

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Variantes genéticas asociadas al metabolismo del arsénico, su efecto sobre el estrés oxidativo y la función renal en individuos expuestos por ingesta de agua en poblaciones del Caribe Colombiano

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

VALENTINA ANDREA BELÉN TORRES INOSTROZA

Director de Tesis: Dr. Luis Quiñones Sepúlveda

Director de Tesis: Dr. Farith González Martínez

Santiago-CHILE

Agosto 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

VALENTINA ANDREA BELÉN TORRES INOSTROZA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico molecular y Título de Bioquímica, en el examen público.

Director de Tesis:

Dr. Luis Quiñones S.

Director de Tesis:

Dr. Farith González M.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Dr. Alfonso Paredes

Dra. Alejandra Loyola

Dedicatoria

Dedicada a mi abuelita
Adriana, quien fue mi
compañera durante mi
niñez y que estaría
contenta de ver a su
última nieta titulada.

Agradecimientos

A mi pareja Maxi quien fue mi principal apoyo desde el día uno, cuando tuve los resultados de las postulaciones a la universidad, quien siempre me dio la contención y amor que necesite en los momentos donde más frustración y desesperación sentí y también el primero en celebrar mis logros en esta larga travesía, ya que sin todo el apoyo que recibí de ti no habría logrado cumplir este sueño. También por haberme tenido paciencia cuando me enseñaste estadística para la realización de los modelos estadísticos y por todos los consejos que me diste para que hiciera un buen escrito de tesis.

A mi mamá y tío Lombardo, quienes fueron importantes y fundamentales en mi acercamiento al mundo de la ciencia, regalándome libros, la oportunidad de haber participado en los cursos de verano de la Universidad de Chile, lo que me permitió poder dilucidar hacia donde quería dirigir mis estudios universitarios y por todo el apoyo que recibí durante estos años para llegar a este momento.

Una breve mención a mi perrita Wanda, que fue mi perro de contención emocional durante todo el período de tesis y me ayudó a seguir adelante y no rendirme en esta travesía cuando sentía que no podría lograrlo.

A mis amigos de la universidad, Nachi, Cristina y Guille por haberme ayudado en este largo camino para culminar la carrera, donde nos hemos pasado por diversas emociones, pudiendo salir adelante y donde también pude aprender de ustedes, ayudándome en mi formación tanto profesional como personal.

A todos mis compañeros del laboratorio CQF, por ser un ambiente de constante de aprendizaje, correcciones que me fueron ayudando a mejorar aspectos como bioquímica y donde las risas y buenos momentos no faltaron, haciéndome sentir parte de una nueva familia donde me hicieron sentir parte desde el día uno.

A Leslie, por todas las cosas que aprendí, que me apoyo cuando tenía dudas ya sea conocimientos o de las técnicas de laboratorio, a poder interpretar los resultados obtenidos de manera correcta y a entender estadística, lo que me permitió poder sacar adelante este proyecto de tesis y también agradecerle por toda la paciencia que me tuviste.

A Sabina por toda la retroalimentación de conocimientos que compartimos en el laboratorio mientras sacábamos nuestras tesis adelante y por todos los buenos momentos y conversaciones que también han sido un aporte y contribución en el ámbito personal y académico.

A las estudiantes de Colombia: Jessica, Nazly y Sindy, quienes fueron parte importante en la realización de este proyecto, donde con Nazly y Sindy hicimos la estandarización, obtención e interpretación de los resultados genéticos y por su parte Jessica quien en realizó las mediciones de FRAP gracias a la colaboración del Dr. Ramón Rodrigo en su laboratorio del Campus Norte de la Universidad de Chile.

Finalmente agradecer de mis directores de tesis, a los profesores Luis y Farith por su apoyo, enseñanzas, paciencia, dedicación y confianza en mí para poder llevar a cabo este proyecto, espero de corazón que esta sea el principio en la realización de proyectos de investigación, con el propósito de seguir contribuyendo a la ciencia a crecer y acercarlas a las personas.

Muchas gracias a todos quienes pudieron hacer esto una realidad.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

As3MT: Arsénico-3-metiltransferasa.

As3MT^{d2d3}: Transcripción empalmada alternativa de *As3MT* que excluye los exones 2 y 3.

As3MT^{full}: Transcripción funcional completa del gen *As3MT*.

CAT: Enzima antioxidante catalasa.

CH₃⁺: Grupo metilo.

CpG: Citosina fosfo-guanina.

DMA: Ácido dimetilarsínico.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP y dUTP)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro.

GST: Glutación S-Transferasa.

HACRE: Hidroarsenicismo crónico regional endémico.

Hcys: Homocisteína.

iAs⁺⁵: Especies inorgánicas pentavalentes de arsénico.

iAs⁺³: Especies inorgánicas trivalentes de arsénico.

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

IMC: Índice de masa corporal.

InAs: Especies inorgánicas de arsénico.

ISP: Instituto de Salud Pública.

LADD: Promedio de la dosis de exposición diaria al arsénico.

MDA: Malondialdehído.

MMA: Ácido monometilarsónico.

MS-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación.

MTHFR: Metiléntetrahidrofolato reductasa.

MTR: Metionina sintasa reductasa.

MTRR: Metionina sintasa.

OMC: Ciclo de un carbono.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PNP: Purina nucleótido fosforilasa.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

SAH: S-adenosilhomocisteína.

SAM: S-adenosilmetionina.

SNP: Polimorfismo de nucleótido único.

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido.

SOD: Superóxido dismutasa.

TFG: Tasa de filtración glomerular.

US-EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos.

Índice

Índice de Figuras	10
Índice de Tablas.....	11
Resumen	12
Abstract.....	14
1. Introducción.....	16
1.1 Exposición al arsénico	16
1.1.1 Exposición al arsénico en Chile	18
1.1.2 Exposición al arsénico en Colombia	19
1.2 Metabolización del arsénico	20
1.2.1 Arsénico y su efecto sobre el estrés oxidativo celular	22
1.2.2 Arsénico y su efecto sobre la función renal	23
1.3 Arsénico y metilación del ADN.....	24
1.4 Variantes genéticas analizadas.....	25
1.4.1 Familia Glutación S-Transferasa (<i>GST</i>).....	25
1.4.2 Arsénico 3 Metiltransferasa (<i>As3MT</i>)-rs3740400	27
1.4.3 Metiléntetrahidrofolato reductasa (<i>MTHFR</i>)-rs1801133	28
2. Hipótesis	29
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo General.....	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. Materiales y métodos.....	30
4.1 Selección de individuos y muestras de estudio.....	30
4.1.1 Tipo de estudio.....	30

4.1.2 Cálculo del tamaño muestral	30
4.1.3 Criterios de selección de participantes	30
4.1.4 Consideraciones éticas	31
4.2 Etapas experimentales y metodologías	31
4.2.1 Determinación de la concentración de Arsénico en agua	31
4.2.2 Determinación del Índice LADD	33
4.2.3 Extracción de ADN a partir de <i>buffy coat</i>	34
4.2.4 Extracción de muestras de plasma	34
4.2.5 Cuantificación y control de calidad del ADN	34
4.2.6 Determinación de variantes genéticas <i>MTHFR</i> , <i>GSTO2</i> , <i>As3MT</i> y <i>GSTP1</i> mediante RT-qPCR asociado a sondas <i>TaqMan</i> ®.....	35
4.2.7 Determinación de genotipos nulos <i>GSTT1</i> y <i>GSTM1</i> mediante PCR Convencional y geles de agarosa.	36
4.2.8 Determinación del estrés oxidativo y daño en la función renal mediante biomarcadores de daño celular.....	41
5. Resultados.....	43
5.1 Estimación de la dosis de exposición al arsénico por ingesta de agua: Índice LADD	43
5.2 Caracterización sociodemográfica de la Población	44
5.3 Determinación de las frecuencias genotípicas de las variantes <i>MTHFR</i> , <i>GSTO2</i> , <i>As3MT</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTT1</i> / <i>GSTM1</i> , genes participantes en el metabolismo de arsénico. .	46
5.4 Cuantificación del estrés oxidativo y estado de la función renal a partir de biomarcadores	49
5.5 Análisis estadístico univariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.	52
5.6 Análisis estadístico multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.	53

5.7 Análisis estadístico univariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estado de la función renal de los participantes.....	54
5.8 Análisis estadístico multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estado de la función renal de los participantes.	55
6. Discusión	56
6.1 Asociación multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.	56
6.1.1 Consumo de mariscos.....	56
6.1.2 Edad.....	57
6.1.3 Concentración de arsénico	57
6.2 Asociación multivariable de variables no genéticas con el efecto sobre la función renal.	58
6.2.1 Edad y estrés oxidativo	58
7. Conclusiones.....	60
8. Limitaciones y proyecciones	61
9. Referencias	62
Anexos	69
ANEXO I: Consentimiento informado.	70
ANEXO II: Documento Aval Comité de ética.	71
ANEXO III: Estandarización protocolo PCR Convencional con geles de agarosa.....	72
ANEXO IV: Modelos de herencia para <i>MTHFR</i> , <i>GSTO2</i> , <i>As3MT</i> y <i>GSTP1</i>	78
ANEXO V: Frecuencias genotípicas y alélicas de <i>MTHFR</i> , <i>GSTO2</i> , <i>As3MT</i> y <i>GSTP1</i> ..	82
ANEXO VI: Técnica de RT-qPCR asociado a sondas <i>TaqMan</i> ®.	83
ANEXO VII: Caracterización sociodemográfica según el estado de la función renal respecto a la exposición al arsénico y variantes no genéticas.....	84

Índice de Figuras

Figura 1: Efectos sobre la salud de acuerdo con el grado de exposición al arsénico.....	18
Figura 2: Ruta de metabolización del arsénico	21
Figura 3: Mapa geográfico de las localidades muestreadas	32
Figura 4: Diagrama proceso de determinación de arsénico en agua subterránea.....	33
Figura 5: Metodología real time qPCR	35
Figura 6: Patrón electroforético GSTT1	41
Figura 7: Patrón electroforético GSTM1	41
Figura 8: Metodología PCR Convencional	41
Figura 9: Flujograma proceso de selección de muestras.....	47

Índice de Tablas

Tabla 1: Secuencias de contexto sondas <i>TaqMan</i> ® para <i>MTHFR</i> , <i>GSTO2</i> , <i>As3MT</i> y <i>GSTP1</i>	35
Tabla 2: Secuencias de partidores para <i>GSTT1</i> y β -Globina (control de carga)	36
Tabla 3: Reactivos utilizados en la preparación del mix de reacción con sus respectivos volúmenes.....	37
Tabla 4: Protocolo del termociclador para <i>GSTT1</i>	37
Tabla 5: Secuencias para <i>GSTM1</i> y <i>CYP1A1</i> (control de carga).....	38
Tabla 6: Reactivos utilizados en la preparación del mix de reacción con sus respectivos volúmenes.....	38
Tabla 7: Protocolo del termociclador para <i>GSTM1</i>	39
Tabla 8: Valores para cada parámetro requerido para el cálculo del índice LADD.....	43
Tabla 9: Parámetros fisicoquímicos y niveles de arsénico en muestras de agua que abastecen a las poblaciones estudiadas.	44
Tabla 10: Caracterización sociodemográfica de la población colombiana estudiada.	46
Tabla 11: Frecuencias genotípicas de los diferentes genes según el grado de exposición..	48
Tabla 12: Relación entre la exposición al arsénico, el estrés oxidativo y variables no genéticas.	50
Tabla 13: Relación entre la exposición al arsénico e indicadores de la función renal.	51
Tabla 14: Análisis de regresión lineal simple para variables genéticas y no genéticas asociadas con la presencia de estrés oxidativo.	52
Tabla 15: Análisis multivariable de variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.....	53
Tabla 16: Análisis de regresión lineal simple para variables genéticas y no genéticas asociadas con la presencia de daño renal.....	54
Tabla 17: Análisis multivariable de diferentes covariables sobre el efecto en la función renal.	55

Resumen

La exposición al arsénico es catalogada como una gran amenaza para la salud pública, debido a los efectos nocivos causados por este metaloide, que van desde la hiperpigmentación, enfermedades cardiovasculares y hasta la aparición de cáncer, dependiendo de la dosis y tiempo de exposición. En el proceso de metabolización de este metaloide intervienen distintos grupos de enzimas: la purina nucleósido fosforilasa (PNP); arsénico 3 metiltransferasa (As3MT); algunas clases de enzimas de la familia glutatión-S-transferasa (GST); y la metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR), responsables de reacciones de oxidación, reducción y metilación oxidativa del arsénico inorgánico para obtener los compuestos MMA y DMA, que son excretados por vía urinaria. Cabe destacar que la capacidad metabólica individual puede verse afectada por factores como la dosis de exposición al arsénico, dieta, sexo, tabaquismo y consumo de alcohol. Por lo que es fundamental estudiar el efecto de una exposición crónica al arsénico sobre el estrés oxidativo y alteraciones de la función renal, cuando se está en presencia de variantes genéticas de las diferentes enzimas asociadas en la metabolización de este metaloide.

Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue evaluar la asociación entre las variantes genéticas participantes en el metabolismo del arsénico con la capacidad de resistencia al daño oxidativo y sus efectos sobre la función renal en individuos expuestos por ingesta de agua.

En este estudio fue realizado un muestreo en dos poblaciones del departamento del Atlántico en Colombia entre los años 2019 y 2020. Para estimar el promedio de la dosis de exposición diaria fue utilizado el índice LADD, el cual relaciona la concentración del arsénico en agua por espectrofotometría de fluorescencia atómica, la frecuencia y duración de la exposición, esperanza de vida y peso de cada individuo. Las variantes genéticas de *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* fueron determinadas mediante *real time* PCR asociado a sondas *TaqMan*®, mientras que los genotipos nulos *GSTT1* y *GSTM1* se obtuvieron mediante PCR convencional. La capacidad de resistencia al daño oxidativo se midió utilizando el Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP) en plasma y la función renal se determinó por la escala CDK Stage obtenida a partir de la velocidad de filtración glomerular. Los datos se analizaron por regresión lineal en Stata 14.0.

Los resultados del modelo multivariable para FRAP mostró que las variantes estudiadas explican en un 12,2 % el aumento en el estrés oxidativo de la población ($p = 0,01$). Mientras que, en el modelo multivariable para daño renal solo es capaz de explicar en un 9,6 % el daño renal que presentó la población ($p = 0,03$). Por lo que dentro de las conclusiones obtenidas del estudio la exposición al arsénico por ingesta de agua y las variantes no genéticas como la edad y el consumo de mariscos pueden causar una disminución de la capacidad de resistencia al daño oxidativo pero esta exposición aún no es consistente para explicar el daño renal en la población. Por otra parte, para el caso de las variantes genéticas analizadas, no se pudo establecer una relación sobre su efecto en el estrés oxidativo y alteraciones sobre la función renal.

Palabras clave: Arsénico, *GSTO2*, *As3MT*, Estrés oxidativo, Función renal.

Abstract

Genetic variants associated with arsenic metabolism, its effect on oxidative stress and renal function in individuals exposed to water ingestion in populations of the Colombian Caribbean

Exposure to arsenic is classified as a major threat to public health, due to the harmful effects caused by this metalloid, ranging from hyperpigmentation, cardiovascular diseases, to the appearance of cancer, depending on the dose and time of exposure. Different groups of enzymes intervene in the metabolization process of this metalloid: purine nucleoside phosphorylase (PNP); arsenic 3 methyltransferase (As3MT); some classes of enzymes of the glutathione-S-transferase (GST) family; and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), responsible for oxidation, reduction, and oxidative methylation reactions of inorganic arsenic to obtain the compounds MMA and DMA, which are excreted through the urine. It should be noted that individual metabolic capacity can be affected by factors such as the dose of arsenic exposure, diet, gender, smoking and alcohol consumption. Consequently, it is essential to study the effect of chronic exposure to arsenic on oxidative stress and alterations in kidney function, when there are genetic variants of the different enzymes associated with the metabolization of this metalloid.

Therefore, the objective of this research was to evaluate the association between the genetic variants involved in arsenic metabolism with the capacity for resistance to oxidative damage and its effects on kidney function in individuals exposed through water consumption.

In this study was carried out sampling two populations of the department of Atlántico in Colombia between 2019 and 2020. To estimate the average daily exposure dose, the LADD index was used, which associates the concentration of arsenic in water by spectrophotometry of atomic fluorescence, the frequency and duration of exposure, life expectancy and weight of each person. The genetic variants of *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* and *GSTP1* were determined by real time PCR associated with TaqMan® probes, while the null genotypes *GSTT1* and *GSTMI* were obtained by Conventional PCR. The ability to resist oxidative damage was measured using Iron Reducing Antioxidant Power (FRAP) in plasma and renal function was determined by the CDK Stage scale obtained from the glomerular filtration rate. Data were analyzed by linear regression in Stata 14.0.

The results of the multivariate model for FRAP showed that the studied variants explain 12.2% of the increase in oxidative stress in the population ($p = 0.01$). While, in the multivariate model for kidney damage, it is only able to explain 9.6% of the kidney damage presented by the population ($p = 0.03$). Therefore, within the conclusions obtained from the study, exposure to arsenic through water intake and non-genetic variants such as age and seafood consumption can cause a decrease in the capacity to resist oxidative damage, but this exposure is still not consistent in explaining kidney damage in the population. On the other hand, in the case of the genetic variants analyzed, a relationship could not be established regarding their effect on oxidative stress and alterations in kidney function.

Keywords: Arsenic, *GSTO2*, *As3MT*, oxidative stress, kidney function.

1. Introducción

1.1 Exposición al arsénico

El arsénico es un metaloide natural ampliamente distribuido en el medio ambiente, estando presente en la tierra, aire y agua. La arsenobetaina es la forma orgánica más común del arsénico, el cual se encuentra principalmente en alimentos marinos como pescados y mariscos. Por otra parte, el arsénico inorgánico se encuentra de forma natural en suelos y rocas, especialmente en minerales que contienen cobre o plomo. Dentro de las especies inorgánicas de arsénico (InAs), se encuentran los arseniats y arsenitos, los cuales son altamente tóxicos para la salud (ISP-Chile, 2015). A continuación, se señala las principales InAs:

Especies de arsenito (As^{III}): AsO_3^{-3} , $HAsO_3^{-2}$, $H_2AsO_3^{-}$ y H_3AsO_3

Especies de arseniato (As^V): AsO_4^{-3} , $HAsO_4^{-2}$, $H_2AsO_4^{-}$ y H_3AsO_4

Cabe destacar que el grado de toxicidad dependerá de su naturaleza química, ya que, las especies inorgánicas trivalentes (iAs^{+3}) son más tóxicas que las especies pentavalentes (iAs^{+5}) y ambas más tóxicas que sus compuestos metilados: el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA) (Ramírez, 2013). Además, el tiempo de vida media de las especies inorgánicas de arsénico en el organismo es menor respecto al de los metabolitos metilados, donde el arsénico inorgánico posee un tiempo de vida media de 10 horas aproximadamente, mientras que los compuestos MMA y DMA poseen un tiempo de vida media de 30 horas (ISP-Chile, 2015).

La principal fuente de exposición al arsénico es por consumo de agua y alimentos contaminados con InAs. En países como Argentina, Bangladesh, Chile, China, India y México es muy común la presencia de arsénico en aguas subterráneas, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US-EPA) han estipulado una concentración de 10 $\mu g/L$ de arsénico como segura en agua potable (OMS, 2022).

Otras fuentes de exposición al arsénico se relacionan con la acción antropogénica (actividad industrial, asentamientos urbanos, actividad agropecuaria, etc.) y los procesos geoquímicos naturales de la zona, como metasedimentos con filones mineralizados, formaciones

volcánicas, formaciones volcano-sedimentarias, distritos mineros, sistemas hidrotermales, cuencas aluviales terciarias y cuaternarias, etc. Este último tipo de fuente de exposición puede causar que se encuentren acuíferos usados para consumo humano con concentraciones de arsénico superior a lo establecido por la OMS (Lillo, 2003).

Debido a esto, en algunas zonas de Sudamérica, Asia, Norteamérica e India, la ingesta de arsénico por aguas contaminadas provoca el hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), que corresponde a una enfermedad ambiental grave de larga evolución que se caracteriza por presentar lesiones en la piel y otras alteraciones sistémicas y no sistémicas. (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2020).

Es por esta razón que la OMS ha catalogado la exposición al arsénico como una amenaza para la salud pública, debido a que los individuos expuestos tienen una mayor predisposición a desarrollar arsenicosis o envenenamientos por arsénico (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2020). La arsenicosis es una enfermedad crónica producida por el consumo prolongado de agua o alimentos contaminados con arsénico por un largo período de tiempo, causando problemas a la piel, cáncer de hígado, riñón y pulmones, hipertensión arterial y problemas reproductivos (Lenntech, 2023).

Por otra parte, la exposición crónica al arsénico tiene como consecuencias sobre la salud de las personas la aparición de lesiones cutáneas, como hiperpigmentación y queratosis; enfermedades neurológicas; desarrollo de diferentes tipos de cáncer (piel, pulmones, hígado, riñones, próstata y vejiga); enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y diabetes mellitus 2. Mientras que una exposición aguda provoca náuseas, vómitos, hipotensión, dolor abdominal, entre otros. Cabe destacar que una exposición crónica al arsénico se considera como un período de entre cinco a diez años de exposición constante a bajas concentraciones de este metaloide (Rahaman *et al*, 2021). En la **Figura 1**, se muestra un esquema con los principales efectos sobre la salud de acuerdo con el grado de exposición.

Es por esto, que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha catalogado las especies inorgánicas de arsénico como compuestos del grupo I, es decir, cancerígenos para el ser humano (Rahaman *et al*, 2021).

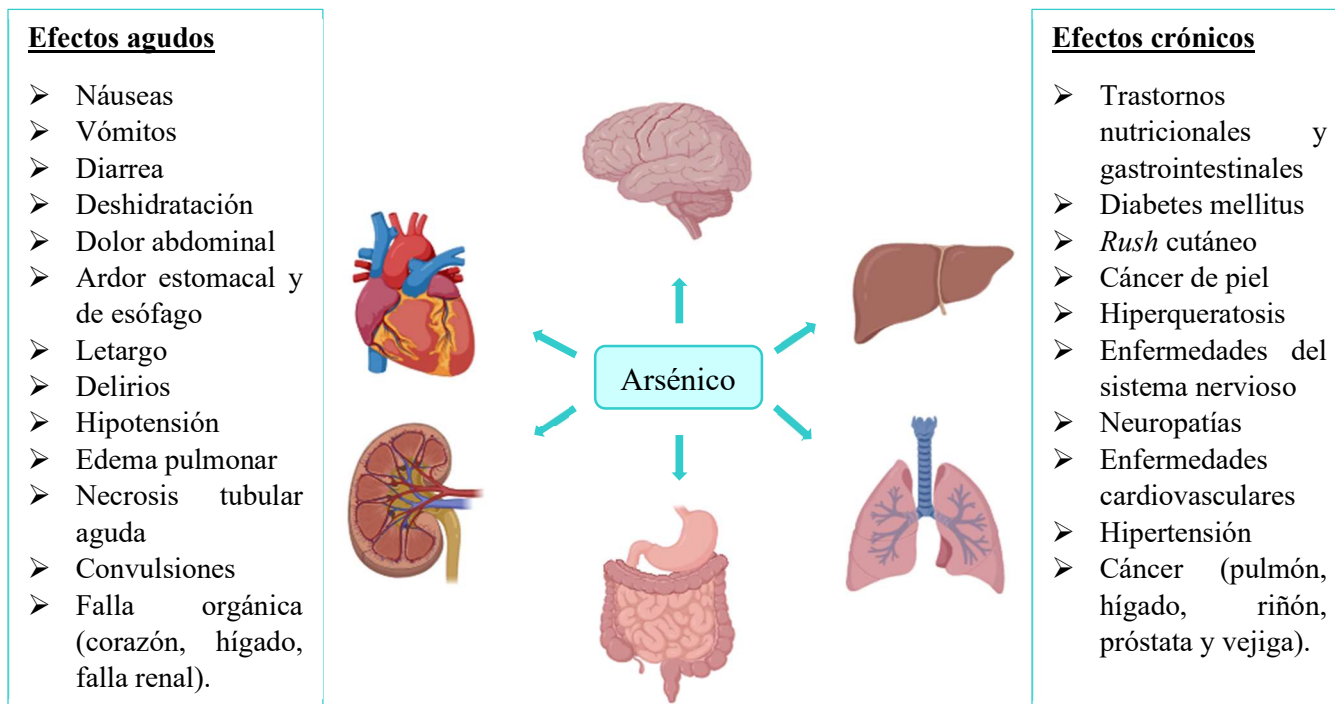


Figura 1: Efectos sobre la salud de acuerdo con el grado de exposición al arsénico. Dentro de los principales efectos de una exposición aguda son náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión y fallas de algunos órganos. Mientras que, frente a una exposición crónica a arsénico, los individuos pueden desarrollar diabetes mellitus tipo II, hipertensión y diferentes tipos de cáncer.

1.1.1 Exposición al arsénico en Chile

En Chile existen dos fuentes de exposición al arsénico, una natural correspondiente a la contaminación de aguas en la zona Norte del país y una antropogénica derivada de la actividad minera, siendo los yacimientos de cobre y el proceso de fundición del mineral el principal tipo de exposición antropogénica, exponiendo a los trabajadores a los compuestos arsenicales por vía respiratoria (ISP-Chile, 2004).

Cabe destacar que las industrias mineras emiten residuos ricos en arsénico y otros metales pesados, los cuales afectan al medio ambiente y a los residentes de esta región (Revista Interamericana de Ambiente y Turismo, 2010). Además, durante el año 2009, pobladores de la ciudad de Arica denunciaron la contaminación de la zona con metales pesados, específicamente plomo y arsénico en el suelo (MINSAL, 2014). Si bien la zona Norte es la más expuesta, hay otras ciudades que cuentan con alta exposición al arsénico, como

Antofagasta, Calama, Santiago, Rancagua, Taltal, Tocopilla y San Pedro de Atacama (Revista Interamericana de Ambiente y Turismo, 2010).

1.1.2 Exposición al arsénico en Colombia

Colombia es el cuarto país más poblado del continente americano y el segundo de América del Sur después de Brasil, con una población estimada de 52 millones. Geográficamente el país se divide en 32 departamentos y un distrito capital (Bogotá DC), donde en amplias zonas los recursos hídricos subterráneos, propensos a la contaminación con arsénico, se utilizan para consumo humano debido a la deficiencia de los sistemas de acueductos y/o falta de agua superficial. Es por esto por lo que la contaminación de aguas subterráneas tiene un origen mixto (natural y antropogénico) (Alonso *et al*, 2014).

Se han realizado diferentes estudios para establecer la presencia de arsénico y en que concentraciones se puede encontrar en aguas subterráneas y en el agua utilizada para el consumo humano y riego de cultivos. En los municipios de Margarita y San Fernando, departamento de Bolívar en el norte de Colombia se encontró que la concentración de arsénico oscilaba entre los 10 y 96 $\mu\text{g/L}$ en agua potable subterránea de pozo, siendo superior a lo establecido como seguro por la OMS y la US-EPA. En el municipio de Margarita se registraron las concentraciones más altas, especialmente en la zona rural, corregimiento de Mamoncito (González-Martínez *et al*, 2018).

Por otra parte, en los municipios de Chinú, departamento de Córdoba y Corozal, departamento de Sucre en el norte de Colombia se encontró que la presencia de arsénico en el agua potable de las zonas hídricas puede estar relacionada con la actividad agroquímica y ganadera realizadas en este sector, por lo que para controlar la biodisponibilidad de arsénico dependerá de las medidas preventivas que cada región tome y con esto disminuir la probabilidad de que la población pueda desarrollar patologías relacionadas con la exposición de este contaminante (Hernández *et al*, 2016).

1.2 Metabolización del arsénico

La metabolización del arsénico consta de una serie de reacciones de reducción y metilaciones oxidativas (González-Martínez *et al*, 2018). Al menos el 90 % de las especies inorgánicas de arsénico ingeridas son absorbidas en el tracto gastrointestinal y excretados por la orina. El órgano que metaboliza principalmente el arsénico es el hígado, donde las especies inorgánicas son metiladas por acción de la enzima arsénico-3-metiltransferasa (As3MT), aunque el mecanismo específico de metilación aún no está claro (Watanabe *et al*, 2013).

Se postulan dos vías metabólicas, la primera es conocida como la vía clásica que consiste en proceso de reducción secuencial y metilación oxidativa (Yamanaka *et al*, 2004 y Vahter, 2002). Este mecanismo postula que las especies inorgánicas de arsénico se absorben en el tracto gastrointestinal, en el cual ocurre la primera reducción previo al proceso de metilación mediante la acción del glutatión (GSH) y la tiorredoxina (TRX) como agentes reductores en el torrente sanguíneo. Luego el arsénico inorgánico ingresa a las células mediante aquaglicoporinas y transportadores de fosfato, donde los arseniatos que ingresen son reducidos a arsenitos (González-Martínez *et al*, 2024). Una vez que esto sucede se produce el proceso de metilación oxidativa, obteniéndose en primera instancia a MMA y posteriormente a DMA, donde el cofactor S-adenosilmetionina (SAM) es la fuente de grupos metilos (CH_3+) y este último compuesto es el agente oxidante en el proceso de conversión de especies arsenicales trivalentes a pentavalentes. Además, se descubrió que la vía clásica sería esencialmente similar a la metabolización de arsénico mediante la conjugación con glutatión o vía de metilación reductora. (Watanabe *et al*, 2013; Cullen *et al*, 1989).

La segunda ruta metabólica consiste en la conjugación con glutatión del arsénico. Este mecanismo fue descrito por primera vez por Hayakawa en 2005, donde se plantea que la conjugación de arsénico trivalente con GSH permite que la As3MT forme los compuestos MMA^{V} y DMA^{V} mediante reacciones de metilación oxidativa (Watanabe *et al*, 2013; González-Martínez *et al*, 2020; Hayakawa, 2005).

Las principales enzimas que participan en la metabolización del arsénico se clasifican en tres grupos: purina nucleósido fosforilasa (PNP), que actúan como agentes reductores de As^{V} ; arsénico-3-metiltransferasa (As3MT), encargada de la metilación del arsénico trivalente (As^{III}) y algunas enzimas de la familia glutatión-S-transferasas (GST), correspondiente a una

familia de enzimas de fase II, responsables de la desintoxicación de xenobióticos mediante reacciones de conjugación con GSH (González-Martínez *et al*, 2020). En humanos, las enzimas GST se clasifican en al menos cinco grandes grupos: alfa(α), mu (μ), pi (π), theta (θ) y zeta (ζ) (Kordi-Tamandani *et al*, 2011).

En la **Figura 2** se gráfica el proceso de metilación de las especies inorgánicas de arsénico, donde el As^V es reducido a As^{III} por acción de la enzima PNP y GSTP1 en presencia de glutatión. Posterior a esto, las especies trivalentes de arsénico se metilan a ácido monometilarsónico (MMA^V) y ácido dimetilarsínico (DMA^V) por acción de la As3MT en presencia de SAM. Para la obtención de DMA^V son necesarias las reacciones de conjugación entre las enzimas GSTO1-2 y glutatión, para formar los productos intermedios ácido monometilarsónico (MMA^{III}) y ácido dimetilarsónico (DMA^{III}) González-Martínez *et al*, 2020).

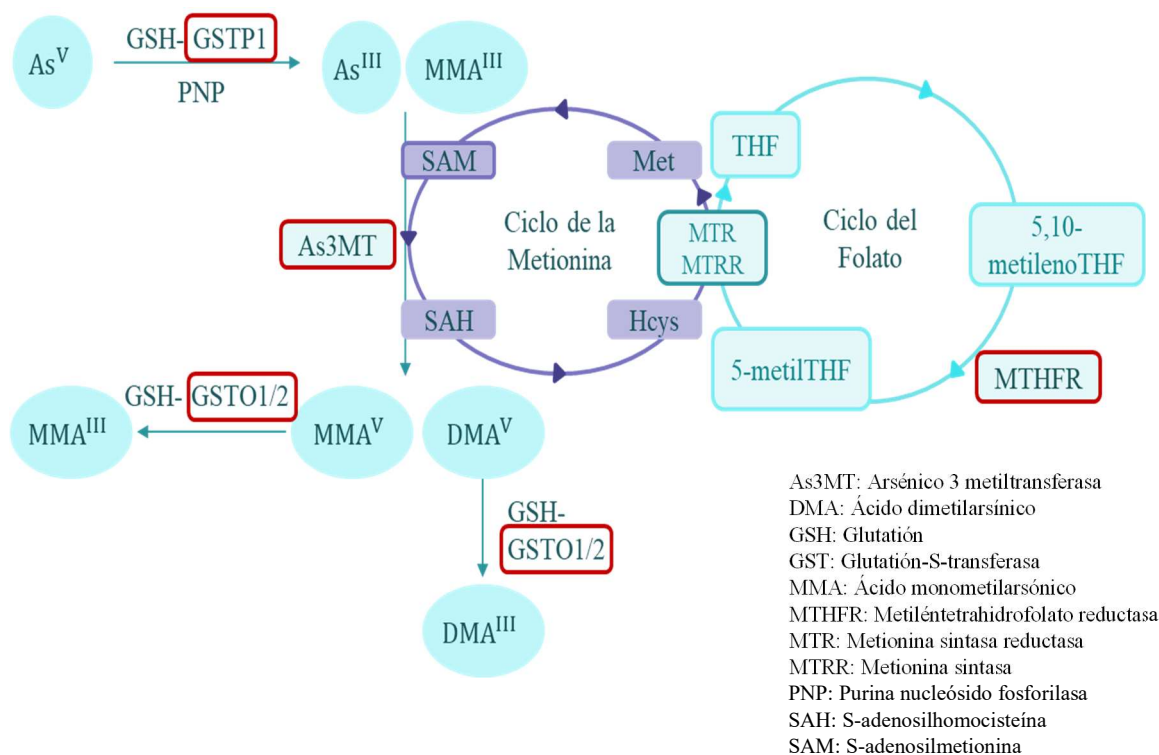


Figura 2: Ruta de metabolización del arsénico. Las especies inorgánicas de arsénico son metabolizadas principalmente en el hígado, donde por acción de algunas de las enzimas GST, As3MT son reducidas y metiladas hasta obtener los metabolitos MMA y DMA, los cuales serán excretados por vía urinaria. También es fundamental la acción de la enzima MTHFR, la cual permite mantener en homeostasis las concentraciones de SAM, cofactor esencial para las reacciones de metilación, debido a su rol como donante de grupos metilos.

Otra enzima fundamental en el proceso de metabolización que se puede observar en la figura es la Metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la cual es esencial en el metabolismo del folato y la homocisteína (Hcys). Ambas vías metabólicas se conectan a través del ciclo de un carbono (OMC), formando así los grupos metilos necesarios en procesos bioquímicos como la síntesis de ADN, generación de antioxidantes y la regulación epigenética, influyendo en la expresión génica y síntesis de proteínas (Niedzwiecki *et al*, 2018; Raghubeer *et al*, 2021).

Por lo que la MTHFR es crucial para mantener constantes los niveles intracelulares de metionina y de SAM al catalizar la reducción de 5,10-metilntetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un cosustrato para la remetilación de homocisteína a metionina y un sustrato para la timidilato sintasa, ambos críticos para la metilación, síntesis de ADN y mantención del patrón de metilación en las islas CpG que regulan la expresión génica (Ruiz-Ramos *et al*, 2009).

1.2.1 Arsénico y su efecto sobre el estrés oxidativo celular

Dentro de los mecanismos de toxicidad del arsénico, el más estudiado es el estrés oxidativo inducido por este metaloide. Esto se debe a que el arsénico es capaz de alternar los estados de oxidación de diferentes metales como el hierro, aumento del estado inflamatorio y oxidar proteínas y ADN, provocando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y radicales peroxilo. También es capaz de producir agotamiento de GSH y el aumento de radicales libres mediante la reducción intracelular de arsenitos a su estado trivalente por acción del GSH intracelular (Flora, 2011; Lantz *et al*, 2006; Susan *et al*, 2019).

El arsénico gatilla cambios morfológicos en la integridad mitocondrial, causando una disminución del potencial de membrana mitocondrial, dando lugar a una producción descontrolada de radicales libres derivados del anión superóxido. Esto en combinación con agentes que disminuyen el glutatión, aumentan la sensibilidad de las células a la toxicidad del arsénico (Jomova *et al*, 2011).

En estudios anteriores se ha visto que la exposición al arsénico genera anión superóxido y peróxido de hidrógeno en ciertos tipos celulares como células musculares lisas vasculares y

células endoteliales vasculares. También se ha visto que cambios en las enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) inducido por arsénico suprimen el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos. Si bien se puede observar el aumento de las ROS en diferentes tipos celulares, el mecanismo por el cual se producen estos cambios aún no está claro (Flora, 2011; Jomova *et al*, 2011).

Dentro de los efectos que produce el estrés oxidativo a nivel de lípidos es el aumento de la peroxidación lipídica, donde las ROS producidas atacan directamente al átomo de hidrógeno de un grupo metileno adyacente a un átomo de carbono insaturado, causando que los ácidos grasos poliinsaturados sean los más propensos al daño de los radicales libres, formando malondialdehído (MDA), HNE y 2-propenal (acroleína) e isoprostanos, que pueden medirse en plasma y orina como indicadores indirectos del estrés oxidativo (Flora, 2011).

El arsénico gatilla daños a nivel del ADN debido a la presencia de dimetil arsina, una sal derivada del arsénico capaz de formar radicales peróxido de este compuesto en presencia de oxígeno. También, el arsénico causa daños en la estructura y función de proteínas, especialmente en proteínas sulfhídricas (SH-proteínas), causando la oxidación de estas, lo cual se asocia con el daño mitocondrial producido por arsénico (Rahaman *et al*, 2021; Prakash *et al*, 2016).

Una manera de cuantificar el estrés oxidativo producido por arsénico es la evaluación del poder antioxidante mediante el biomarcador poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), el cual sufre una reducción considerable cuando hay exposición a este metaloide (Taheri Zadeh *et al*, 2021). El método utilizado para las mediciones de FRAP de este trabajo fue mediante la reducción de iones férricos a ferrosos a pH bajo, formando un complejo coloreado de ferroso-tripiridiltriaquina y su cuantificación se obtiene comparando el cambio de absorbancia a 593 nm (Benzie *et al*, 1996).

1.2.2 Arsénico y su efecto sobre la función renal

La vía urinaria es la principal forma de eliminación de los metabolitos MMA y DMA, por lo que la función renal juega un rol fundamental en el proceso de excreción. Se sabe que cada riñón se forma por aproximadamente un millón de nefronas, donde cada una incluye un filtro

o glomérulo, responsable de filtrar la sangre y un túbulo, encargado de regresar aquellos nutrientes, minerales y un porcentaje de agua al torrente sanguíneo y eliminar los desechos y exceso de acidez de la sangre para formar la orina (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2023).

La toxicidad del arsénico afecta a casi todos los órganos, pero los riñones son los que más se ven afectados, al ser el órgano responsable de la excreción de sus metabolitos y la osmorregulación. Dentro de la activación metabólica de los compuestos de arsénico se generan ROS que aumentan el estrés oxidativo en la nefrotoxicidad inducida por este metaloide, por lo que varios estudios epidemiológicos de áreas contaminadas con arsénico y poblaciones ocupacionales indicaron una correlación entre las altas concentraciones de arsénico en agua potable y el desarrollo de enfermedades renales crónicas (Dutta *et al*, 2018; Yu *et al*, 2013).

También se ha postulado que el arsénico se acumula en el riñón, específicamente en la zona periglomerular, en el cual ocurre la acumulación de ciertos metabolitos como el MMA en las mitocondrias de esta zona, pudiendo provocar insuficiencia renal aguda o crónica, dependiendo del grado de exposición (Jain, 2021).

Un biomarcador utilizado para medir la capacidad metabólica individual del arsénico es la medición de los porcentajes de excreción urinaria de sus metabolitos. Por lo que, la variación interindividual del porcentaje de excreción de MMA y DMA en orina dependerá de hábitos y factores ambientales como el tabaquismo, consumo de alcohol, dieta, frecuencia y tiempo de exposición a arsénico y factores demográficos y antropométricos como la edad, sexo, índice de masa corporal (IMC) y presencia de variantes genéticas, las cuales se ha evidenciado que los polimorfismos de las enzimas metabolizadoras explican la variación en la capacidad de metilación del arsénico en humanos (González-Martínez *et al*, 2018; González-Martínez *et al*, 2020)

1.3 Arsénico y metilación del ADN

Dentro de los efectos que produce el arsénico son cambios a nivel del patrón de metilación del ADN. En mamíferos, el ADN se metila comúnmente en el carbono 5 del residuo de

citocina en los dinucleótidos CpG, donde las metiltransferasas del ADN transfieren un único grupo metilo enzimáticamente desde SAM para generar 5'-CpG-3' (Bailey *et al*, 2014; Li *et al*, 2011).

Para la correcta metilación del ADN es importante la regulación en el proceso de transcripción, supresión de secuencias de ADN parasitarias, reparación de desajustes en el ADN y el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que la aparición de inestabilidad cromosómica es considerada como un evento temprano en el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Pilsner *et al*, 2007). Además, algunos estudios revelan que la exposición al arsénico puede provocar cambios en el patrón de metilación a nivel global o específico de los genes, como, por ejemplo, hipermetilación de la región promotora de genes supresores de tumores o la hipometilación global del ADN, causando predisposición a la carcinogénesis en líneas celulares transformadas malignamente por especies inorgánicas de arsénico *in vitro* (Bailey *et al*, 2014; Pilsner *et al*, 2007).

1.4 Variantes genéticas analizadas

1.4.1 Familia Glutación S-Transferasa (GST)

Las GST son una familia de enzimas responsables de la desintoxicación de compuestos nocivos mediante reacciones de conjugación con GSH. Dentro de las GST existen cuatro miembros que podrían influir en la capacidad metabólica del arsénico de acuerdo con el nivel de expresión y presencia de variantes alélicas, debido a que este grupo de enzimas son multigénicas. Estas son: *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTO* (isoformas 1 y 2) y *GSTP1* (Caceres *et al*, 2010). Por ejemplo, *GSTO* (clase ω) omega 1 reduce las especies de arsénico pentavalente y metilado. Además, el omega 2 de *GSTO* reduce solo las especies metiladas. Por otra parte, la baja actividad enzimática de *GSTP1* (clase π) podría disminuir la función de desintoxicación de GSH y las enzimas *GSTT1* (clase θ) y *GSTMI* (clase μ) pueden facilitar la metilación del arsénico inorgánico. Por ende, la ausencia de su actividad podría aumentar la excreción urinaria del arsénico inorgánico (González-Martínez *et al*, 2020).

1.4.1.1 *GSTT1* Nulo

El gen *GSTT1* (Glutación S-transferasa theta-1) se encuentra ubicado en el cromosoma 22q11.2, donde aquellos individuos que poseen un genotipo nulo no tienen actividad enzimática debido a la delección completa del gen (Jin *et al*, 2021; Hamachi *et al*, 2013). En algunos estudios donde se observó una interacción gen-ambiente significativa entre la exposición urinaria al arsénico en el agua potable, debido a que los individuos con genotipo *GSTT1* nulo poseían una tasa de excreción de arsénico más alto en comparación con el genotipo *wild-type*. Además, las personas con genotipo nulo poseen un índice de metilación primaria más alto y un índice de metilación secundaria más bajo en comparación con el genotipo *wild-type* (Kile *et al*, 2013).

1.4.1.2 *GSTM1* Nulo

El gen *GSTM1* (Glutación S-transferasa mu-1) se encuentra ubicado en el cromosoma 1q13.3 y posee tres alelos: *GSTM1a*, *GSTM1b* y *GSTM1* nulo, este último corresponde a la delección completa del gen. Por lo que los individuos que poseen el genotipo nulo no son capaces de expresar *GSTM1*, lo que significa que no hay actividad enzimática (Hamachi *et al*, 2013).

Al realizar estudios de metaanálisis se observó que existe una correlación significativamente negativa entre el genotipo nulo de *GSTM1* con la susceptibilidad a la intoxicación por arsénico, mientras que en presencia del genotipo nulo para *GSTT1* o un genotipo nulo para ambos genes no se estableció una correlación con el riesgo de intoxicación. Esto sugiere que las personas que poseen la delección para *GSTM1* son menos susceptibles a sufrir envenenamientos por arsénico, causando un efecto protector frente a este tipo de exposición y para aquellos individuos que poseen un genotipo nulo *GSTT1* o ambos genes delecionados no se asocian con el riesgo de sufrir intoxicaciones con este metaloide. Por lo que el genotipo nulo para *GSTM1* puede ser un biomarcador genotóxico para identificar a aquellas personas no son propensas a intoxicación por arsénico. (Jin *et al*, 2021).

1.4.1.3 *GSTO2-rs156697*

El gen *GSTO2* (Glutación S-transferasa omega-2) se encuentra en el cromosoma 10q24.3, codificando una proteína de 243 residuos aminoacídicos, la cual participa en la desintoxicación de arsénico inorgánico, catalizando la reducción de ácido monometilarsónico a ácido monometilarsinoso, paso limitante de la velocidad en la desintoxicación de arsénico.

Una variante genética es el rs156697, la cual corresponde a una mutación *missense*, donde se reemplaza una adenina por una guanina en la posición 424, reemplazando una asparagina por un ácido aspártico en el residuo 142 (Asn142Asp) (Masoudi *et al*, 2011). De acuerdo con algunos estudios, cuando se está en presencia del genotipo heterocigoto u homocigoto de *GSTO2*, el porcentaje de excreción de DMA es menor en comparación el genotipo *wild-type*, por lo que *GSTO2* en conjunto con *As3MT* tienen relación directa con la metilación de especies inorgánicas de arsénico (González-Martínez *et al*, 2020).

1.4.1.4 GSTP1-rs1695

El gen *GSTP1* (Glutathion S-transferasa pi-1) pertenece a la clase π de esta familia y se este gen en particular se encuentra en el cromosoma 11q13, codificando proteínas variantes de *GSTP1* funcionalmente distintas que se involucran en el metabolismo de xenobióticos y tienen un rol en la susceptibilidad al cáncer y otras enfermedades (Kordi-Tamandani *et al*, 2011). El polimorfismo más estudiado de este gen es la variante rs1695, la cual consiste en una mutación *missense*, donde se cambia una adenina por una guanina en la posición 313 de la región codificante, por lo que a nivel de la secuencia aminoacídica ocurre el reemplazo de una Isoleucina por una Valina en la posición 105 (Ile105Val) (Strange *et al*, 2001; Janasik *et al*, 2015). Según la literatura esta variante genética podría aumentar las especies inorgánicas de arsénico, debido a que esta enzima participa en la reducción del arsénico en conjugación de GSH, por lo que en presencia de factores como la edad y consumo de alcohol podrían tener influencia sobre el efecto de este polimorfismo (González-Martínez *et al*, 2018).

1.4.2 Arsénico 3 Metiltransferasa (*As3MT*)-rs3740400

El gen *As3MT* se encuentra en el cromosoma 10 (10q24), la cual codifica una arsenito metiltransferasa responsable de la metilación y desintoxicación del arsénico utilizando S-adenosilmetionina. Este gen se compone de 11 exones, que juntos codifican una transcripción funcional completa (*As3MT^{full}*) y una transcripción empalmada alternativa que excluye los exones 2 y 3 (*As3MT^{d2d3}*) (Washer *et al*, 2022).

La susceptibilidad a la toxicidad por arsénico está directamente relacionada con la eficiencia del metabolismo de este metaloide, la cual se asocia con SNPs no codificantes en la *As3MT*, uno de los SNPs conocidos de este gen es la variante rs3740400, la cual consiste en una

variante intrónica ubicada en el intrón 1 del gen en la cual se reemplaza una timina por una guanina en la posición 97 (Engström *et al*, 2013; Ensembl, 2023; Drobná *et al*, 2016).

Un efecto potencial de los SNPs de este gen sobre la metilación del ADN es que pueden provocar cambios de secuencia que pueden introducir o eliminar sitios de metilación, en el caso de la variante rs3740400 es capaz de introducir sitios CpG en la región 5', representando objetivos de metilación del ADN, ya que los polimorfismos en las regiones promotora e intrónica pueden afectar los niveles de expresión génica de As3MT, que a su vez puede alterar el proceso de metilación del arsénico inorgánico, causando una disminución en la capacidad metabólica y por ende, la posibilidad de detoxificar las especies inorgánicas de arsénico. (Engström *et al*, 2013; Koller *et al*, 2020; Engström K. V. *et al*, 2011).

1.4.3 Metiléntetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*)-rs1801133

El gen *MTHFR* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.6) y codifica proteínas dimericas, donde el principal productos es una proteína de 77 kDa, con una segunda isoforma de 70 kDa que se encuentra en los seres humanos. Una mutación común en el gen de la *MTHFR* es la variante rs1801133, la cual consiste en una mutación *missense*, donde se cambia una citosina por una timina en el nucleótido 677, lo que se traduce en un cambio aminoacídico de una Alanina por una Valina en el posición 222 (Zhao *et al*, 2023).

Este cambio en la secuencia aminoacídica impide el funcionamiento óptimo de la enzima a temperaturas superiores a 37°C, alterando su termoestabilidad y causando una disfunción enzimática, donde la actividad puede verse reducida un 65% a 46°C. Por lo que esta variante tendrá directa relación con la homeostasis de los niveles de SAM, debido a que este polimorfismo genético es la causa más común de la hiperhomocisteinemia, ya que al tener una actividad enzimática disminuida se producen menores cantidades 5-metiltetrahidrofolato en el ciclo del folato, aumentando las concentraciones plasmáticas de homocisteína provenientes del ciclo de la metionina, alterando la síntesis de SAM, causando una menor disponibilidad de este cofactor para la metilación de arsénico (Raghubeer *et al*, 2021).

De acuerdo con los antecedentes presentados, este proyecto de tesis postula la siguiente hipótesis:

2. Hipótesis

“La presencia de variantes genéticas en MTHFR, GSTO2, As3MT, GSTP1, GSTT1 y GSTM1, en la población colombiana, se asocia con una mayor predisposición a desarrollar daño oxidativo celular y alteraciones sobre la función renal en individuos expuestos al arsénico inorgánico”

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar las variantes genéticas asociadas al metabolismo del arsénico y su efecto sobre el estrés oxidativo y la predisposición a desarrollar alteraciones sobre la función renal en individuos expuestos a altas y bajas dosis de Arsénico por ingesta de agua.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estimar la dosis de exposición al arsénico por ingesta de agua en poblaciones del Caribe Colombiano. (Realizado en colaboración con la Universidad de Cartagena, Colombia).

3.2.2 Evaluar la presencia de variantes genéticas de los genes participantes del metabolismo del arsénico: *MTHFR, GSTO2, As3MT, GSTP1, GSTT1* y *GSTM1*.

3.2.3 Determinar el estrés oxidativo y el estado de la función renal a partir de biomarcadores de daño celular. (Realizado en colaboración con la Universidad de Cartagena, Colombia).

3.2.4 Evaluar la asociación entre las variantes genéticas, su relación con estrés oxidativo y la función renal de sujetos expuestos al arsénico en poblaciones del Caribe Colombiano.

4. Materiales y métodos

4.1 Selección de individuos y muestras de estudio

4.1.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de corte transversal, en el cual se estableció un control *post hoc* una vez que se recopiló la información, teniendo en cuenta el nivel de exposición de los participantes por la ingesta de agua. Esto implica que el grupo estudiado fue dividido en dos subgrupos; alta y baja exposición al arsénico, para comparar la presencia de los efectos de la exposición al arsénico sobre el estrés oxidativo y la función renal de los participantes.

4.1.2 Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{[p_1(100 - p_1) - p_2(100 - p_2)]f(\alpha - \beta)}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde n corresponde al valor del tamaño muestral; p1 a la probabilidad de presentar el evento (daño renal) en el grupo con baja exposición en estudios de población general, el cual presenta un valor del 10 %; p2 a la probabilidad de presentar el evento en el grupo con alta exposición, correspondiente a un 30 %; α corresponde al error tipo I con un valor de 0,05; β corresponde al error tipo II con un valor de 0,20 y finalmente el valor de $f(\alpha-\beta)$ equivale a 6,18. Esto da como resultado un valor de tamaño muestral de 124 individuos.

4.1.3 Criterios de selección de participantes

Criterios de inclusión

- Participantes con un consumo regular de agua de pozo.
- Participantes mayores de 18 años.
- Participantes con al menos 5 años de residencia en el municipio estudiado.

Criterios de exclusión

- Participantes con exposición ocupacional al arsénico.
- Participantes con antecedentes médicos previos de enfermedad renal y/o hepática.
- Participantes con exposición a terapias con medicamentos arsenicales.
- Participantes que hayan consumido mariscos 24 horas antes de la toma de muestras.

Una vez seleccionados los participantes, mediante encuesta se recopilaron los siguientes datos: edad, sexo, nivel educacional, peso, talla, índice de masa corporal, antecedentes de insuficiencia renal y/o tratamientos farmacológicos para la caracterización sociodemográfica de la población estudiada. Además, se recabo información sobre co-exposiciones, como consumo de alcohol, cigarrillos y mariscos.

4.1.4 Consideraciones éticas

El estudio consideró todas las normativas internacionales asociadas con la Declaración de Helsinki, las buenas prácticas clínicas y fue sometido al comité de ética en investigaciones de la Universidad de Cartagena, Colombia. Dentro de las consideraciones éticas, a cada participante se le entregó un Consentimiento informado donde se explican los objetivos y el alcance del estudio. Además, previo al proceso de toma de muestras, fue solicitado un permiso a la Secretaría de Salud del municipio para proceder con el estudio.

En el ANEXO I se adjunta el consentimiento informado que fue entregado a los participantes para que estuvieran en conocimiento del tipo de estudio en el cual participaron y en el ANEXO II el documento correspondiente al aval del comité de ética para la realización del estudio.

4.2 Etapas experimentales y metodologías

4.2.1 Determinación de la concentración de Arsénico en agua

Se seleccionaron siete pozos de agua subterránea utilizadas para el consumo humano de las diferentes localidades señaladas en **la Figura 3 (mapa geográfico)**.

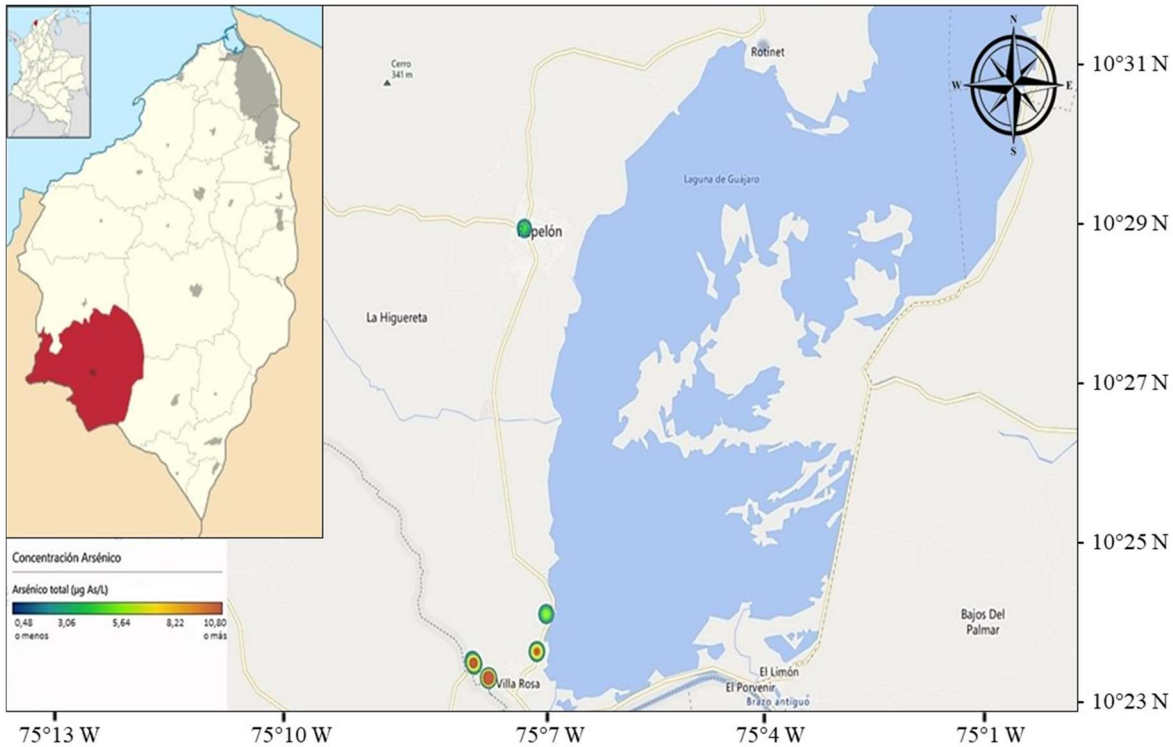


Figura 3: Mapa geográfico de las localidades muestreadas. En la esquina superior izquierda se observa con una sombra rojiza la ubicación del Departamento Atlántico en Colombia. Luego se muestra un segundo mapa con una sombra rojiza que indica la ubicación del Municipio de Repelón dentro del departamento. Por último, se puede apreciar un mapa con las coordenadas geográficas correspondientes a los siete pozos de los cuales se extrajeron las muestras de agua.

Se obtuvo de cada pozo una muestra de agua en un recipiente de 5 litros con el propósito de realizar la medición *in situ* de parámetros fisicoquímicos, como pH, turbidez, DBO (Demanda Bioquímica de oxígeno en agua) y conductividad, usando un dispositivo multiparámetro. Posterior a esto, las muestras fueron envasadas en botellas de polietileno de 250 mL, donde los envases fueron tratados previamente con ácido nítrico al 65 % y a las muestras se sometieron a un tratamiento con ácido nítrico al 10 % v/v durante 2 horas con el fin de eliminar elementos contaminantes que pudieran interferir con la cuantificación de arsénico. Pasado este tiempo se realizó un lavado de las muestras con agua ultrapura. Finalmente, se midió mediante Espectrofotometría atómica con liberación de hidruros la concentración de arsénico de las muestras de agua tratadas, como se muestra en la **Figura 4**.



Figura 4: Diagrama proceso de determinación de arsénico en agua subterránea. Se tomaron muestras de agua de 7 pozos, las cuales fueron sometidas a un pretratamiento con ácido nítrico al 10 % para posteriormente medir la concentración de arsénico utilizando espectrofotometría atómica con liberación de hidruros.

4.2.2 Determinación del Índice LADD

Una vez obtenidas las concentraciones de arsénico de los diferentes pozos de agua subterránea, se procedió con la estimación de la dosis de exposición diaria a arsénico mediante el cálculo del índice LADD. Este índice es calculado mediante la siguiente ecuación:

$$LADD = \frac{(C * IR * ED * EF)}{(BW * AT)}$$

Donde C corresponde a la concentración de arsénico en el agua ($\mu\text{g/L}$); IR corresponde a la tasa de ingesta de agua por día (L/día); ED corresponde a la duración de la exposición (años); EF corresponde a la frecuencia de exposición (días/año); BW corresponde al peso corporal del individuo y AT corresponde a la esperanza de vida colombiana (días).

Los valores de la tasa de ingesta de agua, frecuencia y duración de la exposición para cada participante del estudio se determinaron mediante encuesta y el peso corporal fue medido con bascula.

4.2.3 Extracción de ADN a partir de *buffy coat*

El equipo de investigación de la Universidad de Cartagena tomó muestras de 4 mL de sangre, la cual fue centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos para separar el *buffy coat* del plasma y eritrocitos. A partir del *buffy coat* obtenido se realizó la extracción del ADN mediante el uso del kit comercial GENTECH siguiendo las indicaciones del proveedor. Posterior a esto las muestras de ADN fueron liofilizadas a -49°C por 3 horas para ser trasladadas al Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.2.4 Extracción de muestras de plasma

Además, de la centrifugación realizada a las muestras sanguíneas se extrajo el plasma, sin tocar la capa leucocitaria (*buffy coat*) y se separó en un tubo eppendorf de 250 μL . Posterior a esto las muestras de plasma fueron liofilizadas a -49°C para ser trasladadas al laboratorio del Dr. Ramón Rodrigo, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.2.5 Cuantificación y control de calidad del ADN

Las muestras de ADN liofilizadas fueron re-suspendidas con 12 μL agua de grado biología molecular aproximadamente. La cuantificación de la concentración de ADN de las muestras se realizó mediante espectrofotometría con el equipo Denovix DS-11 (NanoDrop), el cual mide la concentración de ADN mediante el análisis de absorbancia en un rango de longitudes de onda distintas.

Para determinar si una muestra de ADN se encontraba en óptimas condiciones para la genotipificación se realizaron mediciones de las longitudes de onda 230, 260 y 280 de cada muestra para establecer las relaciones 260/280 y 260/230 nm, las cuales indican si la muestra no presenta contaminación por compuestos aromáticos como fenoles ácidos o proteínas. Una muestra en óptimas condiciones para genotipificar tendrá una relación 260/280 idealmente entre 1,8 a 2,0 o un valor sobre 1,5 como tope. Por otra parte, la relación 260/230 tendrá un valor entre 1,9 y 2,2.

Por lo que, una vez que las muestras se cuantificaron y se determinaron las relaciones 260/280 y 260/230, aquellas que tuvieron una buena concentración de ADN (un valor de concentración sobre 20 ng/μL) y una buena razón de longitudes de onda, fueron utilizadas para las genotipificaciones. En el caso de que la muestra tuviera una concentración muy alta de ADN se procedió con la dilución de la muestra hasta obtener una concentración entre los 20 y 50 ng/μL, con el propósito de evitar la saturación de la polimerasa en las reacciones de PCR.

4.2.6 Determinación de variantes genéticas *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* mediante RT-qPCR asociado a sondas *TaqMan*®.

Para la determinación de los genotipos de algunos genes estudiados se utilizó *real time* qPCR asociado a sondas *TaqMan*® a una concentración de 20 ng/μL de ADN. Se utilizó el programa de PCR recomendado por el fabricante con las sondas descritas en la **Tabla 1**. Se utilizaron los termocicladores Biorad®, Agilent Mx3000p y Agilent AriaMx.

Tabla 1: Secuencias de contexto sondas *TaqMan*® para *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*.

Gen	Secuencia contexto
<i>MTHFR</i> -rs1801133	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG <u>G/A</u> CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA
<i>GSTO2</i> -rs156697	GTTGAGATGTGGGAGAGAATGCACT <u>A/G</u> ATCTGAAGGCAGCCCTGCGTCAGGA
<i>As3MT</i> -rs3740400	GTGTCTCGAGACCTTTGTCCTCCCC <u>G/T</u> CACCCCTCGGCCCGCTGCCTGCCCT
<i>GSTP1</i> -rs1695	CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC <u>A/G</u> TCTCCCTCATCTACACCAACTATGT

En la **Figura 5** se presenta el flujo de trabajo correspondiente a este objetivo.

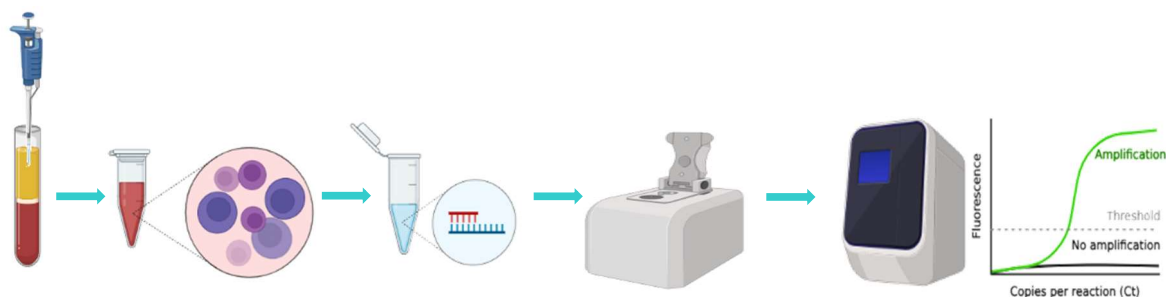


Figura 5: Metodología *real time* qPCR. Para la genotipificación de los genes *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* se extrajo el ADN del *buffy-coat* mediante kit de extracción. Una vez extraído el material genético se cuantificó la concentración de ADN (ng/μL) y determinó la razón 260/280 como control de calidad. Finalmente, las muestras se genotipificaron por RT-qPCR asociado a sondas *TaqMan*®.

4.2.7 Determinación de genotipos nulos *GSTT1* y *GSTMI* mediante PCR Convencional y geles de agarosa.

La determinación de los genotipos nulos se realizó la técnica de PCR Convencional con geles de agarosa al 2 %. Para esto se procedió con la estandarización del protocolo para la elaboración de los productos de PCR de las muestras. En el ANEXO III se encuentra el proceso de estandarización del protocolo para *GSTT1* y *GSTMI*.

Para la genotipificación de *GSTT1* se utilizó el protocolo otorgado por el fabricante de la *MyTaq* ADN Polimerasa, usando el termociclador G-STORM 482 para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los partidores utilizados para *GSTT1* y β -Globina, utilizado como control de carga, se indican en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Secuencias de partidores para *GSTT1* y β -Globina (control de carga)

Gen	Secuencia partidor	Amplicón (pb)
<i>GSTT1 forward</i>	5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	459
<i>GSTT1 reverse</i>	5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	
β -Globina forward	5' CAACTTCATCCACGTTACC 3'	268
β -Globina reverse	5' GAAGAGCCAAGGACAGTTAC 3'	

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 μ L por pocillo (volumen de reacción o *mix* + volumen de muestra requerida). El rango de concentración de ADN óptimo para la reacción establecida por el proveedor es de 5 a 500 ng para ADN genómico, por lo que para establecer el volumen de muestra a cargar se utilizó la siguiente ecuación:

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

Donde V1 corresponde al volumen extraído de cada muestra analizada (μ L), C1 corresponde a la concentración de ADN de la muestra (ng/ μ L), C2 es la concentración de ADN requerida para la correcta acción de la polimerasa (ng/ μ L) y V2 corresponde al volumen del pocillo, correspondiente a 30 μ L.

Los partidores también deben estar a una concentración determinada de 0,2 a 0,6 M, por lo que si es necesario se deberá ajustar la cantidad de cada partidor, lo cual no fue necesario para este protocolo.

Los volúmenes utilizados de cada reactivo para la preparación del *mix* de reacción se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Reactivos utilizados en la preparación del *mix* de reacción con sus respectivos volúmenes.

Reactivo	1X (μl)
Agua Biología Molecular	Lo necesario para llegar a 30 μL
Buffer <i>MyTaq</i>	5
<i>β-globina forward</i>	0,2
<i>β-globina reverse</i>	0,2
<i>GSTT1 forward</i>	0,2
<i>GSTT1 reverse</i>	0,2
<i>MyTaq</i> DNA Polimerasa	0,4
Muestra de DNA	5 ng – 500 ng
	30 μL x pocillo

El protocolo con el programa de termociclador se adjunta en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Protocolo del termociclador para *GSTT1*.

Proceso	T (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	30
<i>Annealing</i>	62	15	
Extensión	75	10	

Una vez finalizado el programa del termociclador, los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta que se preparara el gel de agarosa al 2%.

Para la genotipificación de *GSTMI* se utilizó el protocolo entregado por el fabricante de la *OneTaq* ADN Polimerasa, utilizando el termociclador G-STORM 482 para la reacción de

PCR. Los partidores utilizados para *GSTMI* y *CYP1A1*, utilizado como control de carga, se indican en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Secuencias para *GSTMI* y *CYP1A1* (control de carga).

Gen	Secuencia partidor	Amplicón (pb)
<i>GSTMI forward</i>	5' CTGCCCCACTTGATTGATGGG 3'	273
<i>GSTMI reverse</i>	5' CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3'	
<i>CYP1A1 forward</i>	5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'	340
<i>CYP1A1 reverse</i>	5' CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3'	

La reacción de PCR para *GSTMI* utilizó un volumen final de 25 μ L por pocillo, donde el rango de concentración de ADN óptimo para la reacción establecida por el proveedor es de 1 ng a 1 μ g para ADN genómico, por lo que para determinar el volumen de muestra necesario se utilizó la ecuación descrita con anterioridad, solo que en este caso el valor de V2 tuvo un valor de 25 μ L.

Para este protocolo fue necesario añadir los dNTPs, debido a que el *buffer* para la enzima no los traía incorporados como en el caso de la *MyTaq*. La concentración de los dNTPs establecida por el proveedor es de 10 mM para cada uno. Por otra parte, los partidores deben tener una concentración de 10 μ M, por lo que si es necesario se deberá ajustar la cantidad de cada partidor, lo cual no fue necesario para este caso.

Los volúmenes utilizados de cada reactivo para la preparación del *mix* de reacción se indican en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Reactivos utilizados en la preparación del mix de reacción con sus respectivos volúmenes.

Reactivo	1X (μ l)
Agua Biología Molecular	Lo necesario para llegar a 25 μ L
Buffer <i>OneTaq</i>	5
dNTPs X 4	0,5
<i>CYP1A1 (C44) forward</i>	0,5
<i>CYP1A1 (C47) reverse</i>	0,5

<i>GSTMI forward</i>	0,5
<i>GSTMI reverse</i>	0,5
<i>OneTaq</i> DNA Polimerasa	0,125
Muestra de DNA	1 ng – 1 µg
	25 µL x pocillo

El programa de termociclador utilizado para *GSTMI* se indica en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Protocolo del termociclador para *GSTMI*.

Proceso	T (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	94	30	1
Amplificación			
Denaturación	94	15	30
<i>Annealing</i>	60	15	
Extensión	68	60	
Extensión Final	68	300	1

Una vez finalizado el programa del termociclador, los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta que se preparara el gel de agarosa al 2%.

Para los geles de agarosa fue necesario la elaboración del *buffer* TBE 1X, el cual fue utilizado como *buffer* de corrida y para la preparación de los geles. Para su fabricación se hizo un *buffer* TBE 10X pesando en balanza granataria 7,44 g de EDTA disódico, el cual se trasvasijo a un *shot* limpio de 1000 mL y se añadió 500 mL aproximadamente de agua destilada para posteriormente homogeneizar con agitador magnético hasta la total disolución. Luego se añadieron 108 g de Tris aminometano y se agitó durante 5 minutos para homogeneizar. Finalmente se agregó a la solución 55 g de ácido bórico y se dejó con agitación magnética durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se sonicó el *buffer* durante 10 minutos, se enraso hasta los 1000 mL y nuevamente se homogeneizo.

Para la elaboración del *buffer* TBE (1,1M Tris; 900 mM Borato; 25 mM EDTA; pH 8,3) 1X, se extrajo una alícuota de 100 mL del *buffer* TBE 10X y se trasvasijo a un *shot* limpio de

1000 mL. Luego se completó el volumen hasta el enrase con agua destilada y se dejó con agitación magnética por 5 minutos.

Una vez fabricado el *buffer* TBE, el gel de agarosa al 2 % se preparó pesando en balanza granataria 1 gramo de agarosa, la cual fue trasvasijada a un matraz de Erlenmeyer y se le añadieron 50 mL de *buffer* TBE 1X. Luego se derritió en el microondas en intervalos de 20 segundos aproximadamente, para evitar la ebullición de la agarosa, hasta la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se trasvasijo la solución de agarosa al molde correspondiente y se dejó gelificar por unos 15 minutos aproximadamente.

Luego se llenó la cámara electroforética con la cantidad de buffer necesario hasta que el gel quede completamente sumergido en este y se programó la fuente de poder a 60V por 20 minutos en primera instancia, para que las muestras puedan introducirse correctamente al gel y pasado este tiempo se programó la fuente a 90V por una hora y media, para la correcta separación y resolución de las bandas.

Para la visualización de los patrones de amplificación en el transiluminador UV se utilizó el agente intercalante GelRed diluido en agua de calidad biología molecular (1:100), cargando 1 μ L de la dilución en cada pocillo de Parafilm[®] elaborado con ayuda de una gradilla, debido a que los reactivos deben homogeneizarse antes de cargarlos en el gel.

Se colocaron 5 μ L de producto de PCR, 1 μ L de *buffer* de carga (en caso de que el *buffer* usado en la reacción de PCR sea incoloro) y el GelRed en el Parafilm, utilizando la punta de la micropipeta para homogeneizar y se cargó inmediatamente en el gel de agarosa para evitar la disolución de los reactivos. Para el Ladder, se utilizó el *HyperLadder* 100 bp de Bioline, del cual se cargaron 2 μ L, se homogeneizo con el GelRed y fue cargado al gel.

En el caso de *GSTT1*, para el genotipo *wild-type* se obtuvieron dos bandas: una de 459 pb y otra de 268 pb, mientras que para el genotipo *null*, correspondiente a la delección del gen, solo se obtuvo una banda de 268 pb, que es el amplicón para la β -Globina, como se muestra en la **Figura 6**. Por otra parte, en el caso de *GSTM1*, para el genotipo *wild-type* se obtuvieron dos bandas: una de 340 bp y otra de 273 bp y para el genotipo *null*, sólo se obtuvo una banda en 340 bp, que corresponde al control de carga *CYP1A1* como se visualiza en la **Figura 7**.

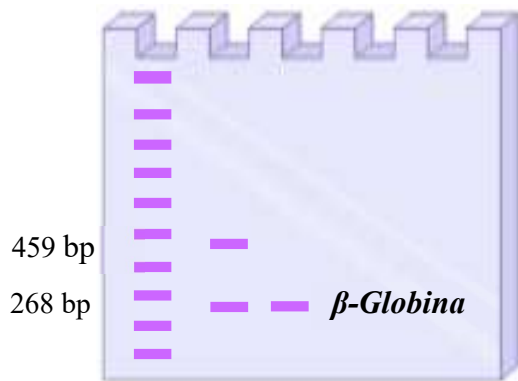


Figura 6: Patrón electroforético *GSTT1*. La banda de 268 bp corresponde al control de carga *β-Globina* y la banda de 459 bp pertenece al gen *GSTT1*.

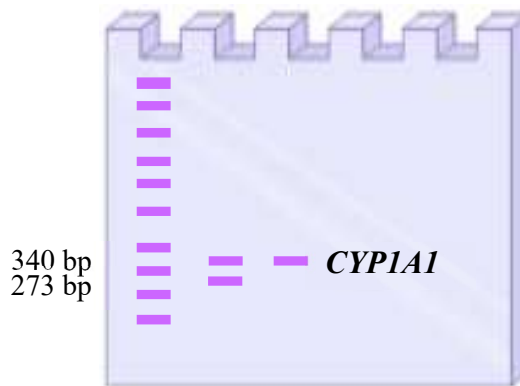


Figura 7: Patrón electroforético *GSTM1*. La banda de 340 bp corresponde al control de carga *CYP1A1*, mientras que la banda 273 bp pertenece al gen *GSTM1*.

En la **Figura 8** se muestra el flujograma para este objetivo.

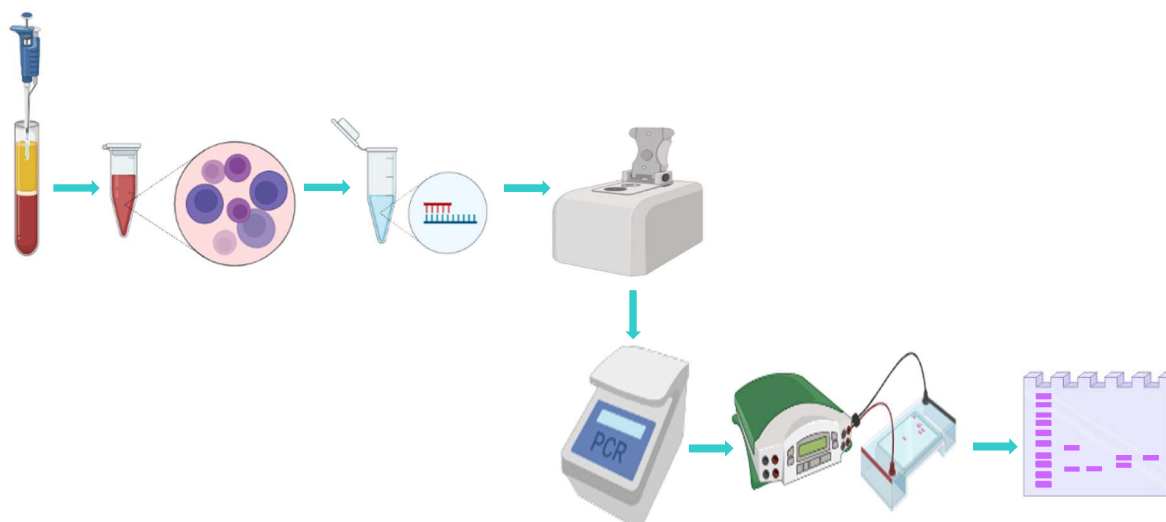


Figura 8: Metodología PCR Convencional. Para la genotipificación de los genes *GSTT1* y *GSTM1* se extrajo el ADN a partir de *buffy coat* mediante un kit comercial. Una vez extraído se realizó la cuantificación (ng/ μ L) y el control de calidad correspondiente. Luego se hicieron los productos de PCR para cada muestra con los respectivos protocolos del termociclador, para posteriormente cargar los productos en un gel de agarosa al 2%. Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó un transiluminador UV.

4.2.8 Determinación del estrés oxidativo y daño en la función renal mediante biomarcadores de daño celular

El biomarcador FRAP fue utilizado para medir el estrés oxidativo de los participantes. Para esto se re-suspendieron las muestras de plasma liofilizadas y la cuantificación de FRAP se

realizó utilizando el método descrito por Benzie y Strain, el cual consiste en medir la absorbancia a 593 nm, que es la longitud de onda en el cual se detecta el complejo coloreado ferroso-tripiridiltriazina.

Para determinar el estado de la función renal de los participantes se les tomaron nuevas muestras de sangre, las cuales fueron procesadas en un laboratorio clínico para cuantificar los diferentes parámetros. Los biomarcadores medidos para evaluar el estado de la función renal fueron la creatinina sérica, el nitrógeno ureico en sangre, el *Cockcroft-Gault* (estimación de la filtración glomerular), el MDRD y el CKD-EPI. Estos parámetros fueron utilizados para el cálculo del CDK *Stage* de cada participante, que corresponde a una escala creada posterior al cálculo de la tasa de filtración glomerular, permitiendo diagnosticar el estado de la función renal, siendo la condición *Stage* 1 y 2 personas con función renal normal y la condición *Stage* 3 y 4 corresponde a personas con alteraciones sobre la función renal. Cabe destacar que tanto las mediciones de FRAP como los biomarcadores de función renal fueron realizados por el equipo de investigación de la Universidad de Cartagena, Colombia. Por último, para la realización del análisis estadístico se utilizó una regresión lineal múltiple, usando Stata 14.0.

5. Resultados

5.1 Estimación de la dosis de exposición al arsénico por ingesta de agua: Índice LADD

De los 124 participantes que fueron calculados en el tamaño muestral, se reclutaron a 154 personas del departamento de Atlántico, Colombia. No obstante, se debieron excluir a 19 participantes por no cumplir con los criterios de inclusión y exclusión señalados anteriormente, quedando un total de 135 participantes para la realización de la caracterización sociodemográfica de la población estudiada.

Una vez recopilados los datos necesarios para la caracterización, se realizó la estimación de la dosis de exposición diaria, utilizando el índice LADD. Posterior a esto se dividió a la población de estudio de estudio en dos subgrupos: alta y baja exposición al arsénico. Se utilizó el valor establecido por la US-EPA como punto de corte para clasificar a los individuos, el cual corresponde a $0,30 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$ (Wong *et al*, 2022). Por lo que aquellos individuos que obtuvieron un valor de índice LADD superior a $0,30 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$ fueron clasificados como el grupo de alta exposición al arsénico; mientras que los participantes con un valor de índice LADD menor o igual a $0,30 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$ fueron catalogados como el grupo de baja exposición. En la **Tabla 8** se indica la descripción de los valores de cada parámetro utilizado en el cálculo de índice LADD separados de acuerdo con el grado de exposición.

Tabla 8: Valores para cada parámetro requerido para el cálculo del índice LADD.

Parámetros LADD	Promedio (DE)		
	Alta dosis de exposición	Baja dosis de exposición	Total
Concentración As ($\mu\text{g}/\text{L}$)	$20,88 \pm 1,6$	$3,80 \pm 2,1$	$14,2 \pm 8,6$
Tasa de ingesta de agua (L/día)	2,50		
Tiempo de exposición (años)	$29,5 \pm 15,2$	$23,3 \pm 15,3$	$25,4 \pm 15,5$
Frecuencia exposición (días/años)	365		
Peso (kg)	$68,3 \pm 12,1$	$71,2 \pm 16,7$	$70,2 \pm 15,3$
Esperanza de vida (día)	27375		
Índice LADD ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$)	$0,42 \pm 0,10$	$0,10 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,18$

DE: Desviación estándar..

En la **Tabla 9** se adjuntan los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de arsénico de las muestras de agua que fueron extraídas desde los acuíferos seleccionados.

Tabla 9: Parámetros fisicoquímicos y niveles de arsénico en muestras de agua que abastecen a las poblaciones estudiadas.

Parámetros	Pozo 1 - Acueducto Villa Rosa	Pozo 2 - Finca Dalmiro	Pozo 3 - Finca Armando Roa	Pozo 4 - Finca El Paraíso	Pozo 5 - Finca La Victoria	Acueducto Repelón	Acueducto Rotinet
Latitud	10°24'42.756"N	10°24'51.894"N	10°24'54.264"N	10°25'0.414"N	10°25'25.41"N	10°29'42.792"N	10°31'43.71"N
Longitud	75°8'12.396"W	75°8'24.672"W	75°8'26.244"W	75°7'30.996"W	75°7'22.956"W	75°7'41.742"W	75°4'17.318"W
pH (unidades)	7,56	6,86	7,18	6,81	6,88	7,60	7,46
Conductividad eléctrica (µS/cm)	384	566	1510	371	471	139	618
Sólidos disueltos totales (mg/L)	202	302	792	197	200	73	334
Turbiedad (NTU)	0,34	0,67	2,0	1,4	1,5	13,9	10,1
Alcalinidad (mg/L)	157,0	130,4	364,5	93,9	120,5	137,8	73,4
Dureza total (mg/L)	149,5	269,9	686,4	200,4	220,5	133,3	239,0
Oxígeno disuelto (mg OD/L)	1,99	4,83	5,49	1,97	1,98	5,38	7,80
Cloruros (mg Cl/L)	106,5	26,6	147,9	76,4	86,5	121,8	101,6
Nitritos (mg NO ₂ /L)	7,176	61,150	17,930	70,690	53,70	127,0	0,460
Nitratos mg NO ₃ /L)	0,014	0,018	0,007	0,034	0,020	0,310	0,002
Arsénico total (µg As/L)	21,13*	9,27	5,68	10,97*	6,20	4,60	0,94

Nota: *Valores de As en agua por encima de valores de referencia (10 µg/L) (US EPA, 2011).

5.2 Caracterización sociodemográfica de la Población

De los 135 participantes seleccionados, el 37,0 % corresponde a participantes masculinos y un 63,0 % a participantes femeninas. En la **Tabla 10**, también se puede observar que, el 33,3% de los individuos estudiados se clasificaron como el grupo de alta exposición por tener un valor de índice LADD superior a los 0,30 µg/kg*día, mientras que el 66,7 % restante corresponde a aquellas personas con una baja exposición al arsénico. Al observar la cantidad

de hombres y mujeres de ambos grupos, se aprecia que se mantiene una proporción similar tanto en el grupo de alta exposición como en el de baja exposición.

Respecto a la edad promedio de los individuos fue de 45,5 años, con una dispersión de 17,3 años aproximadamente. Mientras que en el grupo de alta exposición se observa una edad promedio de 51,9 años, mientras que el grupo de baja exposición tiene una edad promedio de 42,4 años, por lo que se observó significancia estadística entre ambos grupos ($p\text{-value} < 0,05$).

Por otra parte, para los parámetros de peso, estatura e IMC se obtuvieron valores promedio de 70,2 kg; 164,3 cm y 25,9 kg/m² respectivamente para la población estudiada. Los valores promedio de cada grupo para estos parámetros fueron de 68,3 kg; 163,8 cm y 25,3 kg/m² respectivamente para el grupo de alta exposición y de 71,2 kg; 164,5 cm y 26,2 kg/m² respectivamente para el grupo de baja exposición.

En relación con los valores de concentración promedio de arsénico de los pozos de agua analizados, se tiene que la concentración promedio de arsénico tuvo un valor de 14,2 µg/L para los pozos de agua subterránea estudiados. Además, el tiempo de exposición promedio de los individuos entrevistados fue de 25,4 años. Para el grupo de alta exposición se obtuvo una concentración de arsénico promedio de 21,13 µg/L; mientras que para el grupo de baja exposición fue de 10,7 µg/L.

Además, de los siete pozos estudiados, dos fueron catalogados con una alta concentración de arsénico por tener mediciones de este metaloide superiores a lo establecido por la OMS, mientras que los cinco pozos restantes se clasificaron en el grupo de baja exposición, ya que presentan una concentración de arsénico inferior a 10 µg/L. Las concentraciones de arsénico de cada pozo estudiado se encuentran en la **Tabla 9**.

Finalmente, en la población estudiada el 51,1% son consumidores de alcohol; un 6,7 % son fumadores y el 63,7 % consumen mariscos de manera habitual.

Tabla 10: Caracterización sociodemográfica de la población colombiana estudiada.

Características	Alta dosis de exposición	Baja dosis de exposición	Total	p-value
N° Individuos (%)	45 (33,3)	90 (66,7)	135 (100)	-
Género Masculino (%)	18 (40,0)	32 (35,6)	50 (37,0)	0,614
Género Femenino (%)	27 (60,0)	58 (64,4)	85 (63,0)	
Edad (años), media ± DE	51,9 ± 14,0	42,4 ± 18,0	45,5 ± 17,3	0,002*
Peso (kg), media ± DE	68,3 ± 12,1	71,2 ± 16,7	70,2 ± 15,3	0,302
Altura (cm), media ± DE	163,8 ± 8,5	164,5 ± 9,3	164,3 ± 9,0	0,671
IMC (kg/m ²), media ± DE	25,3 ± 3,4	26,2 ± 5,5	25,9 ± 4,9	0,309
N° pozos de agua (%)	2 (29)	5 (71)	7 (100)	-
Arsénico total (µg/L), media ± DE	21,13 ± 0,0	10,7 ± 8,6	14,2 ± 8,6	< 0,01
Tiempo de exposición (años), media ± DE	29,5 ± 15,2	23,3 ± 15,3	25,4 ± 15,5	0,028*
Consumo de Alcohol (%)	22 (48,9)	47 (52,2)	69 (51,1)	0,715
Consumo de Cigarros (%)	2 (4,4)	7 (7,8)	9 (6,7)	0,464
Consumo de Mariscos (%)	27 (60,0)	59 (65,6)	86 (63,7)	0,527

DE: Desviación estándar.

5.3 Determinación de las frecuencias genotípicas de las variantes *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT*, *GSTP1*, *GSTT1* / *GSTM1*, genes participantes en el metabolismo de arsénico.

De los 154 personas reclutadas, solo se contaron con 147 en el laboratorio para la realización de las genotipificaciones y las mediciones de FRAP. En la **Figura 9** se muestra el flujograma de cómo fueron seleccionadas las muestras de trabajo, debido a que, de las 147 muestras disponibles, no todas se encontraban en las condiciones óptimas para analizarlas. Por lo que para la realización de los análisis estadísticos correspondientes se seleccionaron 116 muestras del total que se tenía en el laboratorio.

Las muestras que fueron consideradas como válidas cumplían con el valor de la razón 260/280, tenían una buena concentración de ADN para el análisis y se contaba con la información sociodemográfica de la persona, ya que aquellas muestras que no tenían la información debieron ser descartada de los análisis estadísticos.

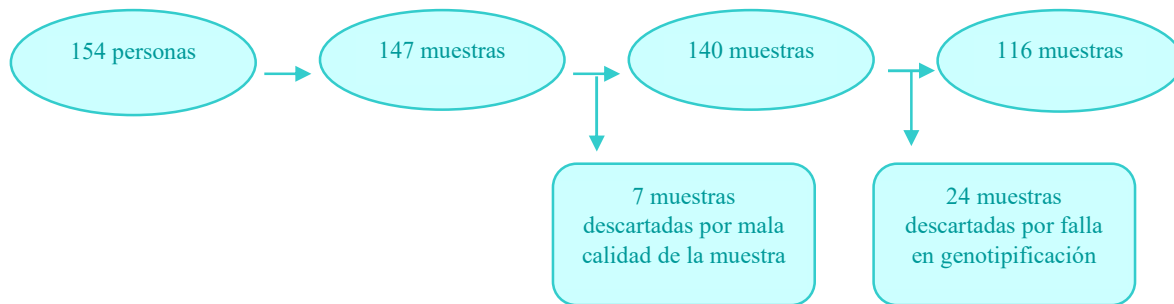


Figura 9: Flujograma proceso de selección de muestras. De las 154 personas reclutadas, solo se obtuvieron 147 muestras. De este total de muestras, solo 116 fueron consideradas como válidas para la parte experimental y posterior análisis estadístico. Las 24 muestras restantes fueron descartadas debido a que tenían una concentración muy baja de ADN, no cumplían con el valor de la razón 260/280 requerida o no se obtuvieron resultados genéticos.

La determinación del genotipo para las variantes genéticas para *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* fue realizada mediante RT-qPCR asociado a sondas *TaqMan*® y las variantes *GSTT1* y *GSTM1* se realizaron por PCR Convencional con geles de agarosa. Una vez que se obtuvieron los resultados de las genotipificaciones de las variantes analizadas, se procedió a determinar el modelo de herencia para cuatro de las seis variantes (*MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*), debido a que en el caso de *GSTT1* y *GSTM1* se consideró un modelo de herencia tipo dominante, en donde el genotipo nulo fue considerado como el genotipo de riesgo.

Para establecer el modelo de herencia se consideraron el codominante, dominante y recesivo, donde utilizando el software Stata.14, se realizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) y aquel modelo que estuviera más cercano a la significancia estadística indicara el tipo de modelo que presenta la variante analizada.

Para *MTHFR* y *GSTO2* se determinó un modelo de herencia recesivo para el alelo de riesgo, con un *p-value* de 0,166 y 0,108 respectivamente. Mientras que para las variantes *As3MT* y *GSTP1* el modelo de herencia establecido fue el dominante para el alelo de riesgo, con un *p-value* de 0,185 y 0,235 respectivamente.

En el ANEXO IV se encuentran los resultados de los modelos de herencia estudiados para los genes *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* de la población estudiada.

En la **Tabla 11** se indican las frecuencias genotípicas de cada gen de acuerdo con el grado de exposición. En los casos de *MTHFR* y *GSTO2* se agruparon los genotipos heterocigoto homocigoto tipo wild-type y en el caso de *As3MT* y *GSTP1* se agruparon los genotipos heterocigoto y homocigoto para el alelo de riesgo, debido al modelo de herencia determinado.

Tabla 11: Frecuencias genotípicas de los diferentes genes según el grado de exposición.

Genotipos	Alta exposición	Baja exposición	Total	<i>p-value</i>
<i>MTHFR</i>-rs1801133, (%) Modelo de herencia recesivo				
CC (<i>WT</i>) + CT	35 (87,5)	72 (94,7)	107 (92,2)	0,17
TT	5 (12,5)	4 (5,3)	9 (7,8)	
<i>GSTO2</i>-rs156697, (%) Modelo de herencia recesivo				
AA (<i>WT</i>) + AG	28 (70,0)	63 (82,9)	91 (78,5)	0,11
GG	12 (30,0)	13 (17,1)	25 (21,5)	
<i>As3MT</i>-rs3740400, (%) Modelo de herencia dominante				
AC + CC	32 (80,0)	52 (68,4)	84 (72,4)	0,19
AA (<i>WT</i>)	8 (20,0)	24 (31,6)	32 (27,6)	
<i>GSTP1</i>-rs1596, (%) Modelo de herencia dominante				
AG + GG	22 (55,0)	33 (43,4)	55 (47,4)	0,24
AA (<i>WT</i>)	18 (45,0)	43 (56,6)	61 (52,6)	
<i>GSTT1</i>, (%) Modelo de herencia dominante				
Null	11 (27,5)	13 (17,1)	24 (20,7)	0,19
Activo	29 (72,5)	63 (82,9)	92 (79,3)	
<i>GSTM1</i>, (%) Modelo de herencia dominante				
Null	25 (62,5)	30 (39,5)	55 (47,4)	0,02*
Activo	15 (37,5)	46 (60,5)	61 (52,6)	
Total	40 (34,5)	76 (65,5)	116 (100)	

Para *MTHFR* se observó que el alelo de riesgo está presente en un 12,5 % de los participantes del grupo de alta exposición y en un 5,3 % para aquellos con baja exposición. Por lo que, en la población de estudio, un 7,8 % de los participantes cuentan con el alelo de riesgo, mientras que el 92,2 % restante poseen el alelo *wild-type* para *MTHFR* de forma homocigota o heterocigota.

Para *GSTO2* se puede observar que el 30,0 % de los individuos con alta exposición poseen el genotipo de riesgo, mientras que en el grupo de baja exposición el 17,1 % de los participantes cuentan con este tipo de genotipo. Mientras que la frecuencia del genotipo de riesgo para la población fue un 21,5 %.

En el caso de *As3MT* se puede observar que el 80,0 % de los individuos con alta exposición poseen genotipos con el alelo de riesgo, mientras que en el grupo de baja exposición el 68,4% de los participantes cuentan con esta condición.

Para el *GSTP1* se puede observar que el 55,0 % de los participantes con alta exposición cuentan con el alelo de riesgo, ya sea en la forma heterocigota u homocigota. Sin embargo, para aquellos que poseen una exposición baja, predomina el genotipo *wild-type*, con un valor de 56,6 % de los individuos.

En el caso de *GSTT1* se puede observar que tanto en el grupo de alta exposición como en el de baja exposición predomina el genotipo activo, con un porcentaje de individuos del 72,5% y 82,9 % respectivamente.

Finalmente, para *GSTM1* predomina el genotipo *Null* para el grupo de alta exposición con un 62,5 % de los participantes de este grupo, mientras que en el grupo con baja exposición se encuentra en una mayor proporción el genotipo activo con un 60,5 % de los individuos.

Cabe destacar que, de las variantes genéticas analizadas, *GSTM1* fue el único gen que presentó significancia estadística ($p\text{-value} < 0,05$) según el valor de $p\text{-value}$ obtenido en la prueba de chi cuadrado (χ^2).

En el ANEXO V se encuentra la tabla con las frecuencias alélicas y genotípicas para los genes *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1* de la población estudiada.

5.4 Cuantificación del estrés oxidativo y estado de la función renal a partir de biomarcadores

En la **Tabla 12** se puede observar la relación entre los grupos de individuos catalogados en alta y baja exposición con el estrés oxidativo y variantes no genéticas. Al analizar los valores de FRAP de cada subgrupo, se observó que el grupo de alta exposición al arsénico obtuvo una concentración promedio de FRAP de 226,4 μM , mientras que el grupo con baja exposición tuvo una concentración promedio de FRAP de 221,6 μM . Cabe destacar que el valor normal de FRAP oscila entre los 600 - 1200 μM (Bahr, V. P. *et al*, 2004), por lo que aquellos valores inferiores a los 600 μM indicarían un aumento en los niveles de estrés

oxidativo debido a la disminución del poder de reducción antioxidante de iones férricos. Esto indicaría que en la población estudiada tanto el grupo de alta como de baja exposición presentan un aumento del estrés oxidativo.

Tabla 12: Relación entre la exposición al arsénico, el estrés oxidativo y variables no genéticas.

Características	Alta exposición	Baja exposición	Total	<i>p-value</i>
Nº Individuos (%)	40 (34,5)	76 (65,5)	116 (100)	-
Género Masculino (%)	15 (37,5)	27 (35,5)	42 (36,2)	0,83
Género Femenino (%)	25 (62,5)	49 (64,5)	74 (63,8)	
Arsénico total (µg/L), media ± DE	21,13 ± 0,0	10,5 ± 8,4	14,2 ± 8,5	< 0,01
Concentración plasmática de FRAP (µM), media ± DE	226,4 ± 63,1	221,6 ± 76,0	223,2 ± 71,6	0,73

DE: Desviación estándar.

Por otra parte, respecto a la determinación de la función renal se muestrearon nuevamente a 122 participantes para la realización de pruebas clínicas para la obtención de valores de creatinina (mg/dL), nitrógeno ureico (mg/dL), Cockcroft-Gault (mL/min), MDRD (mL/min/1,73 m²) y CKD-EPI (mL/min/1,73 m²) para la realización del cálculo del CDK *Stage*. Este último parámetro permite clasificar a aquellos individuos que presenten alteraciones sobre la función renal, donde las categorías *Stage* 1 o 2 indican una función renal normal y las categorías *Stage* 3, 4 o 5 señalan a aquellas personas que presenten algún daño renal.

En la **Tabla 13** se observa la relación de los grupos de alta y baja exposición con parámetros de la función renal y variantes no genéticas. En este caso de los 122 participantes, se excluyeron 14 personas por no cumplir con los criterios de inclusión y exclusión del estudio, dejando un total de 108 para la caracterización sociodemográfica relacionada al estado de la función renal.

De estos 108 participantes, el 40,7 % de las personas estudiadas fueron catalogados en el grupo de alta exposición, mientras que el 59,3 % restante corresponden a aquellos individuos con una baja exposición al arsénico.

Para los parámetros clínicos de creatinina y nitrógeno ureico se obtuvieron valores promedio de 0,85 mg/dL y 13,2 mg/dL respectivamente para el grupo de alta exposición y de 0,87 mg/dL y 15,6 mg/dL para aquellos individuos con una baja exposición.

Finalmente, una vez obtenidos los valores de *CDK Stage* se observó que solo 8 personas presentan algún tipo de daño renal, donde 3 individuos están catalogados en el grupo de alta exposición al arsénico y las 5 personas restantes presentan una baja exposición.

Tabla 13: Relación entre la exposición al arsénico y los indicadores de la función renal.

Características	Alta exposición	Baja exposición	Total	<i>p-value</i>
Nº Individuos (%)	44 (40,7)	64 (59,3)	108 (100)	-
Género Masculino (%)	18 (40,9)	25 (39,1)	43 (39,8)	0,847
Género Femenino (%)	26 (59,1)	39 (60,9)	65 (60,2)	
Creatinina (mg/dL), media ± DE	0,85 ± 0,5	0,87 ± 0,6	0,86 ± 0,5	0,831
Nitrógeno Ureico (mg/dL), media ± DE	13,2 ± 5,5	15,6 ± 18,0	14,6 ± 14,3	0,403
Individuos con daño renal (%)	3 (6,8)	5 (7,8)	8 (7,4)	0,846

DE: Desviación estándar.

En el ANEXO VII se encuentra la tabla completa de la asociación entre la exposición al arsénico, el estado de la función renal y las variables no genéticas.

De manera adicional se analizó que tipo de variante genética para *GSTM1* tenían los 8 individuos que presentaron algún tipo de daño renal, ya que como se observó anteriormente, el grupo de alta exposición tuvo una mayor frecuencia a presentar el genotipo de riesgo o nulo. Para el grupo de alta exposición se encontró que de los 3 individuos que presentaron algún tipo de daño renal 2 tenían el genotipo activo para *GSTM1* y solo uno contaba con la delección del gen. Mientras que en el grupo de baja exposición se observó que de las 5 personas con daño renal 2 presentaron el genotipo activo, otros 2 individuos tuvieron la delección de *GSTM1* y una persona no obtuvo un resultado concluyente para la genotipificación. Por lo que no es posible establecer para esta población de estudio una relación entre el genotipo de riesgo para *GSTM1* con una predisposición a desarrollar alteraciones sobre la función renal en la población estudiada.

5.5 Análisis estadístico univariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.

Se realizaron análisis simples mediante regresión lineal, utilizando el biomarcador FRAP como variable dependiente y como variantes independientes cada uno de los parámetros estudiados, como edad, peso, IMC y las variantes genéticas. Esto se realizó con el propósito de establecer aquellas variantes que presenten un valor de *p-value* inferior a 0,20 para la realización del análisis multivariable. En la **Tabla 14** se puede observar el análisis de las variantes genéticas y no genéticas asociadas con el estrés oxidativo.

Tabla 14: Análisis de regresión lineal simple para variables genéticas y no genéticas asociadas con la presencia de estrés oxidativo.

Concentración plasmática FRAP / Covariantes	β	SE $^{\alpha}$	<i>p-value</i>	IC 95%
Edad (años)	0,70	0,38	0,067	-0,05 – 1,45
Género	-11,94	13,85	0,390	-39,38 – 15,49
Talla (cm)	0,75	0,78	0,344	-0,81 – 2,30
Peso (kg)	0,48	0,43	0,268	-0,37 – 1,33
IMC (kg/m ²)	0,56	1,32	0,670	-2,05 – 3,17
Concentración de arsénico (μg/L)	-1,01	0,79	0,203	-2,56 – 0,55
Tiempo exposición (años)	0,17	0,45	0,708	-0,72 – 1,06
Índice LADD (μg/kg*día)	-33,60	41,08	0,415	-114,98 – 47,78
Consumo de alcohol	3,50	13,35	0,794	-22,94 – 29,95
Consumo de cigarros	20,42	27,97	0,467	-35,00 – 75,83
Consumo de mariscos	-30,35	13,94	0,032	-57,97 – -2,74
<i>MTHFR</i> -rs1801133	4,14	24,95	0,868	-45,29 – 53,58
<i>GSTO2</i> -rs156697	-24,78	16,07	0,126	-56,61 – 7,06
<i>As3MT</i> -rs3740400	21,59	14,80	0,147	-7,73 – 50,91
<i>GSTP1</i> -rs1596	-11,41	13,33	0,394	-37,81 – 15,00
<i>GSTT1</i>	10,36	16,45	0,530	-22,24 – 42,95
<i>GSTM1</i>	10,91	13,33	0,415	-15,50 – 37,32

β : Error tipo II (0,20); SE $^{\alpha}$: Error tipo I (0,05); IC: Intervalo de confianza

5.6 Análisis estadístico multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.

De los análisis simple realizados se observa que sólo las variantes genéticas de *GSTO2* y *As3MT* presentaron la significancia mínima para ser incluidos con en análisis multivariable, mientras que de las variantes no genéticas sólo la edad, y el consumo de mariscos cumplen con el *p-value* requerido. A pesar de que la concentración de arsénico no presentó un valor de *p* inferior a 0,20, se decidió incluirlo en el análisis múltiple debido a que quiere establecer una relación entre la exposición al arsénico y el impacto sobre el estrés oxidativo.

Una vez establecidas las covariables con significancia estadística para estrés oxidativo, se procedió con el análisis multivariable, el cual se muestra en la **Tabla 15**. De las covariables analizadas sólo el consumo de mariscos tuvo significancia estadística al tener un *p-value* inferior a 0,05.

Tabla 15: Análisis multivariable de variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.

Concentración plasmática FRAP / Covariantes	β	SE $^{\alpha}$	<i>p-value</i>	IC 95%
Edad (años)	0,66	0,37	0,075	-0,07 – 1,40
Concentración de arsénico ($\mu\text{g/L}$)	-0,93	0,77	0,228	-2,46 – 0,59
Consumo de mariscos	-31,90	13,90	0,024	-59,44 – -4,36
<i>GSTO2</i> -rs156697	-26,38	16,28	0,108	-58,64 – 5,89
<i>As3MT</i> -rs3740400	20,85	14,90	0,165	-8,68 – 50,39
p=0,0125; R ² =0,1223=12,2%				

β : Error tipo II (0,20); SE $^{\alpha}$: Error tipo I (0,05); IC: Intervalo de confianza

A pesar que el análisis multivariable de la concentración plasmática de FRAP con sus diferentes covariables tiene un valor de *p* significativo, tuvo un valor para R² del 12,2 %, lo que significa que este modelo sólo se explica en un 12,2 %, donde el consumo de mariscos se relaciona con un aumento del estrés oxidativo. Además, se pudo establecer que, en la población estudiada, las variantes genéticas analizadas no tienen influencia sobre el estrés oxidativo observado.

5.7 Análisis estadístico univariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estado de la función renal de los participantes.

Se realizaron análisis simples mediante regresión lineal, utilizando el estado de la función renal como variable dependiente y como variantes independientes cada uno de los parámetros estudiados, como edad, peso, IMC y las variantes genéticas. Esto se realizó con el propósito de establecer aquellas variantes que presenten un valor de *p-value* inferior a 0,20 para la realización del análisis multivariable. En la **Tabla 16** se puede observar el análisis de las variantes genéticas y no genéticas asociadas con el estado de la función renal.

Tabla 16: Análisis de regresión lineal simple para variables genéticas y no genéticas asociadas con la presencia de daño renal.

Efecto sobre la función renal / Covariantes	β	SE $^{\alpha}$	<i>p-value</i>	IC 95%
Edad (años)	0,004	0,002	0,001	0,001 – 0,007
Género	-0,10	0,06	0,070	-0,21 – 0,01
Talla (cm)	-0,003	0,003	0,407	-0,009 – 0,004
Peso (kg)	-0,001	0,002	0,425	-0,005 – 0,002
IMC (kg/m ²)	-0,003	0,006	0,615	-0,01 – 0,008
Concentración de arsénico (μg/L)	-0,0008	0,004	0,826	-0,008 – 0,006
Tiempo exposición (años)	0,001	0,002	0,598	-0,003 – 0,005
Índice LADD (μg/kg*día)	0,05	0,17	0,781	-0,29 – 0,39
Concentración de FRAP (μM)	0,0005	0,0004	0,260	-0,0003 – 0,001
Consumo de alcohol	-0,06	0,06	0,268	-0,17 – 0,05
Consumo de cigarros	0,13	0,12	0,288	-0,11 – 0,37
Consumo de mariscos	0,014	0,06	0,815	-0,10 – 0,13
<i>MTHFR</i> -rs1801133	0,097	0,11	0,392	-0,13 – 0,32
<i>GSTO2</i> -rs156697	0,02	0,07	0,767	-0,11 – 0,15
<i>As3MT</i> -rs3740400	-0,04	0,06	0,463	-0,16 – 0,08
<i>GSTP1</i> -rs1596	-0,005	0,06	0,926	-0,12 – 0,11
<i>GSTT1</i>	-0,03	0,07	0,718	-0,17 – 0,11
<i>GSTMI</i>	-0,02	0,06	0,742	-0,13 – 0,09

β : Error tipo II (0,20); SE $^{\alpha}$: Error tipo I (0,05); IC: Intervalo de confianza

5.8 Análisis estadístico multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estado de la función renal de los participantes.

De los análisis simple realizados para establecer aquellas variantes que presenten significancia estadística, se observa que ninguna de las variantes genéticas estudiadas presentó la significancia mínima para ser incluidos con en análisis multivariable, indicando que la presencia de los alelos de riesgo no tendría un efecto directo sobre la función renal de los participantes. Por otra parte, de las variantes no genéticas solo la edad, el género cumplen con el *p-value* requerido. A pesar que la concentración de FRAP no cumple con el *p-value* requerido, se decidió incluirlo en el análisis multivariable debido a la relevancia que tiene el estrés oxidativo en la aparición de alteraciones sobre la función renal.

Una vez establecidas las covariables con significancia estadística con el estado de la función renal, se procedió con el análisis multivariable, el cual se muestra en la **Tabla 17**. De las covariables analizadas sólo la edad tuvo significancia estadística al tener un *p-value* inferior a 0,05.

Tabla 17: Análisis multivariable de diferentes covariables sobre el efecto en la función renal.

Efecto sobre la función renal / Covariables	β	SE $^{\alpha}$	<i>p-value</i>	IC 95%
Edad (años)	0,004	0,002	0,026	0,0004 – 0,007
Género	-0,09	0,06	0,131	-0,20 – 0,026
Concentración FRAP (μ M)	0,0002	0,0004	0,595	-0,0006 – 0,001
p=0,0305; R ² =0,0958=9,6%				

β : Error tipo II (0,20); SE $^{\alpha}$: Error tipo I (0,05); IC: Intervalo de confianza

De este análisis multivariable, si bien es estadísticamente significativo debido a que se obtuvo un valor de *p* de 0,0305, tuvo un bajo valor de R² (9,6 %), lo que significa que el modelo solo es capaz de ser explicado en el 9,6 %, en el cual la edad explica la aparición de alteraciones de la función renal. Además, que de la población de 108 personas solo 8 participantes presentan daño renal, por lo que aquellos individuos que presentan alteraciones sobre su función renal pueden estar asociado con otros factores que no fueron abordados en este estudio.

6. Discusión

6.1 Asociación multivariable de las variantes genéticas y no genéticas con el estrés oxidativo.

Si bien las variantes genéticas para *GSTO2* y *As3MT* fueron los únicos genes estudiados que pudieron ser incluidos para el modelo multivariable del estrés oxidativo de los participantes, al realizar este análisis con las otras covariables se pudo observar que no tuvieron significancia estadística, dilucidando que ambos genes no tienen influencia directa sobre los valores de FRAP obtenidos y que el estrés oxidativo que presenta la población estudiada puede deberse a factores como el consumo de mariscos la edad, debido a que este último tiende a la significancia estadística. Por ejemplo, existen estudios que respaldan que el aumento del daño oxidativo contribuye en el proceso de envejecimiento de un individuo, provocando una mayor susceptibilidad en la aparición y progresión de enfermedades como cáncer, diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Kudryavtseva, A. *et al*, 2016 y Luo, J. *et al*, 2020) y por otra parte, se ha descubierto que frente a una disminución de la capacidad de reducción del hierro, el aumento del estrés oxidativo es significativo, sobre todo cuando existe una exposición al arsénico, el cual contribuye en el desarrollo de patologías (Juybari, KB *et al*, 2018).

Una razón de porque sólo *GSTO2* y *As3MT* mostraron significancia en los análisis simples de regresión lineal es porque en estudios anteriores se observó la directa relación de ambos genes sobre el proceso de metilación de las especies inorgánicas de arsénico, donde *As3MT* juega un rol fundamental en el proceso de metilar As^{III} en los metabolitos MMA^{III} y DMA^{III} y *GSTO2* en el proceso de reducción de los metabolitos metilados MMA^V y DMA^V (González-Martínez *et al*, 2020).

6.1.1 Consumo de mariscos

De los resultados obtenidos del modelo multivariable, el consumo de mariscos fue la única variable que presentó significancia estadística. Esto es concordante ya que, en la realización de la caracterización sociodemográfica de la población de estudio, un 63,7 % señaló el consumo de mariscos con frecuencia, los cuales contienen principalmente arsenobetaína, una

especie orgánica del arsénico, que no presenta toxicidad y no se metaboliza. Sin embargo, los mariscos también contienen otros compuestos orgánicos del arsénico más complejos como arsenoazúcares y arsenolípidos, los cuales, si son absorbidos y metabolizados por el ser humano, produciendo el mismo metabolito urinario que las especies inorgánicas de arsénico, es decir, DMA, lo cual se ha visto que conducen a citotoxicidad, lo que podría explicar su relación con el aumento en el estrés oxidativo de la población de estudio. Es por esta razón que los mariscos también han sido catalogados como una fuente de exposición al arsénico en diversas poblaciones humanas (Taylor *et al*, 2017 y Liu *et al*, 2023).

6.1.2 Edad

Si bien la edad no mostró significancia estadística en el modelo multivariable ($p > 0,05$), esta variable tiende a la significancia, indicando que aquellos individuos que tienen una mayor edad tienen una mayor predisposición a tener niveles más altos de estrés oxidativo, lo cual es concordante a lo observado en la literatura, debido a que a medida que una persona envejece, la capacidad metabólica se reduce y aumentan la cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas. Además, durante el proceso de envejecimiento ocurren otros mecanismos celulares, por ejemplo, inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros alteraciones epigenéticas, disfunción mitocondrial y senescencia celular. Estos procesos podrían ser provocados por aumento del estrés oxidativo, sobre todo el desgaste de los telómeros, debido a que estos son muy sensibles al daño oxidativo y la capacidad de reparación de estas zonas es menor que otras partes del cromosoma, aumentando el riesgo del desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Luo, J. *et al*, 2020).

También se puede observar que la edad promedio es mayor en el grupo catalogado como de alta exposición, lo que daría indicios que los participantes de este grupo al tener una edad mayor, son más susceptibles a padecer enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

6.1.3 Concentración de arsénico

Si bien el *p-value* no obtuvo significancia estadística en el modelo multivariado, al observar los valores de concentración de arsénico estos se encuentran sobre lo establecido como

óptimo por la OMS y la US-EPA. También la población de estudio presenta un valor de FRAP por debajo de los límites de referencia para este parámetro, indicando una drástica disminución de la capacidad antioxidante reductora del hierro y por ende provoca altos niveles de estrés oxidativo en los individuos. Esto se condice con lo observado en estudios previos donde analizaron biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con patologías cardiovasculares, en los cuales se observa una disminución significativa de FRAP entre pacientes sanos y pacientes enfermos y también se observó una relación entre los niveles sérico de arsénico en pacientes con esclerosis múltiple, donde se concluyó que las concentraciones de arsénico se correlacionan negativamente con los valores de FRAP en este tipo de pacientes, favoreciendo el progreso de esta enfermedad (Delgado Roche, L. *et al*, 2009 y Juybari, KB *et al*, 2018).

6.2 Asociación multivariable de variables no genéticas con el efecto sobre la función renal.

Del modelo multivariable sobre el estado de la función renal, sólo se observó que la edad presentó significancia estadística ($p < 0,05$), dando a entender que las demás variantes genéticas y no genéticas no influyen sobre el estado de la función renal en la población estudiada, ya que, de los 108 participantes, sólo 8 individuos presentaron algún grado de daño renal. Además, aquellas personas que presentan alteraciones sobre la función renal pueden ser causada por otros factores que no fueron abordados en este estudio.

6.2.1 Edad y estrés oxidativo

Respecto a la edad, esta es la única variable con significancia estadística en el modelo multivariable, indicando que los individuos que presentan una edad más avanzada son más propensos al desarrollo de alteraciones sobre la función renal, debido al proceso natural de envejecimiento, ya que a medida que ocurre el proceso de envejecimiento del riñón se produce la inflamación crónica de los túbulos renales, lo cual causa respuestas inflamatorias y dañando los túbulos que pueden llegar a provocar fibrosis renal. Una vez que se produce el

daño a nivel tubular, los cuadros inflamatorios de esta zona están directamente relacionadas con una reducción en la tasa de filtración glomerular (TFG) (Kimura, T. *et al*, 2017).

Ademas, se conoce que los túbulos renales son ricos en mitocondrias y por lo tanto, existe una mayor producción de ROS, los cuales van a favorecer en la patogénesis de enfermedades renales. Es por esta razón que el proceso de autofagia mitocondrial en la región tubular es fundamental para la mantención de los niveles de ROS al eliminar aquellas mitocondrias dañadas. No obstante, durante el proceso de envejecimiento se producen deficiencias en la autofagia, emperorando la función mitocondrial y por lo tanto afectando el metabolsimo intracelular (Kimura, T. *et al*, 2017). También se ha visto que el envejecimiento produce glomeruloesclerosis, provocando una disminución en el número y densidad de podocitos y la disminución de la TFG, la cual disminuye después de los 40 años entre un 0,8% y 1,0 % (Shankland *et al*, 2021).

7. Conclusiones

1. Para el grupo de participantes que presentan una alta exposición al arsénico, se observó que tanto la edad como el tiempo de exposición de los individuos tiene directa relación con la obtención de un alto valor de índice LADD.
2. En el modelo univariable asociado al estrés oxidativo, la edad y el consumo de mariscos tienden a aumentarlo, ya que fueron las únicas variables que presentaron significancia. A pesar que las variantes para *GSTO2* y *As3MT* fueron incorporadas en el modelo multivariable, estas poseen un *p-value* mayor a 0,05 en ambos modelos, por lo que no se puede establecer una correlación entre la presencia de estas variantes genéticas con un aumento del estrés oxidativo en la población de estudio.
3. También se observa en el modelo multivariable asociado al estrés oxidativo que la exposición al arsénico en la población estudiada no es consistente para establecer una correlación con el aumento del estrés oxidativo de los participantes, debido a que no se obtuvo significancia estadística para esta variable.
4. En el modelo univariable para función renal, las variantes genéticas para aquellos genes estudiados no tienen influencia sobre la aparición de alteraciones sobre la función renal, ya que no presentaron significancia estadística en ningún caso.
5. En el modelo multivariable asociado a daño renal, se observó que el aumento del estrés oxidativo en la población estudiada no es consistente para establecer una correlación con el daño renal que presentan algunos participantes.
6. La exposición al arsénico por ingesta de agua en la población estudiada no es consistente para explicar el daño renal que presentan los ocho participantes del estudio, por lo que las alteraciones renales que presentan estos individuos estarían asociadas a otras variables que no fueron abordadas en este proyecto.
7. Finalmente, no se cumplió con la hipótesis formulada, debido a que las variantes genéticas estudiadas no se asociaron significativamente con el estrés oxidativo y el estado de la función renal sobre la población estudiada.

8. Limitaciones y proyecciones

- Dentro de las limitaciones que se presentaron en el estudio se encuentran los problemas operacionales en la realización del muestreo de los participantes, específicamente en la tardanza en la toma y procesamiento de muestras sanguíneas para la determinación de los biomarcadores de daño renal de los individuos.
- Por otra parte, se presentaron limitaciones relacionadas a la validez y confiabilidad de los resultados estadísticos obtenidos, debido a potenciales factores no abordados en este estudio, teniendo resultados con poca significancia estadística y por ende sesgos para establecer una correcta relación entre la exposición al arsénico y alteraciones de la función renal.
- Dentro de las proyecciones que surgen de esta investigación podemos destacar la relevancia de extrapolar el estudio a población Chilena tanto en individuos expuestos por fuentes antropogénicas como la actividad minera de la zona Norte del país, como a fuentes naturales. Además, también podría evaluarse la influencia de los pueblos étnicos del país sobre la metabolización de arsénico.
- Para estudios posteriores se plantea realizar análisis de los patrones de metilación de aquellos genes asociados con el metabolismo de arsénico, para dilucidar el impacto de una exposición prolongada de este metaloide sobre uno de los mecanismos de regulación génica a nivel celular y si dicho efecto tiene efectos sobre la salud de los individuos.
- Finalmente, la realización de este estudio en una población con individuos que posean daño renal y/o hepático, debido a que sería una población más representativa y se podría establecer la relación entre la exposición al arsénico con alteraciones sobre estos órganos. También se podría realizar la especiación del arsénico y sus metabolitos en muestras de orina para personas con enfermedad renal y/o hepática.

9. Referencias

1. Alonso, D. L. (2014). Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review. *Environmental pollution*, 186, 272-281.
2. Bahr, V. P., & Basulto, L. Y. (2004). The ferric reducing power (FRP). An assay for the serum antioxidant capacity assessment. *Correo Científico Médico de Holguín*, 8(4).
3. Bailey, K. A. (2014). Arsenic-associated changes to the epigenome: what are the functional consequences?. *Current environmental health reports*, 1(1), 22-34.
4. Benzie, I. F. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239 (1), 70-76.
5. Caceres, D. D., Werlinger, F., Orellana, M., Jara, M., Rocha, R., Alvarado, S. A., & Luis, Q. (2010.). Polymorphism of glutathione S-transferase (GST) variants and its effect on distribution of urinary arsenic species in people exposed to low inorganic arsenic in tap water: an exploratory study. *Archives of environmental & occupational health*, 65(3), 140-147.
6. Cullen, W. R. (1989). The metabolism of methylarsine oxide and sulfide. *Applied organometallic chemistry*, 3(1), 71-78.
7. Delgadillo-Guzmán, D., Quintanar-Escorza, M. A., Carrera-Gracia, M. D. L. A., & Lares-Aseff, I. (2015). Relación de la leptina en plasma con el daño oxidativo en poblaciones indígena tepehuana y mestiza de Durango. *Gaceta Médica de México*, 151(2), 216-224.
8. Delgado Roche, L., Martínez Sánchez, G., & Díaz Batista, A. (2009). Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(3), 307-313.
9. Drobná, Z. M.-A. (2016). Analysis of maternal polymorphisms in arsenic (+ 3 oxidation state)-methyltransferase AS3MT and fetal sex in relation to arsenic metabolism and infant birth outcomes: Implications for risk analysis. *Reproductive Toxicology*, 61, 28-38.

10. Dutta, S. S. (2018). Melatonin attenuates arsenic induced nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling cascades in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 303-316.
11. Engström, K. S. (2013). Efficient arsenic metabolism—the AS3MT haplotype is associated with DNA methylation and expression of multiple genes around AS3MT. *PloS one*, *8(1)*, e53732.
12. Engström, K. V. (2011). Polymorphisms in arsenic (+ III oxidation state) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. *Environmental health perspectives*, *119 (2)*, 182-188.
13. Ensembl. (29 de Diciembre de 2023). *rs3740400 SNP*. Obtenido de https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=10:102869208-102870208;v=rs3740400;vdb=variation;vf=654468623
14. Flora, S. J. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, *51(2)*, 257-281.
15. González-Martínez, F. S.-R.-R. (2018). Arsenic exposure, profiles of urinary arsenic species, and polymorphism effects of glutathione-s-transferase and metallothioneins. *Chemosphere*, *212*, 927-936.
16. González-Martínez, F. S.-R.-R. (2020). As3MT and GST polymorphisms influencing arsenic metabolism in human exposure to drinking groundwater. *International Journal of Molecular Sciences*, *21 (14)*, 4832.
17. González-Martínez, F., Johnson-Restrepo, B., & Quiñones, L. A. (2024). Arsenic inorganic exposure, metabolism, genetic biomarkers and its impact on human health: A mini-review. *Toxicology Letters*.
18. Hamachi, T. T. (2013). CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and NQO1 polymorphisms and colorectal adenomas in Japanese men. *World journal of gastroenterology: WJG*, *19(25)*., 4023.

19. Hayakawa, T. K. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of toxicology*, 79, 183-191.
20. Hernández Miguel, M. J. (Junio de 2016). *Trihalometanos y arsénico en el agua de consumo en los municipios de Chinú y Corozal de Colombia: Evaluación del riesgo a la salud*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-34612016000100005
21. Instituto de Salud Pública. (Septiembre de 2015). *Exposición laboral a arsénico*. Obtenido de <https://www.ispch.cl/sites/default/files/NotaT%C3%A9cnica%20N%C2%B0%20024%20Exposici%C3%B3n%20Laboral%20a%20Ars%C3%A9nico.pdf>
22. Instituto de Salud Pública de Chile. (2004). *Determinación de los niveles de arsénico no dietario urinario en una población de trabajadores expuestos, II región*. Obtenido de https://www.conicyt.cl/wp-content/themes/fondef/encuentra_proyectos/PROYECTO/A0/4/SA04I2027.html
23. Jain, R. B. (2021). Concentrations of selected arsenic species in urine across various stages of renal function including hyperfiltration. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(7), 8594-8605.
24. Janasik, B. R. (2015). Biological monitoring and the influence of genetic polymorphism of As3MT and GSTs on distribution of urinary arsenic species in occupational exposure workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 88., 807-818.
25. Jin, B. W. (2021). GSTM1 and GSTT1 null genotype polymorphisms and susceptibility to arsenic poisoning: a meta-analysis. *Biological Trace Element Research*, 199(6)., 2085-2095.
26. Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudcova, D., ... & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of applied toxicology*, 31(2), 95-107.

27. Juybari, KB, Ebrahimi, G., Moghaddam, MAM, Asadikaram, G., Torkzadeh-Mahani, M., Akbari, M., ... y Nematollahi, MH. (2018). Evaluación del arsénico sérico y sus efectos sobre las alteraciones antioxidantes en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente. *Esclerosis múltiple y trastornos relacionados*, 19, 79-84.
28. Kile, M. L. (2013). Influence of GSTT1 genetic polymorphisms on arsenic metabolism. *Journal of the Indian Society of Agricultural Statistics. Indian Society of Agricultural Statistics*, 67 (2), 197.
29. Kimura, T., Isaka, Y., & Yoshimori, T. (2017). Autophagy and kidney inflammation. *Autophagy.*, 13(6), 997-1003.
30. Koller, B. H.-M. (2020). Arsenic metabolism in mice carrying a BORCS7/AS3MT locus humanized by syntenic replacement. *Environmental health perspectives*, 128(8), 087003.
31. Kordi-Tamandani, D. M. (2011). Lack of association of GSTT1 and GSTP1 genes methylation and their expression profiles with risk of NAFLD in a sample of Iranian patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 35 (5), 387-392.
32. Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., ... & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.*, 7(29), 44879.
33. Lantz, R. C. (2006). Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug metabolism reviews*, 38 (4), 791-804.
34. Lenntech. (15 de Octubre de 2023). *Arsenicosis* . Obtenido de <https://www.lenntech.es/biblioteca/enfermedades/ascariasis/arsenicosis.htm>
35. Li, Y. &. (2011). DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. In *Epigenetics Protocols* . In *Epigenetics Protocols*, Humana Press, 11-21.
36. Lillo, J. (2003). *Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas*. Obtenido de Grupo de Estudios de la Minería y Medio Ambiente: https://www.aulados.net/GEMM/Documentos/Peligros_geoquimicos_As/Peligros_As_2.pdf

37. Liu, B., Sui, J., Feng, R., Lin, H., Han, X., Sun, X., & Cao, L. (2023). Transformation of arsenic species from seafood consumption during in vitro digestion. . *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1207732.
38. Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., & van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next?. *Ageing research reviews*, *57*, 100982.
39. Masenga, S. K., Kabwe, L. S., Chakulya, M., & Kirabo, A. (2023). Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome. *International journal of molecular sciences*, *24*(9), 7898.
40. Masoudi, M. S. (2011). Association between N142D genetic polymorphism of GSTO2 and susceptibility to colorectal cancer. *Molecular biology reports*, *38*, 4309-4313.
41. Ministerio de Salud. (2014). *Vigilancia Biológica de la Población Expuesta a arsénico en la Comuna de Arica*. Obtenido de Santiago: MINSAL, 2014: https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/Guia_Clinica_Vigilancia_Arsenico_final.pdf
42. Ministerio de Salud de la Nación. (03 de 10 de 2020). *Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico HACRE: Módulo de Capacitación*. Obtenido de <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-10/03-%202011-HACRE-modulo-capacitacion.pdf>
43. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (Diciembre de 2023). *Los riñones y su funcionamiento*. Obtenido de <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/rinones-funcionamiento>
44. Niedzwiecki, M. M. (2018). Serum homocysteine, arsenic methylation, and arsenic-induced skin lesion incidence in Bangladesh: a one-carbon metabolism candidate gene study. *Environment international*, *113*, 133-142.

45. Organización Mundial de la Salud. (7 de Diciembre de 2022). *Arsénico*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
46. Pilsner, J. R. (2007). Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *The American journal of clinical nutrition*, 86 (4), 1179-1186.
47. Prakash, C., Soni, M., & Kumar, V. (2016). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. *Journal of Applied Toxicology*, 36(2), 179-188.
48. Raghubeer, S. &. (2021). Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients* 2021,13, 4562.
49. Rahaman, M. S. (2021). Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management. *Environmental Pollution*, 289, 117940.
50. Ramírez, A. V. (2013, July). Exposición ocupacional y ambiental al arsénico: actualización bibliográfica para la investigación científica. *In Anales de la Facultad de Medicina*, Vol. 74, No. 3, pp. 237-248.
51. Revista Interamericana de Ambiente y Turismo. (10 de Junio de 2010). *Impacto y consecuencias del arsénico en la salud y el medio ambiente en el Norte de Chile*. Obtenido de <https://riat.utralca.cl/index.php/test/article/viewFile/65/56>
52. Ruiz-Ramos, R. L.-C.-R. (2009). Sodium arsenite alters cell cycle and MTHFR, MT1/2, and c-Myc protein levels in MCF-7 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 241 (3), 269-274.
53. Shankland, S. J., Wang, Y., Shaw, A. S., Vaughan, J. C., Pippin, J. W., & Wessely, O. (2021). Podocyte aging: why and how getting old matters. *Journal of the American Society of Nephrology*, 32(11), 2697-2713.
54. Strange, R. C. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1-2), 21-26.

55. Susan, A., Rajendran, K., Sathyasivam, K., & Krishnan, U. M. (2019). An overview of plant-based interventions to ameliorate arsenic toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *109*, 838-852.
56. Taheri Zadeh, Z. E. (2021). Resveratrol attenuates learning, memory, and social interaction impairments in rats exposed to arsenic. *BioMed Research International*, *2021*.
57. Taylor, V., Goodale, B., Raab, A., Schwerdtle, T., Reimer, K., Conklin, S., ... & Francesconi, K. A. (2017). Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Science of the Total Environment*, *580.*, 266-282.
58. Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, *181.*, 211-217.
59. Washer, S. J.-A. (2022). Functional characterization of the schizophrenia associated gene AS3MT identifies a role in neuronal development. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *189(5)*, 151-162.
60. Watanabe, T. &. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. . *Archives of toxicology*, *87*, 969-979.
61. Wong, C. R. (2022). Review of regulatory reference values and background levels for heavy metals in the human diet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *130*, 105122.
62. Yamanaka, K., Kato, K., Mizoi, M., An, Y., Takabayashi, F., Nakano, M., ... & Okada, S. (2004). The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. . *Toxicology and applied pharmacology*, *198(3).*, 385-393.
63. Yu, M. X. (2013). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity by facilitating arsenic metabolism and decreasing oxidative stress. *Archives of toxicology*, *87*, 1025-1035.

64. Zhao, L. L. (2023). Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) rs1801133 (677C> T) gene polymorphism with ischemic stroke risk in different populations: An updated meta-analysis. *Frontiers in Genetics, 13*, 1021423.

Anexos

ANEXO I: Consentimiento informado.

ANEXO II: Documento Aval Comité de ética.

ANEXO III: Estandarización protocolo PCR convencional.

ANEXO IV: Modelos de herencia para *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*.

ANEXO V: Frecuencias genotípicas y alélicas de *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*.

ANEXO VI: Técnica de RT-qPCR asociado a sondas *TaqMan*®.

ANEXO VII: Caracterización sociodemográfica según el estado de la función renal respecto a la exposición al arsénico y variantes no genéticas.

ANEXO I: Consentimiento informado.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

Yo _____ identificado con Cédula de ciudadanía número _____ declaro que he sido invitado a participar en la investigación **“Riesgo, susceptibilidad genética y estrés oxidativo debido a la exposición del arsénico en poblaciones del Caribe colombiano”**. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir los propios del uso inadecuado de protocolos y manejo de las diferentes pruebas usadas en el presente estudio. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Firma del Participante _____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo 1 _____

Parentesco con el participante _____

Firma del testigo 1 _____

Nombre del testigo 2 _____

Parentesco con el participante _____

Firma del testigo 2 _____

Nombre del Investigador o coinvestigador encargado: Farith González Martínez

Firma _____

Fecha _____ ^[]_[] Día/mes/año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado.

ANEXO II: Documento Aval Comité de ética.



403962017

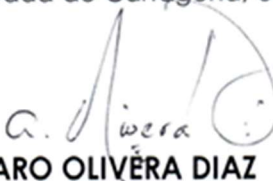
EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

HACE CONSTAR

Que, el proyecto titulado **“Riesgo, susceptibilidad genética y estrés oxidativo debido a la exposición del arsénico en poblaciones del Caribe colombiano”**, presentado por **FARITH DAMIAN GONZALEZ**, docente de la **Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena**, se ajusta a los requerimientos de los referentes éticos contemplados en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y por no tratarse de un proyecto relacionado con ensayos clínicos, se omite el requerimiento contemplado en la resolución 2378 de 2008.

El presente proyecto requiere de Consentimiento Informado, de acuerdo al riesgo mínimo inherente, según la interpretación del artículo 11 de la resolución 08430 de 1993, tal como consta en el Acta N° 96 del Comité de Ética en Investigaciones con fecha 25/05/2017.

Para constancia se firma en la ciudad de Cartagena, el dos (02) de junio del año dos mil diecisiete (2017).


ALVARO OLIVERA DIAZ
Presidente



Vicerrectoría de Investigaciones
Centro – Cra. 4 No. 38-40, Claustro de la Merced Telefax 6642663
E-mail: investigaciones@unicartagena.edu.co
web: www.unicartagena.edu.co
Cartagena de Indias, D.T. y C. – Colombia

ANEXO III: Estandarización protocolo PCR Convencional con geles de agarosa.

Prueba 1: 21 Octubre y 10 Noviembre 2022

El *mix* de reacción para PCR convencional se compone de:

Reactivo	1X (μL)	X 4
Agua biología molecular	23,8	95,2
Buffer <i>MyTaq</i>	5	20
<i>GSTT1 forward</i>	0,2	0,8
<i>GSTT1 reverse</i>	0,2	0,8
<i>β-globina forward</i>	0,2	0,8
<i>β-globina reverse</i>	0,2	0,8
<i>MyTaq</i> DNA Polimerasa	0,4	1,6
	30 μL x pocillo	120 μL

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	60	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	30
<i>Annealing</i>	58	15	
Extensión	75	10	

Se cargó 0,82 μL de muestra + 30 μL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizó un gel al 2% (0,5 gramos de agarosa en 25 mL de TBE) y se dejó correr a 70V durante una hora, luego se subió el voltaje a 90V por 30 minutos más para ver si se separan las bandas del Ladder. Se observó en el gel un chorro de las muestras por lo que se hace una segunda prueba.

Prueba 2: 22 Noviembre y 23 Noviembre 2022

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	60	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	30
<i>Annealing</i>	60	15	
Extensión	75	10	

Se cargó 1 μL de muestra + 30 μL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizo un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora.

Se observo en el transiluminador el gel y se observan bandas claras, observándose la deleción del gen *GSTT1*, pero aún falta que se separen las bandas del Ladder, por lo que se dejó corriendo nuevamente a 90V por 30 minutos.

Se hará una tercera modificación al protocolo de PCR.

Prueba 3: 24 Noviembre 2022

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	60	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	30
<i>Annealing</i>	62	15	
Extensión	70	10	

Se cargó 1 µL de muestra + 30 µL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizó un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora y media.

Se observó en el transiluminador el gel y se observan bandas claras, sin embargo, se observa una banda sobre 300 bp, por lo que se probara otro partidor para *β-globina*.

Por lo que se mantendrá el protocolo de PCR realizado y se ajustaran la cantidad de partidores y se hará cambio del partidor reverse para *β-globina*.

Prueba 4: 24 noviembre 2022

Solo se modificará el partidore reverse para β -globina.

Una vez que salió el gel se aconseja aumentar el número de ciclos a 35.

Prueba 5: 30 Noviembre 2022

El *mix* de reacción para PCR convencional se compone de:

Reactivo	1X (μ L)	X 4
Agua biología molecular	24,2	95,2
Buffer <i>MyTaq</i>	5	20
<i>GSTT1 forward</i>	0,2	0,8
<i>GSTT1 reverse</i>	0,2	0,8
β -globina <i>forward</i>	0,2	0,8
β -globina <i>reverse</i>	0,2	0,8
MyTaq DNA Polimerasa	0,4	1,6
	30 μL x pocillo	120 μL

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	35
<i>Annealing</i>	62	15	
Extensión	70	10	

Se realizó un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora y media.

Bajar cantidad de ciclos a 30, usar partidore de β -globina con los partidores del punto.

Proceso de estandarización PCR Convencional para *GSTM1*

Prueba 1: 24 y 25 Noviembre 2022

El *mix* de reacción para PCR convencional se compone de:

Reactivo	1X (µL)	X 4
Agua biología molecular	23,8	95,2
Buffer <i>MyTaq</i>	5	20
<i>GSTM1 forward</i>	0,2	0,8
<i>GSTM1 reverse</i>	0,2	0,8
<i>C44 forward</i>	0,2	0,8
<i>C47 reverse</i>	0,2	0,8
<i>MyTaq</i> DNA Polimerasa	0,4	1,6
	30 µL x pocillo	120 µL

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	30
<i>Annealing</i>	58	15	
Extensión	75	10	

Se cargó 1 µL de muestra + 30 µL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizó un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora y media.

Se observó en el transiluminador el gel y se observan bandas claras, sin embargo, se observaron productos inespecíficos en la zona final del gel, además de una leve amplificación de los controles negativos.

Por lo que se modificó el protocolo de PCR realizado, subiendo a 35 la cantidad de ciclos realizados.

Prueba 2: 29 y 30 Noviembre 2022

El *mix* de reacción para PCR convencional se compone de:

Reactivo	1X (µL)	X 4
Agua biología molecular	23,8	95,2
Buffer <i>MyTaq</i>	5	20
<i>GSTMI forward</i>	0,2	0,8
<i>GSTMI reverse</i>	0,2	0,8
<i>C44 forward</i>	0,2	0,8
<i>C47 reverse</i>	0,2	0,8
<i>MyTaq</i> DNA Polimerasa	0,4	1,6
	30 µL x pocillo	120 µL

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	35
<i>Annealing</i>	58	15	
Extensión	75	10	

Se cargo 1 µL de muestra + 30 µL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizó un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora y media.

Se observó en el transiluminador el gel y se observan bandas claras para *GSTMI* y *CYP11A1*, sin embargo, se observó un chorreo de las muestras y una amplificación de los controles negativos.

Por lo que se aumentó la temperatura de *Annealing* a 60°C y se utilizaron 2 *buffers* diferentes para determinar si es el buffer o el agua el que está contaminado.

Prueba 3: 30 Noviembre y 1 Diciembre 2022

El *mix* de reacción para PCR convencional se compone de:

Reactivo	1X (μL)	X 4
Agua biología molecular	23,8	95,2
Buffer <i>MyTaq</i>	5	20
<i>GSTMI forward</i>	0,2	0,8
<i>GSTMI reverse</i>	0,2	0,8
<i>C44 forward</i>	0,2	0,8
<i>C47 reverse</i>	0,2	0,8
<i>MyTaq</i> DNA Polimerasa	0,4	1,6
	30 μL x pocillo	120 μL

Se estableció el siguiente protocolo para PCR:

Proceso	T °C	Tiempo (seg)	Ciclos
Denaturación inicial	95	600	1
Amplificación			
Denaturación	95	15	35
<i>Annealing</i>	60	15	
Extensión	75	10	

Se cargó 1 μL de muestra + 30 μL de *mix* (Control negativo: agua).

Se realizó un gel al 2% (1 gramo de agarosa en 50 mL de TBE) y se dejó correr a 60V por 20 minutos para que las muestras se introduzcan en el gel y luego se subió el voltaje a 90V durante una hora y media.

Protocolo listo sólo, dejar correr más tiempo para eliminar la sombra del exceso de partidores.

ANEXO IV: Modelos de herencia para *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*

MTHFR:

Codominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
CC	34	19	53
CT	38	16	54
TT	4	5	9
Total	76	40	116
<i>p-value</i> = 0,305			

Dominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
CC	34	19	53
CT + TT	42	21	63
Total	76	40	116
<i>p-value</i> = 0,776			

Recesivo	Baja exposición	Alta exposición	Total
CC + CT	72	35	107
TT	4	5	9
Total	76	40	116
<i>p-value</i> = 0,166			

GST02:

Codominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	23	11	34
AG	40	17	57
GG	13	12	25
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,267</i>			

Dominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	23	11	34
AG + GG	53	29	82
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,756</i>			

Recesivo	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA + AG	63	28	91
GG	13	12	25
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,108</i>			

As3MT:

Codominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	24	8	32
AC	33	23	56
CC	19	9	28
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,299</i>			

Dominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	24	8	32
AC + CC	52	32	84
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,185</i>			

Recesivo	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA + AC	57	31	88
CC	19	9	28
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,765</i>			

GSTPI:

Codominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	43	18	61
AG	25	18	43
GG	8	4	12
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,425</i>			

Dominante	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA	43	18	61
AG + GG	33	22	55
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,235</i>			

Recesivo	Baja exposición	Alta exposición	Total
AA + AG	68	36	104
GG	8	4	12
Total	76	40	116
<i>p-value = 0,930</i>			

ANEXO V: Frecuencias genóticas y alélicas de *MTHFR*, *GSTO2*, *As3MT* y *GSTP1*.

<i>MTHFR</i> (rs1801133)					
n = 116	Genotipo			Alelo	
	C/C	C/T	T/T	C	T
Frecuencia (n)	0,457 (53)	0,466 (54)	0,078 (9)	0,690	0,310

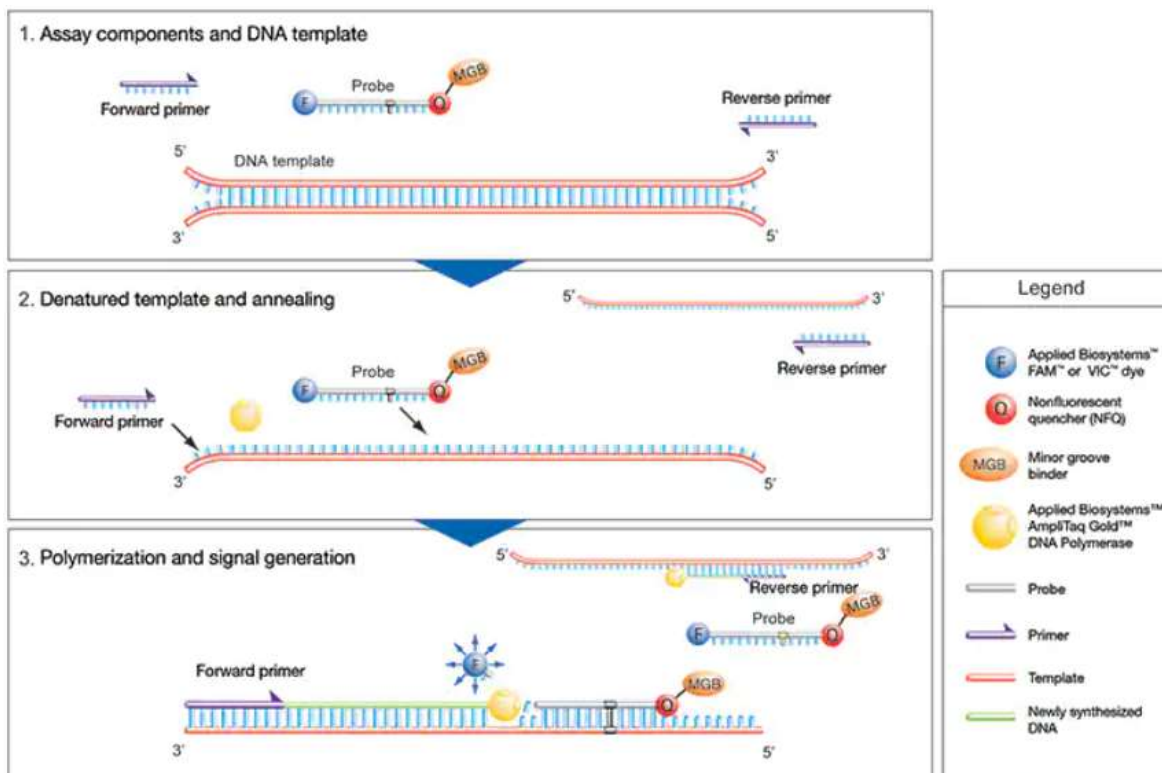
<i>GSTO2</i> (rs156697)					
n = 116	Genotipo			Alelo	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Frecuencia (n)	0,293 (34)	0,491 (57)	0,216 (25)	0,539	0,461

<i>As3MT</i> (rs3740400)					
n = 116	Genotipo			Alelo	
	A/A	A/C	C/C	A	C
Frecuencia (n)	0,276 (32)	0,483 (56)	0,241 (28)	0,517	0,483

<i>GSTP1</i> (rs1695)					
n = 116	Genotipo			Alelo	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Frecuencia (n)	0,526 (61)	0,371 (43)	0,103 (12)	0,711	0,289

ANEXO VI: Técnica de RT-qPCR asociado a sondas *TaqMan*®.

En la siguiente figura se presenta un esquema de la técnica experimental de RT-QPCR asociado a sondas *TaqMan*®



Extraído de: Folleto técnico ThermoFisher Scientific

ANEXO VII: Caracterización sociodemográfica según el estado de la función renal respecto a la exposición al arsénico y variantes no genéticas.

En la **Tabla S1** se observa la relación de los grupos de alta y baja exposición con parámetros de la función renal y variantes no genéticas. En este caso se contaron solo se seleccionaron 108 participantes de los 122 individuos muestreados.

De estos 108 participantes, el 40,7 % de las personas estudiadas fueron catalogados en el grupo de alta exposición, mientras que el 59,3 % restante corresponden a aquellos individuos con una baja exposición al arsénico. En el grupo de alta exposición se observa que la proporción de hombres y mujeres corresponde a un 40,9 % y 59,1 % respectivamente, mientras que en el grupo de baja exposición se observa una proporción de un 39,1 % para individuos del género masculino y del 60,9 % para el género femenino.

Respecto a la edad, se observó que el grupo de alta exposición posee una edad promedio de 52,2 años, mientras que el grupo de baja exposición tiene una edad promedio de 42,5 años.

Por otra parte, los valores promedio de cada grupo para los parámetros de peso, estatura e IMC tuvieron un valor de 69,2 kg; 164,3 cm y 25,6 kg/m² respectivamente para el grupo de alta exposición y de 71,8 kg; 165,5 cm y 26,1 kg/m² respectivamente para el grupo de baja exposición.

Para los parámetros clínicos de creatinina y nitrógeno ureico se obtuvieron valores promedio de 0,85 mg/dL y 13,2 mg/dL respectivamente para el grupo de alta exposición y de 0,87 mg/dL y 15,6 mg/dL para aquellos individuos con una baja exposición. En el caso de los parámetros Cockcroft-Gault, MDRD y CKD-EPI tuvieron un valor de 96,5 mL/min; 95,3 mL/min/1,73 m² y 92,7 mL/min/1,73 m² respectivamente para aquellos individuos con alta exposición y de 117,3 mL/min; 100,8 mL/min/1,73 m² y 103,0 mL/min/1,73 m² respectivamente para el grupo de baja exposición.

Finalmente, una vez obtenidos los valores de CDK Stage se observó que solo 8 personas presentan algún tipo de daño renal, donde 3 individuos están catalogados en el grupo de alta exposición al arsénico y las 5 personas restantes presentan una baja exposición.

Tabla S1: Relación entre la exposición al arsénico e indicadores de la función renal.

Características	Alta dosis de exposición	Baja dosis de exposición	Total	p-value
N° Individuos (%)	44 (40,7)	64 (59,3)	108 (100)	-
Género Masculino (%)	18 (40,9)	25 (39,1)	43 (39,8)	0,847
Género Femenino (%)	26 (59,1)	39 (60,9)	65 (60,2)	
Edad (años), media ± DE	52,2 ± 13,6	42,5 ± 18,0	46,5 ± 17,0	0,003*
Peso (kg), media ± DE	69,2 ± 11,4	71,8 ± 18,0	70,7 ± 15,6	0,403
Altura (cm), media ± DE	164,3 ± 8,1	165,5 ± 9,8	165,0 ± 9,1	0,490
IMC (kg/m ²), media ± DE	25,6 ± 3,3	26,1 ± 5,6	25,9 ± 4,8	0,583
Arsénico total (µg/L), media ± DE	21,13 ± 0,0	11,5 ± 8,6	15,4 ± 8,1	< 0,01
Tiempo de exposición (años), media ± DE	29,0 ± 15,2	24,4 ± 15,7	26,3 ± 15,6	0,137
Creatinina (mg/dL), media ± DE	0,85 ± 0,5	0,87 ± 0,6	0,86 ± 0,5	0,831
Creatinina en hombres (mg/dL), media ± DE	1,10 ± 0,6	1,13 ± 0,9	1,12 ± 0,8	0,912
Creatinina en mujeres (mg/dL), media ± DE	0,67 ± 0,1	0,70 ± 0,2	0,69 ± 0,2	0,448
Nitrógeno Ureico (mg/dL), media ± DE	13,2 ± 5,5	15,6 ± 18,0	14,6 ± 14,3	0,403
Nitrógeno Ureico en hombres (mg/dL), media ± DE	16,1 ± 6,8	16,7 ± 12,7	16,4 ± 10,6	0,870
Nitrógeno Ureico en mujeres (mg/dL), media ± DE	11,2 ± 3,2	14,9 ± 20,9	13,4 ± 16,3	0,378
Cockroft-Gault (mL/min), media ± DE	96,5 ± 31,7	117,3 ± 40,4	108,9 ± 38,3	0,005*
MDRD (mL/min/1,73 m ²), media ± DE	95,3 ± 28,9	100,8 ± 38,0	98,5 ± 34,5	0,422
CKD-EPI (mL/min/1,73 m ²), media ± DE	92,7 ± 21,3	103,0 ± 28,7	98,8 ± 26,3	0,045*
CDK Stage 1	27 (61,4)	49 (76,6)	73 (71,6)	0,356
CDK Stage 2	14 (31,8)	10 (15,6)	22 (21,6)	
CDK Stage 3	2 (4,6)	3 (4,7)	4 (3,9)	
CDK Stage 4	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (2,0)	
CDK Stage 5	-	1 (1,6)	1 (1,0)	
Individuos con daño renal (%)	3 (6,8)	5 (7,8)	8 (7,4)	0,846
Consumo de Alcohol (%)	21 (47,7)	34 (53,1)	55 (50,9)	0,581
Consumo de Cigarros (%)	2 (4,6)	5 (7,8)	7 (6,5)	0,498
Consumo de Mariscos (%)	27 (61,4)	42 (65,6)	69 (63,9)	0,651

DE: Desviación estándar.

Adicionalmente se adjuntan los valores referenciales para creatinina y nitrógeno ureico en sangre según el género en la **Tabla S2**. Se puede observar que los valores de creatinina y nitrógeno ureico de ambos grupos se mantienen dentro de los parámetros normales.

Tabla S2: Valores de referencia de creatinina y nitrógeno ureico.

	Creatinina (mg/dL)	Nitrógeno ureico (mg/dL)
Mujeres	0,55 – 0,97	1,2 – 22,8
Hombres	0,7 – 1,24	1,47 – 22,9