en un rango

de edad de 6 a 11 años correspondiente a la edad en la que cursan la educación primaria en México, esto se decidió así con el fin de usar la dosis de exposición para la estimación del riesgo no cancerígeno. Considerando que este grupo poblacional se encuentra en una ventana de vulnerabilidad se espera incluir a las poblaciones en mayor riesgo al momento de intervenir el sitio. Las variables tasa de ingesta y peso corporal se calcularon a partir de los datos obtenidos de las mediciones antropométricas y de un cuestionario de exposición que se realizó a un grupo de niños residentes de la zona de estudio, con el fin de obtener la mayor información posible de las condiciones reales del sitio. A partir de los estadísticos de tendencia central y de las distribuciones de frecuencia de cada una de las variables involucradas se calcularon las dosis de exposición, para cada localidad por el método determinista y para la totalidad de la zona estudiada mediante el método probabilístico sugerido por la EPA (EPA, 2001), esta información se detalla en la tabla 5, cabe resaltar, que las variables se ajustaron a la distribución que mejor las describía, esto en base a pruebas estadísticas de ajuste, realizadas mediante el programa Crystal Ball™.

Tabla 5. Parámetros utilizados para estimar el riesgo en salud no cancerígeno.

Parámetro	Unidades	n	Distribución	Valor	Referencia
Concentración de F ⁻	mg/L	47	Lognormal	1.4 (0.4 - 3.0)	^a
Concentración de iAs	mg/L	47	Lognormal	0.05 (0.004 - 0.298)	^a
Peso corporal	Kg	79	Normal	33.8 (17.7 - 67.5)	^b
Tasa de ingesta	L/día	79	Triangular	0.87 (0.1 - 1.5)	^b
Dosis de referencia para F ⁻	mg/Kg-día	-	Valor único	0.06	(IRIS 1987)
Dosis de referencia para iAs	mg/Kg-día	-	Valor único	0.0003	(IRIS 1988)

^a Información obtenida del área de estudio.

^b información obtenida a partir de la población que vive en la zona de estudio.

Para la estimación del riesgo cancerígeno, fue necesario calcular la dosis de exposición a iAs por agua de grifo para la población adulta (Díaz Barriga, 1999; EPA, 2001), esto porque el valor guía del factor de la pendiente para cáncer (Cancer Slope Factor) está considerado para una exposición de toda la vida (ATSDR, 2005), los detalles de cada variable involucrada se pueden observar en la tabla 6. Dicha estimación se realizó utilizando el valor más representativo de iAs

para cada sitio y la distribución total para estimar la dosis de exposición por el método probabilístico.

Tabla 6. Parámetros para la estimación de riesgo cancerígeno por exposición a arsénico en agua de grifo.

Parámetro	Unidades	n	Distribución	Valor	Referencia
Concentración de arsénico	mg/L	47	Lognormal	0.05 (0.004 - 0.298)	^a
Tasa de ingesta	L/día	-	Valor único	2.0	(Díaz Barriga 1999)
Peso corporal	Kg	-	Valor único	70	(Díaz Barriga 1999)
Factor de potencia cancerígena	mg/Kg-día	-	Valor único	1.5	(Díaz Barriga 1999)

^a Concentración media de arsénico en agua del área de estudio.

Caracterización del riesgo

En este paso, se obtuvieron los cocientes de riesgo no cancerígeno y cancerígeno a partir de la información de las etapas anteriores. El cociente de riesgo no cancerígeno se obtiene mediante la fórmula (Díaz Barriga, 1999)

$$\text{Cociente de riesgo no cancerígeno} = (\text{Dosis de exposición (mg/Kg/día)} / \text{RfD(mg/Kg/día)}) * \text{EF}$$

El tiempo de exposición se consideró como completo y la biodisponibilidad del 100% por lo que el factor de exposición (EF) se tomó como la unidad. Mientras que el cociente de riesgo cancerígeno o valor estimado de riesgo teórico (ER) se calculó a partir de la ecuación (ATSDR,2005; Díaz Barriga, 1999).

$$ER = (\text{Dosis de exposición (mg/Kg/día)} * CSF(\text{mg/Kg/día}))$$

Este ER representa el riesgo cancerígeno individual, para el caso del F⁻ no se incluyó en esta estimación porque como ya se mencionó anteriormente, no se cuenta con el factor de potencia cancerígena para este contaminante en particular. Se incluyó un análisis de sensibilidad usando

técnicas gráficas provistas por el programa Crystalball[®] para evaluar los posibles cambios de importancia relativa de las variables involucradas en las ecuaciones utilizadas.

Evaluación de riesgo en salud

Selección de la población de estudio

Se realizó un estudio transversal en la población infantil de las escuelas seleccionadas. Los criterios de inclusión son niños y niñas en edad escolar (6 a 11 años), residentes en la zona de estudio por lo menos en un periodo de 4 años, que asistan a la escuela en cuestión, y que no se les esté administrando ningún medicamento. Para tener acceso a nuestra población objetivo, de manera inicial se contactaron a los directores de escuelas de la zona, extendiéndoles la invitación para participar en el estudio de manera escrita con el debido respaldo de documentos donde se acreditan los permisos para realizar el estudio, de la Secretaria de Educación Pública, el protocolo del estudio además de la carta de aprobación del comité de bioética de la Universidad Autónoma de Zacatecas (148/2012) (. Si el Director de la escuela mostró interés, se le pidió que gestionara una reunión con los maestros de la escuela donde se abordó de nueva cuenta la información concerniente a la realización del estudio. Los maestros a su vez se les pidieron que citaran a reunión a los padres de familia. Cuando se trabajó con los padres de familia se aplicaron técnicas de exposición grupal para explicarles que el estudio es voluntario, gratuito y que su información se mantendría confidencial además en cualquier momento podrían abandonar el estudio si así lo deseaban. Se explicaron los objetivos del estudio y se les informó que el protocolo cumplía con los requisitos del comité de bioética que lo avala, se fomentó la lluvia de ideas en el grupo. Si los padres o tutores decidieron que su hijo podría participar, se les proporcionó una carta de consentimiento informado y se les resolvió cualquier duda respecto al proyecto.

Monitoreo biológico.

En las reuniones con los padres de familia interesados en que sus hijos participaran en el estudio, se les indicó que día debían presentarse en la escuela y con las recomendaciones de que los niños se presentaran en ayunas y con su muestra de la primera orina del mismo día. La logística del muestreo biológico se diseñó para agilizar la toma de muestras con el fin de que los niños no retrasasen su primer alimento del día y no se perdieran actividades escolares. Se montó un circuito en el área que nos proporcionaron las autoridades de las escuelas. Primeramente, estuvo el módulo de registro, donde se les tomaron los datos generales a los papas y a sus hijos y se les asignó un folio el cuál sirvió de control en los siguientes módulos. Posteriormente pasaron a la toma de muestra de células de descamación del epitelio oral, después siguieron a la toma de muestra sanguínea en donde se contó con personal capacitado y con experiencia amplia en este procedimiento, luego siguieron al módulo donde se les tomaron medidas antropométricas y se les hizo la evaluación del estado nutricional, en este punto del circuito también se contó con la colaboración de nutriólogos competentes en estos protocolos, de manera paralela a los padres se les aplicó la encuesta, procurando que durante todo el circuito tuvieran a sus hijos a la vista. El objetivo de dicha encuesta fue obtener información acerca de los hábitos alimenticios, edad, ingesta de agua, lugar de nacimiento, estado de salud, antecedentes familiares, factores socioeconómicos además de otras posibles fuentes de exposición al arsénico como el consumo de arroz, mariscos etc.

Muestras de orina

La orina se considera un biomarcador de exposición aguda, puesto que si se determina la presencia de arsénico en ella, se infiere que el contaminante es biodisponible y el sujeto se ha expuesto a él de manera reciente. Previamente a los padres de familia interesados en que sus hijos participen en el estudio, se les entregó un envase de capacidad de 100 mL para la recolección de muestras de orina, nuevo, fabricado para ese fin. Se les indicó en ese momento las recomendaciones necesarias para asegurar la viabilidad de la orina, las cuales consisten en

que se recolecte la primera micción del día, de preferencia no tomar las primeras gotas y llenar el recipiente hasta la marca de 100 mL. La mayoría de los participantes cumplieron con este requisito, en el caso de muestras con en el que la cantidad no fuera suficiente para los análisis, se descartaron. El día que se les citó para la toma de muestra sanguínea, llevaron también la muestra de orina con los requerimientos solicitados. La muestra de orina se mantuvo fría hasta llegar al laboratorio donde se fraccionó la muestra en dos alícuotas una muestra de 15 mL se reservó para el análisis de iAs y sus metabolitos, así como de F⁻ y la otra alícuota se entregó a un laboratorio privado para que la realización de un examen general de orina (examen químico y físico).

Muestras de Sangre

La toma de muestra sanguínea fue realizada por personal capacitado y con amplia experiencia en el manejo de niños. Siguiendo los protocolos de ética recomendados por el Comité de Bioética que aprobó el protocolo, la punción se realizó siempre y cuando el padre, madre o tutor del menor estuvo presente. La toma de muestra periférica se realizó por punción venosa y utilizando el sistema Vacutainer®. Se tomaron muestras de sangre, una con anticoagulante EDTA y otra sin ningún aditivo. Esta última se envió lo más rápidamente posible al laboratorio para que se le realizaran pruebas de bioquímica clínica donde se determinaron parámetros relacionados con el estado de salud y nutricional que se consideran importantes para los fines de esta investigación como lo es la concentración de albumina y de hemoglobina en sangre El tubo con la muestra de sangre con EDTA se reservó para los ensayos de biología molecular y se mantuvo frío hasta su procesamiento, el cual consistió en centrifugar la muestra para separar los diferentes componentes de la sangre por la acción de la fuerza de gravedad. El ADN se aisló del paquete de glóbulos blancos o leucocitos, que son las células que cuentan con núcleo en el tejido sanguíneo.

Determinación de especies arsenicales y fluoruro en orina

Se cuantifico el iAs (iAsIII + iAsV), sus metabolitos urinarios monometilados totales (MAs como MAsIII + MAsV) y dimetilados totales (DMAs como DMAsIII + DMAsV) como biomarcadores de exposición. La sumatoria de éstos arsenicales fue considerado como el arsénico total (AsT) considerado de riesgo a la acción tóxica. Esto se realizó en el Departamento de Toxicología en el Cinvestav-IPN mediante un espectrómetro de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros, con un sistema de atomización de celda de cuarzo, equipado con un accesorio automatizado de inyección de flujo FIAS y una criotrampa (HG-CT- AAS)(Devesa et al., 2004; Hernandez-Zavala et al,2008; Matousek et al., 2008), utilizando las alícuotas de orina que se resguardaron en congelación en temperatura a -20°C . Este proceso analítico requiere dos pasos principales, la concentración y separación de las arsinas generadas a partir de las especies de iAs, MAs, DMAs mediante la criotrampa, sin importar el estado de oxidación del As. Esto se logra utilizando un gradiente de temperatura generado por una resistencia colocada alrededor de la celda de cuarzo, que es sumergida en nitrógeno líquido para enfriarla entre cada determinación. El segundo paso es la cuantificación de cada una de las especies mediante la técnica de absorción atómica y utilizando el generador de hidruros, cuyo principio es la absorción de la radiación por las especies presentes en el atomizador (en este caso la celda de cuarzo) y cuyo detector genera una señal proporcional a la absorbancia, teniéndose una señal proporcional a la concentración de iAs, MAs y DMAs presente en la muestra de orina. Las especies orgánicas menos tóxicas de arsénico tales como la arsenocolina o arsenobetaina no se detectan mediante este método; sin embargo, estos arsenicales no están asociados a la exposición y metabolismo del iAs, ya que la principal ruta de exposición para esa clase de formas arsenicales son alimentos tales como los mariscos. Se utilizó el material de referencia certificado NIST SRM 2669 nivel II (Especies de Arsénico en Orina Humana Congelada), teniendo una exactitud de entre 91% y 106% para iAs, 87% y 97% para MAs y 89% y 99% para DMAs, con una precisión menor al 10%.

Para la determinación de F^- , se utilizó el método electroquímico, usando un electrodo de ion selectivo y un electrodo de referencia, el método es semejante al utilizado para la determinación

de F⁻ en agua. Se utilizaron los materiales certificados F1110 y F1216 (Quebec Centre for Toxicology) de F⁻ en orina, que contenían 24.9 y 118 µmol F/L (1.31 y 6.21 mg/L, respectivamente). La exactitud del método estuvo entre 98% y 105%, con coeficientes de variación de 2 a 5%. Es importante mencionar, que se determinó la densidad de las muestras de orina con el fin de corregir posibles errores ligados a cambios en el volumen urinario relacionados con los hábitos de consumo de líquidos, estos datos de densidad urinaria fueron utilizados para corregir las concentraciones de iAs, MAs, DMAs y F⁻ en las muestras. En la literatura se recomienda estandarizar por densidad y no por creatinina ya que esta podría ser afectada por el metabolismo de los mismos tóxicos (González-Horta et al., 2015).

Discriminación alélica de las variantes polimórficas M287T (rs111191439)

El polimorfismo de la As3MT ubicado en la región M287T se determinó por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa) y sondas de oligonucleótidos alelo específicos (ASO por sus siglas en inglés) (Erdmann et al., 2015). El ADN genómico (gDNA) se purificó a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el kit wizard de PROMEGA®, este mismo ADN purificado, se utilizó en los análisis cuantitativos de ADNmt y longitud telomérica. Para los experimentos de PCR en tiempo real, los primers y las sondas de los oligonucleótidos alelo-específicos se diseñaron en el software Beacon de diseño 2.1 (PREMIER Biosoft International) y fueron adquiridos en Biosearch®, estos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de primer y sondas ASO para el análisis de polimorfismos en As3MT.

Nombre	Secuencia
Fwd primerM287T	AGGGCAAGAGCAGAAAGAATACCA
Rev primerM287T	CACTCTAAGACAGGACCAACCAA
Sonda1 M287T	TTGGCATCAAACATTAGTTC
Sonda 2 M287T	ATTGGCATCAAACGTTAGTTC

Se utilizaron los primers directo e inverso en un sistema de detección con PCR fluorescente.

Cada una de las muestras se analizó por duplicado, compuesta por 5 μ l de iQ™ Multiplex Powermix (Bio-Rad, Hercules, CA), además de 300 nmoL de cada uno de los primer (rev y fwd) y 200 nmoL de cada sonda (1 y 2). Se utilizó un termociclador con sistema de detección para PCR tiempo real modelo CFX96 Touch de Bio-Rad, siendo las condiciones las que se describen a continuación, una incubación inicial de 3 minutos a 95°C y 45 ciclos de amplificación de 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 60°C, terminando con 15 segundos a 95°C. Posteriormente se identificó por fluorescencia los valores normalizados de los alelos salvajes (T) y los alelos mutantes (C) (S1 Orange 54, S2 Calfluor red 610). Se determinó el genotipo de cada muestra generándose tres posibles combinaciones TT, CT, CC.

Determinación del número de copias relativas de ADN mitocondrial (ncADNmt) y longitud telomérica

Se utilizó PCR tiempo real para la amplificación de un gen del ADN mitocondrial en relación a un gen de copia única (β -globina), de tal manera se cuantifican de manera relativa las unidades de copias de ADN mitocondrial mediante el cociente del gen mitocondrial ND1/gen de la beta-globina (Mt/S). Se realizó una curva de calibración a partir de una serie de estándares de ADN en un intervalo de 66.00 - 2.06 ng; los estándares de ADN se prepararon a partir de una solución compuesta de 20muestras tomadas al azar del mismo estudio. La mezcla de reacción para la PCR se realizó utilizando una mezcla de 5 μ L de SuperMix SsoFast EvaGreen © de Bio-Rad, y 500nM de los oligos directos (F) y reversos (R) tanto para amplificar el gen ND1 mitocondrial como para el gen de la Beta-Globina, además de un total de 75 ng de ADN de cada muestra. El cociente Mt/S se calculó a partir de la curva de calibración para cada muestra utilizando el Ct obtenido en la qPCR. El control de calidad en la curva consistió en tener un valor de $r=0.999$, una eficiencia de = 99% y una pendiente de -3.21; cada ensayo se realizó por triplicado considerando una variabilidad aceptable cuando el coeficiente de variación (CV) en los CT fue menor del 2%. Los valores medios de las tres determinaciones realizadas tanto para el gen mitocondrial como para el gen endógeno se utilizaron para calcular el cociente Mt/S (Hou et al., 2010; Pavanello et al.

2013). Se utilizó un termociclador con sistema de detección para PCR tiempo real modelo CFX96 Touch de Bio-Rad, siendo las condiciones de amplificación para la determinación de ncADNmt mediante el gen ND1 y para el gen de la beta-globina 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y posteriormente 15 segundos a 95°C. La secuencia de los nucleótidos se puede observar en la tabla 8.

Tabla 8. Secuencias de los nucleótidos utilizados en la determinación de las copias relativas de ADN mitocondrial y la longitud telomérica relativa.

Gen	Secuencia
ND1 Mitocondrial	(F) 5'-CACCCAAGAACAGGG TTTGT-3' (R) 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'
Telómero	(F) 5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3' (R) 5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA-3'
Beta-globina	(F) 5'-GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3' (R) 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

Para la evaluación de la longitud telomérica relativa también se utilizó el método de PCR tiempo real, para esto, se determinó la longitud de manera relativa a un gen endógeno, nuevamente el gen de copia única (β -globina) obteniéndose un cociente Telómero/beta-globina (T/S). La metodología para evaluarlo es semejante a la utilizada para la determinación de número de copias de ADN mitocondrial, basándose nuevamente en ampliación de la secuencia repetitiva en tándem del telómero, por el método de PCR, dicha secuencia se puede observar en la tabla 7. Se construyó una curva de calibración con estándares de ADN en concentraciones de 66 a 2.06 ng, y a partir de ella se estimó el cociente T/S expresado como el valor de Ct correspondiente a cada medida (por triplicado), los valores medios de las tres determinaciones realizadas tanto para el telómero como para el gen endógeno se utilizaron para calcular el cociente T/S. Se utilizó una mezcla de 5 μ L de SuperMix SsoFast EvaGreen[®] de Bio-Rad, 400nM de los oligos F y R para telómero y 500 nM de los oligos F y R del gen de la beta-globina, además de un total de 75 ng de ADN de cada muestra (Alegoría-Torres et al., 2016). Se utilizó un termociclador con sistema de

detección para PCR tiempo real modelo CFX96 Touch de Bio-Rad, siendo las condiciones de amplificación para la determinación de la longitud telomérica relativa de 1 ciclo a 95°C de 15 segundos, 15 segundos a 49°C y 35 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 10 segundos a 62°C y 15 segundos a 74°C. Las condiciones para la beta-globina son las mismas utilizadas en el ensayo para ncADNmt.

Tratamiento estadístico de los datos.

Se obtuvieron medidas de tendencia central, como la media o la mediana; los porcentajes correspondientes además de medidas de dispersión tanto para los biomarcadores de efecto como para las covariables. Posteriormente, para los biomarcadores ncDNAmt y telómero se realizaron comparaciones por grupos de edad, género, sitio mediante pruebas de U Mann-Whitney o t de student, también se analizaron las covariables y posibles variables confusoras mediante pruebas de correlación de pearson, así mismo, se desarrollaron modelos de regresión lineal múltiple para cada biomarcador de efecto y para los posibles escenarios de co-exposición a F y iAs ajustando el modelo por edad. Por último, se determinaron las razones de odds para la exposición a F y iAs de manera individual y conjunta para los biomarcadores de efecto, así como las razones de odds para los genotipos estudiados. Se utilizó el programa estadístico SPSS[®] y Sigma plott[®].

Los resultados se consideraron significativos cuando la $p < 0.05$. En la sección de resultados se muestran además los intervalos de confianza para un nivel de certidumbre del 95% para las OR y el poder de las pruebas estadísticas cuando es el caso.

Capítulo V

Resultados

iAs y F⁻ en agua

Los resultados se observan en la tabla 8. Se puede observar que en solo dos comunidades no hay presencia de iAs en agua de grifo en niveles preocupantes. Las muestras corresponden en su mayoría a grifos de escuelas y en algunos casos en los que no había acceso a las mismas se tomaron de domicilios particulares o a llaves de lugares públicos.

Tabla 9. Concentración de arsénico y fluoruro en agua de grifo y los cocientes de riesgo no cancerígeno estimados para cada comunidad.

Elemento	Sitio	n	Concentración en agua mg/L Media (min-max)	Dosis de exposición mg/kg/día	Cociente de Riesgo no cancerígeno
Arsénico	Jerez	10	0.019 (0.008 – 0.062)	5.0E-04	1.6
	El Visitador	4	0.022 (0.018 – 0.025)	6.0E-04	1.9
	Guadalupe	8	0.078 (0.021 – 0.233)	2.0E-03	6.7
	Ojocaeliente	5	0.186 (0.125 -0.298)	4.8E-03	16.1
	Villanueva	3	0.006 (0.004 -0.0074)	2.0E-04	0.5
	Tabasco	4	0.014 (0.008 -0.025)	4.0E-04	1.2
	Huanusco	3	0.026 (0.025 – 0.026)	7.0E-04	2.2
	Jalpa	5	0.019 (0.013 – 0.035)	5.0E-04	1.7
Fluoruro	Jerez	10	1.8 (1.6 - 2.3)	5.0E-02	0.8
	El Visitador	10	1.3 (0.8 - 2.4)	3.0E-02	0.6
	Guadalupe	6	0.45 (0.4 - 0.5)	1.0E-02	0.2
	Ojocaliente	4	0.7 (0.6 - 0.8)	2.0E-02	0.3
	Villanueva	3	0.4 (0.3 - 0.6)	1.0E-02	0.2
	Tabasco	5	1.9 (0.8 - 3.0)	5.0E-02	0.8
	Huanusco	4	1.1 (0.4 - 1.9)	3.0E-02	0.5

Las dosis de exposición se calcularon basándose en los datos de agua correspondientes a cada sitio.

Estimación de la exposición y caracterización del riesgo

En el primer caso se obtuvo un valor representativo de la dosis de exposición para cada sitio y, por ende, un valor de cociente de riesgo. Los cocientes de riesgo no cancerígeno y las dosis de exposición para cada comunidad se muestran en la tabla 9, mientras que la

dosis de exposición para adultos y el cociente de riesgo cancerígeno se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Cociente de riesgo cancerígeno estimado para la exposición a arsénico en agua de grifo

Sitio	Población (habitantes)	Concentración de iAs mg/L Media (min-max)	Dosis de exposición mg/kg-día	Cociente de riesgo cancerígeno (individual) ^a
Jerez	57610	0.019 (0.008 – 0.062)	5.40E-04	8.10E-04
El Visitador	532	0.022 (0.018 – 0.025)	6.30E-03	9.40E-03
Guadalupe	159991	0.078 (0.021 – 0.233)	2.20E-03	3.30E-03
Ojocaliente	40740	0.186 (0.125 -0.298)	5.30E-03	8.00E-03
Villanueva	29395	0.006 (0.004 -0.0074)	1.70E-04	2.60E-04
Tabasco	15656	0.014 (0.008 -0.025)	4.00E-04	6.00E-04
Huanusco	4306	0.026 (0.025 – 0.026)	7.40E-04	1.10E-03
Jalpa	23557	0.019 (0.013 – 0.035)	5.40E-04	8.10E-04

^a Riesgo cancerígeno estimado para la exposición a arsénico en agua de grifo.

Como se puede observar, las dosis de exposición obtenidas a partir de las iteraciones de Montecarlo, tanto para la población infantil correspondientes a iAs y F⁻, como la dosis de exposición para la población adulta se expresan mediante una gráfica de frecuencia acumulada en la figura 6, esto con el fin de observar los percentiles 50, 90, 95 y 99, que son valores que se consideran para la toma de decisiones (WHO, 2006b), en la gráfica también se puede apreciar la zona atenuada del lado izquierdo de la distribución el porcentaje de la población que se estima, está expuesta a una dosis considerada segura según el criterio aplicable, el cual se enuncia en el extremo inferior izquierdo de cada gráfica.

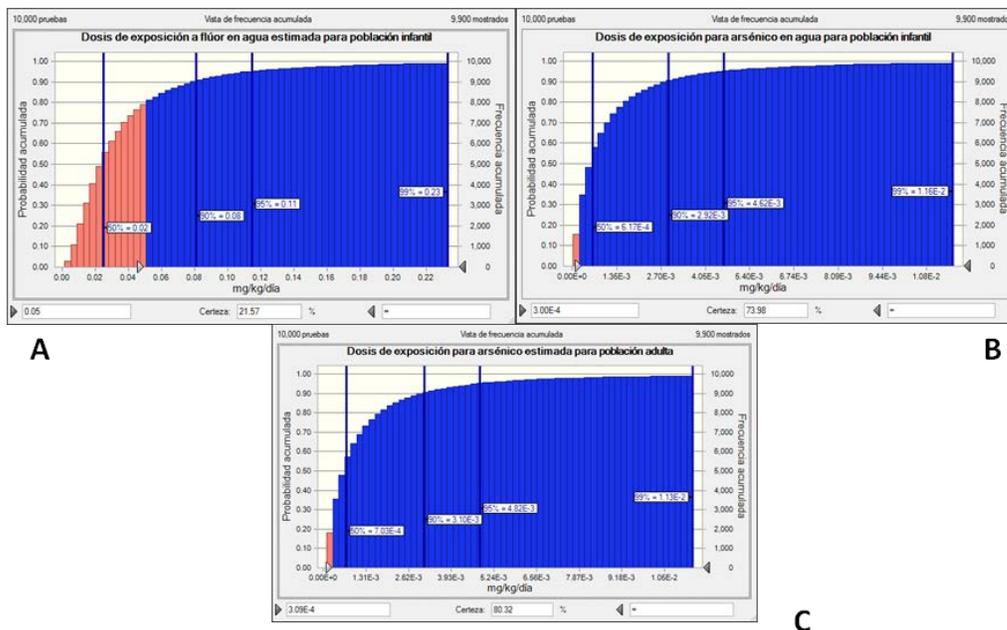


Figura 6. Distribución de frecuencia acumulada para las dosis de exposición estimadas para cada contaminante. A) Dosis de exposición a fluoruro en agua para población infantil. B) Dosis de exposición a arsénico en agua para población infantil. B) Dosis de exposición a arsénico en agua estimada para población adulta (dosis de exposición a lo largo de la vida, utilizada para calcular el cociente de riesgo cancerígeno para arsénico). El área atenuada representa el porcentaje de la población que se estima está expuesta a una dosis menor que el criterio en salud sugerido por la EPA (RfD) para cada contaminante.

Las dosis de exposición estimadas para la población que vive en la zona de estudio mediante el método probabilístico de evaluación de riesgos (EPA, 2001) se resumen en la tabla 11. A partir de estas dosis de exposición, se procedió a calcular los cocientes de riesgo no cancerígeno y cancerígeno.

Tabla 11. Estimación de la dosis de exposición para fluoruro y arsénico en agua.

Contaminante	Población	Dosis de exposición (mg/kg/día)				Criterio de seguridad	Nombre	mg/kg/día	Ref.	% arriba del nivel de seguridad
		Percentil								
		50	90	95	99					
Fluoruro	Infantil	0.02	0.08	0.11	0.23	RfD	0.05	EPA ^a		22
Arsénico	Infantil	6.2E-04	2.9E-03	4.6E-03	1.1E-02	RfD	3.0E-04	EPA ^a		73
Arsénico	Adultos	7.0E-04	3.1E-03	4.9E-03	1.1E-02	RfD	3.0E-04	EPA ^a		80

(EPA, 2002)^a

En adición, se estimó el porcentaje de la población que pudiera estar en riesgo utilizando como criterio el valor de la unidad para el riesgo no cancerígeno y el valor de $1.0E^{-05}$ para el riesgo cancerígeno, esta información se incluye en la tabla 12.

Tabla 12. Estimación del riesgo en salud por exposición a fluoruro y arsénico en agua.

	Población	Riesgo	Riesgo teórico estimado				Criterio de seguridad	Ref.	% arriba del nivel de seguridad
			Percentil						
			50	90	95	99			
Fluoruro	Infantil	No cancerígeno	0.4	1.4	1.9	3.9	1	EPA	16
Arsénico	Infantil	No cancerígeno	2.0	10.6	16.3	41.5	1	EPA	74
Arsénico	Adultos	Cancerígeno	1.0E-03	4.5E-03	7.4E-03	1.7E-02	1.0E-05	EPA	99

(EPA 2001, 2014; ODEQ 1999).

Población infantil

Un total de 116 niños de entre 5 a 13 años de edad participaron en el estudio. Estos niños fueron los que respondieron a la invitación de participar en el estudio, en la tabla 13 se describen la edad, el peso, la talla y el IMC para cada sitio y genero, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los valores medios de los grupos entre los sitios de muestreo.

Tabla 13. Descripción de la población infantil estudiada en Ojocaliente y Guadalupe Zacatecas.

Género		Sitio									
		Ojocaliente				Guadalupe					
		n	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Est.	n	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Est.
Masculino	Edad (años)	10	6	13	2	34	9	5	11	2	
	Peso (Kg)	36	18	58	12		33	20	56	10	
	Talla (metros)	27	1.39	1.13	1.58		0.11	1.34	1.17	1.50	0.10
	IMC (Kg/m ²)	19	13	27	4.5		18	14	26	3.4	
Femenino	Edad (años)	9	5	11	2	28	9	6	13	2	
	Peso (Kg)	32	22	68	11.7		36	20	64	13.1	
	Talla (metros)	27	1.34	1.16	1.53		0.11	1.39	1.18	1.56	0.11
	IMC(Kg/m ²)	17	12	29	3.8		18	13	27	4	

No se encontraron diferencias significativas entre los sitios al contrastar las medias por la prueba de U de Mann Whitney $p > 0.05$.

Al categorizar el IMC, como se muestra en la tabla 14, se encontró una prevalencia alta de obesidad en la población masculina (33% para Ojocaliente y 25% en Guadalupe) en relación a la femenina (6.7% para Ojocaliente y 10.5% en Guadalupe), así como un porcentaje mayor de desnutrición en la población femenina de Guadalupe (42%). La categorización del IMC se realizó siguiendo las recomendaciones de la OMS (WHO, 2009) para población infantil.

Tabla 14. Análisis del IMC categorizado en la población infantil en Ojocaliente y Guadalupe Zacatecas.

		Sitio			
		Ojocaliente		Guadalupe	
		Género		Género	
		Masculino (%) ^a	Femenino (%) ^a	Masculino (%) ^a	Femenino (%) ^a
IMC Categorizado	Desnutrición severa	27	27	10	11
	Desnutrición	13	20	15	42
	Peso normal	27	40	45	11
	Sobrepeso	0	7	5	26
	Obesidad	33	7	25	11

^a Se encontró una diferencia significativa para el índice de masa corporal asociada al género de la población ($p= 0.022$), no así entre los sitios de estudio ($p<0.05$) mediante una prueba de chi cuadrada.

La información recopilada en los cuestionarios de exposición realizados a los padres de familia cuyos hijos participaron en el estudio, se resume en la tabla 15. Se realizó una prueba de chi cuadrada con el fin de encontrar diferencias entre las dos comunidades en características sociodemográficas como el nivel socioeconómico, así como también en el comportamiento sobre el consumo de agua, la principal fuente de agua usada por los padres para consumo y preparación de los alimentos, el tratamiento que se le daba al agua en el hogar antes de ser utilizada, así como el conocimiento de los adultos sobre los posibles riesgos asociados a la existencia de contaminantes en el agua. Como se puede ver en la tabla 14, no se encontraron diferencias significativas entre las dos comunidades estudiadas.

Tabla 15. Características socio demográficas de la población estudiada y comportamientos asociados al uso y tratamiento del agua de consumo.

		Sitio		
		Ojocaliente n = 54	Guadalupe n = 62	Valor de p*
Categorías nivel socioeconómico ^a	AB	4.3%	0.0%	0.143
	C+	6.5%	6.7%	
	C	41.3%	36.7%	
	D+	28.3%	16.7%	
	D	15.2%	35.0%	
	E	4.3%	5.0%	
Fuente principal de agua de consumo	Llave	28.3%	37.5%	0.544
	Pozo	6.5%	0.0%	
	Embotellada	56.5%	56.3%	
	Tratada	6.5%	3.1%	
	Otro	2.2%	3.1%	
Fuente principal de agua utilizada para cocinar	Llave	76.1%	87.9%	0.23
	Pozo	0.0%	0.0%	
	Embotellada	21.7%	9.1%	
	Tratada	2.2%	0.0%	
	Otro	0.0%	3.0%	
Tratamiento que le da al agua de bebida	Ninguno	71.7%	71.0%	0.593
	Le agrega cloro	8.7%	9.7%	
	La hierve	15.2%	9.7%	
	Otro	4.3%	9.7%	
Número de vasos de agua natural que consume al día	No le gusta el agua	6.5%	0.0%	0.053
	1-2 vasos	30.4%	53.1%	
	3-4 vasos	28.3%	40.6%	
	Más de 4 vasos	34.8%	6.3%	
Manifestó conocer la presencia de contaminantes en el agua	No	87.0%	87.9%	0.592
	Si	13.0%	12.1%	
Manifestó conocer los efectos asociados a la exposición de contaminantes en el agua	No	72.1%	65.6%	0.559
	Si	27.9%	34.4%	

^a Índice de Niveles Socio Económicos (NSE), propuesto por la Asociación Mexicana de Inteligencia de Mercado y Opinión (AMAI), son siete niveles que clasifican a los hogares mexicanos en relación a su capacidad para satisfacer las necesidades de sus integrantes en términos de: vivienda, salud, energía, tecnología, prevención y desarrollo intelectual, siendo el AB+ el más alto y el E el más bajo.

*No se encontraron diferencias significativas entre los sitios de estudio ($p > 0.05$) usando una prueba de chi cuadrada.

Al analizar las respuestas que los padres dieron a la pregunta de que fuente usan principalmente para beber y para preparar alimentos, se encontró una asociación entre este comportamiento y la concentración de AsT en la orina de los niños, encontrándose que los hijos de los padres que manifestaron usar agua purificada tanto para beber como para cocinar, presentaron los valores más bajos de AsT en orina en comparación con los que manifestaron usar agua de grifo tanto para cocinar como para beber (Rho de spearman -0.40 $p = 0.001$), este comportamiento se describe en la figura 7.

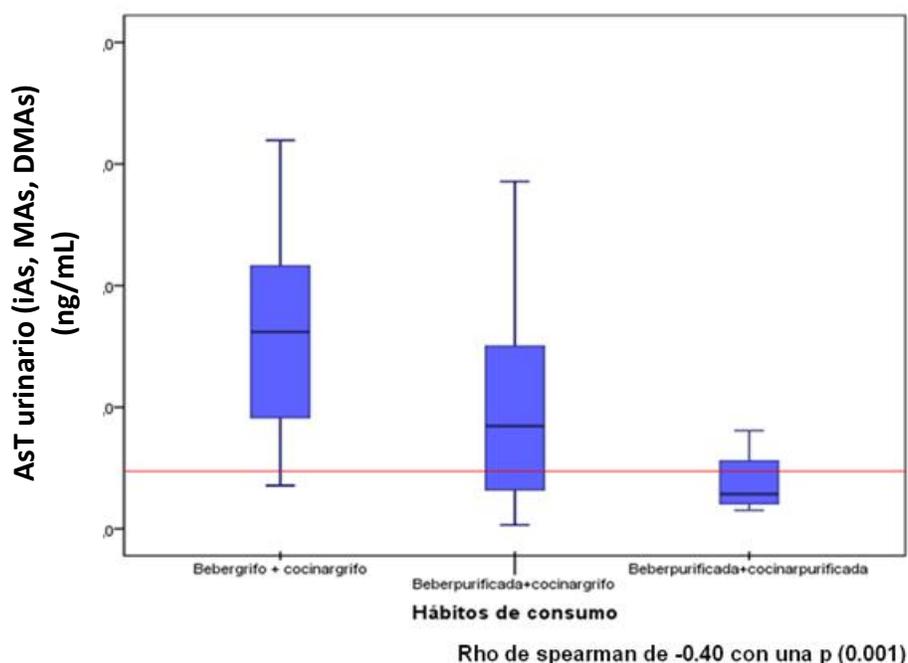


Figura 7. Correlación entre el consumo de agua de grifo y la exposición a arsénico en la población infantil.

Como se puede ver, los niños cuyos padres preparaban los alimentos con agua de grifo, al igual que el grupo de niños cuyos padres usaban el agua de grifo para beber y preparar alimentos, superan el valor del índice biológico de exposición (BEI[®]) para arsénico en orina en una proporción mayor que los que lo hacen con agua purificada.

Concentración de AsT y F⁻ en orina

La concentración de AsT (Σ iAs, MAs and DMAs) en orina se muestran en la figura 8. Los resultados están organizados en base a intervalos <35, 35–70, >70–140, >140 ng/mL que corresponden a 1x, 2x y 4x veces el valor de BEI[®] de 35ng/mL para arsénico (ACGIH, 2002) y otras cuatro categorías <1, 1–2, >2–4, >4 μ g/mL basadas en el BEI[®] de 2 μ g/mL para F⁻ (ACGIH, 2012). En el presente estudio, 69% de las muestras están arriba del BEI para As, mientras que 48.9% está arriba del BEI para F esto se resume en la tabla 16.

Tabla 16. Concentración^a urinaria de Arsénico y F⁻ en población infantil del estado de Zacatecas

	Intervalo de Concentración	n	Media (min-max)	% de muestras
AsT (Σ iAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	<35	33	18.65 (3.7-31.3)	31.4
	35-70	35	53.9 (35.3 - 69.8)	33.3
	>70-140	23	102.3 (70.2 -139.1)	21.9
	>140	14	182.6 (146.3 - 238.5)	13.3
F ⁻ (μ g/mL)	<1	20	0.69 (0.25 - 0.98)	18.8
	1-2	34	1.48 (1-1.95)	32.0
	>2-4	34	2.68 (2.01-3.98)	32.0
	>4	18	4,91 (4.03-7.06)	16.9

^aAjustado por densidad urinaria

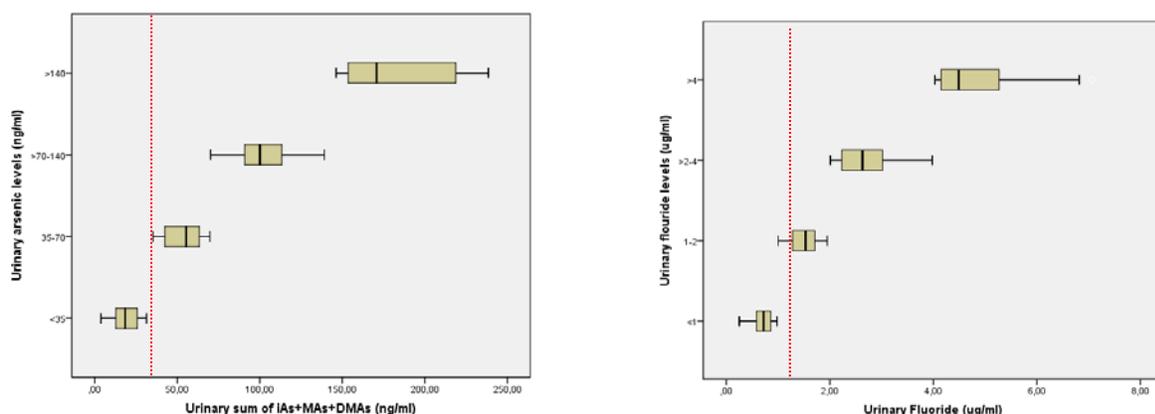


Figura 8. Niveles de exposición para AsT y F⁻ en población infantil.

La línea roja representa el límite BEI.

Al comparar los niveles de exposición a los contaminantes entre ambas localidades, se encontró que Ojocaliente presenta un escenario de mayor exposición ($p < 0.001$) ya que la media geométrica de AsT (\sum iAs, MAs, DMAs) es 72.0 ng/mL, mientras que es de 38.9 ng/mL en Guadalupe, así mismo, la media geométrica para F⁻ es 3.1 μ g/mL en Ojocaliente y 1.5 μ g/mL en Guadalupe (tabla 17).

Tabla 17. Comparación de la exposición entre ambos sitios.

	Sitio	n	Mediana	P	Prueba
AsT (\sumiAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	Ojocaliente	47	72.0	<0.001	U Mann-Whitey
	Guadalupe	58	38.9		
F⁻ (μg/mL)	Ojocaliente	47	3.1	<0.001	U Mann-Whitey
	Guadalupe	58	1.5		

Pruebas no paramétricas

En Guadalupe, aunque la exposición sea menor en relación a Ojocaliente, la media geométrica supera el índice biológico de exposición para ambos contaminantes estudiados. Esto se puede apreciar en la figura 9.

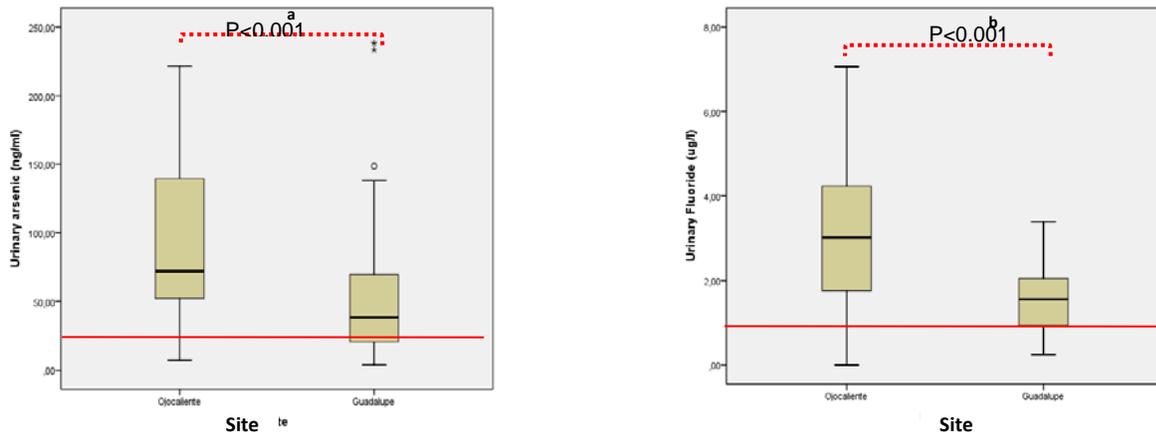


Figura 9. Diferencias en los niveles de exposición entre los dos sitios estudiados.

^{ab}Prueba estadística U de Mann-Whitney para encontrar diferencias entre la mediana del arsénico urinario (ng/ml) en los sitios estudiados.

En la tabla 18 se muestra el perfil urinario de excreción de iAs y los metabolitos del iAs. Cuando se comparan los porcentajes de cada especie de arsénico en relación al género, se encontraron diferencias ($p < 0.01$), las niñas presentaron un aumento en la proporción urinaria de iAs y un menor cociente del segundo paso del metabolismo de iAs, ya que tienen un menor porcentaje de DMAs en relación a los niños.

Tabla 18. Metabolitos urinarios de As en niños residentes en la zona de estudio en el estado de Zacatecas, México.

	Género					
	Masculino			Femenino		
	Media	Mediana	Error estándar	Media	Mediana	Error estándar
%iAs	13.9	14.0 ^a	0.75	16.1	16.1 ^a	0.63
%MAs	12.6 ^b	12.0	0.56	14.4 ^b	14.0	0.56
%DMAs	73.6 ^b	74.5	1.04	69.5 ^b	68.8	0.92
DMAs/MAs	6.7	6.2 ^c	0.39	5.3	5.0 ^c	0.28
MAs/iAs	1.0	1.0	0.05	1.0	0.9	0.05

^a Diferencias entre los valores medios del porcentaje de arsénico inorgánico entre los grupos de niños y niñas ($p = 0.003$ usando una prueba U Mann Whitney).

^b Diferencias entre los valores medio del porcentaje de MAs y DMAs entre los grupos de niños y niñas ($p = 0.01$ y $p = 0.003$ mediante prueba t de student, respectivamente).

^c Diferencias entre el cociente DMAs/MAs entre los grupos de niños y niñas ($p = 0.009$ usando una prueba U Mann Whitney).

Análisis de la asociación entre los biomarcadores de exposición y efecto

Para poder estimar el riesgo entre la exposición y los biomarcadores, se realizó un análisis bivariado, categorizando las variables involucradas como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Categorías utilizadas para realizar el análisis bivariado

Variable	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75
AsT urinario(ng/mL)	26.4	57.1	97.0
F ⁻ urinario(μg/mL)	1.20	1.92	2.99
Telómero T/S	0.06	0.10	0.15
ncADNmtM/S	1.45	2.06	4.81
MAs/iAs	0.7	1.0	1.2
DMAs/MAs	4.1	5.7	7.0

Se consideró como criterio de corte el percentil 50 (p50) tanto para la exposición, siendo considerado como el grupo expuesto (+) si era mayor al p50 y negativo (-) grupo no expuesto si estaba por debajo del p50. En el caso del efecto, se consideró a la inversa, como positivo o en el grupo con en efecto a estudiar si el valor estaba por debajo del p50 y negativo si estaba arriba de él. De esta manera se calculó el OR, los resultados se aprecian en la tabla 20. Se estimó que concentraciones de AsT urinario mayores al p50, aumenta las probabilidades de una disminución en el número de copias de ADN mitocondrial (OR = 4.5 IC95% (1.22-18.3) p= 0.021). En el caso del F⁻ urinario la asociación no llega a ser estadísticamente significativa.

El índice MAs/iAs es un indicador de la eficiencia del primer paso de metilación del iAs, así como el índice DMAs/MAs es del segundo paso. Valores altos en los índices MAs/iAs y DMAs/MAs se consideraron como de mayor eficiencia por lo que el grupo con un valor mayor al p (50) se consideró como el grupo no expuesto (-) y un valor menor al p (50) se consideró como el grupo expuesto (+) con el fin de aplicar la prueba estadística de chi cuadrada; las variables de efecto se consideraron de la misma manera que en el ensayo anterior. Es así que se encontró una asociación entre la disminución de la capacidad del segundo paso de la metilación y la

disminución en el número de las copias de ADN mitocondrial (OR = 3.45 IC95% (1.02-12.4) p = 0.023), para el primer paso la asociación no llega a ser tan fuerte (OR = 2.8 IC 95% (0.8-9.8) p = 0.046). Para la longitud telomérica ninguno de los escenarios propuestos llega a tener una asociación significativa (tabla 20).

Tabla 20. Asociación entre la exposición y la capacidad de metabolizar el iAs y los biomarcadores de efecto estudiados

		ncADNmt		OR	IC 95%	Valor p
		+	-			
AsT urinario (Σ iAs, MAs, DMAs)	+	14	9	4.5	1.22-18.3	0.021
	-	5	15			
F urinario	+	14	11	2.7	0.77-10.1	0.063
	-	6	13			
Longitud telomérica						
		+	-	OR	IC 95%	Valor p
AsT urinario (Σ iAs, MAs, DMAs)	+	10	10	0.8	0.2-3.6	0.831
	-	7	6			
F urinario	+	11	11	1	0.2-4.3	0.999
	-	6	6			
ncADNmt						
		+	-	OR	IC 95%	Valor p
MAs/ iAs	+	13	8	2.8	0.8-9.8	0.046
	-	9	16			
DMAs/MAs	+	14	7	3.45	1.02-12.4	0.023
	-	9	16			
Longitud telomérica						
		+	-	OR	IC 95%	Valor p
MAs/iAs	+	9	8	1.2	0.3-5.1	0.373
	-	8	9			
DMAs/MAs	+	11	9	1.6	0.4-6.7	0.256
	-	6	8			

Criterio de corte p50 para los biomarcadores de exposición y efecto. (Tabla 19).

Posibles escenarios de co-exposición

Con el objetivo de evaluar la exposición simultánea a iAs y F⁻, y los posibles efectos asociados a esta, se plantearon diferentes escenarios, los cuales se resumen en la tabla 21. Los escenarios se clasificaron como de alta o baja exposición a As y F, basándonos nuevamente en el BEI y las posibles combinaciones entre estas.

Tabla 21. Escenarios de co-exposición estudiados

	AsT (Σ iAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	F ⁻ en orina (μ g/mL)	N	Media geométrica	D.E.
ncDNAmt	baja (<35)	baja (<2)	12	3.8	1.9
	alta (\geq 35)	baja (<2)	9	2.6	2.1
	baja (<35)	alta (\geq 2)	2	4.3	1.4
	alta (\geq 35)	alta (\geq 2)	23	2.4	1.8
Longitud Telomérica	baja (<35)	baja (<2)	8	0.117	2.08
	alta (\geq 35)	baja (<2)	5	0.075	1.73
	baja (<35)	alta (\geq 2)	1	0.100	NA
	alta (\geq 35)	alta (\geq 2)	20	0.097	2.35

D.E. representa la desviación estándar

Con base en la revisión bibliográfica y a los resultados de los análisis bivariados realizados anteriormente, se eligieron como posibles covariables para ajustar el modelo multivariado la edad, el género y el índice de masa corporal, esto porque diversos autores se refieren a ellos como variables que afectan directa o indirectamente los biomarcadores estudiados. Los resultados obtenidos al organizar los biomarcadores en base a estas covariables se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Comportamiento de los biomarcadores de efecto estudiados en relación a la edad, el género y el índice de masa corporal de la población estudiada.

	Variable	n	ncADNmt(media ± SD)		Telómero (media ± SD)	
Edad	6-9 años	58	3.04±1.8	p = 0.005 ^a	0.09±2.4	p > 0.05 ^a
	10 a 13 años	58	1.96±2.2		0.10±1.9	
Genero	Femenino	55	2.24±1.9	p > 0.05 ^a	0.09±1.9	p > 0.05 ^a
	Masculino	64	2.65±2.2		0.10±2.5	
Índice de masa corporal	Desnutrición severa	14	1.62±1.4		0.10±1.7	
	Desnutrición	16	1.62±3.2		0.08±2.1	
	Peso normal	21	2.37±1.8	p > 0.05 ^b	0.08±1.8	p > 0.05 ^b
	Sobrepeso	7	2.22±2.5		0.11±1.6	
	Obesidad	13	2.85±1.9		0.11±2.5	

No se contó con el diagnóstico de índice de masa corporal para la totalidad de los niños (n = 71 de 116 totales)

^a Prueba de t student

^b Prueba de ANOVA por rangos

A partir de esta información se realizaron los diversos análisis de regresión múltiple, solo los resultados que cumplieron con el poder estadístico (más de 0.80) se muestran en la tabla 11. Algunos modelos no fue posible realizarlos ya que la n resultante de la combinación de niveles de exposición fue muy pequeña, lo que restringía los grados de libertad. Como puede observarse, se analizaron los modelos sin ajustar, es decir, sin considerar las covariables y ajustando el modelo por las mismas. Utilizando este tipo de estrategia, se encontró una asociación negativa entre el AsT urinario y las copias de ADN mitocondrial $\beta = -0.32$ IC%95 (-0.55 a -0.09) p = 0.006 y una R de 0.41 en el modelo sin ajustar y sin incluir al F⁻ urinario por presentar colinearidad y en el modelo ajustado una $\beta = -0.36$ IC%95 (-0.67- -0.05) p = 0.02 y una R de 0.59, cuando se consideró la interacción de la exposición al iAs y al F⁻ se obtuvo una asociación estadística negativa entre la exposición y las ncADNmt $\beta = -0.08$ IC%95 (-0.15 a -0.01) p = 0.02 en el modelo sin ajustar y de $\beta = -0.08$ IC%95 (-0.14 a -0.01) p = 0.02 en el modelo ajustado por edad (esta variable fue la única que alteraba el valor de R).

Tabla 23. Análisis de la asociación entre los biomarcadores de efecto y la co-exposición a arsénico y flúor

Variable		Modelo sin ajustar					Modelo ajustado					
Dependiente	Explicativa	Coefficiente β	IC 95%		Valor p	R	Explicativa	Coefficiente β	IC 95%		Valor p	R
ncADNmt	AsTurinario $\sum(i$ As, MAs, DMAs)	-0.36	-0.67	-0.04	0.03	0.41	AsT urinario $\sum(i$ As, MAs, DMAs)	-0.58	-1.04	-0.12	0.02	0.59
	Furinario	0.06	-0.35	0.47	0.77		Furinario	0.34	-0.20	0.88	0.21	
	Constante	2.33	1.25	3.40	0.00		IMC	0.03	-0.03	0.10	0.31	
							Genero	-0.28	-0.73	0.17	0.21	
							Edad	-0.14	-0.27	0.00	0.04	
							Constante	3.95	1.54	6.36	0.00	
	AsT urinario $\sum(i$ As, MAs, DMAs)	-0.32	-0.55	-0.09	0.006	0.41	AsT urinario $\sum(i$ As, MAs, DMAs)	-0.36	-0.67	-0.05	0.02	0.55
	Constante ^a	2.24	1.35	3.14	>0.00 1		IMC	0.03	-0.04	0.09	0.38	
							Genero	-0.33	-0.78	0.12	0.15	
							Edad	-0.11	-0.24	0.02	0.08	
						Constante ^a	3.27	1.09	5.45	0.005		
	AsT urinario x Furinario	-0.08	-0.15	-0.01	0.02	0.34	AsT urinario x F urinario	-0.08	-0.14	-0.01	0.02	0.43
	Constante	1.26	0.99	1.52	0.00		Edad	-0.09	-0.20	0.01	0.07	
							Constante	2.11	1.15	3.07	0.00	
Telómero	AsT urinario	-0.80	-1.52	-0.09	0.03	0.54	AsT urinario	-0.81	-1.54	-0.08	0.03	0.55
	F urinario elevado ^b	1.25	0.11	2.39	0.03		F urinario elevado ^b	1.22	0.04	2.39	0.04	
							Edad	0.06	-0.17	0.28	0.61	
	Constante	-0.20	-3.04	2.64	0.88		Constante	-0.62	-4.00	2.75	0.70	

^aSe retiro del modelo la variable del F urinario por tener una correlación con el AsT urinario ($p < 0.0001$)

^bF urinario elevado > 2 μ g/mL (tabla 9). En este caso la variable se mantuvo en el modelo puesto que al representar solo los valores altos de F no presenta una correlación con el AsT urinario ($p > 0.05$). En este modelo solo se incluyó la covariable edad puesto que fue la única que aumentó el valor de R.

Continuando con el análisis se encontró una asociación negativa entre el AsT urinario y la longitud telomérica $\beta = -0.80$ IC%95 (-1.52a -0.09) $p = 0.03$ en el modelo sin ajustar y en el modelo ajustado una $\beta = -0.81$ IC%95 (-1.54a -0.08) $p = 0.03$ y para el flúor elevado una asociación positiva $\beta = -1.25$ IC%95(0.11 a - 2.39) $p = 0.03$ en el modelo ajustado y de $\beta = 1.22$ IC%95 (0.04a - 2.39) $p = 0.04$ en el modelo ajustado.

En este escenario se consideraron solamente los individuos que presentaron un valor de F-urinario mayor al BEI ($>2 \mu\text{g/mL}$). En este caso, aunque ninguna de las covariables estudiadas llegó a ser significativa dentro del análisis estadístico ($p > 0.05$), se mantuvieron en el modelo puesto que aumentaban el valor de R (tabla 23).

Estudio de la prevalencia del polimorfismo en As3MT en la población infantil.

Se determinó el genotipo del M287T en el gen de la As3MT, los resultados se muestran en la tabla 24. Se calculó una prevalencia de 0.91 para el gen silvestre y de 0.09 para el gen mutado. La población cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), en este caso se analizaron solamente 74 muestras.

Tabla 24. Resultados del genotipo de la As3MT en la población estudiada

Genotipo	CC	CU	UU
n	64	8	2

Al realizar un análisis bivariado, se categorizaron las variables como se muestra en la tabla 25, con base en el genotipo wild type (CC) y el mutado (CU y UU). No se encontró ninguna diferencia entre el genotipo y las variables estudiadas.

Tabla 25. Categorización de las variables en base al genotipo de M287T.

		ncADNmt		Telómero		DMAs/MAs		MAs/iAs	
		n	Media	n	Media	n	Media	n	Media
M287T	CC	38	3.0 ± 2.01	32	0.12 ± 0.1	64	5.9 ± 2.73	64	0.89 ± 0.3
	CU, UU	7	2.9 ± 1.8	3	0.06 ± 0.1	10	6.1 ± 3.22	10	0.99 ± 0.4

Valores de p>0.05

		ncADNmt		Telómero		MAs/iAs		DMAs/MAs	
		+	-	+	-	+	-	+	-
M287T	CC	20	18	18	14	33	31	35	29
	CU, UU	3	4	2	1	4	6	5	5

Grupo (+) representa un valor inferior al p (50) para las variables ncADNmt, telómero, MAs/iAs, DMAs/MAs.

Capítulo VI

Discusión

El estado de Zacatecas, en su mayoría, tiene un suelo rico en minerales como la arsenopirita, fluorita y fluoroapatita, en el sur del estado se ha reportado actividad geotérmica, el clima predominante es semidesértico y la mayoría de los acuíferos del estado se consideran sobreexplotados (Mojarro-Davila et al., 2013), el agua destinada al abastecimiento público es de 113 hm³/año (Herrera-Toledo, 2012) además, se considera que la regulación y el control de los contaminantes en el agua suministrada para el consumo humano es uno de los retos a superar en la actualidad y en los años venideros (Vega, 2002). Se cuenta con información limitada sobre las concentraciones ambientales de iAsy F⁻ en agua en el estado de Zacatecas, en la tabla 2 se resumen los resultados encontrados en la literatura referentes a la zona de estudio Guadalupe, Zacatecas, en pozos de agua subterránea utilizados para el suministro de agua para uso humano. Estos antecedentes son concordantes con nuestros resultados, ya que en la zona de Guadalupe el intervalo de concentraciones de arsénico no presenta gran variabilidad con los reportados en años previos, solo para F⁻, nosotros encontramos valores un poco más bajos. Padilla y colaboradores estimaron que el mayor riesgo por exposición a estos contaminantes presentes en el agua, correspondía a los infantes menores de 12 años y las mujeres residentes en la zona (Padilla-Reyes et al., 2012). Para el resto de las zonas no se encontró información disponible en la literatura para realizar alguna comparación en relación a la variabilidad temporal de las concentraciones ambientales.

La exposición crónica al iAsy a F⁻ es principalmente debida al consumo de agua contaminada, esto debido a que se encuentra disponible para la población de manera permanente mientras residan en la zona (Armienta & Segovia, 2008; Bundschuh et al., 2012; Huang et al., 2015; McClintock et al. 2012). Las dosis de exposición a F⁻ en agua de grifo estimadas para cada comunidad, ni los cocientes de riesgo correspondientes sobrepasan el criterio en salud sugerido

por la OMS(WHO,2004); sin embargo, al estimarse el riesgo poblacional, se calculó que el 22% de la población pudiera estar expuesta a una dosis superior a la considerada segura y el 16% tiene riesgo de sufrir fluorosis dental; según los criterios de la EPA (EPA, 2014a), se recomienda realizar una intervención en la zona para mitigar el riesgo ya que tanto el p 90 y el 95 del cociente de riesgo no cancerígeno son mayores a la unidad (EPA, 2014b). Cabe resaltar que las dosis de exposición están calculadas para la población infantil, edad en la cual su dentadura está en formación por lo cual se consideran un grupo vulnerable, Irigoyen y colaboradores reportan que niños expuestos a concentraciones de F⁻ en agua de grifo menores a 0.7 mg/L presentan baja ocurrencia de fluorosis moderada o grave, mientras que a concentraciones de 1.6 mg/L se presenta fluorosis dental moderada o grave (Irigoyen-Camacho et al., 2016), en nuestro estudio solo dos comunidades, Guadalupe y Villanueva, tuvieron concentraciones medias de F⁻ menores a 0.7 mg/L. En Zacatecas se ha reportado un Índice de Fluorosis Comunitaria (IFC) mayor de 1 semejante a estados vecinos como Durango, San Luis Potosí y Aguascalientes y ocurrencia natural de F⁻ en agua (Betancourt-Lineares et al., 2013); se sabe que la fluorosis dental está fuertemente relacionada con la presencia de F⁻ en el agua utilizada para uso humano (Mariño 2013).

Para el arsénico, la dosis de referencia (RfD) y el nivel de mínimo riesgo (MRL) sugeridos por la EPA y el ATSDR (IRIS 1988; ATSDR 2007b) es de 0.0003 mg/kg/día. La dosis de exposición estimada para la comunidad de Villanueva está por debajo de estas dosis de seguridad, las demás comunidades tienen una alta probabilidad de que sus pobladores estén expuestos a dosis superiores al nivel de seguridad. De la misma manera, los cocientes de riesgo no cancerígeno superan la unidad, con excepción de Villanueva. Las dosis de referencia y de mínimo riesgo, se calcularon considerando la hiperqueratosis y posibles alteraciones vasculares. En el estado de Hidalgo, México, se han reportado diversos efectos en salud asociados a la presencia de iAs en el agua, Semeester y colaboradores reportaron en población crónicamente expuesta a iAs en agua cambios epigenéticos relacionados con diversos padecimientos asociados a la arsenicosis (Smeester et al., 2011), Del Razo y colaboradores, encontraron una asociación entre la

exposición a iAsy la prevalencia de diabetes (Del Razo et al., 2011) y por otro lado, también se han reportado lesiones en la piel cuya gravedad se ve alterada por factores de susceptibilidad individual (Valenzuela et al., 2009), en Zacatecas, la probabilidades de que se presenten estas mismas tendencias son altas, ya que según nuestras estimaciones, un 73% de la población infantil y un 80% de la población adulta podrían estar exponiéndose a dosis elevadas de este contaminante. Los percentiles 90 95 y 99 del cociente de riesgo no cancerígeno estimados para la población superan con mucho la unidad, ya que desde el percentil 50 se estima el doble del nivel de riesgo aceptable de 1, esperándose que el 74 % de la población esté por encima de este criterio de seguridad. Al igual que en el caso del F-, estas proyecciones justifican una intervención en el sitio (ODEQ, 1999; EPA, 2014b).

A partir del Factor de Riesgo Cancerígeno para iAs sugerido por la EPA (tabla 1), se estimó el cociente de riesgo cancerígeno para este contaminante, en todas las comunidades analizadas, con excepción de Villanueva, el cociente de riesgo carcinogénico excede el criterio de riesgo de 1×10^{-5} , en cuanto al riesgo poblacional, tanto el percentil 90, 95 y 99 superan los criterios de seguridad para la salud ambiental de 1×10^{-4} 1×10^{-5} 1×10^{-6} respectivamente, sugerido como criterio de decisión por diferentes organizaciones a nivel internacional. (Cotruvo, 1988; Hunter & Fewtrell, 2001; WHO, 2006), estimándose que un 99% de la población tiene probabilidades altas de estar expuesta a una concentración no segura de este contaminante. En este sentido, en el estado de Zacatecas, se ha reportado una incidencia de cáncer de piel, un tipo de cáncer asociado a la exposición a iAs (ATSDR, 2007b; McClintock et al., 2012), de 20 casos por cada 100 000 habitantes y se estima que esta incidencia se incrementa en un 10.5% anual (Pinedo-Vega et al., 2014).

La estimación del riesgo para la exposición a ambos contaminantes, a pesar de que comparten la misma ruta de exposición, presenta diferentes retos metodológicos, una es el hecho de que las dosis de referencia para iAsy F-están calculadas en base a diferentes efectos, hiperqueratosis y fluorosis dental, respectivamente, por lo que no es posible simplemente asumir un riesgo

aditivo. Aunque se sabe que el iAsy el F⁻ tienen efectos sobre el sistema nervioso central a la fecha no se cuenta con una dosis de referencia para este efecto; sin embargo, se debe considerar que se está empezando a acumular evidencia de los posibles riesgos en salud que se podría presentar para la población infantil el estar expuesta a esta mezcla al consumir el agua de grifo (Choi et al., 2012; Lu et al., 2000; Rocha-Amador et al., 2007; Wang et al., 2007). Actualmente no se cuenta con un Factor de Riesgo Cancerígeno para la evaluación del riesgo cancerígeno asociado a la exposición de F⁻ ya que aún las agencias reguladoras no reúnen evidencia suficiente que les permita elaborarlo, de hecho, la IARC aún no ha clasificado a este contaminante como carcinógeno, lo que impide estimar el riesgo por la metodología elegida para este trabajo.

Al no considerar las contribuciones de otras posibles rutas de exposición para los contaminantes estudiados, como el polvo, agua embotellada, leche y alimentos preparados con agua de grifo y en el caso específico del F⁻, el uso de sal fluorada y dentífricos, las dosis de exposición pueden estar subestimadas por lo que es un factor a considerar al diseñar la intervención en la zona. Asimismo, la desnutrición infantil es otro factor de incertidumbre que hay que considerar al momento de intervenir, ya que los mecanismos de defensa del organismo pudieran no estar en buenas condiciones por la falta de nutrimentos, por ejemplo, en el caso del iAs, se sabe que la deficiencia de folatos en la dieta, disminuye el metabolismo del iAs (Ghose et al., 2014) así como en el caso de la exposición a F⁻, la incidencia de fluorosis dental aumenta en estados de desnutrición (Irigoyen-Camacho et al., 2016) lo que podría aumentar la vulnerabilidad de la población expuesta.

Sin embargo, consideramos que las dosis de exposición en adición a los cocientes de riesgos estimados aunado a los antecedentes epidemiológicos encontrados en la literatura en zonas donde los niveles ambientales de iAsy F⁻ en agua son semejantes a los de nuestra área de estudio, es suficiente para justificar acciones para disminuir la exposición ambiental a estos contaminantes, comparativamente con el costo en salud y económico si, por el contrario, no se

llevaran a cabo. Es importante recalcar, que las personas que han vivido por generaciones en la zona de estudio, podrían exponerse desde épocas tempranas y en estados cruciales para el desarrollo desde la exposición materna, pre natal (Rager et al., 2014) la niñez, la adolescencia y continuando durante la edad adulta, lo cual podría incrementar el riesgo de que se presenten efectos en salud más graves tanto asociados al iAsy al F⁻ (Smeester et al., 2011), como a otros contaminantes naturales del suelo rico en minerales, característico de nuestra zona de estudio como mercurio y plomo, los cuales se sabe presentan también efectos en sistema nervioso central, lo cual pudiera tener un sinergismo. De la misma manera, la presencia de otros agentes carcinogénicos en el ambiente como la radiación ultravioleta (Pinedo-Vega et al., 2014) puede agravar los efectos en salud asociados a la exposición crónica al iAsy al F⁻.

Los resultados obtenidos de la estimación de riesgo en salud, representan una herramienta rápida y barata para la toma de decisiones relacionadas con problemas de salud ambiental. El uso de metodologías probabilísticas ayuda a disminuir las incertidumbres al realizar iteraciones que simulan diferentes escenarios posibles. Se consideró a la población infantil, para la estimación del riesgo no carcinogénico porque se encuentra en una ventana de vulnerabilidad debido a las características fisiológicas de esta etapa del desarrollo y sus hábitos de juego (Ilizaliturri et al., 2009), y para incluir a las poblaciones en mayor riesgo al momento de intervenir el sitio. Por ende, la implementación de programas de salud ambiental y comunicación de riesgos para disminuir la exposición al arsénico y flúor presente en el agua de grifo debe enfocarse principalmente a los niños, ya que, si se logra proteger a esta población especialmente susceptible, el resto de la población también se verá beneficiada.

El número de unidades relativas de copias de ADN mitocondrial está empezando a ser utilizado como un biomarcador de efecto para exposiciones ambientales a tóxicos, se ha reportado en la literatura una disminución de ncADNmtpoblación expuesta a partículas suspendidas (Hou, et al., 2013), y un aumento de las mismas en población expuesta a compuestos aromáticos policíclicos (Pavanello, et al., 2013). El ncDNAMt es un indicador de la respuesta biológica a la exposición a

iAs, antes de que se presenten signos o síntomas clínicos. Un aumento de ncADNmt se ha asociado a diversos tipos de cáncer, como pulmón o piel; mientras que un decremento se ha observado en enfermedades como la diabetes (Delsite et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado en estudios *in vitro* que la exposición a iAs en células de mamíferos provoca una disminución en el ncADNmt. Se sabe que se tienen unas miles de copias del genoma mitocondrial en cada célula, ahora bien, una disminución en ncADNmt podría afectar los niveles de expresión de las subunidades COX (citocromo C) codificadas en el ADN mitocondrial, en el mismo sentido, se ha reportado que las células cancerosas con una disminución del ADNmt tienen disminuida también la capacidad de reparación del ADN y aumentado el daño oxidativo al genoma nuclear. *In vitro*, también se ha demostrado una reducción dependiente de la dosis de ncADNmt, y que a concentraciones bajas, semejantes a las condiciones de una exposición por iAs en agua de bebida, se presenta una disminución en ncADNmt (Partridge et al., 2007), por otro lado, se ha reportado que el F⁻ puede inhibir la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa y afecta el potencial y la permeabilidad de la membrana de la célula, lo que disminuye la función mitocondrial, asimismo, la exposición a F⁻ incrementa la generación de aniones superóxido lo que puede llegar a dañar a la mitocondria (Barbier et al., 2010).

En el caso del telómero, se ha reportado que una exposición alta al iAs (> BEI) se ha asociado con una elongación en la longitud teloméricas en comparación con poblaciones con un nivel de exposición al iAs más bajo (Chatterjee et al., 2014; Gao et al., 2015; Li et al., 2012). La explicación que dan algunos autores (Gao et al., 2015) es que la sobre regulación de la telomerasa, como por ejemplo algún promotor de la elongación del telómero tal como WRN, la desprotección del telómero o bien al existir daño al DNA, se estimula la reparación del DNA telomérico, lo que tendría como consecuencia un incremento en la longitud telomérica.

Como se mencionó anteriormente, en este estudio encontramos una asociación negativa entre el ncADNmt y la concentración de As urinario ($\beta = -0.32$ $p = 0.006$), mientras que cuando se estudió la interacción de la exposición a iAs y a F⁻ se encontró una asociación negativa

estadísticamente significativa ($\beta = -0.08$ $p = 0.02$), lo que nos habla de que la interacción del F^- y el iAs puede alterar el efecto de los contaminantes en relación si fuera una exposición a solo uno de ellos. En relación a la longitud telomérica, cuando evaluamos el escenario de exposición donde consideramos los valores de AsT urinarios sin estratificar y los valores de F^- urinario mayores al BEI encontramos una asociación negativa entre el AsT ($\beta = -0.81$ $p = 0.03$) y una asociación positiva ($\beta = 1.26$ $p = 0.04$) con el F^- urinario; estos resultados nos muestran que ambos contaminantes tienen efectos diferentes sobre la longitud telomérica, el efecto asociado con el fluoruro es un alargamiento mientras que el efecto del arsénico es negativo. Contrario a la elongación reportada en poblaciones adultas expuestas crónicamente a concentraciones de arsénico mayores (>190 $\mu\text{g/L}$) en agua de bebida, en la población infantil de nuestro estudio, el efecto de la exposición a iAs sobre el telómero es acortarlo. Este resultado nos permitiría inferir que en población infantil los efectos del iAs son diferentes a la población adulta, por las condiciones de desarrollo en esta etapa, aunque, por otro lado, la co-exposición a F^- podría estar alterando el efecto del As en sentido contrario. La longitud telomérica está relacionada con la supervivencia a largo plazo de la célula, por lo que la longitud del telómero debe ser suficiente para evitar la senescencia celular y el envejecimiento acelerado, ambos eventos, si se sostienen en el tiempo, desencadenarían un estado de enfermedad.

Ammer et al., realizó un estudio en residentes en la región de Andes y Chaco en Argentina, siendo mayoría mujeres adultas, reportando una mediana de AsT en orina de 196 y 80 $\mu\text{g/L}$ respectivamente para cada sitio; al estudiar los efectos sobre el ncADNmt y la longitud telomérica, encontraron una mediana de 0.57 y 0.85 copias relativas de ADN mitocondrial para cada sitio, mientras que la mediana de longitud telomérica fue de 0.43 y 1.10 (relativo al gen endógeno) para cada sitio. En su reporte, mencionan una asociación positiva entre el ncADNmt y el AsT urinario en la región de Chaco ($\beta = 0.027$, $p = 0.0085$) y entre la longitud telomérica y el AsT urinario en Chaco ($\beta = 0.016$, $p = 0.0066$) y Andes ($\beta = 0.0075$, $p = 0.029$). En general ellos encontraron un ncADNmt mayor y una longitud mayor telomérica en el grupo con exposición superior al p (50) en su estudio. Al contrastar estos resultados con los del presente trabajo, la

primera diferencia es la edad de los participantes, ya que en el trabajo de Ammer y colaboradores, el rango de edad es de 18 a 69 años, mientras que en el nuestro es de 5 a 13 años, otro factor es la exposición de la población, siendo mayor en el estudio de Ammers que en el que nos ocupa. En diversos reportes se ha descrito un comportamiento dual de los biomarcadores estudiados frente al AsT, como ya se mencionó anteriormente, en estudios *in vitro* y en animales se han encontrados resultados discrepantes frente a exposición a sustancias oxidantes en la mitocondria, incluyendo el arsénico. Hou y colaboradores describe un comportamiento dual frente a agentes generadores de estrés oxidativo como el arsénico, encontrando que un estrés ligero aumenta la síntesis de ADNmt para subsanar la capacidad respiratoria celular y permitir que la célula sobreviva, mientras que, frente a un estrés oxidativo mayor, la síntesis disminuye debido posiblemente a defectos en la mitocondria, resultando en muerte celular y apoptosis (Hou, et al., 2013). En este sentido, Ferrero y colaboradores, encontraron respuestas duales a diferentes niveles de estrés oxidativo, a una concentración muy baja de arsenito, en células de sanguíneas de cordón umbilical se incrementaba la expresión del gen y de la proteína de TERT, una enzima de mantenimiento del telómero, *in vitro*, pero en una concentración de 1 μM de arsenito la expresión de TERT y la longitud telomérica disminuye (Ferrario et al., 2009).

En nuestro estudio los individuos que presentaron los valores más altos de AsT urinario (>p50) tuvieron un número menor de copias de ADN mitocondrial (OR = 4.5 IC₉₅ (1.21-18.3) p= 0.021), esto es que tienen un riesgo mayor de sufrir enfermedades relacionadas con la alteración de la función mitocondrial, tales como cáncer y diabetes, en estudios epidemiológicos ya han sido asociadas a la exposición a arsénico. En cuanto a la población con altos valores de F⁻ urinario (>p50) el riesgo no llega a ser significativo, pero si marginal. (OR = 2.7 IC₉₅% 0.77-10.1 p = 0.063) sin embargo, este resultado no significa que no exista riesgo por la exposición a F⁻, porque como ya se mostró anteriormente, cuando se evalúa la co-exposición de F⁻ alto (>BEI) y el AsT en un modelo multivariado, si se alcanza a dilucidar su efecto a nivel mitocondrial. Es posible que las discrepancias entre estos resultados y los reportados por Ammer y

colaboradores, se deban a las diferencias mencionadas anteriormente y además a la co-exposición a fluoruros, lo que puede estar aumentando el estrés oxidativo al que están siendo sometidas las células.

Se sabe que existen diferencias en el perfil de los metabolitos del iAs excretados en la orina, entre distintas poblaciones e individuos, en la población bajo estudio, encontramos que los individuos con mayores proporciones de MAs en relación a DMAs en el perfil urinario de excreción, tenían un mayor riesgo de tener menor ncADNmt, y por lo tanto de sufrir las enfermedades asociadas a su mal funcionamiento a mediano y largo plazo (OR = 3.45 IC%95 (1.02 a 12.4) $p = 0.023$), esto hace susceptibles a este grupo de individuos a los efectos adversos de la exposición a iAs en el agua. Considerando el escenario de exposición de la población estudiada, donde el agua de bebida contiene ambos contaminantes, es importante considerar al momento de la implementación de los planes de intervención para mitigar la exposición, a ambos elementos.

Capítulo VII

Conclusiones

- Algunas zonas del estado de Zacatecas tienen el reto de enfrentar la problemática de la presencia de iAs y F⁻ en el agua subterránea, como el municipio de Ojo caliente.
- La población infantil que reside en zonas que ingieren agua con concentraciones elevadas de iAs y F⁻ están en riesgo de sufrir los efectos en salud asociados a estos contaminantes.
- Existe una asociación entre la exposición a iAs y a F⁻ en el agua con los biomarcadores de efecto temprano por lo que pueden ser utilizados en la evaluación de riesgos en salud
- Se puede disminuir el riesgo por la exposición a iAs y F⁻ al ofrecer fuentes de agua libres de estos elementos.
- Los datos de las estimaciones de riesgo en salud por la exposición ambiental a iAs y a F⁻ resultaron concordantes con los datos de la evaluación del riesgo en salud utilizando los biomarcadores de exposición.
- La co-exposición a arsénico y fluoruro en agua de bebida altera el número de copias de ADN mitocondrial y la longitud telomérica.

Perspectivas

- Realizar intervenciones a partir de los resultados de las estimaciones de riesgo podrían coadyuvar a ahorrar tiempo en la prevención de los efectos adversos en salud de la población expuesta.
- Continuar con la vigilancia ambiental y el biomonitoreo con el fin de identificar las variaciones relacionadas a condiciones climáticas y cambios en los patrones de consumo de agua.
- Buscar alternativas para ofrecer agua limpia a los habitantes de estas zonas.
- Plantear intervenciones de educación para la salud y comunicación de riesgos con el fin de brindar herramientas a los pobladores para gestionar el riesgo ambiental.
- Adaptar una batería de pruebas en base a los biomarcadores estudiados con el fin de darle seguimiento a la salud de la población infantil estudiada.

Bibliografía

ACGIH, 2012. *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Fluorides: BEI®*. 7th ed., Cincinnati, OH, USA: ACGIH.

ACGIH, 2002. American Conference of Governmental Industrial Hygienists Arsenic and soluble Inorganic compounds: BEI. , 4.

Agusa, T. et al., 2011. *Individual variations in inorganic arsenic metabolism associated with AS3MT genetic polymorphisms,*

Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis J., Raff, M. and Roberts, K., 2008. *Molecular Biology of the Cell* (5th edn). Garland Science, ed., New York.

Alegría-Torres, J.A. et al., 2016. Association of Leukocyte Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Children from Salamanca, México. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(11), p.gtmb.2016.0176. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2016.0176>.

Ameer, S.S. et al., 2016. Exposure to Inorganic Arsenic Is Associated with Increased Mitochondrial DNA Copy Number and Longer Telomere Length in Peripheral Blood. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4(August), p.87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27597942>.

Aposhian, H. et al., 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), pp.327–335.

Armienta, M.A., Finkelman, R.B. & Rubio-Arias, H., 2013. Medical Geology: Its Relevance to Mexico. *TecnoCiencia Chihuahua*, VII(3), pp.152–162.

Armienta, M. a. & Segovia, N., 2008. Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*, 30, pp.345–353.

ATSDR, 2005. Appendix F : Derivation of Comparison Values. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 0. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHAManual/appf.html>

[Accessed November 28, 2015].

ATSDR, 2003a. Public health statement: toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp11-c1-b.pdf>.

ATSDR, 2007a. *ToxGuide for Arsenic as CAS # 7440-38-2*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-2.pdf>.

ATSDR, 2003b. *ToxGuide for Fluorides , Hydrogen Fluoride , and Fluorine.*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-11.pdf>.

ATSDR, 2007b. Toxicological Profile for Arsenic. In *ATSDR's Toxicological Profiles*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, p. 24. Available at: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420061888_ch33.

Bao, D. et al., 2016. Alterations of telomere length and mtDNA copy number are associated with overall survival in hepatocellular carcinoma patients treated with transarterial chemoembolization. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-016-3128-1>.

Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. & Del Razo, L.M., 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), pp.319–333. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279710004631>.

Bhattacharjee, P., Banerjee, M. & Giri, A.K., 2013. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environment International*, 53, pp.29–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.004>.

Bundschuh, J. et al., 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of The Total Environment*, 429, pp.2–35. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969711006486>.

Cawthon, R.M., 2009. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), pp.1–7.

CDC, 2015. U.S. Public Health Service Recommendation for Fluoride Concentration in Drinking Water for the Prevention of Dental Caries. *Reports and Recommendations Public Health*

- Reports*, 130(1), pp.1–14.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*, 125(7), pp.1241–1252.
- Chatterjee, D. et al., 2014. Arsenic exposure through drinking water leads to senescence and alteration of telomere length in humans: A case-control study in West Bengal, India. *Molecular carcinogenesis*, (October 2013), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665044>.
- Choi, A.L. et al., 2012. Developmental fluoride neurotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), pp.1362–1368.
- CONAGUA, 2015. *Determinación de la Disponibilidad de Agua en el Acuífero Guadalupe-Bañuelos, Estado de Zacatecas*, Available at: http://www.conagua.gob.mx/Conagua07/Aguasubterranea/pdf/DR_3227.pdf.
- Delsite, R.L. et al., 2003. Mitochondrial impairment is accompanied by impaired oxidative DNA repair in the nucleus. *Mutagenesis*, 18(6), pp.497–503.
- Devesa, V. et al., 2004. Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, pp.1460–1467.
- Díaz Barriga, F., 1999. *Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados*, Available at: <http://www.bvsde.paho.org/bvsarp/e/fulltext/metodolo/metodolo.pdf>.
- Ding, L. et al., 2012. Methylation of arsenic by recombinant human wild-type arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and its methionine 287 threonine (M287T) polymorph: Role of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), pp.121–130.
- Drobná, Z. et al., 2013. Environmental exposure to arsenic, As3MT polymorphism and prevalence of diabetes in México. , 48(Suppl 2), pp.1–6.
- Engström, K.S. et al., 2007. Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: Evidence from Argentina. *Environmental Health Perspectives*, 115(4), pp.599–605.
- EPA, 1994. *Method 200.7: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes*

- Office of Research and Development*, Available at:
<http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-200.7.pdf>.
- EPA, 2007. *Method 3015A: Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts*, Available at: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3015a.pdf>.
- EPA, 2002. National primary drinking water regulations: Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule. Final rule. *Federal register*, 67(9), pp.1811–44. Available at:
<http://www.epa.gov/safewater/consumer/pdf/mcl.pdf>.
- EPA, 2014a. *Priority Pollutant List*, Available at:
<http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>.
- EPA, 2014b. *Probabilistic Risk Assessment to Inform Decision Making : Frequently Asked Questions EPA/100/R-*, Washington, D.C.: Risk Assessment Forum, Office of the Science Advisor, USEPA. Available at: <http://epa.gov/raf/prawhitepaper/index.htm>.
- EPA, 2001. *Risk Assessment Guidance for Superfund (RAGS) Volume III - Part A: Process for Conducting Probabilistic Risk Assessment, Appendix B*, Available at:
<http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/rags3adt/>.
- Erdmann, V.A., Jurga, S. & Barciszewski, J., 2015. *RNA and DNA Diagnostics* V. A. Erdmann, S. Jurga, & J. Barciszewski, eds., Cham: Springer International Publishing. Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-17305-4>.
- Ferrario, D., Collotta, A., Carfi, M., Bowe, G., Vahter, M., Hartung, T., et al. (2009). Arsenic induces telomerase expression and maintains telomere length in human cord blood cells. *Toxicology* 260, 132–141. doi: 10.1016/j.tox.2009.03.019
- Gao, J. et al., 2015. Arsenic exposure, telomere length, and expression of telomere-related genes among Bangladeshi individuals. *Environmental Research*, 136, pp.462–469. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935114003624>.
- Ghose, N. et al., 2014. Role of Folic Acid on Symptoms of Chronic Arsenic Toxicity. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(1), pp.89–98. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci-hub.io/pmc/articles/PMC3915479/>.

- GODEZAC, 2011. *Programa Hídrico Estatal, visión 2030, Zacatecas.*, Zacatecas, México. Available at: [http://www.finanzas.gob.mx/contenido/2015/Marco Prog2015/UPLA/2\) Programa Hídrico Estatal visión 2030.pdf](http://www.finanzas.gob.mx/contenido/2015/Marco Prog2015/UPLA/2) Programa Hídrico Estatal visión 2030.pdf).
- Gomez-Rubio, P. et al., 2012. Indigenous American Ancestry is Associated with Arsenic Methylation Efficiency in an Admixed Population of Northwest Mexico. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(1), pp.36–49. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2011.615107>.
- González-Dávila, O., 2011. Assessment of the Exposure to Arsenic and Fluoride from Drinking Water in the City of Guadalupe , Zacatecas , Mexico . In *World Congress on Water, Climate and Energy*. pp. 1–8.
- González-Horta, C. et al., 2015. A Concurrent Exposure to Arsenic and Fluoride from Drinking Water in Chihuahua, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), pp.4587–4601. Available at: <http://www.mdpi.com/1660-4601/12/5/4587/>.
- Grimaldo, M. et al., 1995. Endemic fluorosis in San Luis Potosi, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environmental research*, 68, pp.25–30.
- He, H. et al., 1998. pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1372(2), pp.244–254.
- Hernandez-Zavala, A. et al., 2008. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). , 23, pp.342–351.
- Herrera-Toledo, C., 2012. *Análisis del Uso y Manejo de los Recursos Hídricos en el Estado de Zacatecas*, Zacatecas: Banco Mundial. Available at: http://www-wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/2012/04/27/000020953_20120427150616/Rendered/PDF/684220WP0P10580S0HIDRICOS0ZACATECAS.pdf.
- Hou, L. et al., 2010. Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source*, 9, p.48.
- Huang, X. et al., 2015. Different Choices of Drinking Water Source and Different Health Risks in a

- Rural Population Living Near a Lead/Zinc Mine in Chenzhou City, Southern China. *International journal of environmental research and public health*, 12(11), pp.14364–14381.
- IARC, 2011. Arsenic and arsenic compounds. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100 C, pp.41–93.
- Ilizaliturri, C. a et al., 2009. Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencias*, 34(2405), pp.710–717.
- Irigoyen-Camacho, M.E. et al., 2016. Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. *Science of The Total Environment*, 541, pp.512–519. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715307452>.
- IRIS, 1988. *Arsenic , inorganic ; CASRN 7440-38-2*, Integrated Risk Information System. Available at: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0278_summary.pdf.
- IRIS, 1987. *Fluorine (soluble fluoride) ; CASRN 7782-41-4*, Integrated Risk Information System. Available at: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0053_summary.pdf.
- Jarquín-Yañez, L. et al., 2015. Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi. *TheScientificWorldJournal*, 2015, p.647184. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4350618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jha, S.K. et al., 2013. Fluoride in Groundwater: Toxicological Exposure and Remedies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16(1), pp.52–66. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10937404.2013.769420>.
- Kurzius-Spencer, M. et al., 2015. Relation of dietary inorganic arsenic to serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) at different threshold concentrations of tap water arsenic. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, (October 2014), pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jes.2014.92>.

- Leal-Ascencio, M.T., 2006. Evaluación de Acuíferos de la Mesa del Norte. *In memories V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Oaxtepec, Mor. México, 9.*
Available at:
http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/MORELOS/Extenso/CA/EO/CAO-35.pdf [Accessed November 28, 2015].
- Lee, C.-H. et al., 2011. Aberrant Cell Proliferation by Enhanced Mitochondrial Biogenesis via mtTFA in Arsenical Skin Cancers. *The American Journal of Pathology*, 178(5), pp.2066–2076.
Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401100174X>.
- Lee, T.C. & Ho, I.C., 1994. Differential cytotoxic effects of arsenic on human and animal cells. *Environmental health perspectives*, 102 Suppl(18), pp.101–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lee, W. et al., 2015. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell Death and Disease*, 6(2), p.e1664. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.34>.
- Li, H. et al., 2012. Arsenic exposure through drinking water is associated with longer telomeres in peripheral blood. *Chemical research in toxicology*, 25(11), pp.2333–9. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3501147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liu, S. et al., 2005. Mitochondrial Damage Mediates Genotoxicity of Arsenic in Mammalian Cells
Mitochondrial Damage Mediates Genotoxicity of Arsenic in Mammalian Cells. *Cancer Research*, (8), pp.3236–3242.
- Loeffler, M. & Kroemer, G., 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Experimental cell research*, 256, pp.19–26.
- Lu, Y. et al., 2000. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride*, 33(2), pp.74–78.
- Marchiset-Ferlay, N., Savanovitch, C. & Sauvart-Rochat, M.P., 2012. What is the best biomarker

- to assess arsenic exposure via drinking water? *Environment International*, 39(1), pp.150–171. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.07.015>.
- Martin, E. et al., 2015. Metabolomic Characteristics of Arsenic-Associated Diabetes in a Prospective Cohort in Chihuahua, Mexico. *Toxicological Sciences*, 144(2), pp.338–346. Available at: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfu318>.
- Matousek, T. et al., 2008. Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on l-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multi. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 63(3), pp.396–406.
- McCarthy, J. F. & Shugart, L.R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination.*
- McClintock, T.R. et al., 2012. Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429, pp.76–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.051>.
- Merola, R.B. et al., 2015. Arsenic exposure to drinking water in the Mekong Delta. *The Science of the total environment*, 511, pp.544–52. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714018026> [Accessed November 12, 2015].
- Meza, M.M. et al., 2004. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Environmental Research*, 96(2), pp.119–126.
- Mojarro-Davila, F. et al., 2013. *Agua subterránea en Zacatecas* 1st ed., Zacatecas, México: UAZ.
- Naujokas, M.F. et al., 2013. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: Update on a worldwide public health problem. *Environmental Health Perspectives*, 121(3), pp.295–302.
- ODEQ, 1999. *Guidance for Use of Probabilistic Analysis in Human Health Risk*, Oregon Department of Environmental Quality.
- Ortega, A., 2009. Presencia, distribución, hidrogeoquímica y origen de arsénico, F- y otros elementos traza disueltos en agua subterránea, a escala de cuenca hidrológica tributaria de

- Lerma-Chapala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 26, pp.143–161.
- Padilla-reyes, D.A. et al., 2012. Calidad del agua del acuífero Guadalupe-Bañuelos , Estado de Zacatecas , México. *Geos*, 32(2), pp.367–384.
- Partridge, M.A. et al., 2007. Arsenic induced mitochondrial DNA damage and altered mitochondrial oxidative function: Implications for genotoxic mechanisms in mammalian cells. *Cancer Research*, 67(11), pp.5239–5247.
- Partridge, M. a et al., 2007. Arsenic induced mitochondrial DNA damage and altered mitochondrial oxidative function: implications for genotoxic mechanisms in mammalian cells. *Cancer research*, 67(11), pp.5239–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545603>.
- Pavanello, S. et al., 2013. Mitochondrial DNA Copy Number and Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 22(10), pp.1722–1729. Available at: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-13-0118>.
- Rango, T. et al., 2014. Fluoride exposure from groundwater as reflected by urinary fluoride and children’s dental fluorosis in the Main Ethiopian Rift Valley. *Science of The Total Environment*, 496(0), pp.188–197. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714010778>.
- Del Razo, L.M. et al., 2011. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environmental health : a global access science source*, 10(1), p.73. Available at: <http://www.ehjournal.net/content/10/1/73>.
- Del Razo, L.M. et al., 1993. Fluoride levels in well-water from a chronic arsenicism area of Northern Mexico. *Environmental Pollution*, 80(1), pp.91–94.
- Rocha-Amador, D. et al., 2007. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 23 Suppl 4, pp.S579–S587.
- Saha, K.K. et al., 2012. Pre- and postnatal arsenic exposure and body size to 2 years of age: a cohort study in rural Bangladesh. *Environ Health Perspect*, 120(8), pp.1208–1214. Available

- at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3440068/pdf/ehp.1003378.pdf>.
- Sampayo-Reyes, A. et al., 2010. Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT Polymorphisms. *Toxicological Sciences*, 117(1), pp.63–71.
- SCFI, 2001. *NMX-AA-077-SCFI-2001 Determinación de Fluoruros en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas.*, Available at:
<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-077-SCFI-2001.pdf>.
- Shadel, G.S., 2008. Expression and Maintenance of Mitochondrial DNA. New Insights into Human Disease Pathology. *Am J Pathol*, 172(6), p.ajpath.2008.071163+. Available at:
<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.071163>.
- SSA, 2000. *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano- Límites permisibles de Calidad y Tratamientos a que debe someterse al Agua para su Potabilización,"* Available at:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>.
- SSA, 2002. *NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.*, Available at:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>.
- Susin, S. a., Zamzami, N. & Kroemer, G., 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: Doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366(1–2), pp.151–165.
- Tsuji, J.S. et al., 2014. Association of low-level arsenic exposure in drinking water with cardiovascular disease: a systematic review and risk assessment. *Toxicology*, 323, pp.78–94. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0300483X14001218/1-s2.0-S0300483X14001218-main.pdf?_tid=29557042-7a5f-11e4-8152-00000aacb35e&acdnat=1417551166_e0d1d33853fb05da7c5a9e18097f55fb.
- Tyler, C.R. & Allan, A.M., 2014. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Current Environmental Health Reports*, 1(2), pp.132–147. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40572-014->

0012-1.

Valenzuela, O.L. et al., 2009. Association of AS3MT polymorphisms and the risk of premalignant arsenic skin lesions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(2), pp.200–207. Available at:

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19538983&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers3://publication/doi/10.1016/j.taap.2009.06.007\nhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09002579>.

Vega, S., 2002. Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México. *Comisión Nacional del Agua. Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua*, p.15.

Wang, W., Cheng, S. & Zhang, D., 2014. Association of inorganic arsenic exposure with liver cancer mortality: A meta-analysis. *Environmental research*, 135, pp.120–5. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935114003041>.

Warburg, O., 1956. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), pp.309–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>.

WHO, 2011. *Arsenic in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*,

WHO, 2006a. *Constitución de la Organización Mundial de la Salud*., Geneva, Switzerland. Available at: http://www.who.int/governance/eb/who_constitution_sp.pdf.

WHO, 2004. *Fluoride in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*,

WHO, 2006b. *Guidelines for Drinking-water Quality. First Addendum to Thrd Edition 3rd ed.*, Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Wood, T.C. et al., 2006. Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: Gene resequencing and functional genomics studies. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), pp.7364–7373.

World Health Organization, U.N.C.F., 2009. *WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children*, Available at:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44129/1/9789241598163_eng.pdf.

Wyatt, C. et al., 1998. Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico. *Environmental Research*, 76(2), pp.114–119. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935197937956>.

Xie, S.-H. et al., 2010. DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during drinking water treatment in a waterworks in China.

Environmental and molecular mutagenesis, 51(3), pp.229–235.

Zhang, S. et al., 2015. Modifying Effect of COMT Gene Polymorphism and a Predictive Role for Proteomics Analysis in Children's Intelligence in Endemic Fluorosis Area in Tianjin, China.

Toxicological Sciences, 144(2), pp.238–245. Available at:

<http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfu311>.

Zhang, X. et al., 2013. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occupational and environmental medicine*, 70(10), pp.743–9.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775864>.



Preliminary human health risk assessment of arsenic and fluoride in tap water from Zacatecas, México

Mónica I. Martínez-Acuña · Marisa Mercado-Reyes ·
Jorge A. Alegría-Torres · José J. Mejía-Saavedra

Received: 7 January 2016 / Accepted: 23 June 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract Zacatecas state is located in the central area of Mexico, where the underground water contains elevated quantities of natural arsenic and fluoride. In order to estimate health risk associated with human exposure to these pollutants, tap water samples from the southern-central region of the state were analyzed. Ninety percent of the samples exceeded the levels of arsenic established by the World Health Organization (WHO) of 0.01 mg/L and 43 % exceeded the limit established by the NOM-127-SSA1¹ of 0.025 mg/L. Forty-three percent of the samples had fluoride levels above the Mexican regulation limit of 1.5 mg/L (NOM-127-SSA1). We used WHO and EPA's health risk assessment method, we estimated 80 % of the inhabitants of sites studied could be exposed to arsenic levels

higher than those recommended by EPA and the WHO, 22 % could be exposed to fluoride levels higher than those recommended by EPA, and 16 % of the local population may be in risk of suffering dental fluorosis.

Keywords Arsenic · Fluoride · Water · Risk assessment

Introduction

Arsenic (As) and fluoride (F⁻) are elements naturally found in the earth's crust, which when dissolved, by erosion of natural deposits, into bodies of water destined for human consumption may represent a health risk, depending on the quantities in which they are present (Merola et al. 2015; Huang et al. 2015). The state of Zacatecas is located in the central Mexican region, a geological zone with reported concentrations of inorganic arsenic (iAs) and F⁻ in the granular and fluvial aquifers of the region (Ortega 2009; Vega 2002; Leal-Ascencio 2006) in concentration higher than the limits recommended by national and international organizations (0.025 mg/L (SSA 2000) and 0.01 mg/L (WHO 2011; EPA 2002) for As; 1.5 mg/L (SSA 2000; WHO 2004) and 0.7 mg/L (CDC 2015) for F⁻).

The presence of these elements in drinking water has been recognized as a health problem worldwide. It is estimated that in Mexico 4 % of the population is exposed to high concentrations of As (McClintock et al. 2012); meanwhile, some authors report an

M. I. Martínez-Acuña
Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico

M. Mercado-Reyes
Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico

J. A. Alegría-Torres
Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición LIMON, Universidad del Centro de México, San Luis Potosí, Mexico

J. J. Mejía-Saavedra (✉)
Toxicología Ambiental, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Sierra Leona No. 550, Colonia Lomas Segunda Sección, CP 78210 San Luis Potosí, SLP, Mexico
e-mail: jjeus@uaslp.mx

Published online: 21 July 2016



exposure to fluorides in various states within the country's central zone (González-Horta et al. 2015; Grimaldo et al. 1995; Jarquín-Yañez et al. 2015; Irigoyen-Camacho et al. 2016), primarily in regions with desert and semi-desert climates and overexploited aquifers which present high probabilities of being exposed to both pollutants (González-Horta et al. 2015), this is the reason why a continued vigilance is recommended in these areas (CONAGUA² 2015; Armienta et al. 2013).

Many health effects have been associated to chronic exposure to As and F⁻ in drinking water (ATSDR 2007b; ATSDR 2003a). iAs has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2011) as a potent carcinogen. It has also been identified as a priority pollutant (EPA 2014a) associated to adverse effects in the central nervous and cardiovascular systems (Tsuji et al. 2014; Kurzius-Spencer et al. 2015; McClintock et al. 2012; Tyler & Allan 2014), as well as diabetes mellitus (Martín et al. 2015; Wang et al. 2014). In extreme cases, a chronic exposure to iAs, above to 0.5 mg/day, can induce arsenicosis (WHO 2006). On the other hand, it has been reported that F⁻ produces effects on the male reproductive and central nervous system (Ortiz-Pérez et al. 2003; Lu et al. 2000; Rocha-Amador et al. 2007; Choi et al. 2012; Zhang et al. 2015). It has been reported that exposure to concentrations ranging from 3 to 27 mg/day of F⁻ induces a subclinical reproductive effect (Ortiz-Pérez et al. 2003); also, individuals exposed to concentration higher than 1.5 mg/L of F⁻ are at risk of suffering dental fluorosis and in some cases skeletal fluorosis (Rango et al. 2014). F⁻ exposure on children has been associated with a decreased immune response and neurological effects such as a diminished intellectual quotient (Rocha-Amador et al. 2007; Lu et al. 2000). Therefore, it is important to have information based on risk evaluations that allow decision-making and optimize resources and efforts to prevent adverse effects on the population (Buchamer et al. 2012; Jha et al. 2013). The aim of this study is to estimate the health risks due to As and F⁻ exposure in tap water in several towns of the state of Zacatecas, Mexico.

Materials and methods

Study sites

Eight study sites were selected, the towns of *Guadalupe* (159,991 residents), *Jerez* (57,610 residents), *Ojocaliente*

(Pop. 40,740), *Villanueva* (Pop. 29,295), *Jalpa* (Pop. 23,557), *Tabasco* (Pop. 15,656), *Huanusco* (Pop. 4306), and *El Visitador* (Pop. 532), all of them located in the state's southern-central zone. The selection of these sites was based on geological data and reports of pollutants in the state (Armienta et al. 2013; Leal-Ascencio, 2006; Bundschuh et al. 2012) (Fig. 1)

Sampling

Purposive sampling was conducted, the chosen sites can be observed in Fig. 1. Sampling was carried out during the months of August and September 2012, to avoid the possible variations caused by differences in seasonal rainfall patterns. A total of 47 water samples were taken, directly from public access taps, mainly in elementary schools. The number of samples per site varies in relation to the conditions of each locality. Tap water was considered as a most important route for iAs and F⁻ exposure because their contribution to total exposure is very large. Other possible routes of exposure include contaminated soil and foods such as rice (Bundschuh et al. 2012; McClintock et al. 2012).

The volume of the water collected was a liter per sample, using amber containers (Nalgene® HDPE), certified for environmental samples, following the process established by Mexican regulation (SSA 2002). The samples were kept cold and stored at 4 °C until processed in the laboratory.

Determination of arsenic

Five hundred milliliters of sample water were acidified with nitric acid and stored at 4 °C, shielded from light to prevent microbial activity and undesired chemical reactions. Subsequently, digestion, using a Milestone Ethos One® microwave, was performed following EPA's 3015A method (EPA 2007), followed by a potassium iodide, 5 % ascorbic acid, and concentrated hydrochloric acid. Quantification was carried out on atomic emission optical spectroscopy equipment coupled to a source of plasma ionization ICP-OES coupled to a hydride generator based on the method 200.7-1 EPA (EPA 1994). For quality control, the reference standard NIST 1640 was used, trace elements in natural water having an arsenic concentration of ±0.026 mg/L to obtain a recovery of 85 %, the limits



Fig. 1 Location of the state of Zacatecas at 25° 07' north latitude south, east 100°43'; west 104°22' west longitude. Its climate is semi-dry with around 450 mm of precipitation per year and

average annual temperatures between 20 and 15 °C (INEGI 2010). The *dots* represent the exact sites where samples were taken, all of them points of public access

of detection and quantification of the method were below the lowest concentration found in the samples.

Determination of fluorides

Fluoride analysis was done according to Mexican regulation using the electrochemical ion-selective method described in the NMX-AA-007-SCFI-2001 (SCFI 2001). To determine exactitude, a standard NIST® 3183 water solution was used obtaining a recovery of 97 %.

Estimation of health risk

The health risk assessment methodology proposed by Díaz Barriga (Díaz Barriga 1999) is consistent with the economic and social conditions of the study area, which coincide with most contaminated sites in Latin America for which it was adapted; this methodology is also used in conjunction with the methodology for the estimated health risk's probabilistic model proposed by EPA (EPA 2001; Ilizaliturri et al.

2009). These methods allow the estimation of health risk for non-cancer or carcinogenic, as long as the reference values for the pollutant are met within the study.

Dose-response analysis

To begin estimating the health risk, it is necessary to consider the reference values established for each pollutant (Díaz Barriga, 1999). The guideline values for arsenic and F⁻, proposed by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry of the USA (ATSDR) and EPA, are summarized in Table 1 (ATSDR 2005; IRIS 1988, IRIS 1987; ATSDR 2007a; ATSDR 2003b). The guideline values used for calculating the exposure dose for each pollutant were the reference doses listed in Integrated Risk Information System (IRIS 1988; IRIS 1987). As for the guideline values to estimate the carcinogenic health risk, currently, only the carcinogenic risk for arsenic is available, while there is no guideline value available for the risk related to F⁻ exposure (IRIS 1988; IRIS 1987).

Table 1 Guideline health values for the estimation risk of exposure to As and F⁻

Compound	Estimated health risk	Guideline values	Definition	Value	Units	Critical effect	Organization
As	Non-carcinogenic	NOAEL	No observed adverse effect level	0.0008	mg/kg-day	Hyperpigmentation, keratosis and vascular complications	EPA
	Non-carcinogenic	LOAEL	Low observed adverse effect level	0.014	mg/kg-day	Hyperpigmentation, keratosis and vascular complications	EPA
	Non-carcinogenic	RfD	Dose reference	0.0003	mg/kg-day	Hyperpigmentation, keratosis and vascular complications	EPA
	Non-carcinogenic	MRLs	Minimal risk level	0.0003	mg/kg-day	Hyperpigmentation, keratosis and vascular complications	ATSDR
	Carcinogenic	CSF	Cancer slope factor	1.5	mg/kg-day	Cancer	EPA
F ⁻	Non-carcinogenic	NOAEL	No observed adverse effect level	0.06	mg/kg-day	Dental fluorosis	EPA
	Non-carcinogenic	LOAEL	Low observed adverse effect level	2	ppm	Dental fluorosis	EPA
	Non-carcinogenic	RfD	Dose reference	0.06	mg/kg-day	Dental fluorosis	EPA
	Non-carcinogenic	MRLs	Minimal risk level	0.05	mg/kg-day	Dental fluorosis	ATSDR
	Carcinogenic	CSF	Cancer slope factor	NA	NA	Cancer	NA

(ATSDR 2007a; ATSDR 2003b; ATSDR 2005; IRIS 1988; IRIS 1987)

Exposure estimation

To estimate the daily exposure dose (ADD) the following formula was used (Díaz Barriga 1999):

$$\text{ADD} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \left(\frac{(\text{environmental concentration} \times \text{intake rate})}{\text{body weight}} \right) \times \text{exposure factor}$$

The environmental concentration is expressed in milligrams per liter, the ingestion rate is in liters per day and the body weight in kilograms. An exposure factor (EF) of 1 is assumed, considering a permanent exposure route and maximum bioavailability of pollutant (Díaz Barriga, 1999).

The average concentration of As and F⁻ found in the samples was used to estimate the respective exposure dose, the average value of 0.875 l/day was considered for the intake rate and the average body weight was 33.8 kg, these values correspond to the children range of 6 to 11 years old, which is the school age of elementary education in Mexico. ADD is estimated for the children because they are in a window of vulnerability by various biological and social factors such as in growth stage, their central nervous, reproductive, and immune systems are still developing; they could be exposed to higher concentrations in relation to their size

and weight and accessibility to tap water in playgrounds; and in addition, using the hazard quotient (HQ) as a measure to estimate the health risk for this population, we would be estimating the most critical risk which would allow us to include the other age groups. The variable intake rate and body weight were calculated from data obtained through anthropometric measurements, and an exposure questionnaire conducted on a group of 78 children residents of the study zone, students from two schools where tap water samples were taken, these taps water were reach of children and could make use of it for consumption, with the purpose of obtaining as much information as possible about the actual conditions of the site. In Table 2, three different estimates of the rate of intake for children are summarized. As shown, the National Health and Nutrition Survey Data (Hernández et al. 2012) suggested a 0.607 l/day based in a study that includes children throughout Mexico and has a very large sample size; however, the values of 0.875 l/day obtained in the survey conducted in the study area despite having a smaller sample size could be more representative for the aims of this work; since it correspond to the local population in the sites studied, this survey was conducted in two schools where samples of tap water were taken, and information was obtained from parents of infants who are questioned about the habits of consumption tap water for their children. On the other hand, if it

Table 2 Comparison between different intake rate for children

Parameter	Units	n	Intake	Reference
Intake rate	l/day	8122	607 (9.0)	Hernández et al. 2012
	l/day	79	875 (11.4)	Survey in this study
	l/day	–	1	Díaz Barriga 1999

Values are represented as the arithmetic mean and standard deviation

is considered that the rate of water intake suggested by the methodology of Pan American Health Organization (Díaz Barriga 1999) is 1 l/day, our estimate is an average value, in this way would be estimating the risk with a less uncertainty.

Estimation of the ADD and non-carcinogenic health risk or hazard quotients (HQ) respective for each site was conducted using measures of central tendency of each involved parameter (Díaz Barriga 1999), while for the estimation of HQ by the probabilistic method (EPA 2001), a probability distribution is assumed based on the frequency distributions of each parameter (Table 3). The Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling as goodness of fit test was performed using the Crystal Ball™ program.

For the carcinogenic risk estimation or individual carcinogenic risk (ER), it was necessary to calculate the arsenic exposure dose via tap water for the adult population (Díaz Barriga, 1999; EPA, 2001), because the guideline value for the Cancer Slope Factor is based on exposure throughout life (ATSDR 2005), the details of each variable involved are shown in Table 4. This estimation was performed using the arsenic's most representative value for each

site and the total distribution to estimate the exposure dose via the probabilistic method.

Risk characterization

The ratios of non-carcinogenic and carcinogenic risks were obtained from information gathered in previous stages of this study. The non-carcinogenic risk estimated as hazard quotient was obtained through the following formula:

$$HQ = (ADD(mg/kg\text{-}day)/RfD(mg/kg\text{-}day))*EF$$

The exposure time was considered complete and with a bioavailability of 100 % so exposure factor (EF) is assumed as 1. ADD is daily exposure dose and RfD is de value of reference dose. While the carcinogenic risk ratio or theoretical risk value was calculated with the following equation:

$$ER = ADD(mg/kg\text{-}day)*CSF(mg/kg\text{-}day)$$

Díaz Barriga 1999; ATSDR 2005

ER represents the individual carcinogenic risk and CSF is cancer potency factor or slope; F⁻ is not included in this estimation because the carcinogenic potency factor for this pollutant is not available. A sensibility analysis using tornado graphic provided by the Crystal Ball ® program is included, to assess the possible changes of relative importance of the variables involved in the equations used.

Table 3 Parameter used to estimate non-carcinogenic hazard quotients (HQ)

Parameters	Units	n	Distribution	Value	Reference
F ⁻ concentration	mg/l	47	Lognormal	1.4 (0.4–3.0)	^a
As concentration	mg/l	47	Lognormal	0.05 (0.004–0.298)	^a
Body weight	Kg	79	Normal	33.8 (17.7–67.5)	^b
Intake rate	l/day	79	Triangular	0.87 (0.1–1.5)	^b
Reference F ⁻ dose	mg/kg-day	–	Single value	0.06	(IRIS 1987)
Reference As dose	mg/kg-day	–	Single value	0.0003	(IRIS 1988)

The distributions were assumed based on goodness of fit tests

^a ^bInformation obtained in the study area

Table 4 Parameters for estimating cancer risk (ER) by exposure to arsenic in tap water

Parameters	Units	<i>n</i>	Distribution	Value	Reference
iAs concentration	mg/l	47	Lognormal	0.05 (0.004–0.298)	^a
Intake rate	l/day	–	Single value	2.0	(Díaz Barriga 1999)
Body weight	Kg	–	Single value	70	(Díaz Barriga 1999)
Cancer potency factor	mg/kg-day	–	Single value	1.5	(Díaz Barriga 1999)

^a Average arsenic concentration in water from the study area

Results

Arsenic and F⁻ concentrations in tap water

The concentrations of As and F⁻ corresponding to the water samples taken from taps in the studied communities are summarized in Table 4. Ninety percent of the samples exceeded the permissible limits for As in water according to the WHO (WHO 2011), and 43 % exceeded the Mexican regulation (SSA 2000). Forty-three percent of the water samples exceeded the limits permissible by the WHO and Mexican regulation (WHO 2004; SSA 2000) to F⁻. Only the samples taken at Villanueva were found below the permissible limits for both elements.

Estimation of the exposure and risk characterization

Initially, a representative value of the exposure dose for each site was obtained, hence, a risk ratio value. The HQ and the ADD for each community are shown in Table 5, while the exposure dose for adults and the ER is summarized in Table 6.

The probabilistic method (EPA 2001) allows us to perform multiple iterations as from assumed probability distributions for each variable in the model, yielding a probability distribution for the estimated output variable, in this case the ADD. This probability distribution allows us to estimate the most probable ADD. As shown, the ADD obtained through the iterations of the Monte Carlo method, for both the children and adult

Table 5 As and F⁻ concentrations in tap water and the non-carcinogenic risk ratio (HQ) estimated for each community

Element	Site	<i>N</i>	Water concentration in mg/L average (min-max)	ADD mg/kg/day	HQ
As	Jerez	10	0.019 (0.008–0.062)	5.0E-04	1.6
	El Visitador	4	0.022 (0.018–0.025)	5.7E-04	1.9
	Guadalupe	8	0.078 (0.021–0.233)	2.0E-03	6.7
	Ojocaliente	5	0.186 (0.125–0.298)	4.8E-03	16.1
	Villanueva	3	0.006 (0.004–0.0074)	2.0E-04	0.5
	Tabasco	4	0.014 (0.008–0.025)	4.0E-04	1.2
	Huanusco	3	0.026 (0.025–0.026)	7.0E-04	2.2
	Jalpa	5	0.019 (0.013–0.035)	5.0E-04	1.7
	F ⁻	Jerez	10	1.8 (1.6–2.3)	5.0E-02
El Visitador		10	1.3 (0.8–2.4)	3.0E-02	0.6
Guadalupe		6	0.45 (0.4–0.5)	1.0E-02	0.2
Ojocaliente		4	0.7 (0.6–0.8)	2.0E-02	0.3
Villanueva		3	0.4 (0.3–0.6)	1.0E-02	0.2
Tabasco		5	1.9 (0.8–3.0)	5.0E-02	0.8
Huanusco		4	1.1 (0.4–1.9)	3.0E-02	0.5

The exposure doses were calculated based on data for each site

Table 6 Ratio of estimated cancer risk (ER) for exposure to arsenic in tap water

Site	Population (residents)	iAs concentration mg/L average (min-max)	ADD mg/kg-day	ER (individual) ^a
Jerez	57,610	0.019 (0.008–0.062)	5.40E-04	8.10E-04
El Visitador	532	0.022 (0.018–0.025)	6.30E-04	9.40E-04
Guadalupe	159,991	0.078 (0.021–0.233)	2.20E-03	3.30E-03
Ojocaliente	40,740	0.186 (0.125–0.298)	5.30E-03	8.00E-03
Villanueva	29,395	0.006 (0.004–0.0074)	1.70E-04	2.60E-04
Tabasco	15,656	0.014 (0.008–0.025)	4.00E-04	6.00E-04
Huanusco	4306	0.026 (0.025–0.026)	7.40E-04	1.10E-03
Jalpa	23,557	0.019 (0.013–0.035)	5.40E-04	8.10E-04

^aCancer risk estimated for exposure to arsenic in tapwater

population, is expressed through a cumulative frequency graph in Fig. 2, this is in order to observe the percentages 50, 90, 95, and 99, which are values considered for decision-making (WHO 2006); on the graph, it is also possible to see the attenuated zone to the left of the distribution where the percentage of the population estimated to be exposed to a dose that is considered safe appears, according to the applicable criteria, which is stated on the lower left end of each graph.

The ADD for the population living in the study area using the probabilistic risk assessment method (EPA 2001) is summarized in Table 7. Based on these exposure doses, HQ and ER were calculated.

When the risk ratios are obtained based on the model of probabilistic risk estimate, the probability of exposure to certain levels for each pollutant can be elucidated. As shown in Table 8, various dividing criteria can be used in decision-making, just as in exposure doses. Likewise

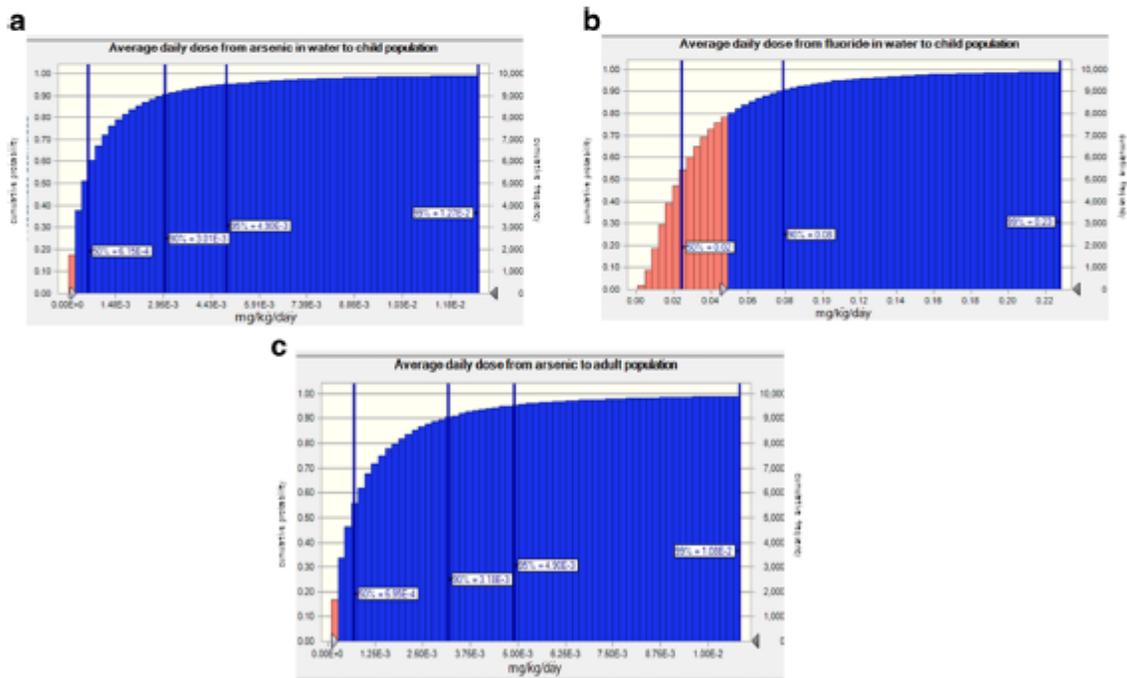


Fig. 2 Accumulative frequency distribution for the ADD. **a** ADD to iAs calculated for child consumption. **b** ADD to F calculated for child consumption. **c** ADD to As calculated for adult consumption (dose of exposure throughout a life time, used to calculate the ER

for As). The white area represents the percentage of the local population estimated to be exposed to a dose lower than that of the suggested health criteria by EPA (RfD) for each pollutant

Table 7 Estimation of exposure doses to As and F⁻ in the water using probabilistic risk assessment method

Pollutant	Population	ADD (mg/kg/day)				Safety criteria			% above the safety level
		Percent				Name	mg/kg/day	Ref.	
		50	90	95	99				
F ⁻	Children	0.02	0.08	0.11	0.23	RfD	0.05	EPA ^a	22
As	Children	6.2E-04	2.9E-03	4.6E-03	1.2E-02	RfD	3.0E-04	EPA ^a	73
As	Adults	7.0E-04	3.1E-03	4.8E-03	1.1E-02	RfD	3.0E-04	EPA ^a	80

^aRfD non-carcinogenic risk (EPA 2002)

in Table 8, the safety criteria suggested by EPA is included, both for carcinogenic and non-carcinogenic risk. In Fig. 3, these results are shown.

In addition, the percentage of the population that may be at risk was estimated using the criteria HQ > 1 and the value of 1.0E-04 for ER, this information is included in Table 8.

Discussion

The state of Zacatecas, for the most part, has soil that is rich in minerals such as arsenopyrite, fluorite, and fluorapatite; to the south of the state, there have been reports of geothermal activity. The climate is predominantly semi-desert and most of its aquifers are considered to be overexploited (Mojarro-Davila et al. 2013); the water destined for public consumption is 113 million m³/year (Herrera-Toledo 2012). In addition to this, the regulation and control of pollutants in the water provided for human consumption is one of the challenges to overcome at present and in the coming years (Vega 2002).

There is limited information available about environmental concentration of As and F⁻ in water in Zacatecas state, data referent to city of Guadalupe is summarized in Table 9. These results are consistent with our data, there is not a great variability in the As concentration reported in previous years; on the other hand, we found slightly lower F⁻ values than reported in the past. Padilla and colleagues estimated that the children younger than 12 years old and women residing in the area were in high health risk associated to As and F⁻ (Padilla-reyes et al. 2012). For the rest of the sites, no available information was found so as to compare the seasonal variability of the environmental concentrations.

Chronic exposure to As and F⁻ is mainly due to the consumption of contaminated water; in addition, it is permanently available for the inhabitants of the site (Armienta et al. 2013; Huang et al. 2015; Bundschuh et al. 2012; McClintock et al. 2012). Neither ADD F⁻ estimated for each community nor the corresponding HQ exceeds the health criteria suggested by the WHO (WHO 2006); however, when estimating the population risk, 22 % of the population may be exposed to a dose higher than considered safe and 16 % could be at risk of suffering dental fluorosis, according to the criteria

Table 8 Estimation of health risk for As and F⁻ in water

Pollutant	Population	Risk	Estimated theoretical risk				Safety criteria	Ref.	% above the safety level
			Percent						
			50	90	95	99			
F ⁻	Children	Non-carcinogenic (HQ)	0.4	1.4	1.9	3.9	1	EPA	16
As	Children	Non-carcinogenic (HQ)	2.0	10.6	16.3	41.5	1	EPA	74
As	Adults	Carcinogenic (ER)	1.0E-03	4.5E-03	7.4E-03	1.7E-02	1.0E-04	EPA	95

(EPA 2001; ODEQ 1999; EPA 2014a)

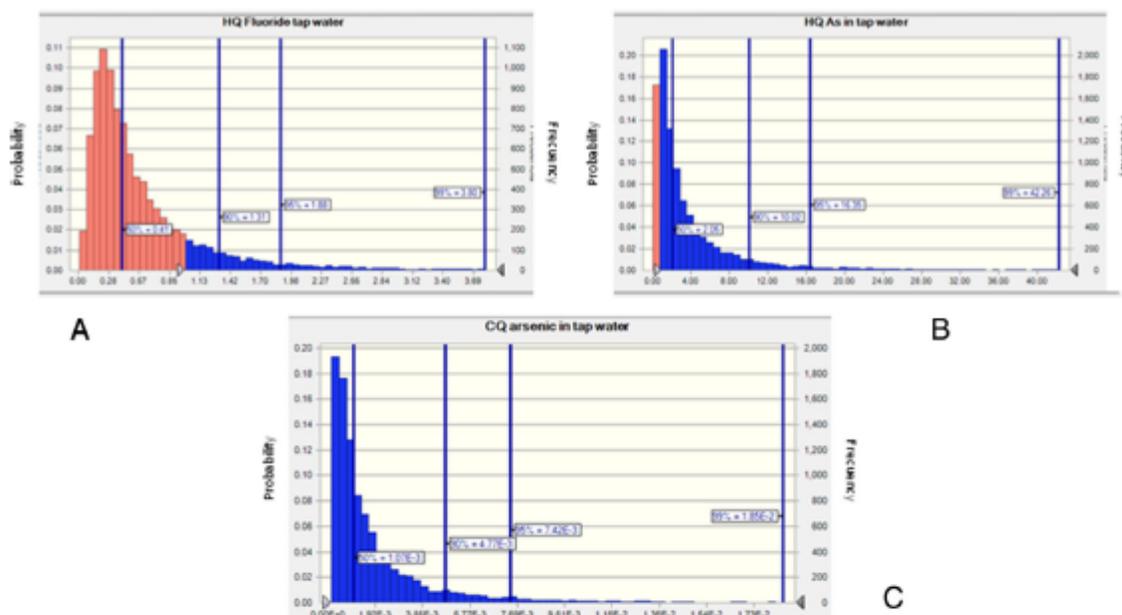


Fig. 3 HQ obtained through the Monte Carlo method. **a** HQ for F^- in water estimated for child consumption. **b** Non-carcinogenic risk ratio for arsenic in water estimated for child consumption. **c** ER show as CQ for arsenic in water. The lines correspond to the level of estimated risk for percentiles 50, 90, 95, and 99

established by EPA (EPA 2014b). An intervention action in the zone is recommended to mitigate the risk.

It has been reported that children exposed to fluoride concentrations in tap water lower to 0.7 mg/L have a low occurrence of moderate or severe fluorosis, while concentrations of 1.6 mg/L cause moderate or severe dental fluorosis (Irigoyen-Camacho et al. 2016). In this study, two communities, Guadalupe and Villanueva, were found to have average concentrations of fluoride lower than 0.7 mg/L. Zacatecas has reported a

community fluorosis index (CFI) above 1 similar to neighboring states such as Durango, San Luis Potosi, and Aguascalientes with naturally occurring fluoride in water (Betancourt-Lineares et al. 2013); it is known that dental fluorosis is closely related to the presence of F^- in drinking water (Mariño 2013).

RfD and MRL to As suggested by EPA and the ATSDR (IRIS 1988; ATSDR 2007b) is at 0.0003 mg/kg/day. Only As ADD for the community of Villanueva is lower than these safety doses, the

Table 9 Background on the concentration of iAs and F^- in Guadalupe, Zacatecas

Locality	Pollutant	Results	Reference
Guadalupe, Zacatecas	As	80 % wells above 0.025 mg/L	(Leal-Ascencio 2006)
	F^-	40 % of wells above 1.5 mg/L	
	As	0.04–0.27 mg/L	(González-Dávila 2011)
	F^-	1.28–2.85 mg/L	
	As	0.016–0.3 mg/L	(Padilla-reyes et al. 2012)
	F^-	1.28–3.2 mg/L	
	As	0.021–0.233 mg/L	(Data from this work)
	F^-	0.4–0.5 mg/L	

Studies conducted in the zone of San Ramón-Ojo de Agua, which are included in this work. The values correspond to the percentage of wells that exceeded Mexico’s existing environmental guide in the years of publication, as well as the concentration range for the water samples from wells used to supply water for human consumption, respectively

population of the rest of the communities has a higher probability of being exposed to doses of above the safety level as show in Table 5. Similarly, the HQ estimated to As exceed the unit, with the exception of Villanueva. The RfD and MRL to As were calculated taking into account hyperkeratosis and possible vascular alterations. The state of Hidalgo, Mexico, has reported various health effects related to the presence of As in the water; Smeester and colleagues reported epigenetic changes related to various diseases associated to arsenicosis in populations chronically exposed to As in drinking water (Smeester et al. 2011). Del Razo and colleagues found a relation between As exposure and the prevalence of diabetes (Del Razo et al. 2011); furthermore, there are reports of skin injuries whose severity is altered by individual susceptibility factors (Valenzuela et al. 2009). The probability that these trends will present themselves in Zacatecas is high, since, according to our estimation, 74 % of the local children and 99 % of the local adult may be exposed to elevated doses of this pollutant. The 90, 95, and 99 % of the HQ estimated for the local population exceed the unit above the acceptable risk level criteria. In the case of F^- , we estimated 16 % of local resident children were above the criteria safety. This estimation justifies an intervention in the zone (ODEQ 1999; EPA2014b).

Based on the ER suggested by EPA (see Table 1), we estimated that the As ER, with the exception of Villanueva, exceeds the risk criteria of 1×10^{-05} ; the 90, 95, and 99 % surpass the safety criteria for environmental health of 1×10^{-04} , 1×10^{-05} , and 1×10^{-06} , respectively, suggested as safety criterion by various international organizations (Cotruvo 1988; Paul R. Hunter & Fewtrell 2001; WHO 2006). We estimated that 99 % of the population resident in the sites study has a high probability of being exposed to a non-safe As dose (see Fig. 3 and Table 8). In this sense, the state of Zacatecas have reported an incidence in skin cancer, a type of cancer associated to arsenic (ATSDR 2007b; McClintock et al. 2012), of 20 cases per every 100,000 inhabitants and estimated that it will increase by 10.5 % annually (Pinedo-Vega et al. 2014).

The estimation for exposure risk for both pollutants, despite sharing the same route of exposure, presents different methodological challenges; the reference dose for arsenic and fluoride is calculated based on different effects, hyperkeratosis and dental fluorosis, respectively,

making it impossible to simply assume an additive risk. Although it is known that both, As and F^- , show associated effects on the central nervous system, which actually does not exist a reference dose for this effects, nonetheless, we must consider that evidence is being accumulated on the health risks assessment that could present themselves in the children exposed to this mixture when consuming tap water (Choi et al. 2012; Lu et al. 2000; Wang et al. 2007; Rocha-Amador et al. 2007). Should be considered, not currently exist a carcinogenic risk factor for F^- , regulatory agencies do not have sufficient evidence to develop criteria, making not possible to estimate the risk by methodology used in this study.

By not considering the contributions of other possible routes of exposure for the studied pollutants such as dust, bottled water, milk and food prepared using tap water, and in the specific case of fluoride, the use of fluoride salt and tooth paste, the exposure doses may be underestimated, factors that must be taken into account when designing an intervention in the area. Childhood malnutrition is another source of uncertainty which must be considered at the moment of intervention, since the body's defense mechanism may not be up to par due to a lack of nutrients, for example, in the case of arsenic; it is known that a folate deficient diet decreases the metabolization of As (Ghose et al. 2014). Likewise, dental fluorosis incidence is higher in states that present malnutrition in its population (Irigoyen-Camacho et al. 2016) which may increase the vulnerability of the exposed population.

However, we believe that the exposure doses, in addition to the risk ratio estimates, together with the epidemiological history found in the literary sources in zones where the environmental levels of arsenic and fluoride in water, are similar to the ones in our study area are enough to justify actions for diminishing the environmental exposure to these pollutants, in comparison to the health and economic cost if they are not carried out. Notably, people who have lived for generations in the study zone may be exposed from an early age and at crucial stages from maternal exposure, during pregnancy (Rager et al. 2014), to childhood, adolescence, and continuing on into adulthood, which could increase the risk of severe health effects associated to As and F^- (Smeester et al. 2011), as well as other natural pollutants from a mineral rich soil, characteristic of our study zone such as mercury and lead, which are known to affect the central nervous system, which could cause

synergism. Likewise, the presence of other carcinogenic agents in the environment such as ultraviolet radiation (Pinedo-Vega et al. 2014) could aggravate health effects associated to chronic exposure to As and F⁻.

The results obtained from the health risk estimation represent a quick and cheap decision-making tool related to environmental health problems. The use of probabilistic methodology helps to diminish uncertainties when performing iterations that simulate different possible scenarios. The children population was considered for the non-carcinogenic risk estimation because they are in a window of vulnerability due to physiological characteristics of their particular phase of development and play habits (Ilizaliturri et al. 2009), also to include the population most at risk when planning and intervention in this zone. Therefore, the implementation of environmental health programs and risk communication to diminish the exposure to As and F⁻ present in tap water should focus mainly on children, because if this particularly vulnerable sector of the population can be protected, the rest of the population will benefit from it.

Conclusions

Base on the results obtained in this study, it is clear that the children have a higher risk of presenting health effects caused by the consumption of water with a high As and F⁻ content. For this reason, it is imperative to take action towards providing these communities with clean drinking water by installing public treatment plants either through campaigns or risk communication, as well as maintaining epidemiological surveillance aimed at mitigating the risks associated to contaminated water exposure. The main contribution of this study is to provide information for decision-making based on risks and to protect the health of the population that resides in the zones with natural contamination in the state of Zacatecas.

Endnotes

¹For its acronym in Spanish Norma Mexicana (Mexican Regulation).

²For its acronym in Spanish *Comisión Nacional del Agua* (National Water Commission)

References

- Amienta, M. A., Finkelman, R. B., & Rubio Arias, H. (2013). Medical geology: its relevance to Mexico. *TecnoCiencia Chihuahua*, VII(3), 152–162.
- ATSDR, 2005. Appendix F : Derivation of comparison values. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 0. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHAManual/appf.html> [Accessed November 28, 2015]
- ATSDR, 2003a. Public health statement: toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp11-c1-b.pdf>
- ATSDR, 2007a. ToxGuide for arsenic as CAS # 7440-38-2, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-2.pdf>
- ATSDR, 2003b. ToxGuide for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine., Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-11.pdf>.
- ATSDR, 2007b. Toxicological profile for arsenic. In *ATSDR's Toxicological Profiles*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, p. 24. Available at: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420061888_ch33
- Betancourt-Lineares, A., et al. (2013). Prevalencia de fluorosis dental en localidades mexicanas ubicadas en 27 estados y el D.F. a seis años de la publicación de la Norma Oficial Mexicana para la fluoruración de la sal. *Revista de Investigación Clínica*, 65(3), 237–247.
- Buchhamer, E. E., et al. (2012). Environmental risk assessment of arsenic and fluoride in the Chaco Province, Argentina: research advances. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 75(22–23), 1437–1450. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2012.721178>.
- Bundschuh, J., et al. (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. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969711006486>.
- CDC. (2015). U.S. public health service recommendation for fluoride concentration in drinking water for the prevention of dental caries. *Reports and Recommendations Public Health Reports*, 130(1), 1–14.
- Choi, A. L., et al. (2012). Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), 1362–1368.
- CONAGUA, 2015. Determinación de la Disponibilidad de Agua en el Acuífero Guadalupe-Bañuelos, Estado de Zacatecas, Available at: http://www.conagua.gob.mx/Conagua07/Aguasubteranea/pdf/DR_3227.pdf
- Cotruvo, J. A. (1988). Drinking water standards and risk assessment. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 8(March), 288–299.
- Del Razo, L. M., et al. (2011). Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environmental health : a global access science source*, 10(1), 73. Available at: <http://www.chjournal.net/content/10/1/73>.

- Díaz Barriga, F. (1999). Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados, Available at: <http://www.bvsde.paho.org/bvsarpc/fulitext/metodolo/metodolo.pdf>
- EPA, 1994. Method 200.7: Determination of metals and trace elements in water and wastes office of research and development, Available at: <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-200.7.pdf>
- EPA, 2007. Method 3015A: Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts, Available at: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3015a.pdf>
- EPA. (2002). National primary drinking water regulations: long term 1 enhanced surface water treatment rule. *Final Rule. Federal Register*, 67(9), 1811–1844. Available at: <http://www.epa.gov/safewater/consumer/pdf/mcl.pdf>
- EPA, 2014a. Priority pollutant list, Available at: <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>
- EPA. (2014a). *Probabilistic risk assessment to inform decision making: frequently asked questions EPA/100/R-ed*. Washington, D.C.: Risk Assessment Forum, Office of the Science Advisor, USEPA. Available at: <http://epa.gov/raf/prawhitepaper/index.htm>
- EPA, 2001. Risk assessment guidance for superfund (RAGS) volume III—part A: process for conducting probabilistic risk assessment, Appendix B, Available at: <http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/rag3adt/>
- Ghose, N., et al. (2014). Role of folic acid on symptoms of chronic arsenic toxicity. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(1), 89–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci-hub.io/pmc/articles/PMC3915479/>
- González-Dávila, O. (2011). *Assessment of the exposure to arsenic and fluoride from drinking water in the city of Guadalupe, Zacatecas* (pp. 1–8). Mexico: World Congress on Water, Climate and Energy.
- González-Horta, C., et al. (2015). A concurrent exposure to arsenic and fluoride from drinking water in Chihuahua, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 4587–4601. Available at: <http://www.mdpi.com/1660-4601/12/5/4587>
- Grimaldo, M., et al. (1995). Endemic fluorosis in San Luis Potosí, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environmental Research*, 68, 25–30.
- Hernández L, Stern D, Tolentino L, Espinosa J, Barquera S. (2012) Consumo de agua en la población infantil y adolescente. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. Available at: http://www.h4hinitiative.com/sites/default/files/basicpage/file/consumoagua_en_ninos_y_adolescentes_insp.pdf. ISBN 978-607-511-040-0
- Herrera-Tolado, C., 2012. Análisis del Uso y Manejo de los Recursos Hídricos en el Estado de Zacatecas, Zacatecas: Banco Mundial. Available at: http://www-wds.worldbank.org/external/default/WDSPContentServer/WDSP/IB/2012/04/27/000020953_20120427150616/Rendered/PDF/684220WP0P10580S0HIDRICOS0ZACATECAS.pdf
- Huang, X., et al. (2015). Different choices of drinking water source and different health risks in a rural population living near a lead/zinc mine in Chenzhou City, southern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(11), 14364–14381.
- IARC. (2011). Arsenic and arsenic compounds. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100(C), 41–93.
- Iizaliturri, C. A., et al. (2009). Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interencias*, 34(2405), 710–717.
- Irigoyen-Camacho, M. E., et al. (2016). Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. *Science of the Total Environment*, 541, 512–519. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715307452>
- IRIS, 1988. Arsenic, inorganic; CASRN 7440-38-2, Integrated risk information system. Available at: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0278_summary.pdf
- IRIS, 1987. Fluorine (soluble fluoride); CASRN 7782-41-4, Integrated risk information system. Available at: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0053_summary.pdf
- Jarquín-Yañez, L., et al. (2015). Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosí. *TheScientificWorldJOURNAL*, 2015, 647184. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4350618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jha, S. K., et al. (2013). Fluoride in groundwater: toxicological exposure and remedies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16(1), 52–66. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10937404.2013.769420>
- Kurzus-Spencer, M. et al., 2015. Relation of dietary inorganic arsenic to serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) at different threshold concentrations of tap water arsenic. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, pp.1–7. Available at: <http://www.nature.com/jes/journal/vaop/ncurrent/full/jes201492a.html>; doi:10.1038/jes.2014.92.
- Leal-Ascencio, M.T., 2006. Evaluación de Acuíferos de la Mesa del Norte. In memories V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Oaxtepec, Mor. México, 9. Available at: http://www.uaemex.mx/Rod_Ambientales/docs/congresos/MORELOS/Extensio/CA/EO/CAO-35.pdf [Accessed November 28, 2015].
- Lu, Y., et al. (2000). Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride*, 33(2), 74–78.
- Mariño, R. (2013). The prevalence of fluorosis in children is associated with naturally occurring water fluoride concentration in Mexico. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 13(3), 100–101. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532338213000973>
- Martín, E., et al. (2015). Metabolomic characteristics of arsenic-associated diabetes in a prospective cohort in Chihuahua, Mexico. *Toxicological Sciences*, 144(2), 338–346. Available at: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/ktu318>
- McClintock, T. R., et al. (2012). Arsenic exposure in Latin America: biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429, 76–91. Available at: doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.051.

- Merola, R. B., et al. (2015). Arsenic exposure to drinking water in the Mekong Delta. *The Science of the Total Environment*, 511, 544–552. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714018026> [Accessed November 12, 2015].
- Mojarro-Davila, F., De León-Mojarro, Benjamín, JÚnez-Ferreira, H. E., & Bautista-Capetillo, C. F. (2013). *Agua subterránea en Zacatecas 1st ed.* Zacatecas, México: UAZ.
- ODEQ (1999). *Guidance for use of probabilistic analysis in human health risk.* Portland, Oregon, United States: Oregon Department of Environmental Quality. Available at: <http://www.deq.state.or.us/lq/pubs/docs/cu/GuidanceProbabilisticAnalysis.pdf>.
- Ortiz Perez, D., Rodríguez Martínez, M., Martínez, F., Borja Aburto, V. H., Castelo, J., Grimakdo, J. L., & Díaz Barriga, F. (2003). Fluoride-induced disruption of reproductive hormones in men. *Environmental Research*, 93(1), 20–30. doi:10.1016/S0013-9351(03)00059-8.
- Ortega, A. (2009). Presencia, distribución, hidrogeoquímica y origen de arsénico, fluoruro y otros elementos traza disueltos en agua subterránea, a escala de cuenca hidrológica tributaria de Lerma-Chapala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 26, 143–161.
- Padilla-reyes, D. A., et al. (2012). Calidad del agua del acuífero Guadalupe-Bañuelos, Estado de Zacatecas, México. *Geos*, 32(2), 367–384.
- Hunter P. R., & Fewtrell L. (2001). Acceptable risk. In J. B. Loma Fewtrell (Ed.), *Water quality: guidelines, standards and health* (pp. 207–227). London, UK: IWA.
- Pinedo-Vega, J. et al., 2014. Incidencia de cáncer de piel en Zacatecas. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social*, 52(492). México. Available at: <http://www.modigraphic.com/pdfs/imss/im-2014/im143k.pdf>.
- Rager, J. E., et al. (2014). Prenatal arsenic exposure and the epigenome: altered microRNAs associated with innate and adaptive immune signaling in newborn cord blood. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(3), 196–208. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.21842>.
- Rango, T., et al. (2014). Fluoride exposure from groundwater as reflected by urinary fluoride and children's dental fluorosis in the Main Ethiopian Rift Valley. *Science of the Total Environment*, 496, 188–197. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714010778>.
- Rocha Amador, D., et al. (2007). Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, 23(Suppl 4), S579–S587.
- SCFI, 2001. *NMX-AA-077-SCFI-2001* Determinación de Fluoruros en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas., Available at: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-077-SCFI-2001.pdf>
- Smeester, L., et al. (2011). Epigenetic changes in individuals with arsenicosis. *Chemical Research in Toxicology*, 24(2), 165–167. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- SSA, 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano- Límites permisibles de Calidad y Tratamientos a que debe someterse al Agua para su Potabilización," Available at: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>.
- SSA, 2002. *NOM-230-SSA1-2002*, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo., Available at: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>.
- Tsuji, J. S., et al. (2014). Association of low-level arsenic exposure in drinking water with cardiovascular disease: a systematic review and risk assessment. *Toxicology*, 323, 78–94. Available at: http://ac.cis-cdn.com/S0300483X14001218/1-s2.0-S0300483X14001218-main.pdf?_tid=29557042-7a5f-11e4-8152-00000aacb35e&acdnat=1417551166_c0d1d33853fb05da7c5a9e18097f55fb.
- Tyler, C. R., & Allan, A. M. (2014). The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Current Environmental Health Reports*, 1(2), 132–147. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40572-014-0012-1>.
- Valenzuela, O. L., et al. (2009). Association of AS3MT polymorphisms and the risk of premalignant arsenic skin lesions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(2), 200–207. Available at: <http://cutis.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/cutis/cutis.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19538983&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1016/j.taap.2009.06.007> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09002579>.
- Vega, S. (2002). *Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México* (p. 15). México: Comisión Nacional del Agua. Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua.
- Wang, S.-X., et al. (2007). Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's iq and growth in Shanyin County, Shanxi Province, China. *Environmental Health Perspectives*, 115(4), 643–647. Available at: <http://www.chponline.org/ambra-doi-resolver/10.1289/ehp.9270>.
- Wang, W., Cheng, S., & Zhang, D. (2014). Association of inorganic arsenic exposure with liver cancer mortality: a meta-analysis. *Environmental Research*, 135, 120–125. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935114003041>.
- WHO, 2011. Arsenic in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/arsenic.pdf.
- WHO, 2004. Fluoride in drinking-water background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/fluoride.pdf.
- WHO. (2006). Guidelines for drinking-water quality. In *First Addendum to Third Edition* (3rd ed.). Switzerland: World Health Organization.
- Zhang, S., et al. (2015). Modifying effect of COMT gene polymorphism and a predictive role for proteomics analysis in children's intelligence in endemic fluorosis area in Tianjin, China. *Toxicological Sciences*, 144(2), 238–245. Available at: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfu311>.

Borrador

Mitochondrial DNA copy number and Telomere length in Mexican Children from Zacatecas, co-exposed to Inorganic Arsenic and Fluoride.

Key World: cnDNAmt Telomere length co-exposure As F Water

Abstract

Variations in mitochondrial DNA and function of telomere have been suggested to be involved in pathogenesis of complex disease. Inorganic arsenic (iAs) and Fluoride (F⁻) exposure is an important public health problem in the world. The children are risk group susceptible to damage by these inorganic pollutants. The co-exposure could induce effects stronger than already reported for each pollutant. Therefore, in this study we used the mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn) and telomere length as an early biomarker to assess iAs and F⁻ co-exposure in children. Urinary geometric mean of arsenic Σ iAs, MAs, DMAs was 38.95 ng/mL and 72.08 ng/mL ($p < 0.001$); while urinary geometric mean of F⁻ was 1.51 μ g/mL and 3.13 μ g/mL ($p < 0.001$) in Ojo de Agua y Ojocaliente respectively. The mean of relative mtDNAcn was 4.27 and 2.28 ($p < 0.001$) and mean of telomere length was 0.092 and 0.104 ($p = 0.61$) in Ojo de Agua y Ojocaliente respectively. After adjusting for age, the total urinary arsenic was negatively associated with mtDNAcn ($\beta = -0.322$, $p = 0.006$, CI95% -0.549 to -0.096) and the interaction of co-exposure to iAs and F⁻ was negatively associated with mtDNAcn ($\beta = -0.079$, $p = 0.02$, CI95% -0.146 to -0.013), on the other hand, Telomere length was negatively associated with iAs ($\beta = -0.807$, $p = 0.029$, CI95% -1.523 to -0.091) and positively with F⁻ ($\beta = 1.262$, $p = 0.03$, CI95% 0.114 to 2.411) in F⁻ high exposition group. This study was a first approach to determine an early effect associated with iAs and F⁻ co-exposure in children.

Introduction

Inorganic Arsenic (iAs) and fluoride (F⁻) in groundwater has been considered as a global health concern. In México, high concentrations of iAs and F⁻ has been reported, mainly in central area of the country where Zacatecas state, is located (Leal-Ascencio 2006; Ortega 2009; Vega 2002). Climate, weak use land planning of population areas, overexploitation of aquifers and drought are some factors that aggravate the problem (Herrera-Toledo 2012). Children are particularly vulnerable, considering they are in a stage of development, could be exposed to higher doses than adults, because their size and weight are lower and children's play activities, in addition with genetic factors and nutritional status (Ilizaliturri et al. 2009).

iAs exposure has been associated with hyperkeratosis, diabetes mellitus type 1, and neurological and cardiovascular system effects. International Agency for Research on Cancer (IARC 2011) classifies arsenic as carcinogenic category 1. (Del Razo et al. 2011; ATSDR 2007b; Wang et al. 2014). F⁻ exposure was associated with neurological and male reproductive system effects, and with dental and skeletal fluorosis (Rocha-Amador et al. 2007; Choi et al. 2012; ATSDR 2003b).

Mitochondria are target cellular organelles for many pollutants, have a fundamental role in mammalian cells, are energy-generating organelles and their alteration has been associated with diseases like cancer (Warburg 1956). Also, it is related with regulation of apoptosis (Susin et al. 1998). Mitochondrial DNA (mtDNA) is different than nuclear DNA, its circular genome and lack of histones, has fewer repair mechanisms than nuclear DNA, and the respiratory chains generate a medium rich in reactive oxygen species (ROS). Mutations in mtDNA have been associated with different cancers in humans, mutation rate increases in excess ROS iAs induced. (M. a Partridge et al. 2007; Liu et al. 2005). Mammalian cells have hundreds of mitochondria, each with several hundred copies of mtDNA. A depletion of copy number of mitochondrial DNA (mtDNAcn) in cells exposed to iAs in vitro has been reported (M. a Partridge et al. 2007), furthermore, an increase of cellular ROS and a declined mtDNA repair system has been observed in cells with depletion of mtDNAcn (Delsite et al. 2003). Mitochondrial damage is critical to mutagenicity caused by arsenic (Lee & Ho 1994; Lee et al. 2015). On the other hand, it has been reported that F⁻ can alter cellular respiration and glutathione levels, often resulting in excessive production of ROS in the mitochondria, in humans, F⁻ alters the activity of mitochondria in soft tissues such as the liver, kidney, brain, lung, and testes (Barbier et al. 2010).

Telomeres are at the chromosome ends, have a DNA protective function, are a tandem repeat sequence, in the cell cycle, telomere sequence shortens with each division, leading to a senescent cell, associated with aging. Furthermore, if not decrease telomere length, the cell can immortalize. An alteration in the telomere length has been associated with many chronic diseases and cancers (Gao et al. 2015). iAs dose-dependently altered telomere length, in low concentration increases telomerase activity and in high concentration reduces telomere length. (Chatterjee et al. 2014) In addition, F⁻ has effects on the cell cycle, increases cellular proliferation in bone cells in high concentration (Barbier et al. 2010). Therefore, mtDNAcn and telomere length could be a biomarker of early effects associated to iAs and F⁻ chronic exposure.

In the context of the assessment of environmental risks to human health, to reduce uncertainty when defining the risks, Diaz-Barriga et al. propose the use of biomarkers in methodologies adapted to the conditions of countries like Mexico. This represents a valuable tool for generating information provided to decision makers resource management and justification of intervention programs (Díaz Barriga 1999; Ilizaliturri et al. 2009), so, the aim of this work is to study the mtDNAcn and telomere length in children exposed to iAs and F⁻ in drinking water as a potential biomarker for early effects.

Materials and Methods

Study Sites and Subject Selection

A cross-sectional study was carried out in children aged 6 -12 years were selected from a two elementary school with high concentration of iAs and F⁻ in tap water (iAs > 100 µg/l; F⁻>1.5 mg/l), based in a previously screening study whose aim was to determine concentration of arsenic and fluoride in tap water in Zacatecas state. One school is located in Ojocaliente, a head city of municipality of Ojocaliente, Zacatecas; the other school is in the suburb of Ojo de Agua which is located within the city limits of Zacatecas, México. Ojocaliente is located 46 kilometers southeast of the capital of the state of Zacatecas and has 20 851 inhabitants and Ojo de Agua has 546 inhabitants according to the 2005 census.

The study population comprised 105 subjects (47 of Ojocaliente, 58 of Ojo de Agua), the subjects were recruited in winter of 2013, through invitation to the parent of student of school selected. Inclusion criteria included living in the area for since birth, use the water from the local network, have good health and the absence of medication. Socio-economic status, residential history, environmental and occupational exposures, lifestyle and dietary habits were collected through interviews with the children parents using questionnaire.

The study was approved by the bioethics committee of the Universidad Autónoma de Zacatecas. All parents signed a written informed consent.

Urine samples

A container for collecting urine samples had given to parents. First micturition of the day was collected, and the container is filled to the mark of 100 ml, sample kept cold until transfer to the laboratory where was fractionated into two aliquots, a sample of 15 ml was reserved for analysis of arsenic and the other referred to density analysis and determination of fluorine.

Blood samples

The blood sampling was performed by trained and experienced in handling children staff. Bioethics Committee guidelines were followed, the puncture was always performed when the parent or legal guardian was present. Peripheral blood sampling was performed by venipuncture and using the Vacutainer® system. Blood samples were taken with EDTA anticoagulant remaining cold until processed in the laboratory. Samples were centrifuged to separate the different components of blood. DNA was isolated from lymphocytes..

Quantification of Urinary iAs

Urinary iAs and its metabolites (Σ MAs and Σ DMAs) were quantified. This study was performance in laboratory in Cinvestav-IPN used a traditional HG-CT- AAS system with

a conventional quartz tube atomizer equipped with FIAS flow injection accessory (FIAS) (Hernandez-Zavala et al. 2008), in aliquots of urine that were stored at -20°C. This method has been optimized to detect all tri and pentavalent metabolites of iAs except dimethylthioarsinic acid (Devesa et al. 2004; Hernandez-Zavala et al. 2008).

Quantification of Urinary Fluoride

An electrochemical method of ion selective was used to determinate urinary F⁻. We used a selective ion F⁻ electrode, this method have high sensibility and selectivity.

Quantification of mtDNAcn and telomere length

Genomic DNA (gDNA) was purified from peripheral blood lymphocytes (PBLs). Promega Wizard genomic DNA purification kit was used to isolated gDNA. gDNA was used for both tests. mtDNAcn and telomere length was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay using beta-globin as a reference gene. mtDNAcn method quantification is based in quantification of M and S quantities expressed as cycle threshold derived from a standard curve obtained from serial dilutions of a reference DNA (Pavanello et al. 2013). Telomere length (TL) was measured using relative telomere length (RTL) using qPCR from genomic DNA PBL. The primers and PCR conditions were adapted from methods reported previously (Cawthon 2009; Pavanello et al. 2013) and used Evergreen mix.

Statistic analyses

Univariate and multivariate linear regressions were conducted as well as t-student and the Mann-Whitney U tests to compare means between groups.

Results

Urinary concentration of iAs and F⁻

∑iAs, MAs and DMAs urine concentration is show in Table 1. The results are organized into strata based on biological exposure index (BEI) recommended for each pollutant, using four concentration ranges: <35, 35–70, >70–140, >140 ng/mL defined by 1x, 2x and 4x BEI value for As (ACGIH 2002) and four concentration ranges (<1, 1–2, >2–4, >4 µg/mL) based on the BEI of 2 µg/mL to F (ACGIH 2012). 69% of sample was above of As BEI, and 81% is above of F⁻ BEI. 13% have a high exposure to As and 17% have a high levels of F, this summarized in figure 1.

Table 1. Urinary Concentration of iAs an F⁻ in children in Zacatecas, México.

	Concentration	n	Mean (min-max)	%
As (\sumiAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	<35	33	18.65 (3.7-31.3)	31.4
	35-70	35	53.9 (35.3 - 69.8)	33.3
	>70-140	23	102.3 (70.2 -139.1)	21.9
	>140	14	182.6 (146.3 - 238.5)	13.3
F⁻ (μg/mL)	<1	20	0.69 (0.25 - 0.98)	18.8
	1-2	34	1.48 (1-1.95)	32.0
	>2-4	34	2.68 (2.01-3.98)	32.0
	>4	18	4,91 (4.03-7.06)	16.9

Ojocaliente has levels higher than Guadalupe for both pollutant ($p < 0.001$), geometric mean of As (\sum iAs, MAs, DMAs) is 72.0 ng/mL in Ojocaliente and 38.9 ng/mL in Guadalupe. Geometric mean F⁻ is 3.1 μ g/mL and 1.5 μ g/mL in Guadalupe. This is show in Table 2 and figure 2.

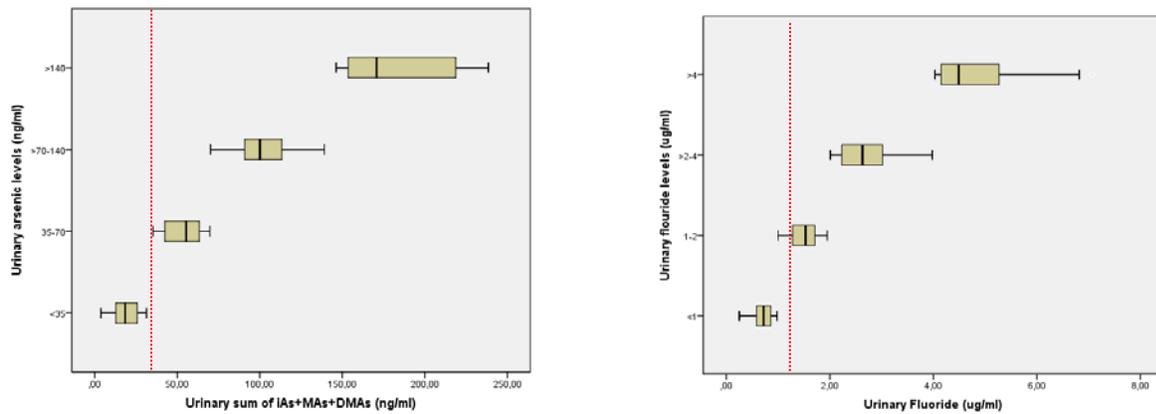


Figure 1. Exposure levels of arsenic and fluorine quantified in child population
The red line represents the limit BEI

Table 2. Comparative concentration of exposure biomarker between sites

	Site	n	Geometric mean	P	test
As (ΣiAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	Ojocaliente	47	72.0	<0.001	U Mann-Whitey
	Guadalupe	58	38.9		
F⁻ (μg/mL)	Ojocaliente	47	3.1	<0.001	U Mann-Whitey
	Guadalupe	58	1.5		

Urine profile excretion of metabolites of arsenic is shown in Table 3. When comparing the percentages of each metabolite depending on the gender of individual we finding differences ($p < 0.01$), girls have a slower rate in the second step of metabolism of arsenic, taking a smaller percentage of DMAs children, which is consistent with the literature.

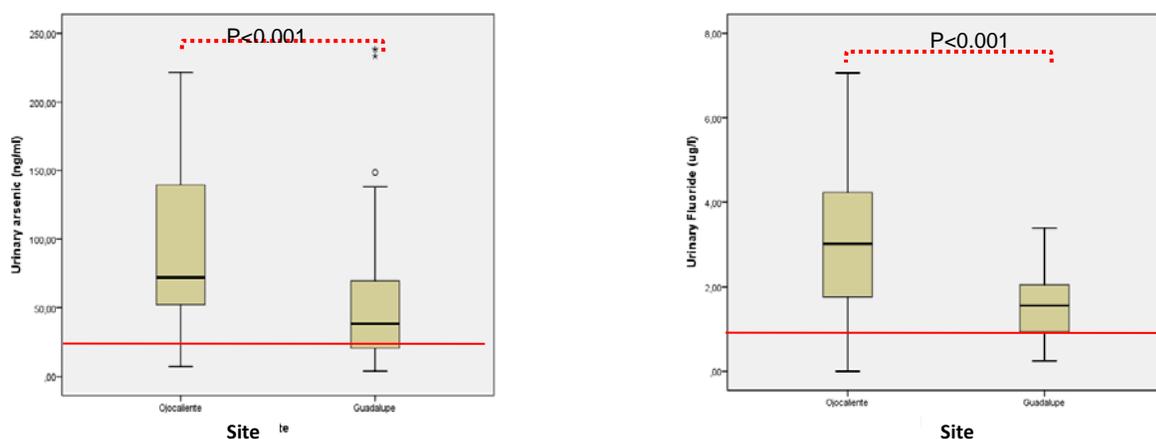


Figure 2. Differences between exposure levels of the two sites studie

Table 3. Urinary metabolites of arsenic in children resident in zone with nature occurrence of iAs and F en water in Zacatecas, México.

	Estimate	Male n = 57	Female n = 49	P	test
%Asi	Geometric mean	14.0	16.1	0.003	U Mann- Whitney
%MAs	mean	11.8	13.9	0.01	t student
%DMAs	mean	73.6	69.3	0.003	

In order to study exposure to As and F and the possible effects, different scenarios they were hypothesized and summarized in Table 4. Scenarios are classified as high or low level of As and F based on BEI and the possible combinations between them. This hypothesis has been studied in multiple linear regression tests.

Tabla 4. Possible co-exposure scenarios analyzed

	Category	As (Σ iAs, MAs, DMAs) (ng/mL)	F in urine (μ g/mL)	N	MeanGeometric	DES
mtDNAcn	0	low (<35)	low (<2)	12	3.8	1.9
	1	high (\geq 35)	low (<2)	9	2.6	2.1
	2	low (<35)	high (\geq 2)	2	4.3	1.4
	3	high (\geq 35)	high (\geq 2)	23	2.4	1.8
Telomeric length	0	low (<35)	low (<2)	8	0.117	2.08
	1	high (\geq 35)	low (<2)	5	0.075	1.73
	2	low (<35)	high (\geq 2)	1	0.100	
	3	high (\geq 35)	high (\geq 2)	20	0.097	2.35

Analyzing biomarkers of effect between study sites, we found that the results are as follows; Urinary geometric mean of arsenic Σ iAs, MAs, DMAs was 38.95 ng/mL and 72.08 ng/mL ($p < 0.001$); while urinary geometric mean of F⁻ was 1.51 μ g/mL and 3.13 μ g/mL ($p < 0.001$) in Ojo de Agua y Ojocaliente respectively. The mean of relative mtDNAcn was 4.27 and 2.28 ($p < 0.001$) and mean of telomere length was 0.092 and 0.104 ($p = 0.61$) in Ojo de Agua and Ojocaliente respectively. After adjusting for age, the total urinary arsenic was negatively associated with mtDNAcn ($\beta = -0.322$, $p = 0.006$, CI95% -0.549 to -0.096) and the interaction of co-exposure to iAs and F⁻ was negatively associated with mtDNAcn ($\beta = -0.079$, $p = 0.02$, CI95% -0.146 to -0.013), on the other hand, Telomere length was negatively associated with iAs ($\beta = -0.807$, $p = 0.029$, CI95% -1.523 to -0.091) and positively with F⁻ ($\beta = 1.262$, $p = 0.03$, CI95% 0.114 to 2.411) in F⁻ high exposure group.

Discussion

First the weight of confounding variables such as body mass index, age, sex, if someone in the family smokes and the place of origin, was analyzed for which introduced the logistic regression model together with explanatory and independent variables. None of them presented a statistically significant relationship so they were discarded from the model.

The number of relative units of copies of mitochondrial DNA is starting to be used as a biomarker of effect for environmental toxic exposures, has been reported in the literature decreased mtDNAcn in population exposed to particulate matter (Hou et al. 2013) and an increase of the same in people exposed to polycyclic aromatic compounds (Pavanello, et al. 2013). The mtDNAcp is an indicator of the biological response to arsenic exposure before clinical signs or symptoms. An increase ADNMtcn has been associated with various cancers, such as lung or skin; while a decrease was observed in diseases such as diabetes (DELSITE et al. 2003). Furthermore, it has been reported that in vitro exposure As in mammalian cells causes a decrease in the number of copies of mitochondrial DNA. Is known to have a few thousand copies of the mitochondrial genome in each cell, however, a decrease in mtDNAcp could affect the levels of expression of COX subunit (cytochrome C) encoded in the mitochondrial DNA, in the same sense, it has reported that cancer cells with a disminucion mtDNA have also diminished DNA repair capacity and increased oxidative damage to nuclear genome. In vitro it has also been demonstrated dependent reduction of the dose of mtDNAcn, and low, similar to the conditions of exposure arsenic in drinking water concentrations, presents a decrease in mtDNAcp (MA Partridge et al. 2007) on the other hand, it has been reported that fluoride may inhibit Na + / K + ATPase pump and affects the potential and permeability of the cell membrane, which decreases mitochondrial function, likewise, exposure to fluorides increases the generation superoxide anion which I can damage the mitochondria (Barbier et al. 2010).

In the case of the telomere, it has been reported that high exposure to arsenic has been associated with lengths greater telomere compared with populations with a level of exposure to lower arsenic (Gao et al 2015;. Li et al 2012.; Chatterjee et al. 2014). The explanation given by some authors (Gao et al. 2015) is an up-regulation of telomerase, a promoter of the elongation of the telomere as WRN, deprotection of the telomere or having DNA damage, repair is stimulated telomeric DNA, which would result in an increase in telomere length. In this study we found a significant negative association between mtADNcp and the concentration of total urinary iAs ($\beta = -0,322$ p = 0.006), which is consistent with the results of previous studies, whereas when they study the interaction of exposure to iAs and F a statistically significant negative association ($\beta = -0,079$ p = 0.02) was found, which tells us that the interaction of F and IAS can alter the effect of pollutants in relation if exposure to just one from them. Regarding the telomere length, we found a negative association between exposure to iAs ($\beta = -0,807$ p = 0.029) and a positive association ($\beta = 1.262$ p = 0.033) related to high exposure to fluorides in drinking water, which leads us to believe that such exposure enhances the effect of as on the telomere.

Conclusions

This study was a first approach to determine an early effect associated with iAs and F⁻ co-exposure in children.

Bibliografía

- ACGIH, 2012. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Fluorides: BEI®. 7th ed., Cincinnati, OH, USA: ACGIH.
- ACGIH, 2002. American Conference of Governmental Industrial Hygienists Arsenic and soluble Inorganic compounds: BEI. , 4.
- ATSDR, 2003. ToxGuide for Fluorides , Hydrogen Fluoride , and Fluorine., Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-11.pdf>.
- ATSDR, 2007. Toxicological Profile for Arsenic. In ATSDR's Toxicological Profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, p. 24. Available at: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420061888_ch33.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. & Del Razo, L.M., 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), pp.319–333. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279710004631>.
- Cawthon, R.M., 2009. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), pp.1–7.
- Chatterjee, D. et al., 2014. Arsenic exposure through drinking water leads to senescence and alteration of telomere length in humans: A case-control study in West Bengal, India. *Molecular carcinogenesis*, (October 2013), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665044>.
- Choi, A.L. et al., 2012. Developmental fluoride neurotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), pp.1362–1368.
- Delsite, R.L. et al., 2003. Mitochondrial impairment is accompanied by impaired oxidative DNA repair in the nucleus. *Mutagenesis*, 18(6), pp.497–503.
- Devesa, V. et al., 2004. Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, pp.1460–1467.
- Díaz Barriga, F., 1999. Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados, Available at: <http://www.bvsde.paho.org/bvsarp/e/fulltext/metodolo/metodolo.pdf>.
- Gao, J. et al., 2015. Arsenic exposure, telomere length, and expression of telomere-related genes among Bangladeshi individuals. *Environmental Research*, 136, pp.462–469. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935114003624>.
- Hernandez-Zavala, A. et al., 2008. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). , 23, pp.342–351.
- Herrera-Toledo, C., 2012. Análisis del Uso y Manejo de los Recursos Hídricos en el Estado de Zacatecas, Zacatecas: Banco Mundial. Available at: http://www-wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/2012/04/27/000020953_20120427150616/Rendered/PDF/684220WPOP10580S0HIDRICOS0ZACATECAS.pdf.
- IARC, 2011. Arsenic and arsenic compounds. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100 C, pp.41–93.
- Ilizaliturri, C. a et al., 2009. Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencias*, 34(2405), pp.710–717.
- Leal-Ascencio, M.T., 2006. Evaluación de Acuíferos de la Mesa del Norte. In *memories V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales*. Oaxtepec, Mor. México, 9. Available at: http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/MORELOS/Extenso/CA/EO/CAO-35.pdf [Accessed November 28, 2015].
- Lee, T.C. & Ho, I.C., 1994. Differential cytotoxic effects of arsenic on human and animal cells. *Environmental health perspectives*, 102 Suppl (18), pp.101–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lee, W. et al., 2015. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell Death and Disease*, 6(2), p.e1664. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.34>.
- Liu, S. et al., 2005. Mitochondrial Damage Mediates Genotoxicity of Arsenic in Mammalian Cells. *Cancer Research*, (8), pp.3236–3242.

- Ortega, A., 2009. Presencia, distribución, hidrogeoquímica y origen de arsénico, fluoruro y otros elementos traza disueltos en agua subterránea, a escala de cuenca hidrológica tributaria de Lerma-Chapala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 26, pp.143–161.
- Partridge, M. a et al., 2007. Arsenic induced mitochondrial DNA damage and altered mitochondrial oxidative function: implications for genotoxic mechanisms in mammalian cells. *Cancer research*, 67(11), pp.5239–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545603>.
- Pavanello, S. et al., 2013. Mitochondrial DNA Copy Number and Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 22(10), pp.1722–1729. Available at: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-13-0118>.
- Del Razo, L.M. et al., 2011. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environmental health : a global access science source*, 10(1), p.73. Available at: <http://www.ehjournal.net/content/10/1/73>.
- Rocha-Amador, D. et al., 2007. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 23 Suppl 4, pp.S579–S587.
- Susin, S. a., Zamzami, N. & Kroemer, G., 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: Doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366(1-2), pp.151–165.
- Vega, S., 2002. Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México. Comisión Nacional del Agua. Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua, p.15.
- Wang, W., Cheng, S. & Zhang, D., 2014. Association of inorganic arsenic exposure with liver cancer mortality: A meta-analysis. *Environmental research*, 135, pp.120–5. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935114003041>.
- Warburg, O., 1956. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), pp.309–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>.

Anexo 3. Aval del comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Zacatecas para el proyecto.

**Universidad Autónoma de Zacatecas**
"Francisco García Salinas"
Área de Ciencias de la Salud
Odontología - Enfermería - Químico Farmacéutico Biólogo - Medicina Humana - Nutrición

**UNIVERSIDAD**
FRANCISCO GARCÍA SALINAS
Área de Ciencias de la Salud

ACS/UJAZ Ofc. No. 148/2012

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe **M. EN C. MARÍA DEL CARMEN ACEVES MEDINA**, Coordinadora del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas "Francisco García Salinas"

OTORGA EL AVAL

Al protocolo de Investigación denominado: "**DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD POR HIDROARSENISMO EN POBLACIÓN DEL ESTADO DE ZACATECAS**" presentado por la M. en C. Mónica Imelda Martínez Acuña, Docente Investigador del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Cabe mencionar que dicho protocolo ya fue evaluado y aprobado por el Comité en su Conjunto.

ATENTAMENTE
Zacatecas, Zac., 11 de Octubre del 2012.



Área Ciencias de la Salud
2009-2012

c.c.p. Archivo institucional

Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km.6,
Ejido la Escondida C.P. 98160 Zacatecas, Zac. Mexico.
Tel y Fax. 01 (492) 92-5-66-96



Anexo 4. Permisos de la Secretaria de Educación pública para realizar el estudio

SEC
Secretaría de
Educación y Cultura
Subsecretaría de Educación Básica y Normal
Dirección de Educación Básica Estatal
Departamento de Educación Primaria Estatal



Memorandum No. 88

Guadalupe, Zac., 1 de noviembre de 2012

M.C. MONICA IMELDA MARTINEZ ACUÑA
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS
QUIMICAS DE LA UAZ
PRESENTE

En respuesta a su oficio de fecha 29 de octubre de 2012 en donde solicita autorización para que escuelas primarias de los municipios de Jerez, Ojocaliente y Guadalupe del Estado de Zacatecas, participen en el protocolo de investigación denominado: "Determinación de Marcadores de Suceptibilidad para Evaluar Riesgos en Salud por Hidroarsenismo en Población del Estado de Zacatecas" financiado por fondos mixtos CONACYT clave de registro: ZAC-2011-C01-170692 y registro ante la Universidad Autonoma de Zacatecas UAZ-2012-36178.

Le comunico que dicha solicitud ha sido aceptada para que se realice en los tiempos y términos establecidos; así mismo solicito envíe los resultados obtenidos antes de darlos a conocer a la población estudiada para tomar las consideraciones pertinentes.

Sin mas por el momento le deseo éxito en la tarea emprendida.


ATENTAMENTE
PROFR. GUILLERMO VARELA MORENO
DIRECTOR DE EDUCACION BASICA ESTATAL


Lateral López portillo 305
Col. Dependencias Federales
Guadalupe, Zacatecas, C.P. 38618
Tel: 492 9239600 ext. 5470 y 5471