

**Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado
Escuela de Salud Pública**



**EXPOSICIÓN PRENATAL A BAJAS CONCENTRACIONES DE ARSÉNICO
INORGÁNICO Y SU ASOCIACIÓN CON CORTISOL SALIVAL EN INFANTES
DE ARICA, CHILE**

MACARENA VALDÉS SALGADO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN SALUD PÚBLICA

Directora de Tesis: Dra. Verónica Iglesias

Santiago, enero 2017

ÍNDICE	
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
Paradigma del valor umbral y efectos a bajas concentraciones de arsénico	10
Contexto de estudio	12
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	13
1.1. Arsénico: generalidades	13
1.2. Arsénico y sus efectos en salud	17
1.3. Arsénico y efectos durante el embarazo	17
1.4. Disruptores endocrinos	20
1.6. Cortisol y factores asociados	23
1.7. Relación entre cortisol y α -amilasa	26
1.8. Limitaciones del uso de evidencia toxicológica	27
1.9. Modelo conceptual de estudio entre arsénico inorgánico y cortisol salival	28
CAPÍTULO 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	29
CAPITULO 3. OBJETIVOS	30
CAPITULO 4. DISEÑO METODOLÓGICO	31
4.1. Diseño de Estudio	31
4.2. Población y Muestra	31
4.3. Variables	34
4.4. Plan de análisis	38
4.5. Aspectos éticos	41
4.6. Difusión de resultados	42
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	43
Artículo 1	43
Artículo 2	67

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN	85
ANEXO 1. Característica de los 74 no participantes	86
ANEXO 2. Coeficientes de regresión múltiple para los tres estratos de ingreso familiar considerando los datos imputados	87
ANEXO 3. Manual de Toma de Muestra	89
ANEXO 4. Cuestionario	93
ANEXO 5. Protocolos de Laboratorio	94
ANEXO 6. Proyecto Piloto	99
REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de sustancias prioritarias, según ATSDR 2013	14
Tabla 2. Riesgo para la Salud Infantil según vía de exposición, EPA 2007	16
Tabla 3. Efectos del iAs sobre la salud materno infantil	19
Tabla 4. Efecto del arsénico y otros metales como disruptores endocrinos	20
Tabla 5. Valores de referencia de cortisol obtenidos en distintos grupos de sujetos	24
Tabla 6. Ejemplo de alteración del nivel de cortisol, según distintos agentes de stress	25
Tabla 7. Valores de referencia para α -amilasa salival en un grupo de adultos	27
Tabla 8. Estimación del error del coeficiente de regresión lineal del arsénico inorgánico	34
Tabla 9. Descripción, operacionalización y fuente de información de las variables utilizadas en el estudio “Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile”	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la contaminación por arsénico según Smedley, 2002	14
Figura 2. Vía de óxido-reducción del Arsénico inorgánico según Hayawaka, 2005	15
Figura 3. Grafo Acíclico Dirigido (GAD) para el estudio de Cortisol en niños tras la exposición intrauterina a iAs	28
Figura 4. Flujograma	33
Figura 5. Modelo de ecuaciones estructurales considerando efecto directo e indirecto del arsénico sobre cortisol, ajustando por covariables presentes en el modelo teórico	40

RESUMEN

Introducción: Estudios toxicológicos demuestran que la exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico produce efectos deletéreos en salud infantil. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre la exposición prenatal a arsénico inorgánico y la concentración de cortisol salival en una cohorte de infantes de Arica, Chile.

Métodos: Estudio de cohorte. La exposición prenatal a arsénico inorgánico fue medida en una muestra de orina de la madre en el segundo trimestre de embarazo. El cortisol fue medido entre los 18 y 24 meses en una muestra de saliva del infante. Para el análisis se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple y sistemas de ecuaciones estructurales.

Resultados: El tercer cuartil de la concentración urinaria de arsénico inorgánico se asoció con el logaritmo natural del cortisol salival en niños con ingreso familiar de \$400.000 CLP o superior. Bajo el enfoque de ecuaciones estructurales, no se encontró efecto directo ni indirecto del arsénico sobre el cortisol.

Conclusión: En los infantes con ingreso familiar de \$ 400.000 CLP o más, la exposición a arsénico explicó parte de la variabilidad del cortisol salival. Es relevante evaluar los efectos crónicos de exposiciones a bajas o moderadas concentraciones, considerando una exposición temprana y persistente.

ABSTRACT

Introduction: Toxicological studies demonstrate that prenatal exposure to low concentrations of inorganic arsenic produces health effect in children. The objective of this study was to evaluate the association between prenatal exposure to inorganic arsenic and salivary cortisol concentration in a cohort of infants from Arica, Chile.

Methods: Cohort study. Prenatal exposure to inorganic arsenic was measured in a sample of the mother's urine in the second trimester of pregnancy. Cortisol was measured between 18 and 24 months in a sample of infant's saliva. For the analysis, multiple linear regression models and systems of structural equations were used.

Results: The third quartile of the urinary concentration of inorganic arsenic was associated with the natural logarithm of salivary cortisol in children with a family income of \$ 400,000 CLP or higher. Under the structural equations approach, direct neither indirect inorganic arsenic effects on salivary cortisol concentration were found.

Conclusion: In infants with income of \$ 400,000 CLP or higher, exposure to arsenic explained part of the variability of cortisol's concentration. It is pertinent to do research about the chronic effects of exposure to low or moderate concentrations of this pollutant.

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en la corteza terrestre y actualmente encabeza la lista de sustancias prioritarias de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, por su sigla en inglés). Esta lista se establece de acuerdo al riesgo que el contaminante representa para la salud humana y ambiental tomando en cuenta la ubicuidad en el ambiente, la toxicidad y el potencial de exposición humana.

La utilización de agua contaminada con arsénico inorgánico para consumo humano y riego de cultivos, son las fuentes principales de exposición y representan un desafío permanente para la salud pública. Las exposiciones a concentraciones altas de este metaloide se han asociado con mayor mortalidad (1) y enfermedades como cáncer de piel, vejiga, pulmón, problemas cardiovasculares y alteraciones neurológicas (2-5). Sin embargo, en la actualidad la preocupación está dirigida a estudiar los efectos producidos por concentraciones bajas, cercanas a los valores de referencia sugeridos por agencias internacionales como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las normas actuales sostienen que el arsénico tiene un umbral bajo el cual su exposición es inocua respecto de efectos no cancerígenos. No obstante, estudios toxicológicos y epidemiológicos muestran que la exposición a bajas concentraciones tiene efectos que contribuyen al desarrollo de patologías a largo plazo (6). Esto podría indicar que una red causal común subyace entre distintos efectos y que es posible evitar consecuencias más perniciosas estudiando los efectos de exposiciones de menor intensidad.

La dosis de referencia para evitar los efectos no cancerígenos del arsénico a través del agua de consumo es de 0,3 µg/kg de peso diario (considerando un individuo de 55 kilos que consume diariamente 4,5 litros de aguas), según el Sistema Integrado de Información de Riesgo de la Agencia de Protección Ambiental. No obstante, la exposición a concentraciones similares ha sido asociada con el desarrollo de cáncer, efectos cardiovasculares y deterioro de la salud mental en estudios previos (7-10).

El arsénico inorgánico como disruptor endocrino inhibe la transcripción de receptores específicos, como receptores de hormonas sexuales y receptores de glucocorticoides a nivel del sistema nervioso central. A dosis bajas es capaz de alterar la homeostasis endocrina, facilitando el desarrollo de eventos como estrés, ansiedad o deterioro cognitivo. La etapa del ciclo de vida en la que se produce la exposición, la cuantía y el tiempo de duración de ésta, son factores que determinan la gravedad del efecto.

Estudios toxicológicos desarrollados en modelos murinos han permitido evaluar la exposición a bajas concentraciones de arsénico inorgánico a través del agua de consumo y su asociación causal con efectos neuroendocrinos, específicamente con niveles aumentados de corticosterona. Ratas expuestas durante la gestación a una baja concentración de arsénico inorgánico a través del agua de consumo, generan una descendencia de ratones con mayores niveles de ansiedad y estrés (11). Esto indica que es biológicamente factible

que el arsénico inorgánico en bajas concentraciones actúe como disruptor endocrino a escala humana.

El cortisol, análogo de corticosterona en ratas, se ha convertido en una hormona ampliamente estudiada en situaciones de estrés y actualmente es común medirla en saliva, dada su alta correlación con el cortisol sérico. Corresponde al producto final de la acción del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), encargado del manejo del estrés, y se ha estudiado su asociación con diversas enfermedades tales como depresión, hipertensión arterial y obesidad en adultos (12-17). Estos estudios muestran que las personas con peor estado de salud presentan una concentración de cortisol diferente respecto de sujetos sanos. En Chile un estudio previo realizado el 2010, mostró que las personas con Enfermedad de Cushing, presentaban niveles de cortisol salival aumentados respecto de participantes controles, y a su vez éstos presentaban mayores niveles que pacientes con depresión (18). No obstante, actualmente no existen estudios que utilicen el cortisol salival como un biomarcador de efecto tras la exposición a contaminantes ambientales como el arsénico (19).

Considerando la exposición permanente a bajas concentraciones de arsénico inorgánico a través del agua de consumo, es necesaria más evidencia que permita conocer la relación entre cortisol y el arsénico como un disruptor endocrino, en niños expuestos durante la gestación (20).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Paradigma del valor umbral y efectos a bajas concentraciones de arsénico

La contaminación del ecosistema afecta el desarrollo de la comunidad, acrecentando la morbimortalidad asociada a polución. Lo anterior involucra la gestión de políticas públicas orientadas a resguardar el derecho a un ambiente saludable y próspero, lo que es consistente con el discurso de la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la prevención de riesgos modernos (21,22). Consecuentemente, las normas y regulaciones actuales tanto nacionales como internacionales, se sustentan en la evaluación de riesgo, un proceso mediante el cual la información científica sobre los contaminantes (especialmente productos químicos) basada en estudios toxicológicos y epidemiológicos, es recopilada y analizada críticamente de modo de establecer los valores de referencia que minimicen el riesgo de efectos adversos para la salud de la población (2).

En salud ambiental, existen dos categorías de efectos: cancerígenos y no cancerígenos. Para los efectos cancerígenos cada exposición aumenta el riesgo de sufrir el evento y por lo tanto el riesgo de cáncer es una función lineal de la exposición. Sin embargo, con respecto a los efectos no cancerígenos se establecen valores de referencia bajo los cuales una exposición determinada no produce efecto (6,23), lo que es consistente con lo encontrado en diversos estudios que proponen distribuciones de probabilidad no lineales, permitiendo establecer un valor umbral (24-26).

Paradójicamente, se ha mostrado que la relación lineal de dosis-respuesta no es exclusiva de los estudios de efectos cancerígenos, sino que se repite en algunos efectos endocrinos (27,28); los agentes que producen este efecto, son conocidos como disruptores endocrinos y aunque los estudios realizados no son totalmente concluyentes, las curvas de dosis-respuesta requieren de mayor estudio para poder precisar niveles de exposición seguros para la población (29-31).

Los disruptores endocrinos, generalmente están presentes en bajas concentraciones, pero son persistentes en el ambiente ocasionando una gama de efectos adversos en animales de muchas especies (32). Los metales pesados son reconocidos como disruptores endocrinos (33), afectando funciones reproductivas e inmunitarias entre otras. Chile naturalmente exhibe altas concentraciones de metales pesados principalmente en el norte del país, y la exposición se acrecienta con la actividad minera. En la actualidad, parece ser que los niveles de exposición a arsénico cumplen con los valores de referencia sugeridos internacionalmente, tanto en agua de consumo como en exposición aire /ambiente (34).

En modelos con ratas, el mecanismo fisiopatológico mediante el cual la exposición a bajas concentraciones de arsénico inorgánico contribuye en la expresión de desórdenes endocrinos, se iniciaría a nivel intracelular produciendo una menor expresión de receptores de glucocorticoides y consecuentemente una desregulación del eje HPA. Esto genera un aumento de la concentración de corticosterona, glucocorticoide análogo al cortisol en

humanos (11). Lo anterior hace biológicamente plausible el estudio de cortisol como biomarcador de efecto (19) tras la exposición permanente a arsénico inorgánico en concentraciones cercanas al valor de la norma para calidad de agua de consumo.

A pesar de que existe evidencia sosteniendo el paradigma del valor umbral para los efectos no cancerígenos del arsénico, trabajos como los de Cohen y cols., en el estudio de la contaminación del aire, indican que los efectos no cancerígenos comparten vías causales con los efectos cancerígenos (35,36), por lo que la exposición a bajas dosis de un contaminante durante un tiempo prologando, podría presentar una relación de dosis-respuesta tipo lineal (37). Considerando los estudios toxicológicos que destacan el efecto del arsénico como disruptor endocrino, es relevante conocer si existe una función de dosis-respuesta lineal, sometiendo a juicio el paradigma del valor umbral para un efecto no cancerígeno del arsénico.

Contexto de estudio

Estudios previos realizados en nuestro país, indican que existe heterogeneidad con respecto a la exposición a arsénico vía agua de consumo. Ferreccio y Sancha (38) en su revisión sobre la exposición a arsénico y su impacto sobre la salud en nuestro país, detallan que la principal zona de exposición es el norte, donde la población afectada alcanza a un 12% del país. Se han identificado concentraciones altas de arsénico inorgánico en las ciudades de Antofagasta, San Pedro, Tocopilla y María Elena alcanzando los niveles de exposición más altos registrados en el país durante el periodo comprendido entre los años 1930 y los 1990 (14,39,40).

A pesar de que Arica se consideró una ciudad libre de exposición a arsénico vía agua de consumo de acuerdo a su registro de aguas municipales con un promedio de concentración de arsénico de 0,01 mg/L, la concentración reportada en los valles aledaños de Lluta, Azapa y Camarones fluctuaba entre 0,02 a 5,1 mg/L, de acuerdo a los registros de los años 1930 a 1994 (41). Adicionalmente, en esta ciudad fueron internados cerca de 20.000 toneladas de residuos mineros los cuales exhibían altos niveles de metales de plomo y arsénico entre otros metales. A lo anterior, se suma la contaminación con polimetales derivada del transporte de concentrados de minerales a través del ferrocarril desde Bolivia. Ambas situaciones provocaron un daño ambiental que aún requiere la vigilancia de las autoridades sanitarias.

El depósito de estos residuos en zonas que posteriormente fueron utilizadas en el proceso de urbanización y crecimiento de la ciudad de Arica afectó la salud de la población residente. Actualmente tras la implementación del “Programa Maestro de Intervención de Zonas en Presencia de Polimetales en Arica” (42) el cual representa una Ley vigente del Estado (Ley N°20.590), se han establecido actividades para reparar el daño ambiental, como la limpieza de los sitios contaminados, la vigilancia de la exposición de la población, y la provisión de becas escolares. Actualmente, la contaminación por arsénico parece ser baja de acuerdo a estudios previos, pero la exposición vía agua de consumo es permanente por lo que parece pertinente evaluar su efecto como disruptor endocrino (43).

En nuestro país ya se han hecho estudios sobre la exposición a arsénico y efectos como mortalidad infantil, lesiones de piel, enfermedades respiratorias y cardiovasculares (38); o efectos tipo cáncer tales como: cáncer de piel, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón y cáncer vejiga, en ciudades como Antofagasta, Tocopilla y Calama. Sin embargo, no hay estudios sobre efectos de exposiciones a dosis continuas, ocurridas en períodos críticos como la gestación, tales como las que experimentan las gestantes de la ciudad de Arica.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Arsénico: generalidades

La contaminación por metales pesados, generalmente hace referencia a la contaminación por plomo, mercurio, cadmio y arsénico, entre otros elementos que no necesariamente son de naturaleza metálica. El Arsénico (As), pese a que no es un metal químicamente puro, es considerado un metal pesado debido a su toxicidad. Por lo tanto, la designación de metal pesado hace referencia a la capacidad de generar daño, más que a una característica química (44).

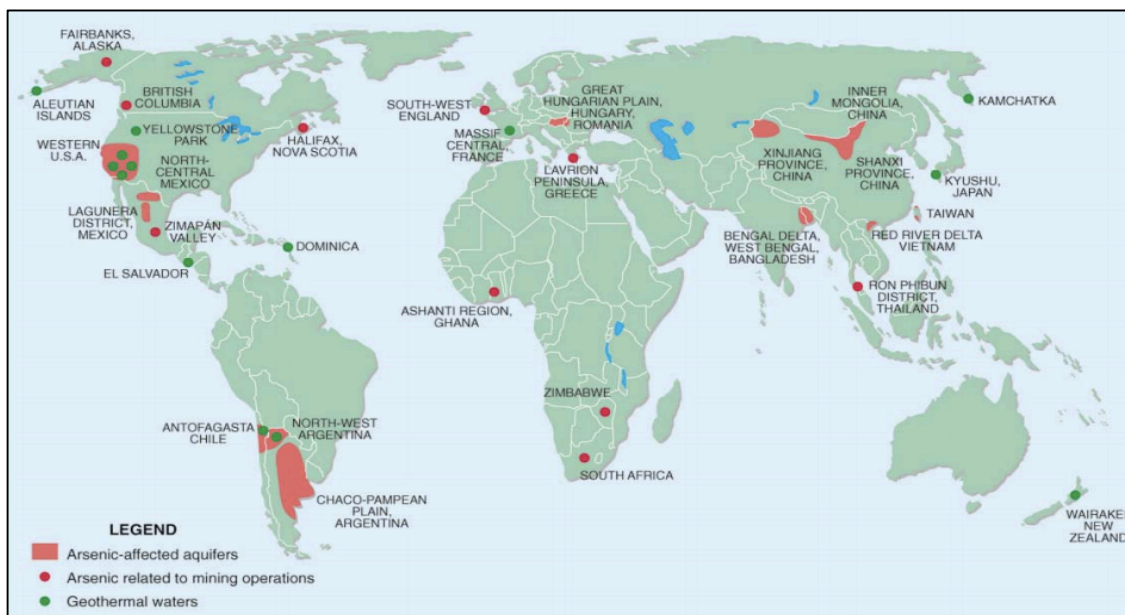
El arsénico es un elemento químico ubicuo (Figura 1), alcanzando el vigésimo lugar dentro del ranking de abundancia en la corteza terrestre, el 14º lugar en agua de mar y el 12º lugar en el cuerpo humano (15). La especie más perjudicial para la salud es el arsénico inorgánico, que se encuentra naturalmente en las aguas subterráneas de países como: China, Taiwán, India, Bangladesh, Tailandia, Argentina, Rumania, México y Chile (15).

La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), clasifica los productos químicos de acuerdo al riesgo que representan para la salud pública mediante un sistema de puntos escalonados basado en la frecuencia de aparición, la toxicidad y el potencial de exposición humana. El arsénico encabeza este ranking (Tabla 1), a pesar que este sistema no incluye la exposición asociada a consumo de agua potable, a la dieta, a la madera tratada con arsénico, a pesticidas arsenicales, o a remedios homeopáticos. Por lo tanto, la amenaza para la salud humana es aún mayor que lo sugerido por ATSDR (45).

El arsénico en el ambiente puede encontrarse en su forma orgánica y menos tóxica, unido a material orgánico del suelo o agua, pero principalmente se encuentra en estado inorgánico (iAs), principalmente en dos estados de oxidación: arsénico inorgánico trivalente (iAs^{III}) y pentavalente (iAs^V) siendo el segundo estado más estable y menos tóxico que el trivalente (46).

El iAs ingresa al organismo por distintas vías, siendo la más frecuente la vía digestiva. El metabolismo humano permite transformar el iAs^{III} y el iAs^V , en compuestos metilados como el ácido monometil-arsónico (MMA) y ácido dimetil-arsónico (DMA) (Figura 2), con la participación de enzimas como glutatión reductasa (GSH), S-adenosil-metionina (SAM) y la enzima arsénico metil-transferasa (45,47). Las especies de MMA y DMA se encuentran en la orina de personas expuestas a arsénico orgánico e inorgánico. Sin embargo, ambas están más asociadas con la exposición a iAs; especies conocidas como arsenocolina y arsenobetaína, provenientes de la dieta, se asocian con el metabolismo del As orgánico (48).

Figura 1. Distribución mundial de la contaminación por arsénico según Smedley, 2002.



Fuente: Smedley et al. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters (49).

Tabla 1. Lista de sustancias prioritarias, según ATSDR 2013.

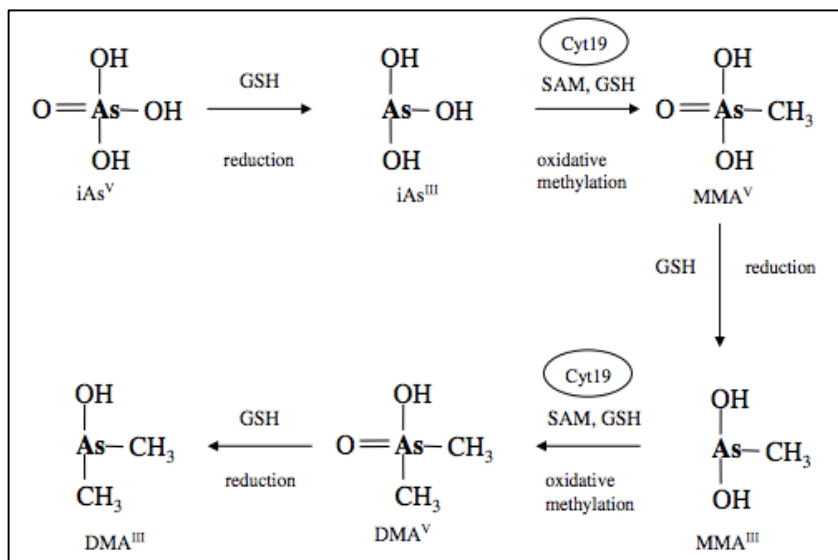
Ranking	Producto químico	Puntaje
1	Arsénico	1670,4
2	Plomo	1529,2
3	Mercurio	1458,6
4	Cloruro de vinilo	1359,8
5	Bifenilos policlorados	1343,5
6	Benceno	1328,5
7	Cadmio	1318,7
8	Benzo(a)pireno	1304,7
9	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	1279,7
10	Benzo(b)fluranteno	1251,2

Fuente: ATSDR. 2013. Lista de Sustancias Prioritarias. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html> (50)

La toxicidad del iAs^{III} y sus versiones metiladas MMA^{III} y DMA^{III} se debe principalmente a la capacidad que tienen para unirse con grupos sulfhidriilo enzimáticos y con ello generar especies radioactivas de oxígeno como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos (51). Estudios experimentales con células endoteliales intestinales han permitido observar que las especies trivalentes ingresan en forma más rápida que las versiones pentavalentes al ambiente intracelular, con un inmediato estallido oxidativo (52). Dado esto, las versiones derivadas de arsénico trivalente son consideradas más tóxicas que las pentavalentes.

La vida media del iAs en sangre es de 2 horas, mientras que sus metabolitos metilados pueden permanecer entre 5 a 20 horas, haciendo que el iAs sea rápidamente biotransformado y eliminado principalmente por vía renal y una menor parte es eliminada por vía digestiva, piel y leche. En población general la vida media de excreción urinaria de arsénico es de 3 a 5 días (53). En orina de embarazadas, el metabolito arsenical que predomina es el DMA , indicando un metabolismo de excreción acrecentado y por ende un mecanismo de protección para la madre y el hijo (54).

Figura 2. Vía de óxido-reducción del Arsénico inorgánico según Hayawaka, 2005.



Fuente: Hayawaka et al. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19 (55).

Es posible utilizar distintas matrices de acuerdo a las indicaciones de la ATSRD (56) para evaluar la exposición a arsénico. La matriz dependerá de la vía y periodo de exposición (57). Para evaluar la exposición reciente a iAs por vía oral, se utilizan muestras de orina. Las muestras de sangre son mejores para exposición reciente por vía respiratoria. Pelo y uñas son útiles para evaluar una exposición crónica. Sin embargo, dosis bajas y moderadas son determinadas con mayor fiabilidad en muestras de orina (58).

Efectos cancerígenos, son estudiados según modelos lineales de dosis-respuesta o concentración-respuesta, asumiendo que cualquier dosis tiene probabilidad de hacer el evento estudiado. En el *Integrated Risk Information System* de la Agencia Americana de Protección Ambiental (US-EPA) se indica que el nivel de riesgo de cáncer asociado a una exposición diaria de 2 µg/L de iAs en agua de consumo es de 1 en 10.000 personas. Organismos como la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de Francia (IARC, por su sigla en inglés) y la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) perteneciente al Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, coinciden en definir al iAs como un agente cancerígeno en humanos. Distintos niveles de riesgo son definidos en base a la vía de exposición y condiciones del ambiente (Tabla 2).

Tabla 2. Riesgo para la Salud Infantil según vía de exposición, EPA 2007.

Riesgo Potencial	Medio de exposición	Especificación ¹
Alto	Agua para beber	Si las fuentes de agua potable son cercanas a zonas industriales mineras, la contaminación del agua para beber se hace más probable y de alto riesgo para los niños.
	Aguas subterráneas	Las aguas subterráneas pueden estar contaminadas naturalmente. El problema se produce cuando las aguas subterráneas contaminan el agua para beber.
	Suelo	Los suelos de recintos como escuelas o parques representan una fuente de exposición, si son cercanos a zonas de industria minera.
Bajo	Sedimentos	Sedimentos acuáticos o en la tierra no representan gran peligro para los niños dada su baja concentración de iAs.
	Aire ambiental	El aire ambiental representa una fuente de contaminación cuando existen industrias cercanas que trabajen con iAs, y además la corriente de vientos favorece la exposición.
	Aire dentro de casa	El aire dentro de las casas suele no estar contaminado con arsénico. Sin embargo, pueden existir trazas provenientes de humo de tabaco.
	Dieta	Algunos pescados y moluscos marinos concentran preferentemente arsénico orgánico. Sin embargo, trazas de iAs, también pueden ser encontradas y consumidas a través de la dieta.

Fuente: EPA. 2007. Disponible en: <https://archive.epa.gov/region5/teach/web/html/index.html>

Para los efectos no cancerígenos del iAs, existen valores de referencia que se sustentan en el paradigma del valor umbral. Con respecto a la dosis de referencia de iAs en agua de consumo, según el *Integrated Risk Information System* (IRIS) de la *Environmental Protection Agency* (EPA) para una concentración de 0,0003 mg por kg de peso, asumiendo una ingesta de 4,5 litros de agua diaria, no existe evidencia de efectos adversos. Sin embargo, modelos toxicológicos muestran efectos adversos en ratas expuestas entre 50 y 100 µg/L a través del agua de consumo (59).

1.2. Arsénico y sus efectos en salud

Los efectos que tiene el iAs sobre la salud, varían de acuerdo al tipo de exposición, aguda y crónica, la dosis y tiempo de exposición (60). Las exposiciones agudas generalmente corresponden a la ingestión accidental de altas dosis de pesticidas con iAs^{III}; se caracterizan por vómitos, diarrea y gastritis hemorrágica conduciendo a un estado de deshidratación general. Los cuadros más graves de este tipo de intoxicaciones conllevan arritmia, insuficiencia hepática y renal, alteración de las funciones neurológicas y en el peor de los casos la muerte (34).

Las exposiciones crónicas ocurren principalmente a través de tres vías: respiratoria, dérmica y digestiva, siendo la última la predominante. En lugares como Chile, Bangladesh, Estados Unidos y Taiwán, los estudios muestran que concentraciones moderadas y altas de iAs vía agua de consumo, se asocian con altas tasas de lesiones dermatológicas, cáncer de piel, vejiga, riñón, próstata, hígado y pulmón (16,39,61). Zierold y cols. estudiaron la exposición a iAs vía agua para consumo como factor de riesgo de enfermedades crónicas tales como problemas circulatorios $OR_a = 2,64$ (IC95% 1,17-5,95); hipertensión $OR_a = 1,68$ (IC95% 1,13-2,49); e infarto al miocardio $OR_a = 2,08$ (IC95% 1,10-4,31) (62), encontrando asociación significativa. La asociación con otras enfermedades crónicas como diabetes mellitus, angina, enfermedad cardíaca, o infarto agudo al miocardio, aún no es concluyente (62). No obstante, revisiones como las de Engel, Yoshida y Wang (17,63,64), documentan los efectos crónicos del iAs sobre el sistema cardiovascular, coincidiendo en que la exposición a este contaminante es perjudicial.

A nivel del sistema nervioso, la exposición a iAs en seres humanos se ha asociado con efectos como: alteraciones de la audición, memoria deteriorada, alteraciones en aprendizaje y concentración, coeficiente intelectual disminuido y alteraciones en patrones de memoria y déficit atencional (65). En países como Bangladesh y Estados Unidos, se han reportado prevalencias altas de cuadros depresivos. Personas expuestas a concentraciones moderadas de arsénico (2 a 10 $\mu\text{g/L}$), tienen un riesgo mayor de desarrollar depresión $OR_a = 2,74$ (IC95% 1,14-6,63), en comparación con personas expuestas a concentraciones leves (< 2 $\mu\text{g/L}$) (66). De todos modos, estos estudios son de un nivel de evidencia bajo por tratarse de estudios de corte transversal; es necesario realizar otro tipo de diseño para precisar estos resultados.

1.3. Arsénico y efectos durante el embarazo

Durante la gestación los contaminantes ambientales pueden generar diversos efectos, como abortos o problemas congénitos (54). En ambos casos, tanto para la salud de la madre como la del hijo, el arsénico es perjudicial ya que es capaz de atravesar la barrera placentaria; la exposición de la madre tiene alta correlación con la exposición del hijo en gestación.

En madres de Bangladesh, la exposición a iAs vía agua de consumo medida en una muestra de orina se asoció positivamente con marcadores inflamatorios de la placenta tales como 8-oxoguanina (8-oxo G) e interleucina-1 β (IL-1 β), durante la 30^{ava} semana gestación. La exposición se asoció con marcadores como factor de necrosis tumoral- α (TNF) e interferón- γ cuando la medición de exposición se realizó en la 8^{va} semana. Adicionalmente citoquinas presentes en sangre de cordón umbilical (IL-1 β , IL-8, IFN, TNF) mostraron correlación con arsénico urinario, en una medición realizada en la semana número 30 (67).

Dos grupos de ratas expuestas a concentraciones de 10 y 30 $\mu\text{g/L}$ de iAs^{III} y el iAs^V durante el periodo gestacional, presentaron mayor diferencia en la acumulación de trimetilarsénico (TMA) tanto en hígado como en cerebro. En ambos grupos, el TMA fue el metabolito más predominante. En el caso de las crías, la situación fue similar con respecto al TMA. Sin embargo, las crías también presentaron mayor acumulación de DMA (similar a la concentración de acumulación de TMA), con diferencias estadísticamente significativas en el nivel de metabolización de DMA entre los distintos grupos de exposición (68). Lo anterior indica que a pesar que el nivel de exposición de madre y niño sea similar, los perfiles de acumulación, de excreción son distintos y probablemente de efectos, es distinto.

En madres, los estudios coinciden en que la exposición a iAs genera estrés oxidativo y afecta diversas vías metabólicas, como la formación de hemoglobina o el metabolismo de los azúcares. Se ha establecido su asociación con diabetes gestacional, encontrando que las mujeres en el quintil más alto de exposición respecto de las menos expuestas (primer quintil de exposición a iAs), tenían 2,8 (IC95% 1,1-6,9) veces más riesgo de tener un test de tolerancia alterado (69), y anemia (70), ajustando por el efecto de la edad, raza, índice de masa corporal previo al embarazo, uso de *Medicaid* y estado civil. Particularmente, en un estudio realizado en embarazadas chilenas la anemia alcanzó una prevalencia del 49% en mujeres expuestas a arsénico, versus mujeres no expuestas en quienes se determinó un 17% (70). Estas diferencias a pesar de ser estadísticamente significativas, requieren de más estudios que confirmen este hallazgo.

La exposición a iAs durante el embarazo también ha sido asociada aborto y mortinato. La exposición a altas concentraciones de iAs (>200 $\mu\text{g/L}$) durante el embarazo vía agua de consumo se asoció con mayor riesgo de muerte fetal $\text{OR}_a = 6,07$ (IC95% 1,54-24,0) (71). Exposición a concentraciones más bajas de iAs (50 $\mu\text{g/L}$) aumentó el riesgo de pérdida fetal $\text{RR} = 1,14$ (IC95% 1,04-1,25) y mortalidad infantil $\text{RR} = 1,17$ (IC95% 1,03-1,32) (72); la exposición moderada y baja se ha asociado con bajo peso al nacer (73,74). El iAs medido en muestras de pelo de embarazadas expuestas vía agua de consumo se ha asociado negativamente con el peso de nacimiento ($\beta = -193,5 \pm 90,0$ g, valor-p= 0,04). La edad gestacional también se ha asociado negativamente con la exposición a iAs vía agua de consumo. Mediciones de iAs urinario se han correlacionado negativamente con las semanas de gestación ($\beta = -0,069$ IC95% -0,13- -0,0043) (75). La tabla 3 resume los principales efectos sobre la salud materno infantil que han sido estudiados previamente.

Tabla 3. Efectos del iAs sobre la salud materno infantil.

	Efecto en salud	Concentración de Exposición	Medida de Asociación	Referencias
Efectos salud infantil	Aumento de mortalidad infantil	Embarazadas con concentraciones de arsénico urinario entre 249 a 1253 µg/L respecto de las con <38 µg/L	HR= 5,0 (IC 95% 1,4- 18)	Rahman et al. 2010 (76)
	Bajo peso al nacer	Embarazadas con concentraciones de arsénico urinario >=100 µg/L respecto de las con <100 µg/L	β adj=-1,68 (EE=0,62; valor-p=0,007)	Rahman et al. 2009 (77)
	Metilación alterada del ADN, en regiones del promotor tumoral, en sangre de cordón umbilical	Embarazadas expuestas vía agua de consumo en el segundo tercil de exposición a arsénico en comparación con el primer tercil	β adj=1,1 (IC 95% 0,17- 2,04; valor-p=0,02)	Kile et al. 2012 (78)
	Deterioro neurológico en niños	Niños con concentraciones de iAs urinario de 35 µg/L (12-155) y 51 µg/L (20-238) a los 1,5 años y 5 años, respectivamente	En niñas, se asoció una concentración de arsénico urinario de 100 µg/L con una disminución de 1 a 3 puntos en la dimensión verbal y en la escala completa, de inteligencia	Hamadani et al. 2011 (79)
	Aumento de infecciones en niños	Bebes en el quintil más alto de exposición (262-977 µg/L) respecto de los que tuvieron una exposición en el quintil más bajo (<39 µg/L).	El RR para infecciones respiratorias bajas fue de 1,69 (IC95% 1,36-2,09). Para diarrea el RR fue de 1,20 (IC 95%: 1,01-1,43).	Rahman et al. 2010 (80)
Efectos sobre la madre	Intolerancia a la glucosa en embarazadas	Mujeres en el cuartil más alto de exposición a iAs de acuerdo a la concentración en sangre (2,09–24,07 µg/L) respecto de mujeres expuestas a concentraciones más bajas de iAs (0,23–0,92 µg/L)	Ajustando por edad, raza, nativo americano, el índice de masa corporal previo al embarazo, el uso de Medicaid y el estado civil, las mujeres en el cuartil más alto de exposición a arsénico en sangre tenían 2,8 veces mayor chance de un test de tolerancia a glucosa alterado que las mujeres en el cuartil más bajo de exposición (IC95% 1,1- 6,9)	Ettinger et al. 2009

Fuente: Elaboración propia.

1.4. Disruptores endocrinos

El año 2002 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió disruptor endocrino como “una sustancia exógena o una mezcla que altera las funciones del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos a la salud en un organismo intacto, o su progeñe, o (sub) poblaciones” (81). Dentro del grupo de disruptores endocrinos, se encuentran contaminantes como diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos; dioxinas, bisfenol A, y los bifenilos policlorados (PCB); pesticidas como insecticidas clorados, imidazoles, y triazoles; sustancias químicas de uso común en cosméticos, como ftalatos; y también los metales pesados (33).

Los efectos de estos contaminantes, desde una perspectiva epigenética, sugieren que su presencia ejerce un mecanismo de activación de metiltransferasas que metilan zonas ricas en citosina del ácido desoxirribonucleico (ADN) lo cual activa complejos proteicos que remueven grupos acetilos del ADN, esenciales en el proceso de transcripción (82). La represión de la transcripción, es decir de la transferencia de la información genética del ADN al ARN, es una de las rutas consideradas dentro de los mecanismos epigenéticos que puede afectar negativamente a la salud.

Se ha identificado que metales como cadmio, arsénico, níquel, cromo, y metilmercurio producen cambios epigenéticos. Estos implica la metilación del ADN, la modificación de histonas y de microARN (83). Estos contaminantes potencialmente alteran la síntesis de proteínas, tales como receptores hormonales. El arsénico tiene acción sobre el hipotálamo alterando la síntesis de los receptores de glucocorticoides que se encuentran ubicados en el eje HPA. Esto implica alteraciones del metabolismo de hormonas sexuales y tiroideas, así como del metabolismo de las grasas. En la tabla 4 se muestran los efectos que tiene el arsénico junto con otros metales, sobre distintas rutas endocrinas.

Tabla 4. Efecto del arsénico y otros metales como disruptores endocrinos.

Metal	Efecto	Mecanismo de acción
Arsénico	Alteración de la transcripción de los siguientes receptores: glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), progesterona (PR), andrógenos (AR), ácido retinoico (RAR), y la transcripción mediada-TR (receptor de hormona tiroidea) a dosis bajas; Efecto estrogénico; Inhibición del espermatogénesis	La estimulación o inhibición de la actividad de transcripción nuclear mediada por varios receptores de hormonas; Unión a los receptores de estrógeno
Cadmio	Alteraciones de los patrones de secreción de hormonas hipofisarias; La estimulación de la síntesis de la progesterona (dosis bajas); Inhibición de la síntesis de la progesterona (dosis altas); Efecto estrogénico; Aumento	Unión a los receptores de estrógenos; La inhibición de la transcripción del receptor de la lipoproteína de baja densidad

	de parto prematuro; Bajo peso al nacer; El inicio temprano de la pubertad	(LDL); Inhibición del citocromo P ₄₅₀
Mercurio	Estimulación de síntesis de progesterona; Reducción de niveles plasmáticos de testosterona y 17-beta-estradiol; Reducción de conteo y movilidad de espermatozoides; Aumento de los niveles plasmáticos de tetrayodotironina (T4), hormona tiroestimulante (TSH), estrógeno y estradiol	La inducción de la deshidrogenasa 3 beta-hidroxiesteroide; Inhibición de la yodotironina deiodinasa tipo I
Plomo	Alteraciones de la afinidad de los receptores de estrógeno y la hormona luteinizante (LH); Acción en múltiples sitios en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal; Reducción de los niveles séricos de factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), LH, testosterona y estradiol; Alteraciones del inicio de la pubertad; Alteraciones morfológicas y funcionales de los espermatozoides; Inhibición síntesis de hormona del crecimiento (GH)	Reducción de la expresión de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR); Inhibición de la secreción de LH; Aumento de la peroxidación de lípidos en el plasma seminal; Aumento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)
Manganeso	Aumento de los niveles séricos de LH, hormona folículo estimulante (FSH) y testosterona; La estimulación del espermatogénesis; La estimulación de la secreción de LH y hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH); Inicio temprano de la pubertad	Activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y del sistema de cGMP-PKG
Zinc	Estimulación de espermatogénesis	Actividad antioxidante; Inhibición de la ADNasa

Fuente: Iavicoli et al. 2009. The Effects of Metals as Endocrine Disruptors (33).

La exposición crónica al arsénico, en la forma predominante de arsenito (arsénico inorgánico trivalente) a través del agua de consumo, es un problema que afecta a diversos países en el mundo (84). Cambios epigenéticos podrían ser el antecedente de otras enfermedades asociadas a la contaminación con este metaloide (85). Durante los últimos años ha aumentado la evidencia científica sobre los efectos del arsénico como disruptor endocrino (11,86,87), en especial literatura relacionada con diabetes, y cáncer. Los efectos neuroendocrinos, relacionados con la síntesis de receptores de glucocorticoides (88), representan un área de exploración considerando los efectos no cancerígenos que pueden producirse tras la exposición a concentraciones bajas y moderadas de arsénico.

1.5. Arsénico como disruptor endocrino del cortisol

Los modelos murinos utilizados en toxicología han generado nuevo conocimiento respecto de las consecuencias que tiene la exposición a bajas concentraciones de iAs y los efectos neuroendocrinos, que se producen en etapas tempranas tras la exposición. Bajo condiciones experimentales, se ha observado que la exposición a arseniatos genera aberraciones meióticas que impiden la implantación y aumentan la apoptosis (89).

La exposición de las ratas embarazadas se realiza en condiciones controladas considerando una exposición continua desde el periodo previo a la fecundación y durante

toda la gestación (11). En estos estudios experimentales se ha determinado que las ratas expuestas a concentraciones moderadas de arsénico durante la vida intrauterina (0,05 mg/L), muestran niveles plasmáticos de corticosterona significativamente más elevados que ratas no expuestas (Grupo control = 50 ng/ml; grupo expuesto a arsénico = 120 ng/ml; valor- $p=0,03$), junto con niveles de factor liberador de corticotropina hipotalámica mucho más bajos (Grupo control= 32 unidades de inmunoreactividad; grupo expuesto a arsénico= 22 unidades de inmunoreactividad; valor- $p<0,001$). La concentración de receptores de glucocorticoide en regiones específicas del hipotálamo es menor, con diferencias estadísticamente significativas, respecto de las ratas no expuestas (11,90,91).

La activación transcripcional de los receptores de glucocorticoides es acompañada por cambios en las proteínas histonas H3 y H4, específicamente en la modificación de zonas post-transduccional (PTM) que resultan de la actividad enzimática de 2 proteínas, conocidas como GRIP1 y CARM1. En el estudio de Barr y cols. se observó que la exposición a concentraciones de iAs de 8 μM (599,37 $\mu\text{g/L}$) en cultivos celulares de adenocarcinoma, producía menor expresión de los promotores de CARM1. La exposición a iAs, facilitó la metilación y acetilación de las histonas H3, lo que inhibió la transcripción de CARM1 y subsecuentemente del receptor de glucocorticoide. Por otro lado, GRIP1, no fue afectada por la presencia del iAs, y su expresión fue capaz de revertir la supresión de CARM1 (85).

Lo anterior, sugiere una vía causal a través de la que el iAs es capaz de alterar la neuroarquitectura del feto. En una etapa inicial, la dehidroepiandrosterona (DHEAS), producto principal de la corteza suprarrenal fetal, muestra un aumento progresivo con el crecimiento de la corteza suprarrenal. En la gestación temprana, a pesar de que existe deficiencia de la enzima 3- β -hydroxysteroid dehydrogenasa (3 β -HSD), la suprarrenal fetal produce pequeñas cantidades de cortisol que aumentan simultáneamente durante el último trimestre gracias a la acción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) placentaria, en combinación con otros factores tales como la hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH) placentaria y el estrógeno (92).

En modelos experimentales, el iAs es capaz de metilar regiones específicas del DNA; las ratas expuestas durante la gestación son más ansiosas y manejan las situaciones estresantes deficientemente, debido a la alteración del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (11,90,93). La exposición a iAs altera la biosíntesis de proteínas kinasas activadoras de mitógeno (MAPK) y las kinasas reguladas por señales extracelulares (EPK), involucradas en procesos de aprendizaje y memoria, lo que a su vez es modulado por la síntesis de receptores de glucocorticoides. Las ratas expuestas presentaron menor nivel de expresión de los genes H-Ras (valor- $p=0,0005$) y de proteínas Raf-1 (valor- $p=0,003$) en comparación con los controles. Ambos genes corresponden a precursores que se encuentran en la región "río arriba" de la transcripción de proteínas kinasas, fundamentales en la síntesis de receptores de glucocorticoides (91).

En humanos, la exposición a iAs favorecería la expresión de alteraciones como: autismo, déficit atencional, déficit de aprendizaje, ansiedad, depresión y agresividad en etapas posteriores (66). De todos modos, en pacientes con patología mental, los mecanismos

por los cuales se establece una patología específica tras la exposición no han sido completamente dilucidados y su estudio resulta interesante.

1.6. Cortisol y factores asociados

En general, los glucocorticoides comparten una estructura química de 21 átomos de carbono. Los que no poseen un radical hidroxilo en C-11 como la cortisona o la prednisona son inactivos hasta que son hidroxilados en el hígado a cortisol o a prednisolona respectivamente (94). En seres humanos, el principal glucocorticoide es el cortisol el que es secretado por la corteza suprarrenal y cuya regulación consta de tres sistemas independientes pero interrelacionados:

- Un mecanismo de retroalimentación negativo entre la hormona adrenocorticotropina ACTH y cortisol. Esta hormona es el único regulador de glucocorticoides como el cortisol y la aldosterona.
- Señales provenientes del sistema nervioso central, mediadas por neurotransmisores y que representan percepciones ambientales (como frío-calor, luz-oscuridad), o estrés (dolor, ansiedad, etc.)
- Un ritmo horario conocido como ritmo circadiano.

La integración de estos tres sistemas se realiza en el hipotálamo, donde las neuronas del plexo venoso portal hipotalámico-hipofisiario sintetizan un péptido de 41 aminoácidos denominado hormona liberadora de corticotropina (CRH).

En la adenohipófisis, los corticotropos sintetizan y liberan ACTH en respuesta a CRH. La ACTH, péptido de 39 aminoácidos, al llegar a través de la circulación sanguínea a las glándulas suprarrenales estimula las células de la zona fasciculata de la corteza. Estas células, luego de 2 a 3 minutos sintetizan cortisol, el cual por vía sanguínea inhibe a la ACTH y CRH. Esta inhibición de ACTH por cortisol tiene una modalidad inmediata que no depende de la concentración de cortisol, y una modalidad paulatina que sí depende de la concentración de cortisol. La presencia del cortisol en los receptores de glucocorticoides hipotalámicos e hipofisiarios, provoca la inhibición de ACTH y CRH (95).

En la sangre, el 10,5% de cortisol está en su forma no unida o biológicamente activa. El cortisol restante se une a las proteínas séricas (96). El cortisol libre, se libera a la saliva a través de mecanismos intracelulares; en la saliva, la mayoría de cortisol permanece no unido a proteína. Los niveles de cortisol salival no se ven afectados por la tasa de flujo salival y son relativamente resistentes a la degradación por enzimas (97). Estudios reportan consistentemente altas correlaciones entre el cortisol en suero y el cortisol salival, lo que indica que los niveles de cortisol salival estiman con fiabilidad los niveles de cortisol sérico (98). La concentración de cortisol salival varía levemente según sexo y grupo etario. Pero las variaciones más importantes se identifican según la hora de toma de muestra, lo que es

consistente con el ritmo circadiano, en el cual la concentración de cortisol matutino es mayor que la vespertina (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de referencia de cortisol obtenidos en distintos grupos de sujetos.

Grupo	Nº de sujetos	Rango AM (µg/dL)	Rango PM (µg/dL)
Niños 2,5 a 5,5 años	112	0,034 – 0,645	0,053 – 0,607
Niños 8 a 11 años	285	0,084 – 0,839	ND – 0,215
Adolescentes 12 a 18 años	403	0,021 – 0,883	ND – 0,259
Hombres de 21 a 30	26	0,112 – 0,743	ND – 0,308
Mujeres de 21 a 30	20	0,272 – 1,348	ND – 0,359
Hombres de 31 a 50	67	0,122 – 1,551	ND – 0,529
Mujeres de 31 a 50	31	0,094 – 1,515	ND – 0,181
Hombres de 51 a 70	28	0,112 – 0,812	ND – 0,228
Mujeres de 51 a 70	23	0,149 – 0,739	0,022 – 0,254
Todos los Adultos	192	0,094 – 1,551	ND – 0,359

Fuente: Salimetrics. 2016. Disponible en: <https://www.salimetrics.com/assets/documents/1-3002.pdf>.

*ND= No detectable

Normalmente el rango de valores de variación del cortisol en adultos va desde los 6 a 23 µg/dL en una muestra matutina tomada entre 8 am a 12 pm. Estos valores van disminuyendo paulatinamente con el transcurso del día, alcanzando un rango que varía entre 5 a 15 µg/dL entre 12 pm y 8 pm y llegando a concentraciones no detectables durante la noche. Este ciclo ocurre naturalmente en adultos. Luego de despertar y con el transcurrir de las horas de la mañana debido a la necesidad de incorporar fuentes de energía, el cortisol comienza a disminuir; durante la tarde se ha visto que aumenta levemente, pero no en las cantidades matutinas hasta que declina casi totalmente durante la noche (99). Este ritmo está relacionado con la secreción de ACTH, secretada en la parte anterior de la glándula pituitaria y que tiene su acción en la corteza adrenal (100).

En el recién nacido, tanto el cortisol como sus precursores disminuyen, especialmente en prematuros. A nivel suprarrenal, la sensibilidad de la corteza suprarrenal a la ACTH puede ser reducida en neonatos regularizándose con el tiempo. Adicionalmente varias enzimas esteroideogénicas importantes que participan en la síntesis de cortisol, son

relativamente deficientes en recién nacidos. Esto conduce a un aumento de los niveles de precursores esteroidales y niveles de cortisol (92). Por lo tanto, en niños recién nacidos el ritmo circadiano no muestra el ritmo circadiano descrito y se considera como inmaduro. Algunos autores han mencionado que el ritmo circadiano es adquirido durante los primeros 5 meses de vida, mientras otros argumentan que los niños pueden demorar hasta 18 meses en adquirir el ritmo característico de un adulto.

En adultos la variabilidad puede explicarse por distintos factores tales como: el abuso emocional, el estrés en los primeros años de vida, el abandono emocional, el abandono, el abuso físico, la pérdida de los padres, la negligencia física, el abuso sexual y las experiencias traumáticas en general (101). Cada uno de estos estresores tiene un impacto distinto sobre el nivel de cortisol y de ACTH, lo que adicionalmente podría variar según el sexo (Tabla 6). Particularmente en las mujeres, el efecto de distintos estresores durante la vida provoca una disminución en el nivel de cortisol lo que sugiere que el estrés crónico provoca disminución en la actividad del eje HPA. Contrariamente en los hombres con depresión y que han sufrido estrés durante los primeros años de vida, los niveles de cortisol tienden a estar aumentados.

Tabla 6. Ejemplo de alteración del nivel de cortisol, según distintos agentes de stress.

Estresor	Cambios en el nivel de cortisol
EA, PA, AS, EN, PN	Tendencia de los individuos con ELS a presentar cortisol ↓.
EA, PA, AS, EN, PN	↓ El cortisol en individuos con EA.
EA, PA, AS, EN, PN	El cortisol y ACTH ↓ en las mujeres con ELS.
EA, PA, AS, TEG	El cortisol y ACTH ↑ en hombres con depresión y ELS.
PL, EA, PA, AS, EM, PN	El cortisol ↑ en los hombres con la pérdida de los padres. No hubo influencia sobre los niveles de ACTH.
EA, PA, AS, EM	No hubo influencia de ELS en el eje en respuesta a la prueba.
EA, PA, AS, TEG	El cortisol y ACTH ↓ en mujeres con depresión y ELS.
EA, PA, AS, N	No hubo influencias de ELS en el eje en respuesta a las pruebas.
EA, PA, AS, N	No hubo influencia de ELS en el eje en respuesta a la prueba.

Fuente: Baes et al. 2012. Review. Assessment of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress – a systematic review (101).

EA, el abuso emocional; ELS, el estrés primeros años de vida; EN, abandono emocional; N, el abandono; PA, el abuso físico; PL, la pérdida de los padres; PN, negligencia física; AS, el abuso sexual; TEG, experiencias traumáticas general.

La variabilidad en niños, parece ser mayor a la exhibida en adultos de diversos grupos etarios, como se muestra en la tabla 5 (102-104). Genéricamente podrían definirse tres grandes grupos de factores que afectan el cortisol en niños: factores de la muestra, características sociodemográficas y hábitos de los padres, y estados de salud de la madre (105). Con respecto a los determinantes de la muestra, éstos están asociados al ritmo circadiano anteriormente mencionado, es decir la hora de la toma de muestra, la forma que se toma la muestra y la edad del niño.

El sexo no parece estar relacionados con los niveles de cortisol, aunque en algunos trabajos se señala que las mujeres tienen niveles levemente aumentados respecto de los hombres, al igual que los ancianos parecen tener niveles relativamente más bajos comparados con los jóvenes (105-108). Con respecto a la posición socioeconómica, existen diversos estudios que indican que una posición desventajada condice un patrón aumentado de los niveles de cortisol (109,110). Esto último puede también estar asociado con condiciones de trabajo deficitarias, situaciones de estrés permanentes o crónicas.

A pesar de que las madres consumidoras de tabaco no tienen hijos con niveles de cortisol salival distintos a los hijos de madres no expuestas a tabaco (111,112), otros estudios establecen asociación entre el consumo de tabaco del adulto y el nivel de cortisol del niño (113). Con respecto al consumo de alcohol y drogas, ambos atributos se relacionan con el nivel de cortisol de los niños; no obstante, es importante mencionar que los niños evaluados eran sometidos a constantes situaciones de estrés (114). En niños, cuyas madres han sido expuestas a condiciones de maltrato o que presentan depresión, los niveles de cortisol han sido ligeramente más altos respecto de niños de madres no expuestas y emocionalmente saludables (115-117).

1.7. Relación entre cortisol y α -amilasa

En el estudio del estrés, se ha hecho común la medición de cortisol salival junto con ACTH sérica, como biomarcadores de la actividad del eje HPA. Sin embargo, es necesario complementar estos análisis con otras mediciones involucradas en la psicobiología del estrés (118). Una vía complementaria, está basada en el estudio del sistema nervioso simpático y la medición de catecolaminas, por ejemplo norepinefrina (119). No obstante, la medición de cualquier biomarcador en una muestra de sangre puede sesgar el resultado dado el estrés que conlleva la punción. Para superar este problema, la activación del sistema nervioso, es decir el estrés agudo, puede ser medido con precisión a través de la α -amilasa, la enzima más abundante a nivel salival en seres humanos.

Esta es una enzima digestiva que descompone el almidón de la dieta, y se hipotetiza que juega un papel clave en el establecimiento y mantenimiento de la microflora oral para formar placas dentales (120). La secreción de α -amilasa se produce en las glándulas

salivales, tras estímulos nerviosos que han mostrado un alto correlato con la actividad simpática en condiciones de estrés.

Estudios en humanos muestran que los niveles de α -amilasa en saliva aumentan bajo una variedad de condiciones de estrés (físico y psicológico), por lo que podría ser utilizado como un biomarcador de estrés agudo. Curiosamente, se muestra que los niveles de cortisol a menudo no se correlacionan con la α -amilasa durante el estrés agudo (121), lo que sugiere que ambos biomarcadores responden a distintos estímulos y varían según el estresor sea agudo o crónico. La tabla 7 muestra los valores de referencia para α -amilasa en saliva.

Tabla 7. Valores de referencia para α -amilasa salival en un grupo de adultos.

Grupo	Nº de Sujetos	Media de α -amilasa (U/ml)	Rango de referencia
Adultos	75	92,4	3,1 – 423,1

Fuente: Salimetrics. 2016. Disponible en <https://www.salimetrics.com/assets/documents/1-1902.pdf>

Por otro lado, la α -amilasa no ha sido tan estudiada como el cortisol como biomarcador de enfermedades. En ese contexto, los estudios han mostrado que el cortisol se mantiene aumentado en adultos con estados mórbidos tales como: inmunosupresión, obesidad, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus y osteoporosis (122-126). Dicho lo anterior, se hace relevante indagar uno de los mecanismos toxicológicos mediante el cual el cortisol puede verse alterado en etapas iniciales de la vida tras la exposición a contaminantes como el iAs sin generar aumento o cambios en la actividad de α -amilasa. (127-130).

1.8. Limitaciones del uso de evidencia toxicológica

Gran parte de la evidencia que sustenta las regulaciones, proviene de estudios toxicológicos, lo que implica el desarrollo de experimentos en condiciones controladas y en modelos animales. A pesar que estos experimentos permiten estudiar causalidad y las vías involucradas, existe controversia respecto de la extrapolación de estudios en modelos animales a escala humana. Uno de los aspectos considerados, es el tema de la dosis/respuesta (131).

Cada nivel de organización, desde lo molecular hasta los organismos superiores, define una respuesta distinta frente a una determinada dosis. Por lo tanto, la métrica usada a nivel de cultivos celulares o en modelos animales, en ocasiones pareciera no ser extrapolable a humanos. Distintos niveles de organización expuestos a una misma dosis, exhiben distinta toxicodinamia, lo que implica distintos resultados.

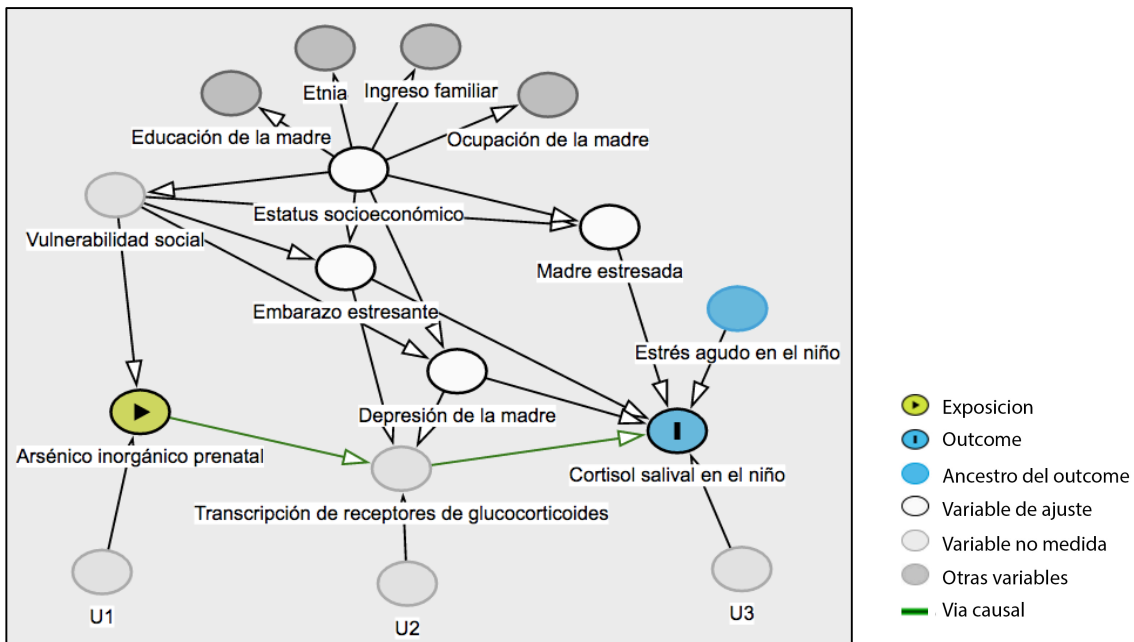
Otro aspecto a considerar es la exposición a mezclas. La evidencia toxicológica a menudo pretende verificar causalidad modificando sólo un factor y manteniendo el resto del sistema experimental estable. Los seres humanos se encuentran expuestos a mezclas de factores ambientales, lo que puede influir en la respuesta (132). El efecto de la mezcla probablemente no es la sumatoria del efecto que cada uno de los elementos tiene (133). Asumir el efecto aditivo entre las sustancias podría conllevar a una subestimación del riesgo.

1.9. Modelo conceptual de estudio entre arsénico inorgánico y cortisol salival

En el estudio del iAs como disruptor endocrino del cortisol, se propone como modelo teórico el siguiente grafo acíclico dirigido (GAD) (Figura 3). En él se incorporan variables del contexto, así como variables del embarazo que pueden afectar el nivel del cortisol en el niño de acuerdo a la evidencia presentada en este documento.

De acuerdo al GAD, el estrés durante el embarazo o actual de la madre y el diagnóstico de depresión, son variables que se relacionan directamente con el cortisol del infante. Estas variables a su vez, se relacionan con el estatus socioeconómico; estas 4 variables son los nodos de ajuste para evitar confusión. Bajo el enfoque estadístico tradicional, el ingreso familiar fue utilizado como sustituto de estatus socioeconómico y bajo el enfoque de sistema de ecuaciones estructurales, el estatus socioeconómico se consideró como una variable latente cuya variabilidad se explica a través de la educación, la etnia, el ingreso y la ocupación.

Figura 3. Grafo Acíclico Dirigido (GAD) para el estudio de Cortisol en niños tras la exposición intrauterina a iAs.



CAPÍTULO 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

2.1. Pregunta de Investigación

¿Existe asociación entre la exposición prenatal a arsénico inorgánico y la concentración de cortisol salival, en infantes entre 18 y 24 meses?

2.2. Hipótesis

En este estudio epidemiológico se plantea la siguiente hipótesis: “infantes entre 18 y 24 meses expuestos durante la gestación a arsénico inorgánico, presentan concentraciones más altas de cortisol salival”.

La plausibilidad biológica de esta hipótesis se basa en los estudios toxicológicos que han mostrado que ratas gestantes expuestas a arsénico inorgánico a través del agua de consumo, tienen crías con menor expresión de los receptores de glucocorticoides a nivel del hipotálamo y con esto, concentraciones más altas de corticosterona.

CAPITULO 3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la asociación entre la exposición prenatal a arsénico y la concentración de cortisol salival, en infantes de la comuna de Arica.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de cortisol salival en niños entre 18 y 24 meses de la comuna de Arica.
- Caracterizar la concentración de arsénico inorgánico en la orina y la concentración de cortisol salival de acuerdo a las características socio demográficas de la muestra.
- Identificar variables asociadas con la concentración de cortisol salival en el niño.
- Estimar la asociación entre la exposición a arsénico inorgánico durante la etapa prenatal y la concentración de cortisol salival en el niño, ajustando por variables de confusión.
- Comparar la estimación de la asociación entre arsénico inorgánico prenatal y cortisol salival, según el enfoque estadístico clásico y sistema de ecuaciones estructurales.

CAPITULO 4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Diseño de Estudio

Cohorte de embarazadas participantes del estudio marco FONDECYT N° 11121672 “Exposición pre y post natal a humo de tabaco ambiental y arsénico y su relación con el desarrollo infantil: Estudio de cohorte en infantes de Arica”.

4.2. Población y Muestra

Población

Esta muestra representa a la población de infantes, hijos de las madres usuarias de los servicios de atención de salud pública de la ciudad de Arica. El reclutamiento del proyecto marco se realizó el año 2013, invitando a participar a las embarazadas atendidas en los 5 Centros de Salud Familiar (CESFAM) de la ciudad de Arica.

Arica tenía una población estimada para el año 2015 de 176.067 habitantes, con una proyección de población total femenina de 92.396 para el mismo año. Se estimó que durante el quinquenio 2010 a 2015 la Tasa Bruta de Nacimientos (TBN) sería de 14,51/100.000 habitantes, con una Tasa Global del Fecundidad (TGF) de 1,89 por cada mujer en etapa fértil (15). En el registro de egresos hospitalarios del año 2011 se indicó que el número de embarazos, parto y puerperio para la modalidad de atención institucional fue de 2.902 en la Región de Arica y Parinacota, con una estimación del número de nacidos vivos totales de 3.559 (134). Considerando que gran parte de los partos de la Región de Arica y Parinacota se atienden en el sector público, la muestra de embarazadas recogida desde los 5 CESFAM de la ciudad de Arica: Amador Neghme, Sapunar, Punta Norte, Iris Veliz, Bertín Soto y René García, se consideró representativa.

Diseño de muestreo

El marco muestral se construyó con los registros de las pacientes que demandaban atención obstétrica para el cuidado de su embarazo en los centros de salud familiar de la red de atención pública. Se invitó a participar a mujeres entre 18 y 40 años con fecha de última regla entre noviembre del 2012 y mayo del 2013, alcanzado a reclutar a 257 voluntarias. No fueron usados métodos probabilísticos para la selección de la muestra.

Reclutamiento

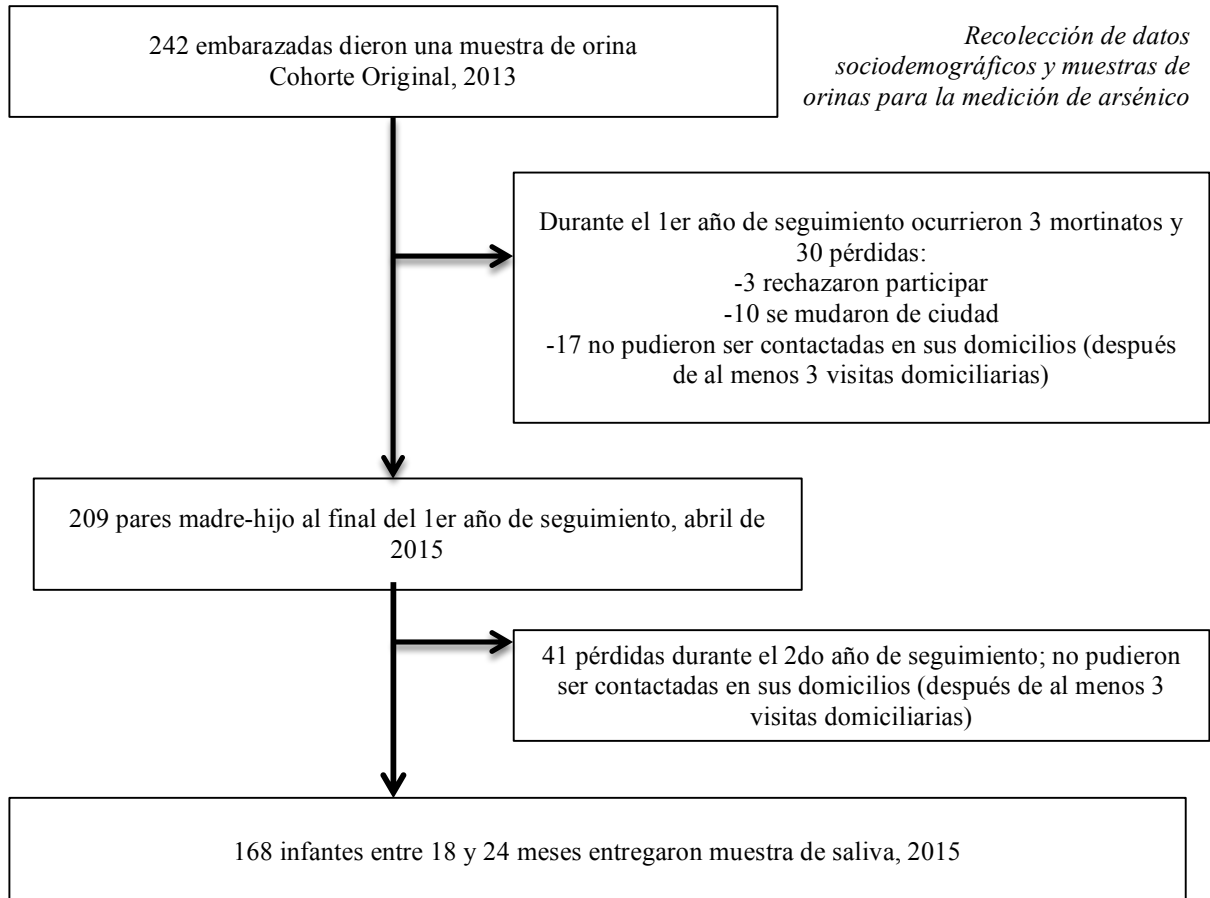
Las mujeres registradas en los 5 CESFAM fueron 538. De éstas 132 no pudieron ser visitadas en sus domicilios, dado que la dirección no correspondía o simplemente ya no vivían ahí; 115 se desconoce la razón por la cual no participaron y 32 no aceptaron participar. Doscientas cincuenta y siete embarazadas cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar durante la visita domiciliaria.

Las mujeres reclutadas en la cohorte fueron 242, ya que las 15 restantes no entregaron la muestra de orina. En esa visita, adicionalmente se aplicaron cuestionarios para recolectar antecedentes de la madre, información sobre fuentes de exposición, historia de exposición, condiciones del hogar y otras variables relevantes para el estudio marco. La información de exposición a iAs, el dato del ingreso familiar, origen étnico de la madre, escolaridad de la madre, tipo de agua para beber y para cocinar fueron utilizados desde el estudio marco.

Seguimiento

Durante el primer año postparto, entre los 3 a 10 meses, las mujeres fueron contactadas nuevamente, a fin de disminuir las pérdidas en el seguimiento y para la recolección de nuevos datos. Estos datos fueron recogidos en el contexto de la unidad de investigación “Exposición prenatal a arsénico inorgánico y síntomas de Depresión Postparto”, desarrollada como estudio preliminar a esta tesis. De dicho estudio se utilizaron los datos de: depresión de la madre; situaciones crónicas que generaban estrés en la madre, y hábitos en la madre (alcohol, drogas, tabaco) y la familia. El cortisol salival del niño fue medido entre los 18 y 24 meses junto con información relevante en la toma de muestra (Figura 4).

Figura 4. Flujograma



Muestra

Con una muestra de 168 participantes, **el error estimado para el coeficiente de regresión lineal del arsénico inorgánico fue de 0,113 (Tabla 8) y el poder estadístico *post-hoc* fue de 0,701.**

El poder estadístico y error del estimador se han estimado considerando como peor escenario tener un modelo múltiple de 5 variables, cuyo R^2 ajustado es 0,06, con una variabilidad explicada por el iAs prenatal de 0,03, y con una confianza de que el error no es mayor al estimado del 80% (135).

Tabla 8. Estimación del error del coeficiente de regresión lineal del arsénico inorgánico.

	Escenario 1	Escenario 2	Escenario 3	Escenario 4	Escenario 5
N	168	168	168	168	168
Variables del modelo	5	5	5	5	5
R² ajustado del modelo múltiple	0,45	0,30	0,20	0,10	0,06
R² del iAs prenatal	0,15	0,10	0,10	0,05	0,03
Confianza	80	80	80	80	80
Error del estimador	0,121	0,132	0,141	0,146	0,113

4.3. Variables

4.3.1. Variable de exposición

La exposición a arsénico inorgánico, fue operacionalizada como concentración total de arsénico inorgánico urinario ($\mu\text{g/L}$), medida en escala continua.

La muestra de orina fue recogida por personal capacitado de acuerdo al protocolo estandarizado de obtención de muestras (Protocolo específico, descrito en el proyecto FONDECYT Nro.11121672). A las mujeres que aceptaron participar en el estudio marco se les solicitó una muestra de la primera orina de la mañana para la determinación de arsénico inorgánico en una visita realizada durante el segundo trimestre de gestación. Para ello, el personal de campo les entregó un frasco, así como las instrucciones para que las muestras fueran tomadas por las propias mujeres. Luego de su recolección, el frasco se rotuló, almacenó en una bolsa hermética y luego se congeló hasta que fue enviada al laboratorio para su análisis. El transporte se efectuó según las recomendaciones del manual de bioseguridad para transporte de material biológico.

El análisis de las muestras se realizó en un laboratorio internacional acreditado, y la técnica utilizada para la medición de iAs urinario fue la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas (HPLC-MS). Se determinaron las concentraciones de las especies metiladas: DMA y MMA, y las trazas de arsénico inorgánico trivalente (iAs^{III}) y pentavalente (iAs^{V}). El arsénico inorgánico total urinario se obtuvo mediante la suma de las fracciones y mostró amplia variabilidad (Mediana=14,8; Rango= 2-69,2 $\mu\text{g/L}$). Estos datos fueron recolectados entre junio y octubre de 2013.

4.3.2. Variable resultado

La concentración de cortisol salival del infante fue medida en escala continua en $\mu\text{g/dL}$ entre los 18 a 24 meses. Se consideró este rango ya que, de acuerdo a lo señalado en el marco teórico, el ritmo circadiano de esta hormona estaría estabilizado.

Para la recolección y transporte de muestra, personal previamente entrenado siguió las instrucciones del fabricante Salimetrics y Fermelo. (Anexo 1). Ésta fue efectuada en el domicilio del niño/a participante, durante la jornada de la mañana (dado que durante la mañana se presenta la concentración más alta de cortisol en saliva). Previamente se realizó un contacto telefónico, donde se coordinó la visita para la toma de muestra y se entregó información sobre este examen (Anexo 1).

La determinación de cortisol se realizó mediante la técnica inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, de su sigla en inglés), mediante el uso del *kit Expanded Range High Sensitivity SALIVARY CORTISOL*, del fabricante Salimetrics. El protocolo abreviado de la técnica de ejecución se detalla en el Anexo 3. El análisis de las muestras piloto fue realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Bernardo O'Higgins (Santiago, Chile). El límite de detección reportado por el fabricante es de $0,007 \mu\text{g/dL}$ con un coeficiente de variación del 3 al 11%.

El rango de valores de cortisol salival en niños menores de 2 años no está claramente establecido. Los valores descritos en niños entre 3 a 5,5 años ($n=112$) varían entre $0,034$ y $0,645 \mu\text{g/dL}$, según lo indicado por el fabricante. Un estudio realizado en población chilena adulta muestra que el cortisol salival varía desde $0,1$ a $3,3 \mu\text{g/dL}$ (18).

Dada la falta de evidencia respecto de la variabilidad del cortisol salival en infantes, se realizó un estudio piloto cuyo objetivo fue conocer la variabilidad del cortisol salival, la reproducibilidad de la toma de muestra y la reproducibilidad de la técnica analítica (Anexo 6).

Los resultados obtenidos en el estudio piloto mostraron que el rango de cortisol salival en niños entre 18 y 24 meses variaba entre $0,073$ y $0,266 \mu\text{g/dL}$, con una distribución asimétrica y una mediana de $0,15 \mu\text{g/dL}$. Respecto de la reproducibilidad, los duplicados de toma de muestra tuvieron una concordancia (ρ) de $0,73$ y los duplicados de técnica analítica tuvieron una concordancia de $0,96$.

4.3.3. Covariables

Las covariables utilizadas provienen de tres fuentes: (1) el estudio marco, (2) la unidad de investigación “Exposición prenatal a arsénico inorgánico y síntomas de Depresión Postparto”, realizada como estudio preliminar al proyecto de tesis y (3) el registro de datos recolectados como parte de la Tesis Doctoral al momento de la toma de muestra de saliva en los infantes y sus madres. Las variables, así como la operacionalización y la fuente de información se describen con más detalle en la Tabla 9.

Tabla 9. Descripción, operacionalización y fuente de información de las variables utilizadas en el estudio “Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile”.

Fuente de Información	Variables usadas	Operacionalización de la variable	Comentario
VARIABLE DE EXPOSICIÓN			
Estudio Marco FONDECYT N° 11121672: “Exposición pre y post natal a humo de tabaco ambiental y arsénico y su relación con el desarrollo infantil: Estudio de cohorte en infantes de Arica”. Investigador Responsable: V. Iglesias	Concentración Prenatal de Arsénico Inorgánico Urinario	Escala continua en µg/L	La variable fue medida durante el 2do trimestre de embarazo con una muestra de la madre
VARIABLE RESULTADO			
Tesis doctoral: “Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile” Investigador Responsable: M. Valdés	Cortisol salival	Escala continua en µg/dL	La variable fue medida durante la mañana en niños de 18 a 24 meses.
COVARIABLES			
Estudio Marco FONDECYT N° 11121672: “Exposición pre y post natal a humo de tabaco ambiental y arsénico y su relación con el desarrollo infantil: Estudio de cohorte en infantes de Arica”. Investigador Responsable:	Ingreso promedio hogar	Escala Ordinal (<\$200000;\$201000-\$400000;\$400001-\$600000;\$600001-\$800000; >\$800000)	Variable registrada al momento de toma de muestra de orina
	Escolaridad de la madre	Escala continua en años de escolaridad	Variable registrada al momento de toma de muestra de orina
	Origen étnico de	Escala Nominal	Variable registrada al

V. Iglesias	la madre	(Caucásico-amerindio; Aymará; Otro)	momento de toma de muestra de orina
	Tipo de agua de beber	Escala dicotómica (0:embotellada/1:potable)	Variable registrada al momento de toma de muestra de orina
	Tipo de agua de cocinar	Escala dicotómica (0:embotellada/1:potable)	Variable registrada al momento de toma de muestra de orina
Unidad de Investigación: "Exposición prenatal a arsénico inorgánico y síntomas de Depresión Postparto". Investigador Responsable: M. Valdés	Consumo de alcohol durante el embarazo	Escala dicotómica (0/1)	Variable registrada al año postparto en visita domiciliaria
	Consumo de drogas durante el embarazo	Escala dicotómica (0/1)	Variable registrada al año postparto en visita domiciliaria
	Exposición a tabaco durante el embarazo	Escala dicotómica (0/1)	Variable registrada al año postparto en visita domiciliaria
	Depresión de la madre diagnosticada por médica	Escala Dicotómica (Sin síntomas DPP; con síntomas de DPP)	Variable registrada al año postparto en visita domiciliaria
	Comportamiento del niño	Escala Dicotómica (Muy tranquilo o Tranquilo; Inquieto o muy inquieto)	Variable registrada al año postparto en visita domiciliaria
Tesis doctoral: "Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile" Investigador Responsable: M. Valdés	Situaciones estresantes agudas	Escala dicotómica (0/1)	Variable registrada en el momento de toma de muestra
	Ritmo Circadiano	Hora de toma de muestra	Variable registrada en el momento de toma de muestra
	Edad del niño	Escala continua en meses cumplidos	Variable registrada en el momento de toma de muestra
	Sexo del niño	Escala dicotómica (0:Femenino/1:Masculino)	Variable registrada en el momento de toma de muestra
	Consumo de corticoides del niño	Escala dicotómica (0/1)	Variable registrada en el momento de toma de muestra
	Actividad de alfa amilasa	Escala continua U/ml	Variable registrada en el momento de toma de muestra

4.3.4. Potenciales Sesgos

Dado que las mujeres aceptaron participar voluntariamente y no existió un criterio subjetivo de selección por parte del equipo investigador, se consideró una muestra a demanda; no se utilizaron herramientas probabilísticas para la selección de la muestra. Dado el carácter voluntario de las participantes, no fue posible evitar el sesgo de autoselección.

En un estudio de cohorte, el sesgo de selección más riesgoso se relaciona con las pérdidas en el seguimiento. Para evitar los efectos de las pérdidas, se contó con un equipo que mantuvo continua comunicación con las participantes de modo de minimizar este potencial sesgo. A pesar del esfuerzo por evitar pérdidas de seguimiento, se produjo una pérdida de 30%. Con el fin conocer la robustez de los resultados, se realizó un análisis de sensibilidad en el cual los datos faltantes fueron imputados mediante imputación múltiple y luego fueron comparados con los estimadores obtenidos con la muestra de 168 participantes.

El sesgo de información se minimizó a través de la aplicación de cuestionarios previamente piloteados, que consideró preguntas estandarizadas en estudios anteriores. El sesgo de memoria se manejó a través de preguntas que dieron cuenta de una situación actual o reciente. Cuando una variable fue estimada analíticamente (laboratorio), el control de calidad asociado a la medición contribuyó a la disminución del sesgo de información.

4.4. Plan de análisis

4.4.1. Manejo de Bases de datos

Para la construcción de la base de datos se utilizó el programa Epi data, que permitió construir la máscara o maqueta del cuestionario con el fin de disminuir los errores de digitación a través de una plantilla pre-establecida. El proceso de digitación de datos se realizó en duplicado de modo de detectar errores en el llenado de los cuestionarios, así como errores en el ingreso de datos.

Cabe destacar que el proceso de digitación en duplicado y la validación de las bases de datos se realizó en etapas anteriores con los datos provenientes del estudio marco y de la unidad de investigación preliminar a esta tesis. Los datos provenientes de la toma de muestra entre los 18 y 24 meses fueron unidos con los datos generados en las etapas previas, a través de un identificador único para cada participante. La unión de las tres bases de datos se realizó con el comando *merge* del software Stata/SE versión 12.

Una vez validada la base de datos final, se verificaron datos anómalos y/o duplicados, previo al análisis estadístico.

4.4.2. Análisis estadístico

En el análisis exploratorio, las variables de naturaleza cuantitativa fueron reportadas a través de medidas de posición (promedio o mediana) y dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico). Tanto para el iAs urinario total como para el cortisol, esta información permitió considerar transformaciones logarítmicas o a variables categóricas para cumplir con el supuesto de linealidad en análisis posteriores. Con respecto a las covariables categóricas se reportaron frecuencias absolutas y relativas.

El análisis descriptivo bivariado se realizó con tablas de contingencia en caso de variables categóricas, y tablas de estadísticos resúmenes para comparar descriptivamente una variable continua respecto a una categórica. Se comparó la concentración de iAs total urinario, entre las covariables categóricas incluidos en el DAG mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para covariables dicotómicas, y la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis para covariables con más de 2 categorías. El cortisol salival fue analizado bivariadamente siguiendo la misma metodología.

Para estudiar la asociación entre la exposición a iAs durante el embarazo y la concentración de cortisol salival se desarrolló un modelo de regresión lineal múltiple con el arsénico inorgánico total urinario en cuartiles y el cortisol transformado a logaritmo natural. Los estimadores fueron ajustados por el efecto de la depresión de la madre diagnosticada por médico, reporte de embarazo estresante, estrés de la madre medido a través de su cortisol salival, e ingreso familiar como indicador de posición socioeconómica, de acuerdo al modelo teórico (DAG) (Figura 3).

Se propuso el siguiente modelo de regresión múltiple:

Modelo de Regresión Lineal Múltiple

$$\text{Ln}(\text{Cortisol salival}_{(\text{ug/dl})}) = \beta_0 + \beta_1 * Q_2 \text{ iAs} + \beta_2 * Q_3 \text{ iAs} + \beta_3 * Q_4 \text{ iAs} + \sum \beta_k * \text{Covariables} + \varepsilon$$

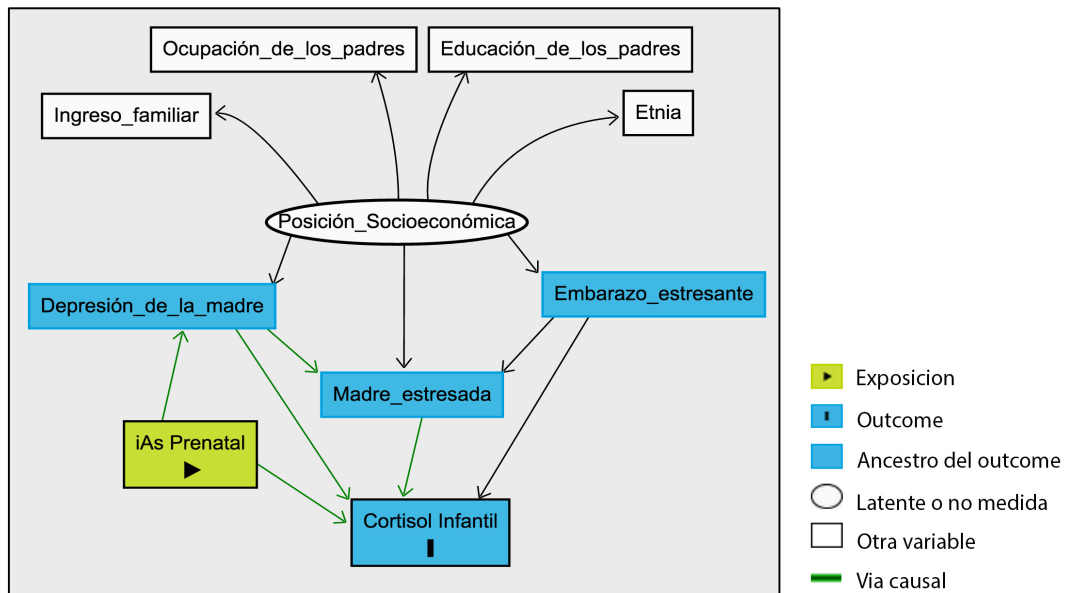
donde, Q_1 es el 1er cuartil de arsénico inorgánico urinario; Q_2 es el 2do cuartil de arsénico inorgánico urinario; Q_3 es el 3er cuartil de arsénico inorgánico urinario; Q_4 es el 4to cuartil de arsénico inorgánico urinario

Considerando la evidencia que existe sobre la relación entre la posición socioeconómica y cortisol salival, se estudió el efecto modificador del ingreso familiar como *proxy* de posición socioeconómica, mediante la estratificación según categoría de ingreso. Para definir el ingreso familiar como un modificador de efecto, se consideró un valor-p menor o igual a 0,25 para el factor de interacción generado entre la variable de exposición y la variable ingreso familiar.

Para complementar el enfoque sugerido en el grafo acíclico, se utilizó un modelo de ecuaciones estructurales que permitió estudiar el efecto directo e indirecto del arsénico inorgánico sobre el cortisol considerando como potencial mediador de efecto indirecto la depresión diagnosticada por un médico en la madre, dado que en estudios de corte transversal la prevalencia de depresión crónica se ha asociado con mayor exposición a arsénico vía agua de consumo.

Adicionalmente, el modelo de ecuaciones estructurales permitió mejorar la caracterización de la posición socioeconómica, integrando la información sobre etnia, educación y ocupación de la madre con la información del ingreso familiar, utilizado en el enfoque tradicional.

Figura 5. Modelo de ecuaciones estructurales considerando efecto directo e indirecto del arsénico sobre cortisol, ajustando por covariables presentes en el modelo teórico.



4.4.3. Criterios de plan de análisis y diagnóstico del modelo

Para el modelamiento estadístico, la variable de exposición arsénico inorgánico urinario fue transformada a cuartiles, y la variable estrés durante el embarazo fue transformada de una escala Likert de 5 categorías a una variable de dos categorías (haber sufrido estrés muy bajo o bajo durante el embarazo; haber sufrido estrés moderado o superior durante el embarazo). La transformación de la variable de respuesta cortisol salival, se realizó mediante *Box-Cox transformation*.

El criterio utilizado para realizar estas transformaciones se basó en dar cumplimiento a los supuestos teóricos que permiten utilizar el análisis con regresión lineal, es decir, se aplicaron las transformaciones que permitieron alcanzar un mejor ajuste del modelo. La evaluación del ajuste modelo de regresión lineal múltiple se realizó a través del análisis de multicolinealidad utilizando el factor de inflación de varianza, la detección de datos atípicos y normalidad de residuos, utilizando el gráfico de densidad de Kernel, gráficos Quantile-Quantile y la prueba de Shapiro-Wilk.

El ajuste de los modelos de ecuaciones estructurales se evaluó utilizando el error cuadrático medio de aproximación (RMSEA) con un valor $<0,05$, el índice de ajuste comparativo (CFI) con un valor $> 0,95$, un índice de Tucker-Lewis (TLI) con un valor $> 0,95$ y el Coeficiente de Determinación (CD) que debe ser cercano a 1. Para comparar ambos modelos, se utilizó el criterio de información Akaike y Bayesiano.

4.5. Aspectos éticos

El estudio marco, en el cual se anida la presente propuesta, fue aprobado por del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el Comité Ético y Científico de la Zona Norte. Además, se contó con la autorización del director del Servicio de Salud Municipal de Arica.

La presente propuesta cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se consideró la aplicación de un nuevo consentimiento informado a aquellas madres que asintieran participar voluntariamente.

4.6. Difusión de resultados

De los resultados de esta tesis doctoral se elaboraron dos manuscritos que serán enviados a revistas de corriente principal en el área ambiental. Los títulos de los artículos y las revistas donde serán enviados son los siguientes:

Título artículo 1: Prenatal exposure to low-level inorganic arsenic concentrations associated with salivary cortisol in infants from Arica, Chile: an exploratory approach. Revista: Environmental Research.

Título artículo 2: Structural equation modeling as a tool to study environmental exposure associated with health effects: A pathway analysis. Revista: American Journal of Epidemiology.

Adicionalmente se han presentado dos trabajos a congreso que derivan de la tesis doctoral:

- Se presentó en la 27th Conference of the International Society of Environmental Epidemiology el trabajo titulado “Is arsenic exposure during pregnancy associated with postpartum depression in women from Arica, Chile?” en formato poster.
- Se presentó en la 28th Conference of the International Society of Environmental Epidemiology el trabajo titulado “Is arsenic exposure during pregnancy associated with salivary cortisol 2-year-old children from Arica, Chile? Preliminary results” en formato poster.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

Artículo 1

Title

Prenatal exposure to low-level inorganic arsenic concentrations associated with salivary cortisol in infants from Arica, Chile: an exploratory approach

Abstract

Background

Exposure to inorganic arsenic during pregnancy has been associated with corticosterone in mice models. This association has not been studied in children exposed in utero to low concentrations of inorganic arsenic.

Methods

Cohort study. Pregnant women were recruited from public health centers at Arica, Chile in 2013. During the 2nd trimester, a urine sample was collected for the measurement of inorganic arsenic metabolites. Cortisol was measured in 168 infants with a saliva sample that was collected between 18 and 24 months of age. Multiple regression was used to explore the adjusted association between prenatal arsenic on cortisol.

Results

The median of urinary inorganic arsenic concentration in pregnant women was 14.1 µg/L (IQR: 10.4-21.7), while salivary cortisol concentration in children was 0.17 µg/L (IQR: 0.11-0.38). In children of families in the highest income stratum (> 614 USD/month), arsenic exposure was associated with salivary cortisol. Those children belonging to the third quartile of arsenic exposure had -0.769 units ($p= 0.045$) of the natural logarithm of salivary cortisol in comparison with the first quartile.

Conclusion

In this sample, prenatal exposure to arsenic (third quartile) was associated with salivary cortisol only in infants belonging to the highest income strata (> 614 USD).

Key words: Arsenic; Chile; Cohort Study; Environmental Exposure; Pregnant Women

Introduction

Environmental exposure to inorganic arsenic derived from dietary sources such as drinking water or food, continues to be a public health concern for countries with natural arsenic pollution (Cantor and Lubin, 2007). Inorganic arsenic tops the priority list proposed by The Agency Toxic Substances and Disease Register due to the frequency of occurrence worldwide, toxicity and the potential for human exposure (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015). There is strong evidence that indicates that high-level inorganic arsenic exposure is associated with different types of cancer as well as cardiovascular diseases, skin lesions and higher mortality in the general population (Yunus *et al.* 2011). Recent data also suggests that low-levels of arsenic exposure are also associated with long-term outcomes in adults (Tsuji *et al.* 2014; Farzan *et al.* 2015) and children (Tsuji *et al.* 2015)

According to the Developmental Origins of Health and Disease paradigm (DOHaD), arsenic exposure during critical periods, such as fetal developmental stages, should be considered an environmental stressor. Observations in laboratory animal models have shown that arsenic exposure causes disruption of early developmental processes and thereby increase the susceptibility to disease/dysfunction later in life (Grandjean, P. *et al.* 2015). In mice models, arsenic exposure during critical fetal developmental stages has been associated with changes in neuroarchitecture that reduce the expression of glucocorticoid receptors in the hippocampus ($P < 0.001$) and disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) (Martinez-Finley *et al.* 2011). Arsenic exposure was also linked to increased corticosterone levels ($P = 0.03$) and increased spatial-learning and memory impairment when compared to control mice ($P < 0.0001$) (Martinez *et al.* 2008; Martinez-Finley *et al.* 2009).

Despite experimental validity, there is scarce evidence regarding the effect of low-level arsenic exposure during pregnancy and its impact on future human neurodevelopment. Different stressors affect cortisol levels, the human analogue of corticosterone. However, human cortisol could demonstrate similar behavior to that observed in animal models, after controlling for these stressors. Even though low-level inorganic arsenic exposure may not have any evident short-term effects, it could be associated with a higher susceptibility when dealing with stressful situations according to the DOHaD paradigm. Stress response and failure to manage stress during childhood might be a consequence of environmental exposure during pregnancy and could be associated with mental disorders developed later in adulthood (Brinkel *et al.* 2009). In Chile, the prevalence of psychiatric disorders in children is 22.5% (Vicente *et al.* 2012), which is higher than the pooled prevalence of mental health worldwide (13.4%) (Polanczyk *et al.* 2015). A successful strategy to tackle mental disorders should consider environmental pollution as a risk factor, especially during pregnancy.

Arica is a northern city in Chile with natural and anthropogenic arsenic pollution (Biblioteca Del Congreso Nacional De Chile, 2009). A current study shows a broad low-level inorganic arsenic variability in this area (Burgos *et al.* 2017), which allows for the assessment of the effect of arsenic exposure during pregnancy in the mother and their infant's cortisol. The main objective of this study was to estimate the association between inorganic arsenic exposure during pregnancy and salivary cortisol in a cohort of infants, considering potential confounders.

Methods

Design and Study Population

The study design was a cohort study that used a sampling frame comprised by 591 women who were attended at public health centers in Arica, Chile. Every woman was visited at her home; a convenience sample of 242 pregnant women between their 13th and 26th week of pregnancy accepted to participate. Only those women with multiple gestation were excluded. Participation was voluntary and women who agreed to participate signed an informed consent, according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. In the consent, pregnant women agreed to complete a questionnaire to compile socio-demographic data, morbidity history and provide biological samples. The Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Chile approved the protocol of this study (Project N° 069-2014).

Data Collection

Maternal Urine collection

Women were asked to provide a urine sample to assess inorganic arsenic exposure between June and October 2013.

Using pre-labeled urine containers, the urine samples were taken at home, stored at -10°C, and sent to the Laboratory Trace Metals Core of Columbia University (New York, USA). Urine inorganic arsenic was determined using high-performance liquid chromatography with Inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS); in this case, the HPLC was used to separate each of the metabolites and quantify the relative proportions (and amounts) of each urinary metabolite: arsenocholine, arsenobetaine, arsenate (AsV), arsenite (AsIII), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA). Total urinary inorganic arsenic was considered as the sum of AsV, AsIII, MMA and DMA.

Salivary cortisol collection and analysis in infants.

Families were contacted when infants were between 18 and 24 months of age. We targeted this age range to ensure the establishment of the cortisol circadian rhythm. Fieldwork was conducted between July and October 2015. Trained staff took salivary

samples from infants between 9 a.m. and 12 p.m. at home, in a visit previously arranged by phone call. A swab was placed inside the mouth of each infant for 60 seconds to be transported afterwards in a swap storage tube to be frozen at -20 °C, according to the manufacturer's collection protocol (Salimetrics USA). The same procedure was applied to mothers.

Each salivary sample was thawed and centrifuged before analysis. Cortisol concentration was measured using an expanded range high sensitivity salivary cortisol ELISA Salimetric kit. Sample analyses were performed at the Biotechnology Laboratory of Bernardo O'Higgins University (Santiago, Chile); all samples were measured in duplicates.

A previous pilot study was performed to determine salivary cortisol variability in infants of the same age group and the reproducibility of the sampling and analytical technique. The distribution of salivary cortisol was asymmetric with a median of 0.15 µg/dL (Min: 0.073 Max: 0.266). Duplicate sampling showed a rho index of concordance of 0.73 and duplicate analytical technique presented rho index of concordance of 0.96.

Covariates

The theoretical relation between arsenic exposure during pregnancy and salivary cortisol in infants is based on previous literature, taking into account ancestors, descendants and intermediate variables (Figure 1).

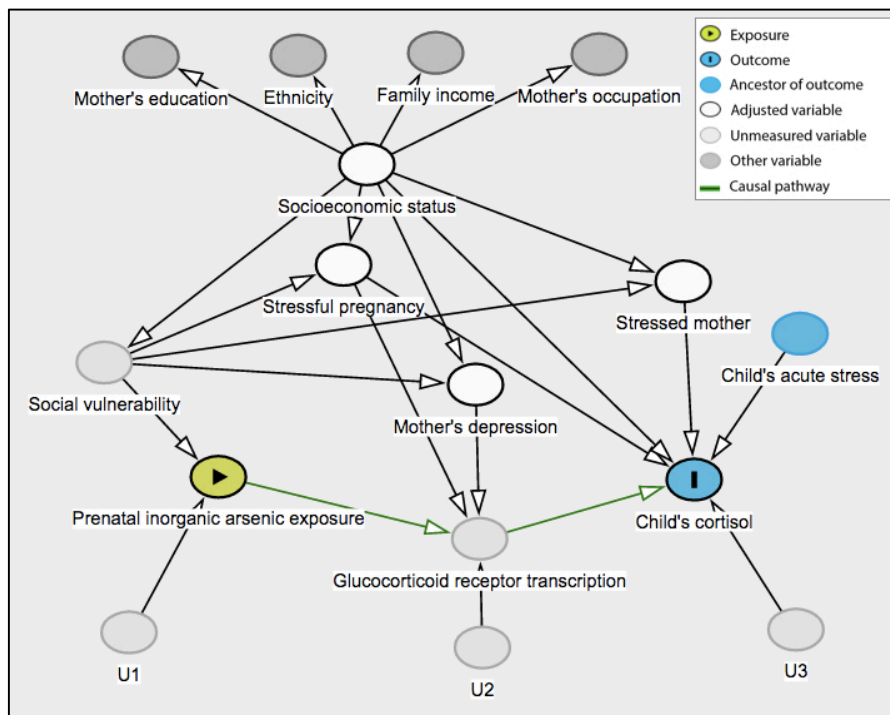


Figure 1. The DAG shows the possible relationships between the prenatal arsenic exposure and salivary cortisol. The arsenic exposure during pregnancy reduces the transcription of

glucocorticoid receptors in the HPA axis; the cortisol concentration increases consequently. However, there are other factors related to the cortisol control that could be considered as back-door variables, letting to link the cortisol variable with the arsenic exposure.

Sociodemographic information such as monthly family income (< 307 USD, 307 – 614 USD, >614 USD), mother's educational level (years of education), ethnicity (mixed-race, Aymara or other) and occupation (student, housewife, remunerated job) were obtained via face-to-face questionnaires during the first visit when pregnant women were recruited. Pregnancy-related data such as reporting of having a stressful pregnancy (very low or low, moderate, high or very high) and depression, diagnosed by a medical doctor (yes/no), were obtained using a standardized questionnaire after childbirth.

During the sampling collection, we gathered additional data including the time of collection, sex and age of infants, corticoid use (both the infant and the mother in the case if she was breast-feeding), α -amylase activity (U/mL) as a biomarker for acute stress in infants (Nater and Rohleder, 2009) and stress levels in mothers measured through salivary cortisol.

Statistical analysis

Univariate analysis was done using central descriptive estimators, dispersion measures for continuous variables (median and interquartile range) and frequency tables for categorical variables. Bivariate analyses for covariates and urinary inorganic arsenic or salivary cortisol were performed using non-parametric tests (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test) given their right-skewed distribution.

Scatter-plot was used to analyze graphically the relationship between urinary inorganic arsenic and salivary cortisol. Given the non-linear relationship between both variables, arsenic exposure was quartile-transformed while salivary cortisol was natural logarithm-transformed before running the models.

To estimate the effect of urinary inorganic arsenic exposure on salivary cortisol, a multiple linear regression analysis was conducted, controlling by back-door covariates according to the directed acyclic graph (DAG) as mother's measured stress, income as a socioeconomic position status, stressful pregnancy and depression diagnosed by a medical doctor.

The evidence in this field of research indicates that cortisol-influencing factors in infants are closely related to cortisol-influencing factors in mothers. Therefore, stressful situations that affect the mother could also have an impact on the infant, via the mother. Stress during pregnancy, depression and current exposure to stress were considered in the DAG as well.

According to the conceptual framework of social determinants of inequalities on health, socioeconomic status is linked with the exposure to poor working conditions, work overload, poor material conditions, or social vulnerability linked to ethnicity and

education level (Solar and Irwin, 2010). Kumari's studies have shown that people exposed to stressful social situations change their cortisol concentration profile (Kumari, Badrick, Chandola, *et al.* 2009; Kumari, Badrick, Ferrie, *et al.* 2009; Kumari *et al.* 2010). In children, a useful proxy for socioeconomic status is family income, which was considered as a modifier of the relationship between arsenic exposure and cortisol concentration.

The model evaluation was done through multicollinearity analysis using variance inflation factor, outlier detection through Cook's distance and leverage against residual squared plot, and normality residual analysis using kernel density plot, Shapiro-Wilk test and quantile-quantile plots.

The sensitivity analysis approach was applied to evaluate how robust the results were in taking into account dropouts during the follow-up meetings. Those observations without natural logarithm of salivary cortisol data were imputed using multiple imputation procedures, and descriptive comparisons were performed between linear regression coefficients from data with and without imputation.

We used Epidata Entry v3.1 to create the database. Data was entered in duplicate to avoid typing errors, allowing us to carry out the quality control. The statistical package used to perform the analyses was Stata IC v12.0.

Results

Characteristics of participants

Between 2013 and 2015 we completed data collection for 168 infants out of 242 pregnant women. Seventy-four participants dropped out during the follow-up meeting (Figure 2).

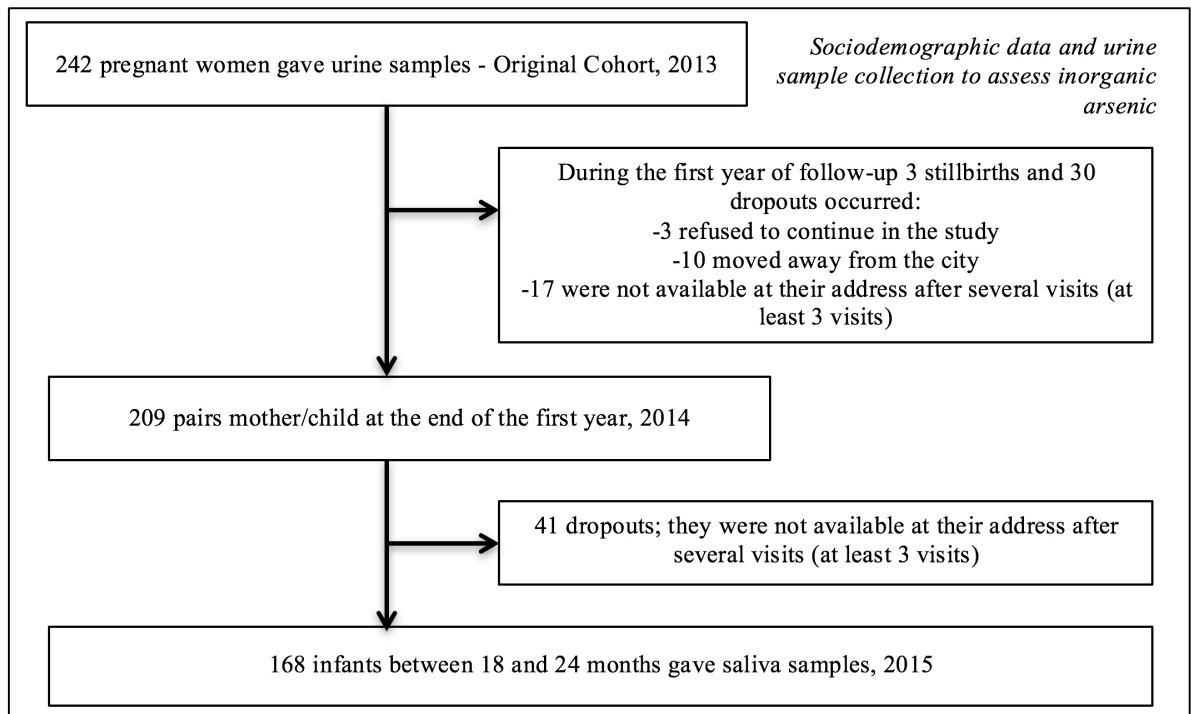


Figure 2. Sample Flow Chart

The characteristics of the participants are shown in Table 1. The median and interquartile range of α -amylase activity as a proxy of acute stress in infants were 94.16 U/mL and 91.44 U/mL respectively; cortisol levels in mothers used as a proxy for stress had a median of 0.226 $\mu\text{g/dL}$ and interquartile range 0.322 $\mu\text{g/dL}$. No participants were using corticosteroid drugs at the time of saliva sampling.

Table 1. Baseline Characteristics of 168 Participants, Arica 2013

	n (%)	Median (IQR*)
Infant Age (months)		21 (20-23)
Infant sex		
Women	85 (50.9)	
Men	82 (49.1)	
Gestational age (weeks)		39 (39-40)
Maternal age (years)		25 (20.5-30)
Maternal education (years of total education)		12 (12-14)
Maternal Ethnicity		
Mixed-raced	113 (67.7)	
Aymara	47 (28.1)	
Other	7 (4.2)	
Family Income		
< 307 USD	63 (38.2)	
307 – 614 USD	70 (42.4)	
> 614 USD	32 (19.4)	
Maternal Occupation		
Student	40 (25.0)	
Housewife	76 (47.5)	
Remunerated job	44 (27.5)	
Stressful pregnancy		
Very low or low	54 (33.1)	
Moderate	84 (51.5)	
High or very high	25 (15.4)	
Maternal depression diagnosed by medical doctor		
Yes	37 (22.7)	
No	126 (77.3)	

*Interquartile Range: P_{25} - P_{75}

Urinary inorganic arsenic in pregnancy

The distribution of urinary iAs was asymmetric with positive bias, with a median of 14.1 µg/L (Interquartile Range, IQR: 10.4-21.7). The distribution of each arsenical species was also asymmetric with positive bias. The most prevalent species was DMA (Table 2).

Table 2. Arsenical species assessed in 168 pregnant women, Arica 2013

Arsenical species	Proportion (%)	Median (IQR*) µg/L
iAs III	5.0	0.7 (0.3-1.1)
iAs V	3.4	0.4 (0.05-0.7)
DMA	82.7	12 (8.5-18.1)
MMA	8.9	1.3 (0.8-1.8)

*Interquartile Range: P_{25} - P_{75}

According to the occupational cut-off for arsenic exposure (19), 14 samples (8.3%) were above 35 µg/L.

Family income, occupation, ethnicity, stressful pregnancy and depression diagnosed by a medical doctor, were not associated with urinary inorganic arsenic concentration (Table 3).

Table 3. Urinary Inorganic Arsenic Exposure During Pregnancy by Covariates (Arica 2013) and Child's Salivary Cortisol (Arica 2015) Concentration by Covariates in 168 Pregnant women and 168 Infants

Covariates	iAs µg/L Median (IQR*)	<i>P</i>	Cortisol µg/dL Median (IQR*)	<i>P</i>
Family Income				
< 307 USD	14.6 (10.4-21.7)	0.923	0.174 (0.121-0.392)	0.515
307 - 614 USD	14.0 (10.5-23.0)		0.145 (0.098-0.365)	
> 614 USD	14.4 (11.5-20.8)		0.196 (0.117-0.402)	
Ethnicity				
Mixed-race	13.8 (10.4-20.9)	0.395	0.179 (0.115-0.382)	0.240
Aymara	15.4 (11.1-22.6)		0.170 (0.104-0.408)	
Other	18.3 (9.3-28.3)		0.127 (0.104-0.150)	
Occupation				
Student	14.2 (10.0-21.7)	0.755	0.181 (0.111-0.439)	0.743
Housewife	13.9 (11.8-20.8)		0.165 (0.092-0.426)	
Remunerated job	15.0 (10.5-23.0)		0.167 (0.118-0.329)	
Stressful pregnancy				
Very low or low	14.5 (10.4-25.5)	0.955	0.165 (0.113-0.320)	0.219
Moderate	14.6 (10.5-20.2)		0.247 (0.111-0.641)	
High or very high	12.8 (10.0-16.0)		0.156 (0.102-0.248)	
Depression diagnosed by medical doctor				
Yes	14.7 (10.8-26.2)	0.452	0.172 (0.124-0.382)	0.383
No	14.1 (10.0-21.0)		0.164 (0.110-0.337)	

*Interquartile Range: P_{25} - P_{75}

Kendall's Rank Correlation test showed that the mother's education level ($P=0.960$), cortisol in mothers ($P=0.732$) and α -amylase activity ($P= 0.273$) were independent of urinary inorganic arsenic.

Salivary cortisol in infants

Salivary cortisol distribution was skewed with a positive bias. The median was 0.17 $\mu\text{g/dL}$ (IQR: 0.11-0.38) with a minimum and maximum values of 0.0096 $\mu\text{g/dL}$ and 1.3 $\mu\text{g/dL}$, respectively.

The α -amylase activity, as a biomarker for acute stress in infants ($P = 0.196$), and educational level in mothers ($P = 0.683$) were independent of cortisol concentration, according to the Kendall's Rank Correlation.

However, cortisol levels in mothers (used as a biomarker for stress) was linearly associated with cortisol levels in infants with a Pearson's correlation coefficient of 0.791 ($P < 0.0001$). Family income, ethnicity, occupation, stressful pregnancy and depression diagnosed by medical doctor were not associated to salivary cortisol (Table 3).

Association between urinary inorganic arsenic and salivary cortisol in infants

The relationship between urinary iAs and salivary cortisol in infants was not linear. Therefore, iAs was categorized into quartiles while salivary cortisol was natural logarithm-transformed (Figure 3).

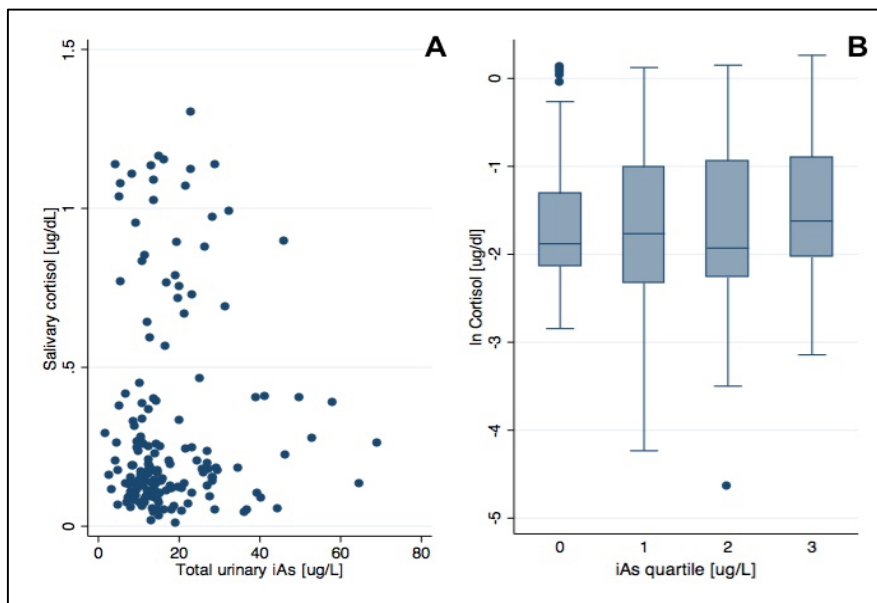


Figure 3. The relationship between urinary inorganic arsenic concentration during pregnancy and salivary cortisol in the infants between 18 and 24 Months, Arica 2015. The urinary iAs and the salivary cortisol were not linearly related (Figure 3A); urinary iAs quartiles and the natural logarithm-transformed salivary cortisol show a slight positive tendency (Figure 3B).

In the multiple linear regression analyses, the relationship between urinary iAs and salivary cortisol was modified by family income (Table 4). Both subgroups, infants belonging to < 307 USD family income strata and between 307 to 614 USD family income strata, urinary iAs were not associated to salivary cortisol. 3 outliers were detected using Cook's distance and leverage against residual squared plot.

Table 4. Adjusted Linear Regression Model Between Urinary Inorganic Arsenic Concentration and Natural Logarithm of Salivary Cortisol in Each Strata of Family Income, Arica 2015

	Coef.	95% CI		P
Income < 307 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.178	-0.584	0.228	0.383
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.094	-0.464	0.277	0.614
>21.70 – 69.3 µg/L	0.271	-0.131	0.672	0.182
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	0.086	-0.271	0.443	0.629
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	0.009	-0.318	0.336	0.955
High or very high	0.010	-0.471	0.492	0.965
Mother's cortisol (µg/dL)	2.246	1.774	2.718	<0.001
Constant	-2.401	-2.778	-2.023	<0.001
Income 307 - 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	0.111	-0.416	0.637	0.676
>14.08 – 21.70 µg/L	0.013	-0.585	0.559	0.964
>21.70 – 69.3 µg/L	0.137	-0.399	0.672	0.611
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	-0.005	-0.430	0.419	0.980
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.358	-0.789	0.072	0.101
High or very high	-0.180	-0.762	0.401	0.537

Mother's cortisol (µg/dL)	1.968	1.363	2.573	<0.001
Constant	-2.184	-2.738	-1.629	<0.001
Income > 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.052	-0.809	0.705	0.889
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.769	-1.538	-0.001	0.045
>21.70 – 69.3 µg/L	-0.232	-0.641	1.107	0.587
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	-0.435	-1.274	0.403	0.294
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.010	-0.695	0.674	0.975
High or very high	0.090	-0.639	0.820	0.800
Mother's cortisol (µg/dL)	1.873	1.007	2.739	<0.001
Constant	-1.911	-2.729	-1.094	<0.001

Infants belonging to family income strata > 614 USD and who were exposed to a concentration between 14.08 and 21.70 µg/L of iAs during pregnancy had -0.769 µg/dL of natural logarithm of salivary cortisol than those exposed to 2.05 to 10.43 µg/L of iAs during pregnancy (P = 0.045).

In addition, the three stratified models showed a strong association between natural logarithm of salivary cortisol in infants and salivary cortisol in mothers; both variables had a positive correlation. The models for each family income strata did not have multicollinearity according to the variance inflation factor; residual means were close to zero, and residual distributions did not reject normality (Figure 4).

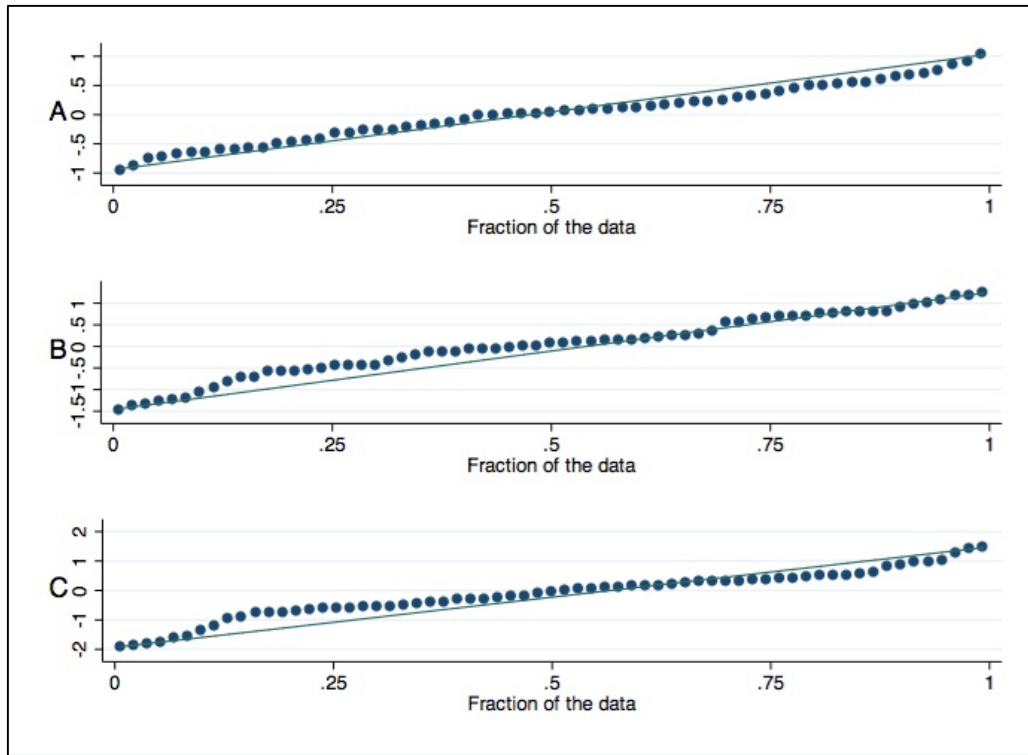


Figure 4. A: The quantil-quantil plot to the family income stratum <307 USD; B: the quantil-quantil plot to the family income stratum 307-614 USD; C: the quantil-quantil plot to the family income stratum >614 USD.

Sensitivity analysis

Regarding the 74 non-participants, the median of urinary inorganic arsenic concentration was slightly higher than in the participants. The distributions of covariates which included years of education, ethnicity, family income, occupation, stressful pregnancy, depression diagnosed by a medical doctor, child's sex, gestational age and mother's age, were similar between participants and non-participants (Annex 1). Salivary cortisol with imputed data showed a median of 0.18 $\mu\text{g/dL}$ and the interquartile range was 0.213 $\mu\text{g/dL}$. The results obtained in the stratified models with imputed data were consistent with the results without imputations (Annex 2).

Discussion

Under an exploratory approach, we found an association between the third quartile of urinary iAs concentration and natural logarithm of salivary cortisol in infants belonging to the > 614 USD income strata. The median concentration of urinary inorganic arsenic in pregnant women was 14.1 µg/L (Min: 2.05, Max: 69.3) while the median salivary cortisol concentration in infants was 0.17 µg/dL (Min: 0.0096 µg/dL; Max: 1.3 µg/dL).

The median of urinary iAs reported in this study was low, which is consistent with similar studies that have explored the effects of intrauterine exposure to low concentrations of arsenic. In the epidemiological study of Davis *et al.* (Davis *et al.* 2015), the median was 3.1 µg/L with a range from 0.0 to 22.0 µg/L and excluded the organic arsenical species from the analysis to evaluate the effect of arsenic exposure during pregnancy and fetal growth. Murine models have shown that exposure to 10 µg/L of iAs through water consumption during and after pregnancy causes adverse health effects in mothers and their offspring, especially in their neurodevelopment and adaptation to stress conditions (Kozul-Horvath *et al.* 2012). We used urinary iAs concentration as a proxy of exposure with the assumption that it is highly correlated with intrauterine exposure and continuous throughout pregnancy.

The range of salivary cortisol values obtained in this study is broader than the values suggested by the manufacturer (Aardal and Holm). This could be explained by the difference between our sample and the sample analyzed to determine reference values. Reference values are established from children whose ages ranged from 2.5 to 5.5 years, older than our participants. According to Watamura's study, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis maturation is still developing during the third year (Watamura *et al.* 2004), therefore cortisol levels vary by age. Age-dependent cortisol levels were confirmed by the Tamayo's results (Tamayo *et al.* 2016); younger children had higher basal cortisol levels throughout the day. In our study, cortisol concentration did not vary according to age because participants were of similar ages; regarding the cortisol concentrations, even though we take into account the results obtained in previous literature, we are not able to define low or high levels of cortisol beyond our study.

To study the effect of urinary iAs measured during pregnancy, it was necessary to stratify our sample into categories (monthly family income quartiles). The association between the third quartile of urinary iAs (with regard to the first quartile) and the natural logarithm of salivary cortisol in infants occurred at low concentrations (>14.08 – 21.70 µg/L), but only in the group of infants belonging to the > 614 USD income strata. According to this result, arsenic effect does not explain cortisol variability by itself, but the effect depends on income and appears after the study of interactions in our sample. We could hypothesize that cortisol variability in infants belonging to lower family income

strata (monthly family income < 614 USD) is explained by different factors than those included in the statistical model; social factors may add more cortisol variability than in the case of higher income strata infants, where environmental factors play a more important role. This is the first study that has explored this association in human; there is experimental evidence about the association between arsenic exposure and corticosterone. Even though, we need more evidence to confirm our hypothesis and our results in a probabilistic and higher sample.

Social stressors seem to be powerful factors that explain the variability of cortisol according to literature that likely affect both the mother and the child. Perhaps environmental pollutants such as arsenic could explain cortisol variability under special conditions, when social factors are not relevant (Gunnar and Donzella, 2002). Even with strong evidence in experimental studies, replicating the same results in humans would appear to be difficult considering the measured and unmeasured social factors in our sample.

Environmental exposures have an important influence in infants, generating short and long-term effects. According to the DOHaD approach, periods such as pregnancy and early childhood are critical in the development of multiple pathologies during youth and adulthood (Grandjean, Philippe *et al.* 2015).

This represents a permanent challenge for cities such as Arica, which should concentrate their efforts on reducing population exposure while at the same time, conducting surveillance aimed at early research on health effects (Uauy *et al.* 2011). Studying primary events in early childhood after prenatal exposures are consistent with the DOHaD approach, and particularly in the case of Arica, contributes to generate evidence for the poly-metal surveillance program.

Strengths and limitations

The directed acyclic graph approach is one of the strengths of this study, taking into account the causal network underlying the effect of arsenic on salivary cortisol. Under this approach, the development of statistical models prevents overfitting and can recognize selection bias and confounding variables produced by backdoor open paths (Howards *et al.* 2007).

The second strength was the use of a collecting and measuring technique that is highly reproducible. The collection method allowed us to have enough specimens in all participants (500 μ L of saliva) and it shows low variability between collecting duplicates ($\rho = 0.73$) and analytical duplicates ($\rho = 0.96$). This implies that the results are reliable considering the reliability of the pre-analytical and analytical phase. It is worth

mentioning that both exposure and outcome variables were measured on continuous scales through high-precision analytical techniques, avoiding misclassification bias in the two main variables of this study.

Complementarily, we used α -amylase activity to study acute stressful situations that could be affecting cortisol concentration. Both biomarkers are related to stress response and previous studies have shown that cortisol concentration often do not correlate with α -amylase (Nater and Rohleder, 2009) because they respond to different stimuli and involve different physiological mechanisms. Our results are consistent with the literature, showing that α -amylase activity was not associated with salivary cortisol concentration.

There is no reference range for salivary cortisol concentration for infants of this age and few studies have assessed it. We conducted a pilot study to calibrate the analytical technique and to know the salivary cortisol concentration in a similar population. However, we cannot assure that our results are conclusive in regard to the cortisol range.

The dropouts that occurred during the follow-up represent a limitation in this study. Even when the sensitivity analysis with imputed data did not show big differences from the results for the 168 participants, our results could be more accurate with the complete data. With our sample size, the estimated coefficient's error by multiple linear regression was 0.113, taking into account the 80% of confidence that the estimated error was not higher than specified.

To perform multiple imputations, we assumed that the missing values were at least at random (MAR), given that the distributions of covariates was similar in participants and non-participants, and that the losses were caused by reasons not associated with the study.

Since some of these covariates were based on self-report, there could be induced measurement and misclassification bias (Argimon and Jiménez, 2013). However, both were non-differential biases, occurring independently of the level of exposure to arsenic.

Socioeconomic status is a latent variable in our study but we used family income as a proxy, which could introduce misclassification bias. Moreover, our sample is very homogeneous regarding income, with little variability. Taking into account the structural equation approach (Sánchez *et al.* 2005), it would be interesting to compare the estimates obtained in this study with those obtained considering ethnicity, education, occupation and income as factors behind the socioeconomic status construct, including

greater variability. These variables are included in the conceptual framework for action on the social determinants of health to tackle health inequities (Solar and Irwin, 2010).

Conclusion

This is the first study to estimate the association between prenatal concentration of inorganic arsenic, as a proxy of intrauterine exposure, and the concentration of cortisol, as an effective biomarker of arsenic exposure in infants aged 18 to 24 months. In this sample of infants whose mothers are public health center users, prenatal exposure to arsenic was associated with salivary cortisol (third quartile of inorganic arsenic), only in infants belonging the highest income strata (> 614 USD), after the interaction analysis. We need more evidence to precise these exploratory and preliminary results.

Although the level of exposure to inorganic arsenic in this cohort is low, evidence shows that the current challenge is to study exposures to low concentrations in critical periods of development. In humans, it is necessary to investigate the effects of low concentrations of arsenic, as well as other pollutants, during intrauterine life and early childhood given their impact on medium and long-term health outcomes. Biomarkers such as cortisol are a fundamental part of environmental research given its contribution to our understanding of disease pathways and in the identification of susceptible subgroups.

Annex 1. Characteristics of non-participants

Covariates	Non participants (n=74)
Total urinary iAs $\mu\text{g/L}$ (Median; IQR)	16.3; 12.1
Years of education (Median; IQR)	12; 1
Ethnicity (% Mixed-race)	60.0
Family Income (% <\$200000 CLP)	47.2
Occupation (% Housewife)	54.7
Stressful pregnancy (%)	81.8
Depression diagnosed by medical doctor (%)	18.2
Sex (% women)	47.3
Gestational age (Median; IQR)	39; 2
Mother's age (Median; IQR)	26; 8

Annex 2. Coefficients of the multiple regression including imputed data

	Coef.	95%CI		P
Income < 307 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.167	-0.519	0.186	0.350
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.068	-0.386	0.250	0.672
>21.70 – 69.3 µg/L	0.120	-0.221	0.461	0.485
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	-0.021	-0.347	0.304	0.898
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.019	-0.315	0.277	0.897
High or very high	0.108	-0.262	0.477	0.564
Mother's cortisol (µg/dL)	2.229	1.798	2.659	<0.001
Constant	-2.278	-2.616	-1.939	<0.001
Income 307 - 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	0.108	-0.322	0.539	0.619
>14.08 – 21.70 µg/L	0.014	-0.428	0.456	0.951
>21.70 – 69.3 µg/L	0.072	-0.366	0.510	0.745
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	0.015	-0.314	0.344	0.928
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.224	-0.567	0.120	0.199
High or very high	-0.157	-0.643	0.329	0.523
Mother's cortisol (µg/dL)	1.863	1.341	2.385	<0.001
Constant	-2.135	-2.587	-1.683	<0.001
Income > 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.159	-0.766	0.446	0.596
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.601	-1.169	-0.033	0.039
>21.70 – 69.3 µg/L	-0.050	-0.714	0.613	0.878
Depression diagnosed by M.D.				

No	Ref.			
Yes	-0.509	-1.244	0.225	0.168
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.183	-0.685	0.319	0.464
High or very high	0.054	-0.531	0.693	0.853
Mother's cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	1.705	0.978	2.432	<0.001
Constant	-1.663	-2.296	-1.029	<0.001

References

AARDAL, E.; HOLM, A. C. Cortisol in saliva--reference ranges and relation to cortisol in serum. n. 0939-4974 (Print), 19961024 DCOM- 19961024

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. The Priority List of Hazardous Substances That Will Be the Candidates for Toxicological Profiles. Available from: www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/atsdr_2015_spl_support_document.pdf. (Accessed on 10.03.2016). 2015.

ARGIMON, J. M.; JIMÉNEZ, J. Sesgos. In: (Ed.). **Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica**. Barcelona, España: ELSEVIER, 2013. chap. 29, p.272-280. ISBN 978-84-8086-941-6.

BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE. Historia de la Ley N°20590. Establece un programa de intervención en zonas con presencia de polimetales en la comuna de Arica. (Accessed on 10.03.2016). 2009.

BRINKEL, J.; KHAN, M. H.; KRAEMER, A. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. **Int J Environ Res Public Health**, v. 6, n. 5, p. 1609-19, May 2009. ISSN 1660-4601 (Electronic) 1660-4601 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543409> >.

BURGOS, S. et al. Cognitive Performance Among Cohorts Of Children Exposed To A Waste Disposal Site Containing Lead in Chile. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 27, n. 2, p. 117-125, 2017.

CANTOR, K. P.; LUBIN, J. H. Arsenic, internal cancers, and issues in inference from studies of low-level exposures in human populations. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 222, n. 3, p. 252-7, Aug 1 2007. ISSN 0041-008X (Print) 0041-008X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382983> >.

DAVIS, M. A. et al. Preliminary analysis of in utero low-level arsenic exposure and fetal growth using biometric measurements extracted from fetal ultrasound reports. **Environ Health**, v. 14, p. 12, Mar 30 2015. ISSN 1476-069X (Electronic) 1476-069X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971349> >.

FARZAN, S. F. et al. Risk of death from cardiovascular disease associated with low-level arsenic exposure among long-term smokers in a US population-based study. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 287, n. 2, p. 93-7, Sep 1 2015. ISSN 1096-0333

(Electronic) 0041-008X (Linking). Available from: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048586> >.

GRANDJEAN, P. et al. Life-Long Implications of Developmental Exposure to Environmental Stressors: New Perspectives. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3408-3415, 2015. ISSN 0013-7227 1945-7170.

GRANDJEAN, P. et al. Life-Long Implications of Developmental Exposure to Environmental Stressors: New Perspectives. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3408-15, Oct 2015. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Available from: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241067> >.

GUNNAR, M. R.; DONZELLA, B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 199-220, 2002.

HOWARDS, P. P.; SCHISTERMAN, E. F.; HEAGERTY, P. J. Potential Confounding by Exposure History and Prior Outcomes. **Epidemiology**, v. 18, n. 5, p. 544-551, 2007. ISSN 1044-3983.

KOZUL-HORVATH, C. D. et al. Effects of low-dose drinking water arsenic on mouse fetal and postnatal growth and development. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e38249, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Available from: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693606> >.

KUMARI, M. et al. Cortisol secretion and fatigue: associations in a community based cohort. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1476-85, Nov 2009. ISSN 1873-3360 (Electronic) 0306-4530 (Linking). Available from: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497676> >.

KUMARI, M. et al. Measures of social position and cortisol secretion in an aging population: findings from the Whitehall II study. **Psychosom Med**, v. 72, n. 1, p. 27-34, Jan 2010. ISSN 1534-7796 (Electronic) 0033-3174 (Linking). Available from: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995885> >.

KUMARI, M. et al. Self-reported sleep duration and sleep disturbance are independently associated with cortisol secretion in the Whitehall II study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 12, p. 4801-9, Dec 2009. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850688> >.

MARTINEZ, E. J. et al. Moderate perinatal arsenic exposure alters neuroendocrine markers associated with depression and increases depressive-like behaviors in adult mouse offspring. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 4, p. 647-55, Jul 2008. ISSN 0161-813X (Print) 0161-813X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573533> >.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; ALI, A. M.; ALLAN, A. M. Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 2, p. 271-7, Dec 2009. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751756> >.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. et al. Reduced expression of MAPK/ERK genes in perinatal arsenic-exposed offspring induced by glucocorticoid receptor deficits. **Neurotoxicol Teratol**, v. 33, n. 5, p. 530-7, Sep-Oct 2011. ISSN 1872-9738 (Electronic) 0892-0362 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784148> >.

NATER, U. M.; ROHLEDER, N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 4, p. 486-96, May 2009. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249160> .

POLANCZYK, G. V. et al. Annual research review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 56, n. 3, p. 345-65, Mar 2015. ISSN 1469-7610 (Electronic) 0021-9630 (Linking). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25649325> .

SALIMETRICS USA. **Expanded Range High Sensitivity Salivary Cortisol. Enzyme Immunoassay Kit Protocol.** Available from: www.salimetrics.com/assets/documents/1-3002n.pdf. (**Accessed on 10.27.2016**).

SÁNCHEZ, B. N. et al. Structural Equation Models. **Journal of the American Statistical Association**, v. 100, n. 472, p. 1443-1455, 2005. ISSN 0162-1459 1537-274X.

SOLAR, O.; IRWIN, A. **A conceptual framework for action on the social determinants of health. Social Determinants of Health Discussion Paper 2 (Policy and Practice).** 2010

TAMAYO, Y. O. M. et al. Longitudinal associations of age and prenatal lead exposure on cortisol secretion of 12-24 month-old infants from Mexico City. **Environ Health**, v. 15, p. 41, Feb 29 2016. ISSN 1476-069X (Electronic) 1476-069X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26926653> >.

TSUJI, J. S. et al. Low-level arsenic exposure and developmental neurotoxicity in children: A systematic review and risk assessment. **Toxicology**, v. 337, p. 91-107, Nov 4 2015. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388044> >.

TSUJI, J. S. et al. Association of low-level arsenic exposure in drinking water with cardiovascular disease: a systematic review and risk assessment. **Toxicology**, v. 323, p. 78-94, Sep 2 2014. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953689> >.

UAUY, R.; KAIN, J.; CORVALAN, C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6_Suppl, p. 1759S-1764S, 2011. ISSN 0002-91651938-3207.

VICENTE, B. et al. Prevalence of child and adolescent mental disorders in Chile: a community epidemiological study. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 53, n. 10, p. 1026-35, Oct 2012. ISSN 1469-7610 (Electronic) 0021-9630 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22646991> >.

WATAMURA, S. E. et al. Developmental changes in baseline cortisol activity in early childhood: relations with napping and effortful control. **Dev Psychobiol**, v. 45, n. 3, p. 125-33, Nov 2004. ISSN 0012-1630 (Print) 0012-1630 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505801> >.

YUNUS, M. et al. Arsenic exposure and adverse health effects: a review of recent findings from arsenic and health studies in Matlab, Bangladesh. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 27, n. 9, p. 371-6, Sep 2011. ISSN 1607-551X (Print) 1607-551X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914523> >.

Artículo 2

Title

Structural equation modeling as a tool to study environmental exposure associated with health effects: an exploratory pathway analysis

Abstract

Structural equation modeling (SEM) allows studying several pathways simultaneously. The purpose of this manuscript was to illustrate the utility of SEM in studying relationships in epidemiology, using an example from arsenic exposure during pregnancy and concentrations of salivary cortisol in infants from Arica, Chile. A cohort study of pregnant women recruited from public health care centers in Arica, Chile, was carried out during 2013. Sociodemographic information and urine samples to assess inorganic arsenic were collected during the 2nd trimester of pregnancy. Saliva samples were collected to assess cortisol in the infants between 18 and 24 months. Structural equation models were used to estimate indirect and direct effects of prenatal arsenic exposure in the children's salivary cortisol concentration. The logarithm of inorganic arsenic was neither associated directly ($\beta_{\text{adj}} = 0.085$, 95%CI -0.124, 0.294) nor indirectly ($\beta_{\text{adj}} = 0.003$; 95%CI -0.015, 0.021) with the logarithm of salivary cortisol. However, the logarithm of mother's cortisol was associated directly with the logarithm of children's cortisol ($\beta_{\text{adj}} = 0.545$; 95%CI 0.399, 0.691). In this example, SEM was useful to assess direct and indirect arsenic effects, considering a latent ancestor as a proxy of socioeconomic status and a mediator as mother's depression for the indirect effect.

Key words: Epidemiologic methods; Path analysis; Path diagram; Statistical Model; Structural equation model

Introduction

Structural equation modeling (SEM) does not refer to a single concept but instead refers to a set of tools known as principal component factor analysis, covariance structure modelling, or pathway analysis among others names (Kline, 2011). Since the 80s, SEM has been applied mainly in social sciences (Anderson, 1987) with an approach that allows quantifying the role of different factors in the construction of non-measurable variables; with SEM, social researchers could assess concepts with multiple dimension in just one (Sánchez *et al.*, 2005; Violato and Hecker, 2007).

According to authors such as Gamborg (Gamborg *et al.*, 2011) or Schreiber (Schreiber *et al.*, 2006) this methodology could be adequate for epidemiology, considering the opportunity to analyze simultaneously several pathways, which cannot be performed by traditional statistical methods.

Arlinghaus *et al.* (Arlinghaus *et al.*, 2012) applied a SEM approach to study fatigue-related risk factors for occupational injury; their findings indicated that SEM was useful not only examining dichotomous outcomes, but also it offered a theoretical model that can incorporate time. However, the SEM utility could be vanished by its stronger assumptions as VanderWheele mentioned in his commentary about Arlinghaus' study (Vanderweele, 2012). Doing a SEM, it is possible to increase in statistical power according Arlinghaus; the price of this is the theoretical and statistical assumptions you must accomplish for each variable pointed by an arrow.

In environmental epidemiology, recent studies have used this technique to evaluate the impact of one pollutant on health; considering more than one health effect, unmeasured variables and confounders in the disease pathways (Baja *et al.*, 2013); or different pollutants acting concurrently in a spatial context (Fontanella *et al.*, 2007).

Our main purpose is to illustrate the utility of SEM in studying relationships in epidemiology, especially when they may be confounded and affected by unmeasured and latent variables, by an example from arsenic exposure during pregnancy and concentrations of salivary cortisol in infants from Arica, Chile.

Application of SEM to study the association between prenatal arsenic exposure and salivary cortisol in infants

Arsenic exposure has been associated with several pregnancy and perinatal outcomes (Tsuji *et al.*, 2014; Farzan *et al.*, 2015; Tsuji *et al.*, 2015); authors such as Fei (Fei *et al.*, 2013), Kile (Kile *et al.*, 2016) and Davis (Davis *et al.*, 2014) applied SEM to study the association between prenatal arsenic exposure and intercorrelated perinatal outcomes that may lie on the same pathway, in quest of preventing overadjustment bias.

In mice models (Martinez-Finley *et al.*, 2011), low-level arsenic exposure causes less expression of glucocorticoids receptors in the hippocampus, and subsequently increased corticosterone levels. In humans, the cortisol is the analogous of corticosterone and it could be considered as potential biomarker for arsenic effects.

Several social factors have been highlighted as predictors of cortisol (Eller *et al.*; Kunz-Ebrecht *et al.*, 2004; Badrick *et al.*, 2008). In children, the liaison with the mother is critical (Martinez-Torteya *et al.*). Bearing in mind a previous study showing that prenatal arsenic exposure was associated with salivary cortisol in children in a subpopulation (Valdés *et al.*, 2017), the SEM should be useful to explore not only the direct effect of arsenic exposure over cortisol concentrations in infants but also to assess indirect effects through mediators. SEM would also allow considering the role of a latent SES variable, seized from partial social factors.

Methods

Sample

This study used the data from the project “Prenatal exposure to low-level inorganic arsenic concentrations associated with salivary cortisol in infants from Arica, Chile”. Arica, the northernmost city in Chile is recognized as an arsenic-polluted setting. Briefly, all pregnant women attending public health centers in Arica (Chile) who were in second trimester of pregnancy were invited to participate voluntarily. For participants, it was mandatory to sign an informed consent and complete a questionnaire to record sociodemographic data as well as to provide urine samples to assess inorganic arsenic species. Recruitment and data collection were conducted between June and October of 2013.

During the first year after delivery, a standardized questionnaire was given to register information pertaining to depression diagnosed by a medical doctor and self-report of stressful pregnancy. Between months 18 to 24 after birth, saliva samples from mothers and children were collected in a home visit to assess cortisol.

The Institutional Review Boards of the Faculty of Medicine of the University of Chile approved this project (Project N° 069-2014). A detailed description of the study is provided elsewhere (Valdés Salgado, 2016; Valdés *et al.*, 2017).

Variables

Prenatal inorganic arsenic exposure.

Inorganic arsenic types were determined using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS) in the Laboratory Trace Metals Core of the University of Columbia (New York, USA) (Gamble *et al.*). The urine inorganic arsenic (iAs) was considered as the sum of arsenate (AsV), arsenite (AsIII), monomethyl arsenic (MMA) and dimethyl arsenic (DMA) with a detection limit of 0.1 µg/L for each species. Arsenical species below the detection limit were assigned a value equal to 0.05 µg/L.

Salivary cortisol outcome.

Cortisol concentration was measured at the Biotechnology Laboratory of Bernardo O'Higgins University (Santiago, Chile) using the expanded range high sensitivity salivary cortisol ELISA Salimetric kit. All samples were measured in duplicates and none of them were below the detection limit (0.007 µg/dL).

Covariates.

To estimate the path analysis, the included covariates were based on literature (Figure 1). Sociodemographic information included monthly family income (<307 USD, 307 - 613 USD, 614 – 920 USD, 921 – 1229 USD, >1229 USD), mother's educational level (years of education), ethnicity (mixed-race, Aymara/other indigenous ethnicities) and occupation (student, housewife or remunerated job) and these were used to estimate socioeconomic status (SES) as latent variable. Depression diagnosed by a medical doctor (yes/no) and self-report of stressful pregnancy (very low and low /moderate/high or very high) was recorded during the postpartum period.

Statistical analysis

Descriptive statistics were computed for all variables. Given the skewed distribution of total urinary iAs and salivary cortisol, both were transformed to natural logarithm before analyses; others quantitative variables were log-transformed to accomplish the statistical assumptions of SEM.

The initial SEM was developed including only the direct effect of ln(iAs). It was named direct effect model. It also included the indirect effect of SES on ln(child's cortisol) through the following mediators: mother's depression, stressful pregnancy and ln(mother's cortisol) as stress biomarker. Additionally, the model included the indirect effects of stress during pregnancy and depression of the mother through the stress

mediator represented by the natural logarithm of the mother's cortisol (Figure 1a). A second model was explored including an indirect effect of $\ln(iAs)$ through mother's depression diagnosed by a medical doctor. It was named total effects model (Figure 1b).

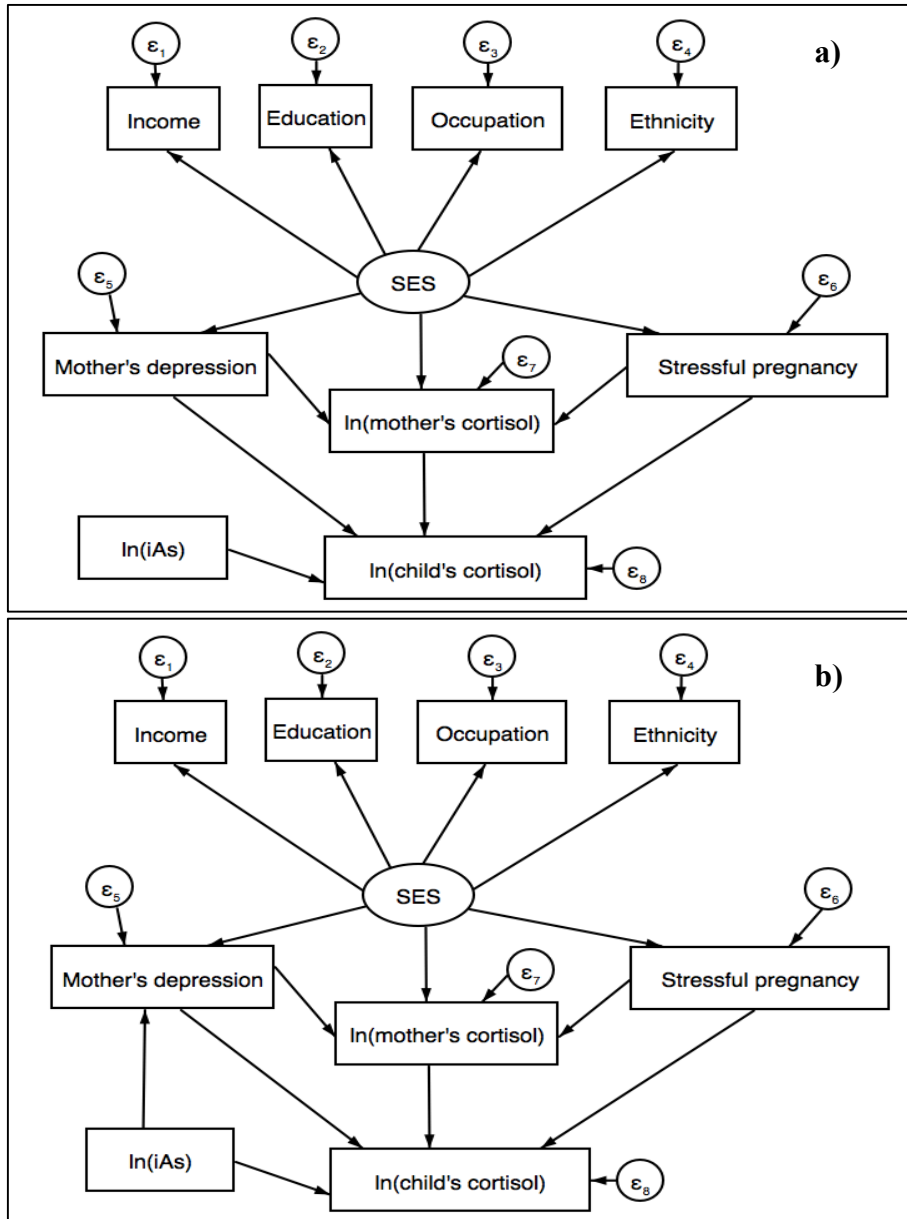


Figure 1. a) Direct effect model. b) Total effect model.

Models fit were evaluated using the root mean square error of approximation (RMSEA) with a value <0.05, the comparative fit index (CFI) with a value >0.95, a Tucker-Lewis index (TLI) with a value >0.95 and the Coefficient of determination (CD) which must be close to 1. To compare both models (direct and total effect model), we used Akaike and Bayesian information criterion. The statistical analyses were done using the statistical package Stata IC v14.0.

Results

Characteristics of mothers and children

The characteristics of 168 pairs of mothers and children are shown in Table 1. Most mothers were young (51.3% were ≤ 25 y), single, Chilean, self-reported as mixed-race, with 12 years of education, equivalent to complete high school; main reported occupation was housewife who largely registered the lowest income level (≤ 613 USD). Most pregnancies were considered to be moderately stressful while most women were not diagnosed as depressive by a physician.

The α - amylase activity, a biomarker of acute stressful state, had asymmetric distributions for mothers and children with medians of 107.56 U/mL (Min: 2.09; Max: 309.88) and 94.16 U/mL (Min: 1.88; Max: 179.08), respectively.

The distribution of each arsenical species detected in mother's urine sample was asymmetric with positive bias as well as the distribution of total urinary iAs, whose median was 14.1 $\mu\text{g/L}$ (Min: 2.1; Max: 69.3).

Salivary cortisol distribution was positively skewed for children and their mothers, with a median of 0.17 $\mu\text{g/dL}$ (Min: 0.0096; Max: 1.3) and 0.23 $\mu\text{g/dL}$ (Min: 0.0124; Max: 1.15), respectively.

Table 1. Characteristics of Mothers, Pregnancies, Deliveries and Children. Arica 2013-2015

	n (%)	Median (IQR)
Mother's characteristics		
Maternal age (years)		25 (9.5)
Civil Status		
Married	38 (23.0)	
Partner	33 (20.0)	
Single	92 (55.8)	
Divorced	2 (1.2)	

	Nationality		
	Chilean	155 (92.3)	
	Other	13 (7.7)	
	Maternal Ethnicity		
	Mixed-race	113 (67.7)	
	Aymara/Other	47 (28.1)	
	Maternal education (years)		12 (2)
	Family Income		
	< 307 USD	63 (38.2)	
	307 – 613 USD	70 (42.4)	
	614 – 920 USD	16 (9.7)	
	921 – 1229 USD	19 (6.1)	
	> \$1229 USD	6 (3.6)	
	Maternal Occupation		
	Student	40 (25.0)	
	Housewife	76 (47.5)	
	Remunerated job	44 (27.5)	
Pregnancy and delivery information	Stressful pregnancy		
	Very low or low	54 (33.1)	
	Moderate	84 (51.5)	
	High or very high	25 (15.4)	
	Maternal depression diagnosed by medical doctor		
	Yes	37 (22.7)	
	No	126 (77.3)	
	Gestational age (weeks)		39 (1)
	Delivery		
	Caesarean birth	83 (65.3)	
	Natural birth	44 (34.7)	
Infant's characteristics	Infant Age (months)		21 (2)
	Infant sex		
	Women	85 (50.9)	
	Men	82 (49.1)	

Structural Equation Modeling

The direct effect model (Figure 2), did not support the existence of a direct effect of ln(iAs) on ln(children's cortisol). Only the ln(mother's cortisol) had a statistically

significant positive effect on $\ln(\text{child's cortisol})$. The association between $\ln(\text{mother's cortisol})$ and its ancestors were not statistically significant (Table 2).

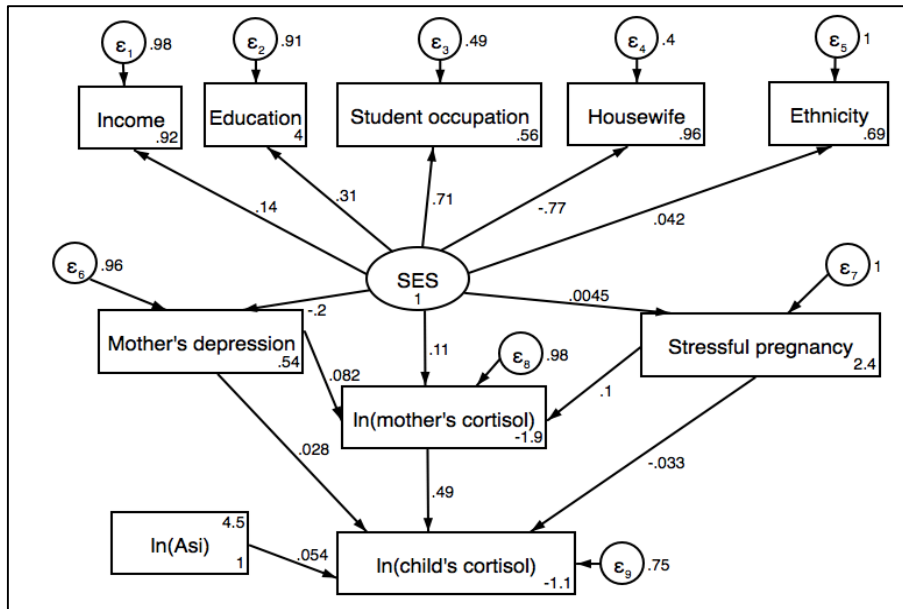


Figure 2. Standardized path coefficient for direct effect model

Table 2. Direct Effect Model of $\ln(\text{iAs})$ on $\ln(\text{child's cortisol})$

	Direct Effect 95% CI		Indirect Effect 95% CI		Total Effect 95% CI	
$\ln(\text{iAs}) \mu\text{g/L}$	0.085	-0.124, 0.294	NP		0.085	-0.124, 0.294
$\ln(\text{mother's cortisol}) \mu\text{g/dL}$	0.545	0.399, 0.691	NP		0.545	0.399, 0.691
Mother's depression	0.064	-0.240, 0.368	0.092	-0.087, 0.271	0.156	-0.199, 0.511
Moderate or high stress during pregnancy	-0.088	-0.443, 0.267	0.130	-0.072, 0.333	0.043	-0.367, 0.452
Socioeconomic status	NP		0.254	-0.466, 0.974	0.254	-0.466, 0.974

*NP indicates no path

In the total effect model (Figure 3), $\ln(iAs)$ had neither a direct nor indirect effect on $\ln(\text{child's cortisol})$; in this model, the direct effect of $\ln(\text{mother's cortisol})$ on $\ln(\text{child's cortisol})$ is maintained (Table 3).

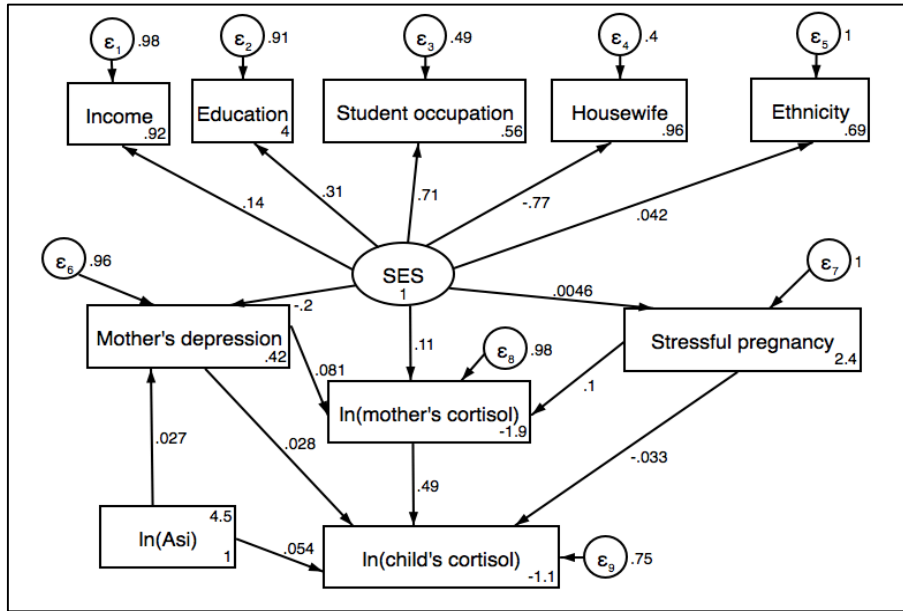


Figure 3. Standardized path coefficient for total effects model

Table 3. Total Effect Model of $\ln(iAs)$ on $\ln(\text{child's cortisol})$

	Direct Effect 95% CI		Indirect Effect 95% CI		Total Effect 95% CI	
$\ln(iAs)$ $\mu\text{g/L}$	0.085	-0.124, 0.294	0.003	-0.015, 0.021	0.088	-0.121, 0.297
$\ln(\text{mother's cortisol})$ $\mu\text{g/dL}$	0.545	0.399, 0.691	NP		0.545	0.399, 0.691
Mother's depression Moderate or high stress during pregnancy	0.063	-0.241, 0.367	0.091	-0.087, 0.270	0.154	-0.201, 0.510
Socioeconomic status	-0.088	-0.443, 0.267	0.130	-0.072, 0.333	0.042	-0.367, 0.452
	NP		0.254	-0.464, 0.971	0.254	-0.464, 0.971

*NP indicates no path

According to the fit index, the fit of both models was good (Table 4). However, the model without the ln(iAs) indirect effect seems to be better, according to Akaike and Bayesian information criterion.

Table 4. Fit Indices for both Structural Equation Models.

Index	ln(iAs) direct effect model	ln(iAs) direct and indirect effects model	Good fit criteria
χ^2 P value	0.326	0.286	>0.05
Root mean square error of approximation (RMSEA)	0.024	0.028	<0.05 (even <0.06)
Akaike's information criterion (AIC)	3384.7	3386.6	It is used to compare between models
Bayesian information criterion (BIC)	3490.9	3495.9	It is used to compare between models
Comparative fit index	0.973	0.965	>0.95
Tucker-Lewis index	0.961	0.948	>0.95
Coefficient of determination	0.731	0.731	Close to 1

Discussion

The application of SEM to explore the association between prenatal arsenic exposure and cortisol, allow us to complement the results obtained after a traditional statistical analysis (linear regression). We were interested in studying different effects and pathways across a set of variables; in this exercise, the $\ln(\text{iAs})$ was not associated with $\ln(\text{child's cortisol})$ directly or indirectly. Both SEMs (direct and total model) obtained similar coefficients, but the direct model gained in parsimony under Akaike and Bayesian's criteria, indicating a better fit.

We also found a strong association between child and mother's cortisol in both SEMs which seems plausible given the many factors including habits or stressful experiences that affect both mother and child simultaneously (Khoury *et al.*). The rest of the studied associations showed some tendencies, but they did not reach statistical significance. For instance, we found a positive tendency between the latent variable SES with education and ethnicity (Galobardes *et al.*, 2006a; b), showing that subjects who reported to be students had better SES than the ones with remunerated jobs and these rated better than those recounted as housewives; mixed-race implied a better SES compared to Aymara/other indigenous ethnicities. Additionally, SES showed an inverse relationship with depression and a positive relation with stressful. These results were inconclusive and we need more evidence to improve our interpretations; however, we can rise some hypothesis about our theoretical model for future studies.

In a previous study (Valdés *et al.*, 2017), the traditional approach allowed finding an inverse relationship between arsenic and cortisol in children of families in the highest monthly family income of our sample (>614 USD), adjusting by other covariates (mother's depression, mother's cortisol, and stressful pregnancy); in this setting, it was evaluated the modification effect of the family income as a proxy of SES. Conveniently with SEM approach, we were able to consider SES as a latent variable taking in account not only the income, but also the ethnicity, occupation and education. If we had done the traditional linear regression, it would not have been possible to add all these variables due to the collinearity among them. However, it was not possible to test the modification effect of the SES using SEM because the sample size was not enough to estimate all coefficients.

Using SEM approach, we applied a statistical tool that allowed us to consider the biological mechanism explored by experimental studies and take into account the social factors that are involved in the cortisol's control in the epidemiological literature. As VanderWeele mentioned in his commentary about Arlinghaus' study, we set our pathway diagrams based on the previous evidence to perform conservative analyses and not only do a graphical representation of our research question. We were focused

in studying a wide range of different effects and pathways and the SEM was a useful alternative for exploring environmental events with hypothesis-generating purposes.

Certainly, our study had many limitations as self-reported variables, small sample size and the lack of interpretability of our results, after the mathematical transformations. Some of our variables were self-reported what would introduce bias; it is likely to be a non-differential bias that affects, regardless of the exposure. On the other hand, if we had had a larger sample size, we could have improved the precision of our results and studied the modification effect of the SES to compare with the traditional approach (linear regression). Regarding interpretability, to express our results in natural logarithm units could be unfamiliar for some readers. Nevertheless, we prefer to lose interpretability and try to accomplish SEMs assumptions.

Conclusion

The SEM application studying the association between arsenic exposure during pregnancy and concentrations of salivary cortisol in infants was useful to explore direct and indirect effects of the exposure, considering indirect effects through mediators, and social factors. In this sample, the prenatal exposure to arsenic was associated neither directly nor indirectly with salivary cortisol based on the theoretical model.

Our results differed from a traditional approach; however more studies are needed to precise the magnitude of the association between arsenic exposure and cortisol concentration. It is also needed a higher sample size including the modification effect of socioeconomic status.

We tried to deal with the statistical assumptions lying under SEM application, to utilize this tool for exploring different effects and pathways across an environmental phenomenon and generate new hypothesis which complemented a traditional approach.

References

ANDERSON, J. G. Structural Equation Models in the Social and Behavioral Sciences: Model Building. **Child Development**, v. 58, n. 1, p. 49-64, 1987. ISSN 0009-3920 1467-8624.

ARLINGHAUS, A. et al. A structural equation modeling approach to fatigue-related risk factors for occupational injury. **Am J Epidemiol**, v. 176, n. 7, p. 597-607, Oct 01 2012. ISSN 1476-6256 (Electronic) 0002-9262 (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956514> >.

BADRICK, E. et al. The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 3, p. 750-7, Mar 2008. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073316> >.

BAJA, E. S. et al. Structural equation modeling of the inflammatory response to traffic air pollution. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v. 23, n. 3, p. 268-74, May-Jun 2013. ISSN 1559-064X (Electronic) 1559-0631 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23232970> >.

DAVIS, M. A. et al. Infant toenails as a biomarker of in utero arsenic exposure. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v. 24, n. 5, p. 467-73, Sep-Oct 2014. ISSN 1559-064X (Electronic) 1559-0631 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896769> >.

ELLER, N. H.; NETTERSTROM B FAU - HANSEN, A. M.; HANSEN, A. M. Psychosocial factors at home and at work and levels of salivary cortisol. n. 0301-0511 (Print), 20061113 DCOM- 20070228

FARZAN, S. F. et al. Risk of death from cardiovascular disease associated with low-level arsenic exposure among long-term smokers in a US population-based study. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 287, n. 2, p. 93-7, Sep 1 2015. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048586> >.

FEI, D. L. et al. Association between In Utero arsenic exposure, placental gene expression, and infant birth weight: a US birth cohort study. **Environ Health**, v. 12, p. 58, Jul 16 2013. ISSN 1476-069X (Electronic) 1476-069X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866971> >.

FONTANELLA, L.; IPPOLITI, L.; VALENTINI, P. Environmental pollution analysis by dynamic structural equation models. **Environmetrics**, v. 18, n. 3, p. 265-283, 2007. ISSN 11804009099095X.

GALOBARDES, B. et al. Indicators of socioeconomic position (part 1). **J Epidemiol Community Health**, v. 60, n. 1, p. 7-12, Jan 2006a. ISSN 0143-005X (Print) 0143-005X (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361448> >.

Indicators of socioeconomic position (part 2). **J Epidemiol Community Health**, v. 60, n. 2, p. 95-101, Feb 2006b. ISSN 0143-005X (Print) 0143-005X (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415256> >.

GAMBLE, M. V. et al. Folic acid supplementation lowers blood arsenic. n. 0002-9165 (Print), 20071008 DCOM- 20071129

GAMBORG, M. et al. Dynamic path analysis in life-course epidemiology. **Am J Epidemiol**, v. 173, n. 10, p. 1131-9, May 15 2011. ISSN 1476-6256 (Electronic) 0002-9262 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415031> >.

KHOURY, J. E. et al. Maternal self-reported depressive symptoms and maternal cortisol levels interact to predict infant cortisol levels. n. 1097-0355 (Electronic), 20160321 DCOM- 20161213

KILE, M. L. et al. Estimating Effects of Arsenic Exposure During Pregnancy on Perinatal Outcomes in a Bangladeshi Cohort. **Epidemiology**, v. 27, n. 2, p. 173-81, Mar 2016. ISSN 1531-5487 (Electronic) 1044-3983 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583609> >.

KLINE, R. B. Part I. Concept and Tools. In: KENNY, D. e LITTLE, T. (Ed.). **Principles and Practice of Structural Equation Modeling. 3rd ed.**, 2011.

KUNZ-EBRECHT, S. R.; KIRSCHBAUM, C.; STEPTOE, A. Work stress, socioeconomic status and neuroendocrine activation over the working day. **Soc Sci Med**, v. 58, n. 8, p. 1523-30, Apr 2004. ISSN 0277-9536 (Print) 0277-9536 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759695>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277953603003472> >.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. et al. Reduced expression of MAPK/ERK genes in perinatal arsenic-exposed offspring induced by glucocorticoid receptor deficits. **Neurotoxicol Teratol**, v. 33, n. 5, p. 530-7, Sep-Oct 2011. ISSN 1872-9738 (Electronic) 0892-0362 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784148> >

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3183307/pdf/nihms312099.pdf> >.

MARTINEZ-TORTEYA, C. et al. Maternal parenting predicts infant biobehavioral regulation among women with a history of childhood maltreatment. n. 1469-2198 (Electronic), 20140409 DCOM- 20141219

SÁNCHEZ, B. N. et al. Structural Equation Models. **Journal of the American Statistical Association**, v. 100, n. 472, p. 1443-1455, 2005. ISSN 0162-1459 1537-274X.

SCHREIBER, J. et al. Reporting Structural Equation Modeling and Confirmatory Factor Analysis Results: A Review. **The Journal of Educational Research**, v. 99, n. 6, p. 323-337, 2006.

TSUJI, J. S. et al. Low-level arsenic exposure and developmental neurotoxicity in children: A systematic review and risk assessment. **Toxicology**, v. 337, p. 91-107, Nov 4 2015. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388044> >.

TSUJI, J. S. et al. Association of low-level arsenic exposure in drinking water with cardiovascular disease: a systematic review and risk assessment. **Toxicology**, v. 323, p. 78-94, Sep 2 2014. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953689> >.

VALDÉS, M. et al. Prenatal exposure to low-level inorganic arsenic concentrations associated with salivary cortisol in infants from Arica, Chile. **[Unpublished]**, 2017.

VALDÉS SALGADO, M. **Prenatal exposure to low-level inorganic arsenic concentration associated with salivary cortisol in infant from Arica, Chile**. 2016. (Ph D). Escuela de Salud Pública. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago.

VANDERWEELE, T. J. Invited commentary: structural equation models and epidemiologic analysis. **Am J Epidemiol**, v. 176, n. 7, p. 608-12, Oct 01 2012. ISSN 1476-6256 (Electronic) 0002-9262 (Linking). Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956513> >.

VIOLATO, C.; HECKER, K. G. How to use structural equation modeling in medical education research: a brief guide. **Teach Learn Med**, v. 19, n. 4, p. 362-71, Fall 2007. ISSN 1040-1334 (Print) 1040-1334 (Linking). Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935466> >.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

Las exposiciones ambientales tienen gran influencia en los niños, condicionando efectos a mediano y largo plazo. De acuerdo al enfoque del origen temprano de las enfermedades, periodos como el embarazo y la primera infancia son críticos en el desarrollo de múltiples patologías (136). La Organización Mundial de la Salud señala que alrededor de 3 millones de niños mueren a causa de exposiciones ambientales (137) y cada día se genera más evidencia que da cuenta del tributo que tiene el ambiente en la morbilidad infantil así como el desarrollo de una mayor susceptibilidad a enfermedades crónicas en etapa adulta.

El desarrollo económico trae consigo externalidades negativas que exponen a la población infantil a nuevos y antiguos peligros; esto es un desafío permanente que aumenta paralelamente con la carga de enfermedad y con ello el uso de recursos que son escasos, pero altamente demandados. De alguna forma, orientar esfuerzos a la pesquisa de mecanismos biológicos que favorecen el deterioro de la salud en etapas tempranas, es una forma de mitigar el daño que ocasiona la polución (138).

La contaminación por arsénico es un reto actual y continuo para países con contaminación natural y antropogénica; la asociación con enfermedades cardiovasculares y cáncer ha sido estudiada en países que experimentan altas concentraciones de exposición. No obstante, a esto se suma el interés por los efectos ocasionados a bajas dosis (139). Teniendo en cuenta que la principal vía de exposición a este contaminante son los alimentos y el agua de consumo, la reducción total de su exposición se hace compleja (140).

En la búsqueda de mecanismos biológicos mediante los cuales el arsénico y especies tóxicas de éste causan eventos deletéreos, los modelos toxicológicos han sido fundamentales. La evidencia experimental ha permitido descubrir los eventos tempranos causados por el arsénico a nivel molecular, tales como los efectos epigenéticos; con esto el paradigma del valor umbral para efectos no cancerígenos parece necesitar precisiones y reconocerse como un consenso normativo que vela por el principio precautorio (57).

Es claro que las condiciones controladas de los estudios experimentales, no son extrapolables a estudios epidemiológicos. Los humanos, permanentemente expuestos a mezclas de contaminantes y a determinantes sociales que afectan su salud, difieren en fisiología, nivel de organización y funciones de dosis-respuesta respecto de otras especies. Sin embargo, la plausibilidad biológica descubierta a nivel de ciencias básicas, favorece el estudio de cambios fisiológicos previos al desarrollo de patologías que podrían ser prevenibles con la identificación de biomarcadores tempranos.

Los estudios desarrollados en esta tesis doctoral están enfocados en explorar los efectos tempranos del arsénico en salud infantil, considerando la exposición durante la vida intrauterina. En ambos casos, se propuso un biomarcador de efecto temprano como el cortisol, basado en estudios toxicológicos.

A pesar de que la inferencia causal en epidemiología perinatal requiere de un marco metodológico que considere dificultades como la presencia de confusores o variables no medidas, los esfuerzos analíticos explorados en ambos estudios son consistentes con la aplicación de herramientas que previenen potenciales sesgos; el uso de grafos acíclicos dirigidos o los sistemas de ecuaciones múltiples permitieron tomar en cuenta la red causal subyacente a la pregunta de investigación de esta Tesis.

La metodología y el plan de análisis propuestos parecen ser los más apropiados para estudiar la exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico y su efecto sobre la concentración de cortisol en infantes. Sin embargo, el potencial error inducido por la medición de las covariables incluidas en el modelo teórico sugerido, es una limitación que debe considerarse al interpretar los resultados obtenidos. De cierta forma, la mejora en el nivel de medición de estas covariables, la incorporación de variables no medidas y el aumento del tamaño muestral, son aspectos perfectibles que en futuras investigaciones podrían precisar estos resultados.

En salud ambiental, los estudios toxicológicos y epidemiológicos son la base que da sustento a las distintas normativas. Los efectos en la morbimortalidad son la evidencia prioritaria para el análisis de riesgo y la gestión de regulaciones que protegen la salud poblacional. Sin embargo, la identificación de biomarcadores y factores de susceptibilidad son una necesidad constante que permite entender la evolución de un proceso patológico y con ello los acontecimientos viables de ser prevenidos.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta cohorte de infantes, la exposición a arsénico inorgánico durante la gestación se asocia con cambios de la concentración de cortisol salival. Este efecto sólo se produce en el subgrupo perteneciente al estrato de ingreso familiar más alto; de lo anterior se deduce que el arsénico no explica la variabilidad del cortisol salival en todo el grupo, sino que su efecto es modificado por el nivel socioeconómico y sin esta estratificación su efecto no se detecta.

Bajo el enfoque de ecuaciones estructurales, no se encontró efecto directo ni a través de potenciales mediadores. Es probable que se requiera mayor tamaño muestral para obtener todos los estimadores establecidos en el modelo teórico con mayor precisión.

ANEXO 1. Característica de los 74 no participantes

Covariates	Non participants (n=74)
Total urinary iAs $\mu\text{g/L}$ (Median; IQR)	16.3; 12.1
Years of education (Median; IQR)	12; 1
Ethnicity (% Mixed-race)	60.0
Family Income (% <\$200000 CLP)	47.2
Occupation (% Housewife)	54.7
Stressful pregnancy (%)	81.8
Depression diagnosed by medical doctor (%)	18.2
Sex (% women)	47.3
Gestational age (Median; IQR)	39; 2
Mother's age (Median; IQR)	26; 8

ANEXO 2. Coeficientes de regresión múltiple para los tres estratos de ingreso familiar considerando los datos imputados

	Coef.	IC 95%		P
Income < 307 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.167	-0.519	0.186	0.350
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.068	-0.386	0.250	0.672
>21.70 – 69.3 µg/L	0.120	-0.221	0.461	0.485
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	-0.021	-0.347	0.304	0.898
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.019	-0.315	0.277	0.897
High or very high	0.108	-0.262	0.477	0.564
Mother's cortisol (µg/dL)	2.229	1.798	2.659	<0.001
Constant	-2.278	-2.616	-1.939	<0.001
Income 307 - 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	0.108	-0.322	0.539	0.619
>14.08 – 21.70 µg/L	0.014	-0.428	0.456	0.951
>21.70 – 69.3 µg/L	0.072	-0.366	0.510	0.745
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	0.015	-0.314	0.344	0.928
Stressful pregnancy				
Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.224	-0.567	0.120	0.199
High or very high	-0.157	-0.643	0.329	0.523
Mother's cortisol (µg/dL)	1.863	1.341	2.385	<0.001
Constant	-2.135	-2.587	-1.683	<0.001
Income > 614 USD				
iAs quartile				
2.05 – 10.43 µg/L	Ref.			
>10.43 – 14.08 µg/L	-0.159	-0.766	0.446	0.596
>14.08 – 21.70 µg/L	-0.601	-1.169	-0.033	0.039
>21.70 – 69.3 µg/L	-0.050	-0.714	0.613	0.878
Depression diagnosed by M.D.				
No	Ref.			
Yes	-0.509	-1.244	0.225	0.168
Stressful pregnancy				

Very low or low	Ref.			
Moderate	-0.183	-0.685	0.319	0.464
High or very high	0.054	-0.531	0.693	0.853
Mother's cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	1.705	0.978	2.432	<0.001
Constant	-1.663	-2.296	-1.029	<0.001

ANEXO 3. Manual de Toma de Muestra

“Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile”

PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA EN ADULTOS

Introducción

El tubo doble fase Salivette es el método de recogida de saliva ideal para la determinación de cortisol y es considerado por muchos investigadores como el estándar de oro en la recogida de este tipo muestras, ya que proporciona una muestra pura y permite almacenar las muestras para pruebas futuras.

Aunque la recolección de saliva, en realidad puede parecer una tarea sucia que desalienta a algunas personas a la donación de saliva, este método es simple, limpio e incluye todo lo necesario para reducir el desorden, aumentar el cumplimiento, acelerar el periodo de recolección, y preserva la integridad de la muestra. Este sistema de recogida de saliva está listo para usarse en el campo o en el sitio de recolección de las muestras y consta de 4 piezas: Una tapa a presión, una tórula de algodón y dos tubos. Un tubo externo y tubo interno que está dentro del tubo más grande y el cual contiene la tórula de algodón.

Ventajas

- Fácil aplicación.
- Almacenamiento individual, hermético y con tapa a presión.
- Listo para usar.
- Colección directamente en tubos que pueden congelarse.
- Construido de material inocuo para la salud.
- Elimina el tiempo y el material necesario para transferir espécimen a viales de almacenamiento en el laboratorio.

Precauciones

- Utilice únicamente según las indicaciones; Use cada recolector de saliva sólo una vez.
- Nunca utilice este dispositivo para los niños menores de tres (3) años, o adultos con alto riesgo de atragantarse.

Procedimiento

Previo al procedimiento:

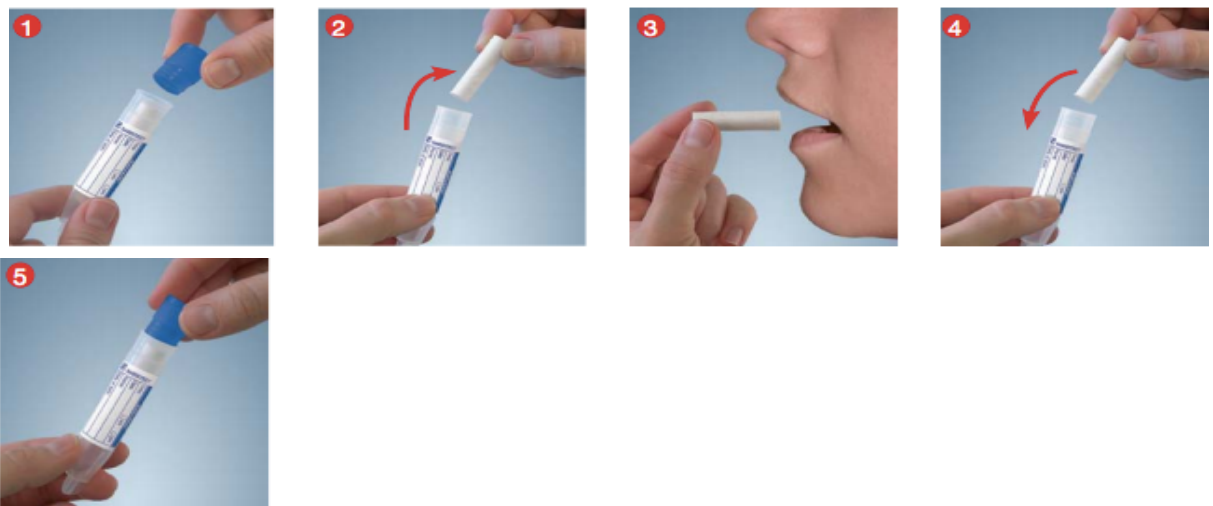
- Evite comer previo a este procedimiento, idealmente manténgase sin comer 30 minutos antes.

- Evitar los alimentos con alto nivel de azúcar o acidez, inmediatamente antes de la recolección de la muestra, ya que pueden comprometer el ensayo mediante la reducción pH de la saliva y aumentar el crecimiento bacteriano.
- Pregunte sobre la presencia de enfermedades bucales o lesiones.
- Lavar la boca con agua para eliminar los residuos de comida si es que la participante ha comido recientemente y esperar al menos 10 minutos después del enjuague para evitar la dilución de la muestra.

Para este procedimiento se utiliza:

- Cuestionario de toma de muestra.
 - Tubo de recolección.
 - Cinta para rotular y lápiz.
1. Complete el cuestionario de toma de muestra con los datos de la madre participante, la fecha y hora de toma de muestra y luego de esto saque la tapa del tubo.
 2. Extraiga la tórula de algodón y póngala dentro de su boca, cuidando de no tragarla.
 3. Mantenga la tórula dentro de la boca por lo menos 60 segundos. Para estimular la salivación puede morder suavemente la tórula de algodón.
 4. Luego devuelva la tórula al tubo pequeño contenido dentro del tubo más grande.
 5. Tape el tubo con la tapa azul y luego coloque dentro del *cooler* con las unidades refrigerantes.
 6. Si la muestra está visiblemente contaminada con sangre, debe tomarse una nueva muestra que esté libre de contaminación.

Figura del procedimiento



Manejo y transporte de muestra

Inmediatamente después de la recolección, congelar las muestras a -20 °C. Si la congelación no es posible, mantenga las muestras entre 2 a 8°C en condiciones herméticas y mantenga a esta temperatura no más de lo necesario (entre 2 a 4 horas). Luego de esto, congele. Las muestras almacenadas durante más de 4 meses se deben congelar a -80 ° C. La muestra congelada dura varios años.

PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA EN NIÑOS

Introducción

Las tómulas SalivaBio son el método de recogida de saliva recomendado para infantes, incluso en menores de 6 meses de edad. También puede ser utilizado como un método de recolección en no humanos. Es un método de recogida limpio, pero no estéril, que requiere la asistencia de adultos y supervisión durante su uso, manteniendo fuera del alcance de los niños.

Procedimiento

Previo al procedimiento:

- Evitar los alimentos con alto nivel de azúcar o acidez, inmediatamente antes de la recolección de la muestra, ya que pueden comprometer el ensayo mediante la reducción pH de la saliva y aumentar el crecimiento bacteriano.
- Evite que el niño coma previo al examen. Si no puede y está comiendo, es preferible que ingiera agua para eliminar la mayor cantidad de residuos. Luego esperar al menos 10 minutos si esto es posible, para evitar la dilución de la muestra antes de la recogida de saliva.

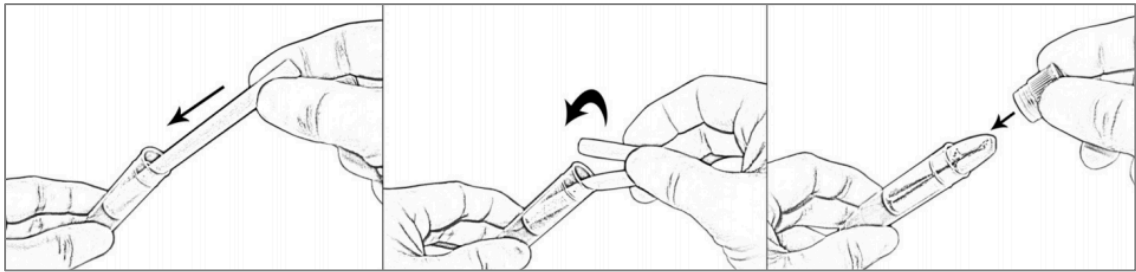
Para este procedimiento se utiliza:

- Cuestionario de toma de muestra.
- Tómula de recolección.
- Tubo de recolección de tómula.
- Cinta para rotular y lápiz.

1. El cuestionario ya fue aplicado a la madre del niño.
2. Abra el paquete que contiene la tómula.
3. Sujete firmemente un extremo de la tómula de recolección y trate de colocar el otro extremo debajo de la lengua del bebe. Es posible, que se recolecte más muestra en las comisuras de la boca. Intente recoger muestra durante 60 a 90 segundos apoyando el hisopo en forma permanente, o recoger en intervalos por la reintroducción de la tómula.

4. Luego de recogida la muestra tome el tubo de recolección, retire la tapa e inserte el extremo saturado con saliva en el tubo interno y doble la parte seca de la tórula e inserte dentro del mismo tubo para luego cerrarlo herméticamente.
5. Asegúrese que el ID del tubo corresponde al del participante.
6. Si la muestra está visiblemente contaminada con sangre, debe tomarse una nueva muestra que esté libre de contaminación.

Figura del procedimiento



Manejo y transporte de muestra

Inmediatamente después de la recolección, congelar las muestras a -20°C . Si la congelación no es posible, mantenga las muestras entre 2 a 8°C en condiciones herméticas y mantenga a esta temperatura durante no más de lo necesario (entre 2 a 4 horas). Luego de esto, congele. Las muestras almacenadas durante más de 4 meses se deben congelar a -80°C . En estas condiciones dura hasta 6 meses en la tórula.

ANEXO 4. Cuestionario

“Exposición prenatal a bajas concentraciones de arsénico inorgánico y su asociación con cortisol salival en infantes de Arica, Chile”

ID: _____
 Nombre Mamá: _____
 Rut mamá: _____
 Edad hijo (meses): _____
 Sexo hijo (0=mujer; 1=hombre): ____
 Rut hijo: _____
 Fecha de toma de muestra: _____
 Hora toma de muestra: _____
 Quien toma la muestra: _____

Agradecemos su tiempo y compromiso con la recolección de saliva. Por favor responda las siguientes preguntas:

	No=0; Sí=1	
1. Hoy, ¿ha sido un día típico en su casa?		<i>Si es No (0), especifique:</i> _____
2. Hoy, ¿su hijo está sano y animado?		<i>Si es No (0), especifique:</i> _____
3. Usted se ha visto expuesta a actividad física vigorosa (ej.: correr o practicar natación)?		
4. Usted se ha sentido emotiva o ha estado llorando previo a la toma de muestra?		
5. Considerando las últimas 12 horas, ¿ha consumido café?		<i>Si es Sí (1), especifique:</i> _____
6. Considerando las últimas 12 horas, ¿ha consumido nicotina?		<i>Si es Sí (1), especifique:</i> _____
7. Considerando las últimas 12 horas, ¿ha consumido alcohol?		<i>Si es Sí (1), especifique:</i> _____
8. Considerando las últimas 12 horas, ¿ha consumido medicamentos?		<i>Si es Sí (1), especifique:</i> _____
9. Ha consumido derivados de leche en los últimos 30 minutos		
10. Su bebe ha tomado leche en los últimos 30 minutos.		

¡MUCHAS GRACIAS!

ANEXO 5. Protocolos de Laboratorio

Determinación de Cortisol y Alfa Amilasa

PROTOCOLO CORTISOL SALIVAL

Procedimiento

Paso 1: Leer y preparar los reactivos de acuerdo a la sección “Preparación del reactivo” antes de comenzar el ensayo. Determine la disposición de la placa. Aquí se presenta un diseño sugerido. (Normas, controles y muestras de saliva deben ser analizadas por duplicado.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.000 Std	3.000 Std	Ctrl-H	Ctrl-H								
B	1.000 Std	1.000 Std	Ctrl-L	Ctrl-L								
C	0.333 Std	0.333 Std	SMP-1	SMP-1								
D	0.111 Std	0.111 Std	SMP-2	SMP-2								
E	0.037 Std	0.037 Std	SMP-3	SMP-3								
F	0.012 Std	0.012 Std	SMP-4	SMP-4								
G	Zero	Zero	SMP-5	SMP-5								
H	NSB*	NSB*	SMP-6	SMP-6								

*NSB = “Non-specific binding wells”. Estos pueden utilizarse como blanco de reacción. Su uso es opcional.

Paso 2: Mantenga el número deseado de tiras en el soporte de tiras y devuelva las tiras restantes en la bolsa de aluminio. Si decide colocar pocillos de unión inespecífica en H-1, 2, quite tiras 1 y 2 del soporte de tiras y rompa el fondo de los pocillos. Coloque las tiras de vuelta en el soporte de tiras dejando H-1, 2 en blanco. Rompa 2 pocillos de la tira NSB de los pocillos NSB incluidos en la bolsa de aluminio. Coloque en H-1, 2. Alternativamente, los NSP pueden colocarse donde quiera en el plato. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio con los pocillos sin usar y el desecante. Almacenar a 2-8 °C.

Precaución: Los pocillos extras de NSB no deben utilizarse para la determinación de controles o “standards”. No insertar los pocillos desde un plato a un plato diferente.

Paso 3: Pipetear 24 ml de diluyente de ensayo en el tubo desechable. Ponga a un lado para el Paso 5.

Paso 4:

- Pipetear 25 μ L de standards, controles y muestras en los pocillos correspondientes.
- Pipetear 25 μ L del diluyente de ensayo en 2 pocillos basales (pocillos cero)
- Pipetear 25 μ L del diluyente de ensayo en cada pocillo NSB

Paso 5: Diluir el conjugado enzimático 1: 1600 mediante la adición de 15 μ L de conjugado a 24 mL tubo de diluyente de ensayo. El tubo conjugado se puede centrifugar durante unos minutos para llevar el líquido hasta la parte inferior del tubo. Mezclar inmediatamente la solución del conjugado diluido y añadir 200 μ L a cada pocillo usando una pipeta multicanal.

Paso 6: Mezclar placa en un mezclador de placas durante 5 minutos a 500 rpm e incube durante un total de 1 hora a temperatura ambiente.

Paso 7: Lave la placa 4 veces con tampón de lavado 1X. Se recomienda utilizar un lavador de placas. Después de cada lavado, la placa debe ser secada completamente con toallas de papel antes de girarla en posición vertical. Si está usando un lavador de placas, se recomienda también secar después del último lavado.

Paso 8: Añadir 200 μ L de la solución de sustrato TMB en cada pocillo con una pipeta multicanal.

Paso 9: Mezclar en un mezclador de placas durante 5 minutos a 500 rpm e incubar la placa en la oscuridad (cubierta) a temperatura ambiente durante 25 min adicionales.

Paso 10: Añadir 50 μ L de la solución de stop 3M con una pipeta multicanal.

Paso 11:

- Mezclar en un mezclador de placas durante 3 min a 500 rpm. Si el color verde se mantiene, continúe mezclando hasta que el color verde se convierte en amarillo. Asegúrese de que todos los pocillos se han convertido en amarillo. Precaución: puede ocurrir derrame de solución si se mezcla a más de 600 rpm.
- Limpie la parte inferior de la placa con un paño sin pelusa humedecido con agua y seque.
- Leer en un lector de placas a 450 nm. Leer la placa a 10 min de la adición de solución de stop 3M. (Para obtener mejores resultados, se recomienda realizar una corrección de filtro secundario en 490-492 nm).

PROTOCOLO ALFA AMILASA SALIVAL

Recomendaciones

Preparación del reactivo

Mantener todos los reactivos a temperatura ambiental

Procedimientos

Paso 1: Determinar el layout (organización) de la placa. A continuación, un ejemplo de "layout" de la placa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl H	S - 7										
B	Ctrl L	S - 8										
C	S - 1	S - 9										
D	S - 2	S - 10										
E	S - 3	S - 11										
F	S - 4	S - 12										
G	S - 5	S - 13										
H	S - 6	S - 14										

Paso 2: Mantenga el numero deseado de tiras en las tiras de pocillo y devuelva las tiras no utilizadas a la bolsa.

Paso 3: Establezca su lector de placas para incubar a 37 °C, y para leer en el centro la medición en modo cinético inicialmente por un minuto, luego nuevamente dos minutos más tarde. Elige el filtro de 405 nm sin filtro de referencia. Para lectores de placas sin estas opciones, la incubación puede realizarse en una placa incubadora/rotador con movimiento manual de la placa dentro y fuera del lector de placas para las lecturas de 1 minuto y 3 minutos. La validación del Kit fue realizada en estas condiciones.

Paso 4: Las muestras de saliva deben ser diluidas con el diluyente para α -amilasa proporcionado. Preparar una dilución 1:10 de la saliva, pipeteando 10 μ L de saliva en 90 μ L del diluyente de α -amilasa. Mezclar bien. Siga diluyendo pipeteando 10 μ L de la dilución previa 1:10 en 190 μ L del diluyente de α -amilasa (1:20). La solución final es de 1:200. El resto de la dilución 1:10 puede dejarse de lado en caso de necesitar una nueva dilución final.

Paso 5: Calentar la solución del sustrato α -amilasa a 37°C en el canal proporcionado, utilizando una placa de incubadora de microtitulación precalentado. Asegúrese que el reactivo se encuentra calentado y mezclado correctamente antes de su uso. (Se recomienda un tiempo mínimo de calentamiento de 20 minutos, desde la temperatura ambiente).

Paso 6: Para un ritmo más preciso, pruebe sólo una tira a la vez. Añadir 8 μ L de las muestras de controle (prediluido) y/o muestra de saliva diluidos a los pocillos individuales. Recomendamos encarecidamente realizar el pipeteado inverso para evitar introducir burbujas en el pocillo.

Paso 7: Añadir 320 μ L de solución del sustrato de α -amilasa precalentado (37°C) en cada pocillo simultáneamente usando una pipeta multicanal. Eliminar posteriormente las puntas de pipeta para evitar la contaminación de los reactivos. No devuelva la solución de sustrato de α -amilasa que pueda quedar en la punta de la bandeja mayor una vez que ya ha sido descargado en los pocillos. Esto podría contaminar el contenido de la bandeja y afectar cualquier prueba posterior. Cualquier pocillo que contenga burbujas al momento de la lectura debe repetirse.

Paso 8: Si se realiza la lectura cinéticamente en un lector de placas programable de 37°C, inmediatamente ubicar la placa en el lector e iniciar la lectura. Dado que los pocillos se encuentran llenos, programe el lector de placas para mezclar lentamente o el sustrato podría derramarse en el lector de placas.

De otro modo, realizar los pasos siguientes:

- Iniciar temporizador inmediatamente y mezclar (500-600 rpm) a 37°C
- Traslade la placa al lector a tiempo de manera de leer la DO a exactamente 1 minuto, luego continúe mezclando a 37°C. Guarde esta información.
- Transferir la placa de nuevo y leer DO a exactamente 3 minutos. Guarde esta información.

Cálculos

Restar la lectura de un minuto a la lectura de tres minutos y multiplicar por el factor de conversión (ver abajo). El factor de conversión toma en cuenta la dilución de la muestra de 1:200 para los controles pre diluidos y las muestras.

Es conveniente establecer una hoja de cálculo Excel para restar las DO y multiplicar por el factor de conversión. Los resultados se expresan en U/mL.

$\Delta\text{Abs.}/\text{min} \times \text{TV} \times \text{DF} = \text{U/mL}$ de actividad de α -amilasa en la muestra
 $\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}$

Donde:

$\Delta\text{Abs.}/\text{min}$ = diferencia de absorbancia por minuto

TV = volumen total (0.328 mL)

DF = factor de dilución

MMA = Millimolar de absorbancia of 2-chloro-p-nitrophenol (12.9)

SV = volumen de la muestra (0.008 mL)

LP = Light path = 0.97 (specific to plate received with kit)

$\Delta\text{Abs.}/2 \times 0.328 \times 200 = \Delta\text{Abs.} \times 328^* = \text{U/mL}$ actividad α -amilasa
 $12.9 \times 0.008 \times 0.97$

Ejemplo: Con un cambio de absorbancia (OD change over 2 minutes) de 0.3, entonces
 $0.3 \times 328 = 98.4 \text{ U/mL}$

*Si se utiliza un lector de placa Tecan y se capturan los datos a través del software Assayzap, multiplicar por 0.0328.

NOTA: Multiplicar el valor por 0.01667 para convertir a unidades SI (nKat/L).

Las muestras que exceden 400 U/ml (límite de linealidad) deben volver a una dilución de 1:400. Los resultados deben ser multiplicados por 2. Los valores demasiado bajos para ser leídos en una dilución 1:200 pueden ser realizados nuevamente en una dilución de 1:10. Resultados deben ser dividido por 20.

ANEXO 6. Proyecto Piloto

“Estandarización de técnica de recolección de saliva, para determinación de cortisol mediante técnica de ELISA”

Objetivo del estudio piloto

El objetivo de estudio piloto fue estandarizar la técnica de recolección de muestra de saliva para evaluar cortisol y alfa amilasa en niños de 18 a 24 meses y mujeres adultas. Además, este piloto sirvió para conocer la variabilidad de cortisol y alfa amilasa en niños chilenos de ese rango de edad y sus madres.

Procedimientos

En una muestra de 18 niños se recolectó muestra de saliva según el protocolo especificado en el anexo 1, durante la jornada de la mañana. Se recolectó adicionalmente una muestra de saliva de la madre. Se aplicó el cuestionario de toma de muestra en cada ocasión. En 3 casos se tomó la muestra en duplicado para determinar la reproducibilidad del método. La información recolectada y la toma de muestra, tardaron alrededor de 10 minutos.

Riesgos

El estudio piloto implicaba riesgos nulos para la salud del niño y su madre. El cuestionario era simple y las muestras de saliva fueron recolectada con tómulas diseñada para tales fines, siendo el método de recolección *gold estándar* para la toma de muestra en infantes. Por lo mismo la recolección de la muestra saliva es un método simple y seguro, tanto para la madre como para el niño.

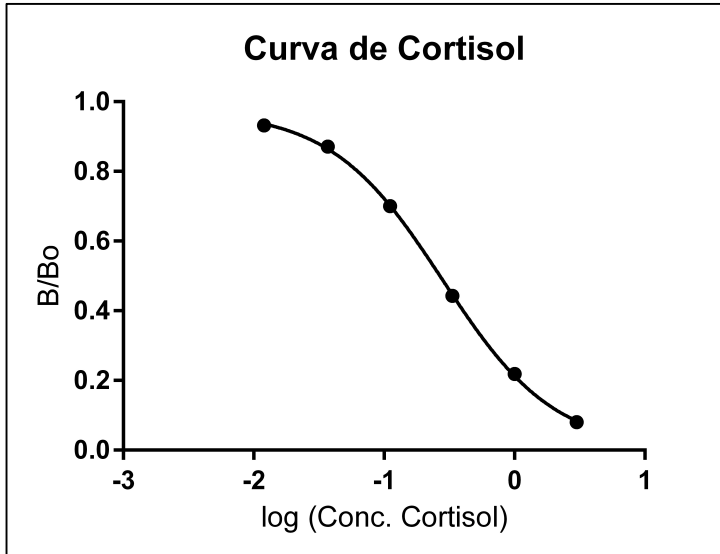
Confidencialidad de los datos

Toda la información derivada de la participación en este estudio piloto fue conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de la investigadora principal y su tutora, así como la Dra. Danka Cárdenas que colaboró con el reclutamiento de los pacientes incluidos en este estudio piloto. Los resultados fueron entregados personalmente por la médica tratante a cada madre y su hijo. Sin embargo, éstos no tenían validez clínica, como se les comentó en la toma de muestra a cada voluntaria.

Resultados del piloto

La estandarización de la técnica fue realizada con los insumos provistos por el fabricante. En la siguiente figura, se muestra la curva estandarización.

Figura. Curva de Estandarización de la técnica de ELISA para determinación de cortisol saliva.



La fiabilidad de la técnica de ELISA fue alta, con un índice de correlación intraclassa (ICC) de 0.996 (IC 95%: 0.994, 0.998) y un coeficiente de correlación lineal de Pearson de 0.996. El gráfico de dispersión muestra la relación de cada punto con su duplicado. En relación a los duplicados de toma de muestra la fiabilidad estimada mediante ICC fue de 0.958 (IC 95%: 0.771, 0.994).

Figura. Asociación entre mediciones y su duplicado analítico

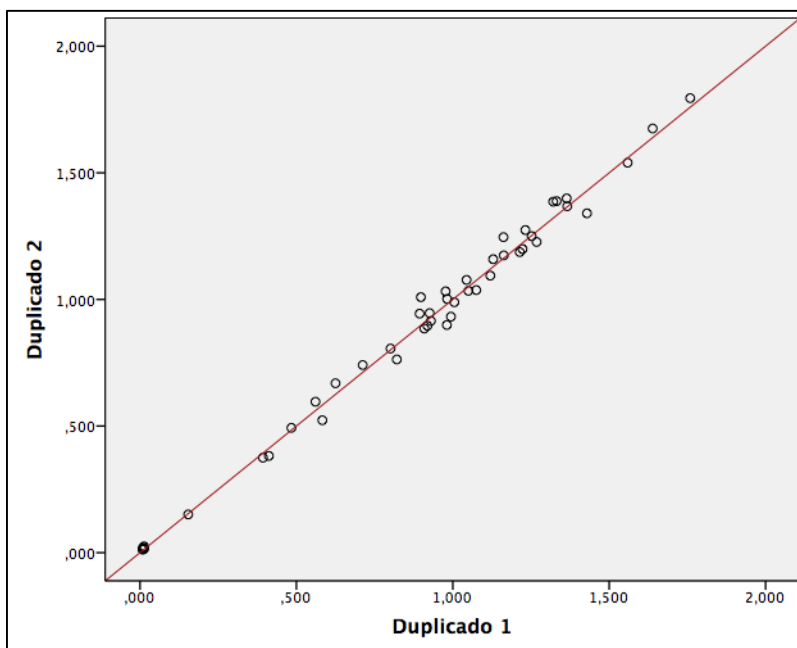
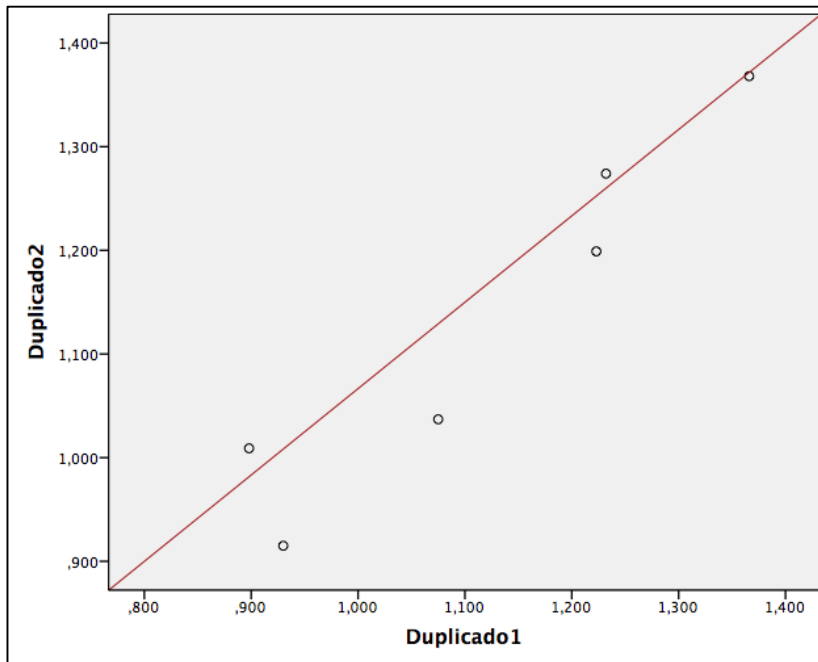


Figura. Asociación entre mediciones y su duplicado de toma de muestra



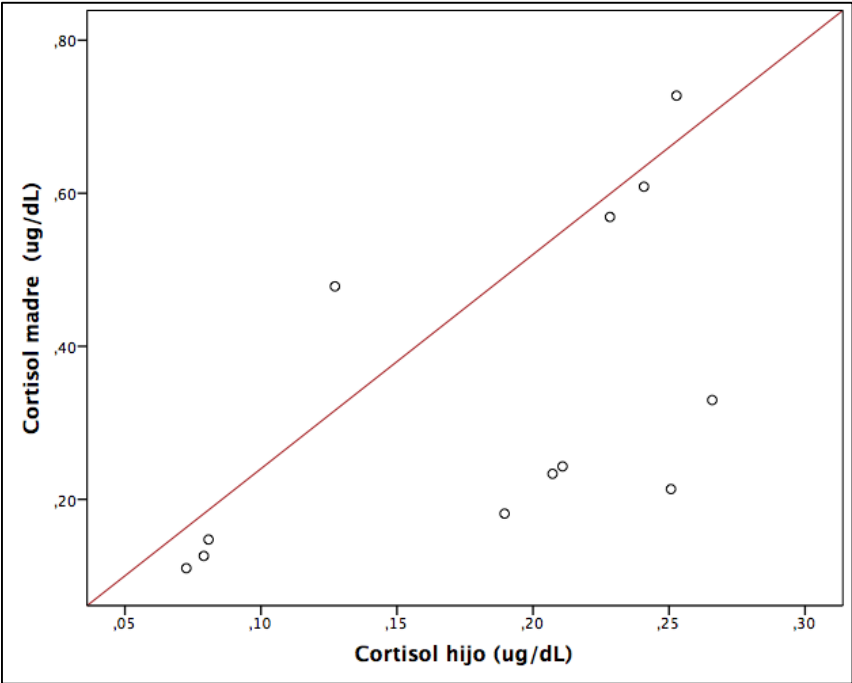
Con respecto a la distribución del cortisol salival en los niños y sus madres la tabla resumen se presenta a continuación.

Tabla. Estadísticos resúmenes para medición de cortisol en niños y madres

	N	Media	Desviación Estándar	Min	Max	Coefficiente de Variación
Cortisol Niño ($\mu\text{g/dL}$)	18	0,2370	0,160	0,07	0,73	67,51%
Cortisol Madre ($\mu\text{g/dL}$)	12	0,3306	0,211	0,11	0,73	63,82%

El coeficiente de correlación lineal de Pearson entre la concentración de cortisol del niño y la madre fue de 0,743 (p-value= 0,007).

Figura. Asociación entre concentración cortisol hijo y madre



REFERENCIAS

1. Tsai SM, Wang TN, Ko YC. Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. *Archives of environmental health*. 1999;54(3):186-93.
2. Lubin JH, Moore LE, Fraumeni JF, Jr., Cantor KA. Respiratory Cancer and Inhaled Inorganic Arsenic in Copper Smelters Workers: A Linear Relationship with Cumulative Exposure that Increases with Concentration. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(12):1661-5.
3. Concha G, Broberg K, Grandner M, Cardozo A, Palm B, Vahter M. High-Level Exposure to Lithium, Boron, Cesium, and Arsenic via Drinking Water in the Andes of Northern Argentina. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(17):6875-80.
4. Halatek T, Sinczuk-Walczak H, Rabieh S, Wasowicz W. Association between occupational exposure to arsenic and neurological, respiratory and renal effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009;239(2):193-9.
5. McClintock TR, Chen Y, Bundschuh J, Oliver JT, Navoni J, Olmos V, et al. Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*. 2012;429:76-91.
6. James RC, Warren DA, Halmes NC, Roberts SM. Risk Assessment. In: Williams PL, James RC, Roberts SM, editors. *Principles of Toxicology*. Canada: John Wiley & Sons, INC.; 2000.
7. Mink PJ, Alexander DD, Barraj LM, Kelsh MA, Tsuji JS. Low-level arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: A review and meta-analysis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008;52(3):299-310.
8. O'Bryant SE, Edwards M, Menon CV, Gong G, Barber R. Long-Term Low-Level Arsenic Exposure Is Associated with Poorer Neuropsychological Functioning: A Project FRONTIER Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011;8(3):861-74.
9. Palacios J, Roman D, Cifuentes F. Exposure to Low Level of Arsenic and Lead in Drinking Water from Antofagasta City Induces Gender Differences in Glucose Homeostasis in Rats. *Biological Trace Element Research*. 2012;148(2):224-31.
10. Tsuji JS, Perez V, Garry MR, Alexander DD. Association of low-level arsenic exposure in drinking water with cardiovascular disease: A systematic review and risk assessment. *Toxicology*. 2014;323:78-94.
11. Martinez EJ, Kolb BL, Bell A, Savage DD, Allan AM. Moderate perinatal arsenic exposure alters neuroendocrine markers associated with depression and increases depressive-like behaviors in adult mouse offspring. *Neurotoxicology*. 2008;29(4):647-55.
12. Ahmad SA, Sayed MH, Barua S, Khan MH, Faruquee MH, Jalil A, et al. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environ Health Perspect*. 2001;109(6):629-31.
13. Hopenhayn C, Ferreccio C, Browning SR, Huang B, Peralta C, Gibb H, et al. Arsenic exposure from drinking water and birth weight. *Epidemiology*. 2003;14(5):593-602.
14. Hopenhayn-Rich C, Browning S, Hertz-Picciotto I, Ferreccio C, Peralta C, Gibb H. Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. *Environ Health Perspect*. 2000;108(7):667-73.

15. Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 2002;58(1):201-35.
16. Navas-Acien A, Sharrett AR, Silbergeld EK, Schwartz BS, Nachman KE, Burke TA, et al. Arsenic exposure and cardiovascular disease: a systematic review of the epidemiologic evidence. *American journal of epidemiology*. 2005;162(11):1037-49.
17. Yoshida T, Yamauchi H, Fan Sun G. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;198(3):243-52.
18. Lépez M, Caamaño E, Romero C, Fiedler J, Araya V. Salivary cortisol among subjects with and without Cushing Syndrome. *Rev Med Chil*. 2010;138:168-74.
19. Baker D. Review of Environmental Health and Epidemiological Principles. In: Baker D, Nieuwenhuijsen MJ, editors. *Environmental Epidemiology*. New York, USA: OXFORD University Press; 2008.
20. Schug TT, Blawas AM, Gray K, Heindel JJ, Lawler CP. Elucidating the links between endocrine disruptors and neurodevelopment. *Endocrinology*. 2015;156(6):1941-51.
21. Chelala C. *Impacto del ambiente sobre la salud infantil*. Washington, D.C., OPS. 1999.
22. Minkler M, Garcia AP, Williams J, LoPresti T, Lilly J. Sí se puede: using participatory research to promote environmental justice in a Latino community in San Diego, California. *Journal Of Urban Health: Bulletin Of The New York Academy Of Medicine*. 2010;87(5):796-812.
23. Bartell S. Risk Assessment. In: Frumkin H, editor. *Environmental Health From Global to Local*. United States of America: John Wiley & Sons, INC.; 2010.
24. Chen JJ, Moon H, Kodell RL. A probabilistic framework for non-cancer risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2007;48(1):45-50.
25. Razzaghi M. Beta-normal distribution in dose-response modeling and risk assessment for quantitative responses. *Environmental and Ecological Statistics*. 2009;16(1):25-36.
26. Wolkoff P, Nielsen GD. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environment International*. 2010;36(7):788-99.
27. Ballantyne JC. Safe and effective when used as directed: the case of chronic use of opioid analgesics. *Official journal of the American College of Medical Toxicology*. 2012;8(4):417-23.
28. Marazziti D, Baroni S, Catena-Dell'Osso M, Schiavi E, Ceresoli D, Conversano C, et al. Cognitive, Psychological and Psychiatric Effects of Ionizing Radiation Exposure. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(12):1864-9.
29. Lee D-H. Endocrine disrupting chemicals and environmental diseases. *Journal of the Korean Medical Association*. 2012;55(3):243-9.
30. Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, et al. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environmental Health Perspectives*. 2002;110(4):427-31.
31. Peluso MEM, Munnia A, Ceppi M. Bisphenol-A exposures and behavioural aberrations: Median and linear spline and meta-regression analyses of 12 toxicity studies in rodents. *Toxicology*. 2014;325:200-8.

32. Robson M, Hamilton G, Siritwong W. Pest Control and Pesticides. In: Frumkin H, editor. Environmental Health From Global to local. United States of America: John Wiley & Sons, INC.; 2010. p. 594.
33. Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews.* 2009;12(3):206-23.
34. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Arsenic [Internet]; 2015. [Citado Septiembre 2014] Disponible desde: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3>.
35. Cohen SM, Arnold LL, Beck BD, Lewis AS, Eldan M. Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic. *Critical reviews in toxicology.* 2013;43(9):711-52.
36. Conolly R, McMullin T, Hines RN, Sheets LP, Cohen SM. In Vitro to In Vivo Extrapolation (IVIVE) for human health risk assessment. *Toxicology Letters.* 2013;221:S14.
37. Brauer M, Brumm J, Vedal S, Petkau AJ. Exposure Misclassification and Threshold Concentrations in Time Series Analyses of Air Pollution Health Effects. *Risk Analysis.* 2002;22(6):1183-93.
38. Ferreccio C, Sancha A. Arsenic Exposure and its impact on health in Chile. *J Health Popul Nutr.* 2006;24(2):164-75.
39. Ferreccio C, González C, Milosavjevic V, Marshall G, Sancha A, Smith A. Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology.* 2000;11(6):673-9.
40. Marshall G, Ferreccio C, Yuan Y, Bates MN, Steinmaus C, Selvin S, et al. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(12):920-8.
41. Arriaza B. Arseniasis as an environmental hypothetical explanation for the origin of the oldest artificial mummification practice in the world. *Chungará (Arica).* 2005;37:255-60.
42. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. Historia de la Ley N°20590. Establece un programa de intervención en zonas con presencia de polimetales en la comuna de Arica. 2009.
43. Iglesias V, Burgos S, Tenorio M, Zapata P, Cáceres D, Klarian J. Estudio características cognitivas de niños expuestos a Plomo en la Ciudad de Arica, Chile. Licitación #5602-168-LE11 SEREMI de Salud Arica y Parinacota.
44. Duffus JH. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2002;74(5):793–807.
45. Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered arsenic trioxide in the hamster. *Toxicology.* 1985;34(2):113-21.
46. Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, et al. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chemical research in toxicology.* 2001;14(4):355-61.
47. Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984;74(1):134-40.
48. Aylward LL, Ramasamy S, Hays SM, Schoeny R, Kirman CR. Evaluation of urinary speciated arsenic in NHANES: issues in interpretation in the context of potential inorganic arsenic exposure. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP.* 2014;69(1):49-54.

49. Smedley PL, Kinniburgh DG. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*. 2002;17(5):517-68.
50. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Substance Priority List [Internet]; 2011. [Citado Mayo, 2015]. Disponible desde: <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>
51. Aposhian HV, Aposhian MM. Arsenic toxicology: five questions. *Chemical research in toxicology*. 2006;19(1):1-15.
52. Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, et al. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Archives of toxicology*. 2003;77(6):305-12.
53. Vera G, Climent B. Intoxicaciones por metales pesados. In: Bataller R, editor. *Toxicología clínica: PUV*; 2004. p. 185-6.
54. Vahter M. Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annual review of nutrition*. 2009;29:381-99.
55. Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of toxicology*. 2005;79(4):183-91.
56. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Arsenic; 2007. [Citado Mayo, 2015]. Disponible desde: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>.
57. James R, Roberts S, Williams P. *General Principles of Toxicology. PRINCIPLES OF TOXICOLOGY Environmental and Industrial Applications*2000.
58. Fillol C, Dor F, Labat L, Boltz P, Le Bouard J, Mantey K, et al. Urinary arsenic concentrations and speciation in residents living in an area with naturally contaminated soils. *The Science of the total environment*. 2010;408(5):1190-4.
59. World Health Organization. Arsenic. Fact Sheet. Media centre. [Internet]; 2012. [Citado Septiembre, 2014]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>
60. Yoshida T, Yamauchi H, Fan Sun G. Chronic health effects in people exposed to arsenic via drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;198(3):243-52.
61. Chen Y, Parvez F, Gamble M, Islam T, Ahmed A, Argos M. Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS) in Bangladesh. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;239(2):184-92.
62. Zierold KM, Knobeloch L, Anderson H. Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic-contaminated drinking water. *Am J Public Health*. 2004;94(11):1936-7.
63. Engel RR, Hopenhayn-Rich C, Receveur O, Smith AH. Vascular effects of chronic arsenic exposure: a review. *Epidemiologic reviews*. 1994;16(2):184-209.
64. Wang CH, Hsiao CK, Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, Chen SY, et al. A review of the epidemiologic literature on the role of environmental arsenic exposure and cardiovascular diseases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(3):315-26.
65. Rodriguez VM, Jimenez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett*. 2003;145(1):1-18.

66. Brinkel J, Khan MH, Kraemer A. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6(5):1609-19.
67. Ahmed S, Mahabbate Khoda S, Rekha RS, Gardner RM, Ameer SS, Moore S, et al. Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ Health Perspect*. 2011;119(2):258-64.
68. Jin Y, Xi S, Li X, Lu C, Li G, Xu Y, et al. Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups. *Environmental research*. 2006;101(3):349-55.
69. Ettinger AS, Zota AR, Amarasiriwardena CJ, Hopkins MR, Schwartz J, Hu H, et al. Maternal arsenic exposure and impaired glucose tolerance during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2009;117(7):1059-64.
70. Hopenhayn C, Bush HM, Bingcang A, Hertz-Picciotto I. Association between arsenic exposure from drinking water and anemia during pregnancy. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*. 2006;48(6):635-43.
71. Sen J, Chaudhuri AB. Arsenic exposure through drinking water and its effect on pregnancy outcome in Bengali women. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2008;59(4):271-5.
72. Rahman A, Vahter M, Ekström E, Rahman M, Golam Mustafa A, Wahed M. Association of arsenic exposure during pregnancy with fetal loss and infant death: a cohort study in Bangladesh. *American journal of epidemiology*. 2007;165(12):1389-96.
73. Huyck KL, Kile ML, Mahiuddin G, Quamruzzaman Q, Rahman M, Breton CV, et al. Maternal arsenic exposure associated with low birth weight in Bangladesh. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*. 2007;49(10):1097-104.
74. Fei D, Koestler D, Li Z, Giambelli C, Sanchez-Mejias A, Gosse J, et al. Association between In Utero arsenic exposure, placental gene expression, and infant birth weight: a US birth cohort study. *Environmental Health*. 2013;12(1):58.
75. Laine JE, Bailey KA, Rubio-Andrade M, Olshan AF, Smeester L, Drobna Z, et al. Maternal arsenic exposure, arsenic methylation efficiency, and birth outcomes in the Biomarkers of Exposure to ARsenic (BEAR) pregnancy cohort in Mexico. *Environ Health Perspect*. 2015;123(2):186-92.
76. Rahman A, Persson LA, Nermell B, El Arifeen S, Ekstrom EC, Smith AH, et al. Arsenic exposure and risk of spontaneous abortion, stillbirth, and infant mortality. *Epidemiology*. 2010;21(6):797-804.
77. Rahman A, Vahter M, Smith AH, Nermell B, Yunus M, El Arifeen S, et al. Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study in Bangladesh. *American journal of epidemiology*. 2009;169(3):304-12.
78. Kile ML, Baccarelli A, Hoffman E, Tarantini L, Quamruzzaman Q, Rahman M, et al. Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes. *Environ Health Perspect*. 2012;120(7):1061-6.
79. Hamadani JD, Tofail F, Nermell B, Gardner R, Shiraji S, Bottai M, et al. Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of cognitive function in pre-school girls and boys: a population-based cohort study. *International journal of epidemiology*. 2011;40(6):1593-604.

80. Rahman A, Vahter M, Ekstrom EC, Persson LA. Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in Bangladesh. *Environ Health Perspect.* 2011;119(5):719-24.
81. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Der Kraak V. World Health Organization. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors, EDS. 2002.
82. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):A160-7.
83. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics.* 2009;21(2):243-51.
84. van Halem D, Bakker SA, Amy GL, van Dijk JC. Arsenic in drinking water: a worldwide water quality concern for water supply companies. *Drinking Water Engineering and Science.* 2009;2(1):29-34.
85. Barr FD, Krohmer LJ, Hamilton JW, Sheldon LA. Disruption of histone modification and CARM1 recruitment by arsenic represses transcription at glucocorticoid receptor-regulated promoters. *PloS one.* 2009;4(8):e6766.
86. Paul DS, Devesa V, Hernandez-Zavala A, Adair BM, Walton FS, Drobna Z, et al. Environmental arsenic as a disruptor of insulin signaling. *Metal Ions in Biology and Medicine, Vol 10. Metal Ions in Biology and Medicine.* 102008. p. 1-7.
87. Rosenblatt AE, Burnstein KL. Inhibition of Androgen Receptor Transcriptional Activity as a Novel Mechanism of Action of Arsenic. *Molecular Endocrinology.* 2009;23(3):412-21.
88. Gosse JA, Taylor VF, Jackson BP, Hamilton JW, Bodwell JE. Monomethylated trivalent arsenic species disrupt steroid receptor interactions with their DNA response elements at non-cytotoxic cellular concentrations. *Journal of Applied Toxicology.* 2014;34(5):498-505.
89. Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biology of reproduction.* 2004;70(4):980-5.
90. Martinez-Finley EJ, Ali AM, Allan AM. Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 2009;94(2):271-7.
91. Martinez-Finley EJ, Goggin SL, Labrecque MT, Allan AM. Reduced expression of MAPK/ERK genes in perinatal arsenic-exposed offspring induced by glucocorticoid receptor deficits. *Neurotoxicology and teratology.* 2011;33(5):530-7.
92. Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and preterm infant. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM.* 2002;15(6):759-69.
93. Tarantino LM, Sullivan PF, Meltzer-Brody S. Using animal models to disentangle the role of genetic, epigenetic, and environmental influences on behavioral outcomes associated with maternal anxiety and depression. *FPSYT.* 2011;2:44.
94. Katzung B. *Basic & Clinical Pharmacology.* Chapter 39. Adrenocorticosteroids & Adrenocortical Antagonists. *Basic & Clinical Pharmacology* 12 ed: McGraw-Hill; 2007.
95. Rodríguez JA. Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Corteza Suprarrenal. In: Rodríguez JA, editor. *Endocrinología Clínica: Mediterraneo;* 1992. p. 229-30.

96. Aardal E, Holm AC. Cortisol in saliva--reference ranges and relation to cortisol in serum. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*. 1995;33(12):927-32.
97. Garde AH, Hansen AM. Long-term stability of salivary cortisol. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2005;65(5):433-6.
98. Maidana P, Bruno OD, Mesch V. A critical analysis of cortisol measurements: an update. *Fundación Revista Medicina (Buenos Aires)* 2013;- 73(- 6):- 584.
99. Van Cauter E. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Hormone research*. 1990;34(2):45-53.
100. Katzung B. *Basic & Clinical Pharmacology*. Chapter 37. Hypothalamic & Pituitary Hormones. 12 ed: McGraw-Hill; 2007.
101. Von Werne Baes C, de Carvalho Tofoli SM, Martins CMS, Juruena MF. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress - a systematic review. *Acta Neuropsychiatrica*. 2012;24(1):4-15.
102. de Weerth C, Zijl RH, Buitelaar JK. Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early human development*. 2003;73(1-2):39-52.
103. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clinical endocrinology*. 1996;44(2):157-61.
104. Tollenaar MS, Jansen J, Beijers R, Riksen-Walraven JM, de Weerth C. Cortisol in the first year of life: normative values and intra-individual variability. *Early human development*. 2010;86(1):13-6.
105. Vreeburg SA, Kruijtzter BP, van Pelt J, van Dyck R, DeRijk RH, Hoogendijk WJG, et al. Associations between sociodemographic, sampling and health factors and various salivary cortisol indicators in a large sample without psychopathology. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(8):1109-20.
106. Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26(6):613-22.
107. Kudielka BM, Kirschbaum C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28(1):35-47.
108. Federenko I, Wust S, Hellhammer DH, Dechoux R, Kumsta R, Kirschbaum C. Free cortisol awakening responses are influenced by awakening time. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29(2):174-84.
109. Kunz-Ebrecht SR, Kirschbaum C, Steptoe A. Work stress, socioeconomic status and neuroendocrine activation over the working day. *Social science & medicine*. 2004;58(8):1523-30.
110. Li L, Power C, Kelly S, Kirschbaum C, Hertzman C. Life-time socio-economic position and cortisol patterns in mid-life. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(7):824-33.
111. Azar R, Paquette D, Stewart DE. Prenatal tobacco exposure and cortisol levels in infants of teen mothers. *Journal of perinatal medicine*. 2010;38(6):689-92.
112. Granger DA, Blair C, Willoughby M, Kivlighan KT, Hibel LC, Fortunato CK, et al. Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase in mothers and their

- infants: relation to tobacco smoke exposure. *Developmental psychobiology*. 2007;49(7):692-701.
113. Azar R, Paquette D, Stewart D. Prenatal tobacco exposure and cortisol levels in infants of teen mothers. *J Perinat Med* 2010;38:689-92.
114. Jacobson SW, Bihun JT, Chiodo LM. Effects of prenatal alcohol and cocaine exposure on infant cortisol levels. *Development and psychopathology*. 1999;11(2):195-208.
115. Field T. The effects of mother's physical and emotional unavailability on emotion regulation. *Monographs of the Society for Research in Child Development*. 1994;59(2-3):208-27.
116. DeHaan M, Gunnar M, Tout K, Hart J, Stansbury K. Familiar and novel contexts yield different associations between cortisol and behavior among 2-year-olds. *Dev Psychobiol*. 1998;31:93-101.
117. Gunnar MR, Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*. 2002;27(1-2):199-220.
118. Granger DA, Kivlighan KT, el-Sheikh M, Gordis EB, Stroud LR. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:122-44.
119. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*. 2005;67:259-84.
120. Rogers JD, Palmer RJ, Jr., Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infection and immunity*. 2001;69(11):7046-56.
121. Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(4):486-96.
122. Beekman ATF, Penninx B, Deeg DJH, Ormel J, Braam AW, van Tilburg W. Depression and physical health in later life: results from the Longitudinal Aging Study Amsterdam (LASA). *Journal of Affective Disorders*. 1997;46(3):219-31.
123. Bjorntorp P, Rosmond P. Obesity and cortisol. *Nutrition*. 2000;16(10):924-36.
124. Ito T, Saitoh D, Takasu A, Kiyozumi T, Sakamoto T, Okada Y. Serum cortisol as a predictive marker of the outcome in patients resuscitated after cardiopulmonary arrest. *Resuscitation*. 2004;62(1):55-60.
125. Raff H, Raff JL, Duthie EH, Wilson CR, Sasse EA, Rudman I, et al. Elevated salivary cortisol in the evening in healthy elderly men and women: Correlation with bone mineral density. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*. 1999;54(9):M479-M83.
126. Schoorlemmer RM, Peeters GM, van Schoor NM, Lips P. Relationships between cortisol level, mortality and chronic diseases in older persons. *Clinical endocrinology*. 2009;71(6):779-86.
127. Puterman E, O'Donovan A, Adler NE, Tomiyama AJ, Kemeny M, Wolkowitz OM, et al. Physical activity moderates effects of stressor-induced rumination on cortisol reactivity. *Psychosomatic medicine*. 2011;73(7):604-11.
128. Cieslak TJ, Frost G, Klentrou P. Effects of physical activity, body fat, and salivary cortisol on mucosal immunity in children. *Journal of applied physiology*. 2003;95(6):2315-20.

129. Sonka J, Sonka K, Polaskova J. The effect of physical activity in obese subjects on the levels of cortisol, glucagon and beta-endorphins in the blood. *Casopis lekaru ceskych*. 1985;124(7):201-4.
130. Roe JJ, Thompson CW, Aspinall PA, Brewer MJ, Duff EI, Miller D, et al. Green space and stress: evidence from cortisol measures in deprived urban communities. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):4086-103.
131. Sim M. Case studies in the use of toxicological measures in epidemiological studies. *Toxicology*. 2002;181-182:405-9.
132. McCarty LS. Issues at the interface between ecology and toxicology. *Toxicology*. 2002;181-182:497-503.
133. McCarty LS, Borgert CJ. Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2006;45(2):119-43.
134. Suzuki KT, Mandal BK, Ogra Y. Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*. 2002;58(1):111-9.
135. Kelley K, Maxwell SE. Sample size for multiple regression: obtaining regression coefficients that are accurate, not simply significant. *Psychol Methods*. 2003;8(3):305-21.
136. Grandjean P, Barouki R, Bellinger DC, Casteleyn L, Chadwick LH, Cordier S, et al. Life-Long Implications of Developmental Exposure to Environmental Stressors: New Perspectives. *Endocrinology*. 2015;156(10):3408-15.
137. World Health Organization. Global Plan of Action for Children's Health and the Environment (2010 - 2015). [Internet]; 2016. [Citado Noviembre, 2016]. Disponible desde: http://www.who.int/ceh/cehplanaction10_15.pdf?ua=1
138. Uauy R, Kain J, Corvalan C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011;94(6_Suppl):1759S-64S.
139. Tsuji JS, Garry MR, Perez V, Chang ET. Low-level arsenic exposure and developmental neurotoxicity in children: A systematic review and risk assessment. *Toxicology*. 2015;337:91-107.
140. Carlin DJ, Naujokas MF, Bradham KD, Cowden J, Heacock M, Henry HF, et al. Arsenic and Environmental Health: State of the Science and Future Research Opportunities. *Environ Health Perspect*. 2016;124(7):890-9.