

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales**

***POLIMORFISMO DEL GEN MTHFR EN LA POBLACIÓN DE  
HERMOSILLO, SONORA Y SU RELACIÓN CON LA  
ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO***

**TODO LO LUMINAN**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:  
Maestría en Polímeros y Materiales**

**Presenta**

**Q.B. Sheyla Dinorah Yáñez Chacón**

**1942**

**Dirigida por: Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán**

**HERMOSILLO, SONORA**

**AGOSTO DEL 2008**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACIÓN**

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Sheyla Dinorah Yáñez Chacón han designado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito para obtener el grado de Maestro en Polímeros y Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.

---

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán  
(Presidente)

---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta  
(Secretaria)

---

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias  
(Vocal)

---

Dra. Teresa Gollas Galván  
(Vocal Externo)

---

Dra. María Mercedes Meza Montenegro  
(Suplente)

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por permitirme llegar hasta donde estoy y por haberme dado salud y ganas de salir adelante día con día.*

*Al National Cancer Institute, por el financiamiento otorgado a través del proyecto No. 3 P50 CA095060-03S1 Arsenic Supplement - México: "Exploring Relationship Between Arsenic and Cancer".*

*Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.*

*A la Dra. Mercedes Meza (Instituto Tecnológico de Sonora), Dra. Robin Harris y Dr. Jason Roberge (University of Arizona), por su valiosa aportación en esta investigación.*

*A mis sinodales Dra. Teresa Gollás, Dra. Mercedes Meza, Dr. Miguel Valdés y Dra. María Burboa por su gran apoyo académico (muchas gracias).*

*A mi director de tesis Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por permitirme una vez mas adquirir un nuevo grado profesional en mi vida.*

*A todo el Departamento de Polímeros y Materiales por haberme aceptado en su posgrado.*

*A todos mis compañeros de Laboratorio, muestreo y de Maestría, porque hicieron que cada día fuera irrepetible e inolvidable, siempre los llevaré en mi Corazón (Erika, Betty, Dolores, Adriana, Gloria, Maribel, Dorita, Viviana y Josué).*

## *DEDICATORIA*

*A mis padres por haberme sacado adelante ante toda adversidad y por creer tanto en mí.*

*A mis abuelas, que aunque ya no estén aquí, siento que están conmigo en todo momento.*

*A toda mi familia (hermano, tías y primos) no se que haría sin ellos.*

*Al amor de mi vida, Jesús Avel por hacerme tan inmensamente feliz. Eres único!*

## CONTENIDO

APROBACIÓN .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	v
CONTENIDO .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
OBJETIVOS .....	x
RESUMEN .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Cáncer .....	3
2.1.1 Sustancias químicas cancerígenas.....	3
2.1.2 Radiación .....	5
2.1.3 Virus .....	5
2.2 Oncogenes y genes supresores de tumores .....	5
2.3 Metabolismo del folato .....	6
2.4 MTHFR y enfermedades relacionadas .....	8
2.5 Descripción de arsénico .....	9
2.5.1 Toxicidad .....	9
2.5.2 Metabolismo del arsénico .....	11
2.5.3 Efectos de la contaminación de arsénico en el ser humano .....	13
2.5.4 Biomarcadores de arsénico .....	13
2.5.5 Distribución de arsénico .....	14
2.6 Polimorfismos de ADN .....	14
2.7 Métodos de detección de polimorfismos .....	16
2.7.1 RFLP .....	16
2.7.2 RAPD .....	17
2.7.3 AFLP .....	17
2.7.4 PCR .....	18

2.7.5 Secuenciación.....	20
2.8 Extracción de ADN .....	20
3. MATERIALES Y METODOS .....	22
3.1 Muestreo de agua en Hermosillo, Sonora .....	22
3.2 Reclutamiento de casos y controles .....	22
3.3 Obtención de muestras .....	23
3.3.1 Agua .....	23
3.3.2 Sangre .....	23
3.3.3 Orina .....	24
3.3.4 Células Bucales .....	24
3.3.5 Uñas .....	25
3.4 Aplicación de cuestionarios .....	25
3.5 Extracción de ADN .....	25
3.5.1 Estimación de la cantidad y pureza del ADN .....	26
3.6 Amplificación del gen MTHFR .....	27
3.7 Análisis de restricción .....	27
3.8 Análisis estadístico .....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
4.1 Selección de las zonas de estudio .....	30
4.2 Selección de los participantes en el estudio .....	34
4.3 Especiación de arsénico en orina .....	34
4.4 Análisis de los genotipos MTHFR 677 y 1298 .....	37
4.5 Efecto de zona, género y genotipos sobre las especies de arsénico .....	41
4.5.1 Efecto de zona .....	41
4.5.2 Efecto de género .....	46
4.5.3 Efecto de genotipos .....	46
4.6 Correlaciones entre especies de arsénico .....	57
5. CONCLUSIONES .....	59
6. RECOMENDACIONES .....	61
7. APÉNDICE .....	62
7.1 Apéndice 1 .....	63

7.2 Apéndice 2 .....	64
7.3 Apéndice 3 .....	65
7.4 Apéndice 4 .....	66
7.5 Apéndice 5 .....	67
7.6 Apéndice 6 .....	68
7.7 Apéndice 7 .....	69
8. BIBLIOGRAFÍA .....	70
9. ANEXO (artículo relacionado con este trabajo) .....	77

## Lista de tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Relación de genes y tipo de cáncer en humanos .....	4
<b>II</b>	Países con contaminación de arsénico en agua .....	15
<b>III</b>	Resumen de las enzimas utilizadas en el análisis de restricción .....	29
<b>IV</b>	Concentraciones de arsénico total en los tanques de abastecimiento de agua potable de Hermosillo, Sonora ...	31
<b>V</b>	Participación de los sujetos en el estudio .....	35
<b>VI</b>	Niveles de arsénico en orina de los participantes de Olivos y Bachoco .....	36
<b>VII</b>	Porcentajes promedio de excreción de arsénico en ambas zonas (Olivos y Bachoco) .....	38
<b>VIII</b>	Frecuencias de los genotipos MTHFR 677 Y MTHFR 1298 en Olivos y Bachoco .....	43
<b>IX</b>	Efectos de zona, género, genotipos 677 y 1298 y diplotipos 677/1298 sobre las especies de arsénico en la población mixta .....	44
<b>X</b>	Medias e intervalos de confianza al 95% de las especies de arsénico urinarios de hombres y mujeres .....	48
<b>XI</b>	Efectos de genotipos MTHFR 677 y 1298 y diplotipo 677/1298 sobre las especies de arsénico en orina, en hombres y mujeres .....	49
<b>XII</b>	Medias e intervalos de confianza al 95% de %MMA entre los diferentes diplotipos MTHFR 677/1298 en mujeres .....	54
<b>XIII</b>	Medias e intervalos de confianza al 95% de %DMA entre los diferentes diplotipos MTHFR 677/1298 en hombres ....	56
<b>XIV</b>	Coeficientes de correlación Spearman entre las especies de arsénico y arsénico total en agua potable .....	58

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Metabolismo del folato .....	7
<b>2</b>	Diferentes formas orgánicas e inorgánicas del arsénico ..	10
<b>3</b>	Metabolismo del arsénico .....	12
<b>4</b>	Pasos que se llevan a cabo para una PCR .....	19
<b>5</b>	Localización de las zonas Olivos y Bachoco .....	32
<b>6</b>	Diferencias entre zonas .....	33
<b>7</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% .....	39
<b>8</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 3% .....	40
<b>9</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 4% .....	42
<b>10</b>	Diferencia de arsénico total en orina entre la zona 1 (Olivos) y la zona 2 (Bachoco) .....	45
<b>11</b>	Diferencia de arsénico V entre hombres y mujeres .....	47
<b>12</b>	Diferencia de arsénico V entre los genotipos 1298AA y 1298AC en mujeres .....	51
<b>13</b>	Diferencia en las proporciones de MMA en orina entre los diplotipos MTHFR 677/1298 en mujeres .....	53
<b>14</b>	Diferencias de las proporciones de DMA en orina entre los diplotipos MTHFR 677/1298 en hombres .....	55

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en la población de Hermosillo, Sonora y su efecto sobre los niveles de arsénico presentes en la orina.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la incidencia del polimorfismo C677T del gen MTHFR en la población de Hermosillo, Sonora.

Determinar la incidencia del polimorfismo A1298C del gen MTHFR en la población de Hermosillo, Sonora.

Evaluar el efecto potencial del polimorfismo C677T del gen MTHFR sobre las concentraciones de especies de arsénico en orina.

Evaluar el efecto potencial del polimorfismo A1298C del gen MTHFR sobre las concentraciones de especies de arsénico en orina.

Evaluar el efecto potencial de género sobre las concentraciones de especies de arsénico en orina.

Evaluar el efecto potencial de zona sobre las concentraciones de especies de arsénico en orina.

## RESUMEN

En este trabajo se investigaron los polimorfismos 677 y 1298 del gen MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) y su posible efecto sobre las especies de arsénico urinario, para lo cual se eligieron una zona control o de baja concentración de arsénico y una zona problema o de alta concentración de arsénico en agua potable en Hermosillo, Sonora. Un total de 95 personas participaron en este estudio, las cuales aportaron una muestra de sangre, agua del hogar y la primera orina de la mañana. La extracción de ADN de sangre se hizo por medio del kit Pax Gen, el arsénico total en agua se determinó por medio de espectrometría de masas utilizando un ICP-MS Agilent 7500 y las muestras de orina fueron digeridas con ácido nítrico de acuerdo al método 3015 de la US-EPA. Se aplicaron análisis de varianza para evaluar los efectos de genotipo, zona y género, sobre las especies de arsénico. Las concentraciones de arsénico total en agua y arsénico total urinario mostraron un efecto directo de zona. En mujeres los niveles de Arsénico V se vieron afectados directamente por los genotipos del polimorfismo MTHFR A1298C ( $p = 0.0290$ ) y los niveles de MMA por los diplotipos MTHFR 677/1298 ( $p = 0.0127$ ). En hombres los diplotipos MTHFR 677/1298 tuvieron un efecto sobre los niveles de DMA urinarios ( $p = 0.0450$ ). Estos datos sugieren que los genotipos de los polimorfismos MTHFR 677 y 1298 influyen el metabolismo del arsénico. Es posible que estos efectos se vean influenciados por la ingesta de ácido fólico (no analizado en este estudio), la cual podría modificar la excreción de arsénico urinario.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las más de 30,000 millones de células que constituyen nuestro organismo nacen, crecen, se dividen y mueren bajo la estricta vigilancia del material hereditario (ADN) (Ríos y Hernández 2001). Cuando existe una alteración en dicha vigilancia se puede generar el cáncer, una anomalía genética en el ámbito celular que implica la mutación de un pequeño número de genes (Klug y Cumming 1999).

En la actualidad se conocen muchas sustancias cancerígenas que pueden influir en la salud de las personas, tal es el caso del arsénico, un conocido carcinógeno humano (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996) que se encuentra presente en el medio ambiente, como arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ) y arseniato ( $\text{As}^{+5}$ ) (Hei *et al.*, 1998), se encuentran principalmente en agua subterránea, agua superficial, polvo y alimentos (Meza *et al.*, 2004). Pueden interferir con funciones esenciales en la célula como apoptosis, señalización celular, metilación del ADN, etc., (Tapio y Grosche, 2006) además de disminuir el proceso de reparación del ADN provocando susceptibilidad al cáncer y otras enfermedades (Duker *et al.*, 2004).

Estudios en animales han demostrado que el consumo de folato puede influenciar el metabolismo del arsénico, es decir que la deficiencia de folato dietario disminuye la excreción de arsénico total en la orina (Gamble *et al.*, 2005). En humanos el arsénico inorgánico es metabolizado por metilación (Abernathy *et al.*, 1999), seguido por excreción en orina como ácido monometilarsónico y ácido dimetilarsínico (MMA y DMA respectivamente). Las especies metiladas son más rápidamente excretadas que el arsénico inorgánico (Tapio y Grosche, 2006) para que esto suceda el arsénico sigue un camino dependiente de folato que genera SAM (S-adenosil metionina) el cual es usado como donador de grupos metilos para la biometilación de arsénico (Ahsan *et al.*, 2007).

La metilentetrahidrofolato reductasa es una enzima que metaboliza el folato (Skibola *et al.*, 1999) y la cual actúa enzimáticamente al convertir 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (Karagas *et al.*, 2005). Dos polimorfismos funcionales en el gen MTHFR (C677T y A1298C) (Sharp *et al.* 2002) han sido asociados con una disminución en la actividad de dicha enzima (Kolling *et al.*, 2004; Karagas *et al.*, 2005) y los cuales posiblemente tengan un efecto sobre la biotransformación del arsénico ya que promueve la formación de S-adenosilmetionina, el donador de grupos metilos (Ahsan *et al.*, 2007) y los cuales son usados para la metilación de arsénico, por esto que en este trabajo se evaluará el polimorfismo del gen MTHFR en la población de Hermosillo, Sonora y su efecto sobre los niveles de arsénico presentes en la orina.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que las células dañadas genéticamente proliferan de una forma autónoma (Mckee y Mckee, 2003). En la actualidad se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un pequeño número de genes (Klug y Cumming, 1999). Como se explica en la tabla 1, la mutación en genes específicos puede llevar a alteraciones graves como es el desarrollo de cáncer en ciertos órganos del cuerpo. El cáncer puede ser provocado por sustancias químicas cancerígenas, radiación y virus.

#### **2.1.1 Sustancias químicas cancerígenas**

Algunos cancerígenos son electrófilos muy reactivos que atacan a los grupos del ADN con electrones abundantes (Mckee y Mckee, 2003). Los agentes químicos capaces de modificar los nucleótidos, provocan cambios tautoméricos (Puertas, 1999), (isómeros estructurales que se diferencian en la disposición de sus átomos de hidrógeno y los dobles enlaces) (Mathews *et al.*, 2002) o desaminaciones o bien añadiendo radicales libres como metilo, etilo, etc., en las bases nitrogenadas. En consecuencia, las propiedades químicas de las bases se modifican y se producen cambios en su capacidad de formar enlaces de hidrógeno (Puertas, 1999), además de las sustancias químicas también la radiación y los virus pueden provocar cambios en la estructura del ADN.

**Tabla 1.** Relación de genes y tipo de cáncer en humanos.

<b>Genes</b>	<b>Cáncer con el que esta involucrado</b>
APC	Cáncer de colon y estómago
DPC4	Cáncer pancreático
NF-1	Cáncer del sistema nervioso periférico y leucemia mieloide
NF-2	Cáncer de cerebro
RB	Cáncer de hueso, vejiga, cáncer de mama, células pequeñas del pulmón
P53	Involucrado en una gran variedad de cánceres
BRCA1	Cáncer de ovario y de mama
BRCA2	Cáncer de mama
NAT1 y NAT 2	Cáncer de mama
MTHFR	Cáncer de mama, cáncer gástrico, leucemia y linfomas

Fuente: Ríos y Hernández, 2001.

### **2.1.2 Radiación**

Colectivamente todos los agentes causantes de cáncer son llamados carcinógenos. Entre los más potentes carcinógenos están la radiación ultravioleta y la radiación ionizante (Watson *et al.*, 2002), además de Rayos X. El daño que producen en el ADN puede consistir en roturas de una cadena o de doble cadena, formación de dímeros de pirimidina y pérdida de bases púricas o pirimidínicas (Mckee y Mckee, 2003). La acción primaria de las radiaciones es la formación de radicales libres muy reactivos, pudiéndose producir transformaciones químicas (Puertas, 1999).

### **2.1.3 Virus**

El material genético de un virus puede ser insertado dentro de un cromosoma huésped en una forma “proviral” (Watson *et al.*, 2002). También se pueden introducir oncogenes en el cromosoma de la célula huésped al insertar su genoma (Mckee y Mckee, 2003).

## **2.2 Oncogenes y genes supresores de tumores**

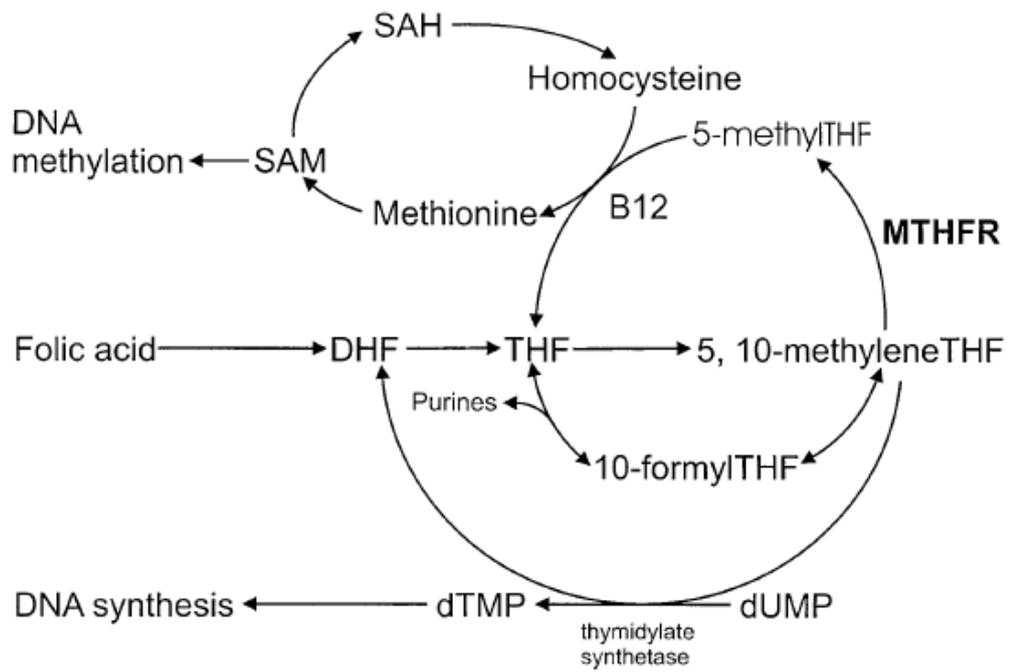
Por medio de la biología molecular se ha visto que el cáncer puede surgir como consecuencia de una acumulación de alteraciones genéticas o polimorfismos genéticos que interfieren en el control normal del crecimiento y diferenciación celular (Lera *et al.*, 1997). Estos genes están agrupados en dos familias. La primera familia está integrada por los genes supresores de tumores también conocidos como genes supresores, que en el organismo sano controlan la proliferación celular (Ríos y Hernández, 2001), inactivan o reprimen el progreso a través del ciclo celular y de la división celular resultante los cuales deben estar ausentes o inactivos para que esta se lleve a cabo (Klug y Cumming, 1999). La segunda familia está integrada por los proto-oncogenes, los cuales dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, etcétera que

estimulan la proliferación celular (Ríos y Hernández, 2001). La versión mutada de los protooncogenes que promueven la proliferación anormal celular se denominan oncogenes (Mckee y Mckee, 2003) los cuales son capaces de orquestar la multiplicación anárquica de las células (Ríos y Hernández, 2001). Al menos tres mecanismos pueden explicar como los protooncogenes se convierten en oncogenes que son: mutaciones puntuales, traslocaciones y sobreproducción (Klug y Cumming, 1999). Un ejemplo de la activación de los proto-oncogenes es la deficiencia de ácido fólico o folato el cual incrementa el riesgo de carcinogénesis causando una hipometilación del ADN (Sharp *et al.*, 2002; Lambropoulus *et al.*, 2003).

### **2.3 Metabolismo del folato**

El ácido fólico es una sustancia amarilla, cristalina que pertenece a un grupo de compuestos conocidos como uterinos (Kathleen y Escote, 1998). El ácido fólico (del latín folium, hoja), está ampliamente distribuido en las plantas (Lehninger, 1995). Su estructura consta de un núcleo de pteridina y el ácido para-aminobenzoico, ligados a uno o varios residuos de ácido glutámico (Mckee y Mckee, 2003).

El folato es donador de carbono para la remetilación de homocisteína a metionina (Skibola *et al.* 1999) (S-adenosilmetionina) (Shrubsole *et al.*, 2004), el cual es importante para la metilación del ADN. El folato que no es convertido a través de esta vía puede ser usado para la síntesis de purinas o la conversión de uracil a timina, el cual es usado para síntesis y reparación de ADN. Como se explica en la figura 1, el folato dietario es convertido a folato circulante dentro del organismo (5,10 metilen THF) y posteriormente es reducido por la enzima MTHFR para formar 5-metiltetrahidro folato el cual es usado para la conversión de homocisteína a metionina el cual pasa a S-adenosilmetionina, el donador universal de grupos metilos.



**Figura 1.** Metabolismo del folato.

El metabolismo del folato se utiliza para la síntesis, reparación y metilación del ADN. DHF= Dihidro folato, THF= Tetrahidro folato.

Fuente: Skibola *et al.*, 1999

Además de una activación de proto-oncogenes una deficiencia de folato induce una mala incorporación de un uracil durante la síntesis del ADN, induciendo una reparación catastrófica (Sharp *et al.*, 2002; Lambropoulos *et al.*, 2003) y el cual puede ser una causa de carcinogénesis.

#### **2.4 MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) y enfermedades relacionadas**

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la reducción de 5,10- metilentetrahidrofolato a 5- metiltetrahidrofolato, la forma circulatoria del folato (Skibola *et al.*, 1999).

El gen metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) esta localizado en el cromosoma 1p36.3 y codifica para una proteína de 656 aminoácidos la cual actúa como un homodímero (Plaschke *et al.*, 2003). Dos polimorfismos en el gen MTHFR han sido identificados, el C677T donde se cambia una citosina por una timina y el cual trae como consecuencia la conversión de una alanina a valina (Campbell *et al.*, 2002), en el aminoácido 222 de la proteína (Plaschke *et al.*, 2003) y puede modificar el riesgo de cáncer de mama y otros cánceres (Campbell *et al.*, 2002). El segundo polimorfismo genético (A1298C) se cambia una adenina por una citosina (Shrubsole *et al.*, 2004) y a nivel de proteína se cambia un glutamato por una alanina en el aminoácido 428 (Plaschke *et al.*, 2003); ambas mutaciones (C677T y A1298C) disminuyen la actividad de la enzima por mas del 50% y pueden promover alteraciones oncogénicas en la metilación del ADN especialmente cuando los niveles de folato son bajos (Yi *et al.*, 2002). Entre las enfermedades reportadas en las que participan los polimorfismos en el gen MTHFR están: Leucemia (Bolufer *et al.*, 2006), enfermedades coronarias (Fernández *et al.*, 2006), homocisteinemia (Sachdev, 2005), cáncer de mama (Campbell *et al.*, 2002), cáncer colorectal (Plaschke *et al.*, 2003) etc

En la actualidad se sabe que en humanos el arsénico inorgánico es metabolizado por metilación lo que hace más fácil su excreción por la orina (Tapio y Grosche, 2006), la enzima MTHFR participa en dicho metabolismo promoviendo la formación de SAM (S-adenosil metionina) el donador de grupos metilos para la metilacion del arsénico.

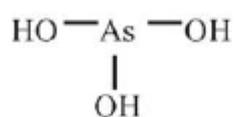
## 2.5 Descripción de arsénico

El arsénico es un metaloide cuyo número atómico es 33 y pertenece al grupo V de la tabla periódica, es de color gris acero (Lauwerys, 1994), tiene una densidad de 5.7 y sublima a 613 °C (Martí *et al.*, 2002). El arsénico existe en tres estados de valencia (-3, +3 y +5) (Duker *et al.*, 2004). Se encuentra presente en alimentos, tierra, aire, agua, y todas las poblaciones están expuestas a una forma u otra (Abernathy *et al.*, 1999). El arsénico trivalente (+3) ó arsenito y pentavalente (+5) ó arseniato están ampliamente distribuidos en el agua (Duker *et al.*, 2004). En el cuerpo el arsénico es metilado formando MMA (ácido monometilarsónico) y DMA (ácido dimetilarsínico) (Meza *et al.*, 2004), y oxido trimetilarsina (TMAO) por microorganismos. La forma trivalente del arsénico es generalmente mas tóxica que la pentavalente. En la figura 2 se observan las forma trivalente y pentavalente del arsénico y sus respectivas formas orgánicas (Duker *et al.*, 2004).

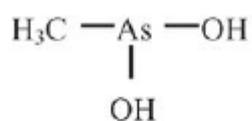
### 2.5.1 Toxicidad

El arsénico puede ser tóxico a través de la interacción de grupos sulfidrido de proteínas y enzimas (Tapio y Grosche, 2006) y a través de un incremento de la reactividad de especies oxigénicas (Abernathy *et al.*, 1999), en la célula llevando a daño celular. El arsenito (As III) es conocido por inhibir mas de 200 enzimas (Tapio y Grosche, 2006). El arseniato (As V)

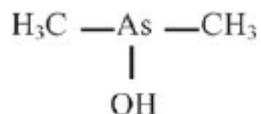
### TRIVALENTES



Arsenite(III)

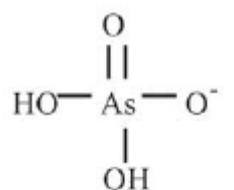


Mono Methyl Arsonous Acid  
MMA(III)

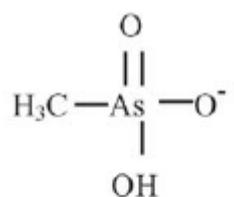


Dimethyl Arsinous Acid  
DMA(III)

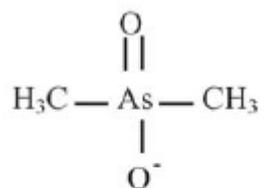
### PENTAVALENTES



Arsenate(V)



Mono Methyl Arsonic Acid  
MMA(V)



Dimethyl Arsinic Acid  
DMA(V)

**Figura 2.** Diferentes formas orgánicas e inorgánicas del arsénico.

MMA (ácido monometilarsónico) y DMA (ácido dimetilarsínico) son el producto de la biotransformación del arsénico inorgánico en el organismo.

Fuente: Tapio y Grosche, 2006

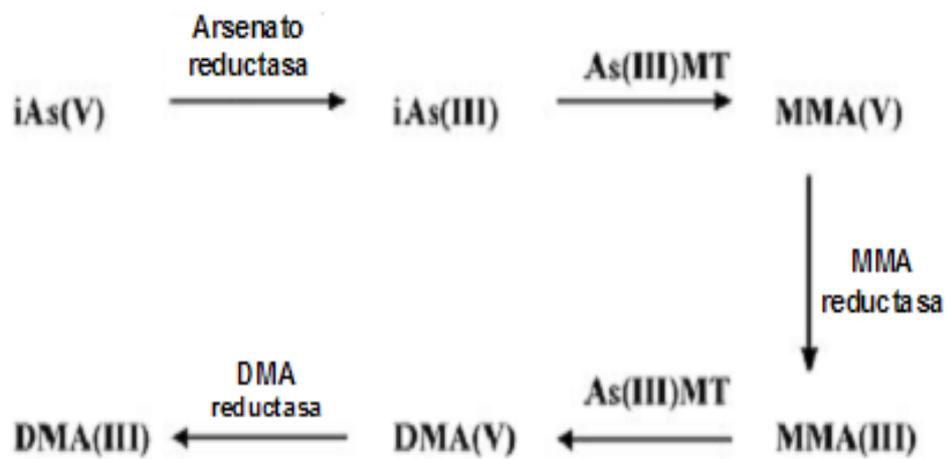
tiene una estructura similar al fosfato y puede sustituir al fósforo en el cuerpo el cual puede almacenarse en los huesos por mucho tiempo (Duker *et al.*, 2004).

### **2.5.2 Metabolismo del arsénico**

El arsénico entra al cuerpo en su forma inorgánica como iAs(V) y iAs(III) (Tapio y Grosche, 2006), son activamente transportados a la célula por las aquaglicoporinas y después por el transportador fosfato, ya dentro de la célula es reducido el iAs(V) a iAs(III) (Aposhian *et al.*, 2004), por la enzima arseniato reductasa (Hugues, 2006).

Tal como se muestra en la figura 3 la biometilación de arsénico inorgánico genera ácido monometilarsónico (MMA V) (Tapio y Grosche, 2006), esta reacción es llevada a cabo por la arsenito metiltransferasa (AsIII MT) (Aposhian *et al.*, 2004) la cual utiliza al SAM (S- adenosil metionina) como el donador de grupos metilos. MMA V es reducido por la enzima MMA reductasa a MMA III (Ahsan *et al.*, 2007), esta a su vez es metilada por la arsénico III metiltransferasa (AsIII MT) a ácido dimetilarsónico V (DMA V) y reducida a DMA III por la enzima DMA reductasa (Aposhian *et al.*, 2004). Las formas metiladas son más fácilmente excretadas en orina que arsénico inorgánico (Gamble *et al.*, 2005), la reducción de iAs(V) a iAs(III) es un prerrequisito para que la metilación se pueda llevar a cabo (Tapio y Grosche, 2006).

Estudios in vivo e in vitro muestran que este proceso de detoxificación de las especies MMA y DMA son ambas tóxicas para el ser humano esto sugiere que la metilación no solo puede ser un proceso de detoxificación si no también puede realzar la toxicidad y carcinogénesis (Duker *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Metabolismo del arsénico

AsV (arseniato), As III (arsenito), MMA (ácido monometilarsónico), DMA (ácido dimetilarsónico). As(III)MT ( Arsénico III metiltransferasa)

Fuente: Tapio y Grosche, 2006.

### **2.5.3 Efectos de la contaminación de arsénico en el ser humano**

Los órganos mas afectados por la toxicidad del arsénico son aquellos involucrados con la absorción, acumulación y excreción del arsénico (Dukeret al., 2004), estudios epidemiológicos han mostrado que una exposición crónica a arsénico puede resultar en daño al hígado, neuropatías periféricas (Hei *et al.*,1998), incremento en la incidencia de cáncer de pulmón, vejiga, riñon, hígado, alteraciones en la piel tales como queratosis e hiperpigmentación (Hopenhayn *et al.*,1996), diabetes mellitus e hipertensión, (Tapio y Grosche, 2006). El arsénico puede ser responsable de la inhibición de la bomba de sodio potasio, también puede disminuir el proceso de reparación del ADN provocando susceptibilidad al cáncer y otras enfermedades (Duker *et al.*, 2004).

Las formas metiladas trivalentes del arsénico MMA (III) y DMA (III) frecuentemente exceden en citotoxicidad y genotoxicidad al iAs (III) (Tapio y Grosche, 2006), el arsenito (As III) es un mutagénico que induce mutaciones cromosomales y la respuesta mutagénica es causada por especies de oxígeno reactivos (ROS) (Hei *et al.*, 1998).

### **2.5.4 Biomarcadores del arsénico**

Un biomarcador es una muestra biológica que puede dar información sobre el tiempo de exposición a algún tóxico. Los biomarcadores del arsénico incluyen análisis de orina, sangre, cabello y uñas.

La detección de As en estas muestras biológicas es indicativa del sistema de absorción después a una exposición a arsénico (Hughes, 2006). Las muestras de orina y sangre pueden ser usados para estimar la dosis individual de exposición actual, mientras que el cabello y las uñas son muestras que dan la exposición promedio por largo periodo de tiempo (Tapio y Grosche, 2006). El mejor análisis de arsénico es el de sangre porque se puede determinar recientes exposiciones de altas dosis, sin embargo es

mas difícil trabajar con sangre que con orina, ya que la colección de sangre es un procedimiento invasivo donde pocos sujetos aceptan participar (Hughes, 2006). El arsénico urinario es considerado un marcador de exposición reciente y puede reflejar la concentración de arsénico en el cuerpo (Gamble *et al.*, 2005).

### **2.5.5 Distribución de arsénico**

Se ha encontrado que existe arsénico dentro del agua subterránea de varios países como Argentina, Bangladesh, India, Pakistan, México, Mongolia, Tailandia, China, Chile, USA, Canadá, Hungría, etc. En la tabla 2 Tapio y Grosche, 2006 reportan algunos países con alta incidencia de arsénico en agua potable y el número de personas afectadas, donde se observa que el número de personas afectadas en México esta por arriba de Chile, Estados Unidos y Finlandia.

En algunos lugares de Bangladesh las concentraciones de As son tan altas como 1000 g/L (Mondal *et al.*, 2006). En México hay reportes de exposición crónica de arsénico en agua para beber (Wyatt *et al.*, 1998), donde la concentración estándar de arsénico es de 35 ppb (Meza *et al.*, 2004). En Sonora especialmente en Magdalena, Caborca, Etchojoa y Hermosillo, han sido reportadas altas concentraciones de arsénico en agua para beber con concentraciones de arsénico total de 117, 67,51 y 305  $\mu\text{g/L}$  respectivamente (Wyatt *et al.*, 1998).

## **2.6 Polimorfismos de ADN**

Polimorfismo genético ó polimorfismo de ADN se refiere a la ocurrencia simultánea en la población de genomas que muestran variantes alélicas (Lewin, 1997). Estos polimorfismos pueden resultar en una proteína defectuosa en su función y estabilidad, procesamiento postranscripcional alterado, o niveles de expresión alterados (Mollerup *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Países con contaminación de arsénico en agua.

<b>País</b>	<b>Número de personas afectadas</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>
Bangladesh	50–75 million	<10–>1000
West Bengal (India)	>6 million	3–3700
China	>2 million	50–2000
Taiwan	120.000 (1982)	200–2500
Tailandia	n.d.	1–5114
Vietnam	11 million	1–3050
México	400.000	8–624
Chile	250.000	470–770
Argentina	2 million	>100
Estados Unidos	350.000	1–1160
Finlandia	10.000	17–980
Hungría	n.d.	1–174

n.d. No determinado

Fuente: Tapio y Grosche, 2006.

Los polimorfismos pueden ser detectados directamente en moléculas de ADN. Existen varios métodos para detectar polimorfismos uno de ellos usa una sonda de ADN que es generalmente obtenido de vectores como plásmidos o fagos dentro de los cuales los fragmentos de ADN del organismo de interés han sido clonados (Hartl y Jones, 1998), a continuación se describen varios métodos para la detección de polimorfismos.

## **2.7 Métodos de detección de polimorfismos**

### **2.7.1 RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción).**

El método RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción) se basa en la digestión total de ADN empleando diferentes enzimas de digestión o enzimas de restricción (Feria *et al.*, 2007). Estas enzimas tienen la propiedad de reconocer secuencias cortas, de cuatro, seis u ocho pares de bases llamados sitios de restricción (Puertas, 1999), los cuales al ser reconocidos por una enzima de restricción divide al ADN (Sasnouskan *et al.*, 2003), produciéndose extremos romos o extremos cohesivos (Brown, 1992).

En RFLP se usan aproximadamente 10 µg de DNA para asegurar la eficiencia en la detección de los fragmentos (Panduro, 2000). Los fragmentos de ADN de diferentes tamaños son producidos cuando el ADN es digerido con una endonucleasa de restricción en particular (Glick y Pasternak, 2003), donde las diferencias en longitud de fragmentos de ADN son producidos por la presencia o ausencia de sitios de división en moléculas de ADN (Hartl y Jones, 1998). Gracias a los fragmentos obtenidos se pueden detectar, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos que pueden ser reconocidos por la enzimas de restricción (Feria *et al.*, 2007). Los RFLPs son utilizados en medicina forense, pruebas de paternidad, identificación de personas, etc (Puertas, 1999) y la detección de

una gran variedad de polimorfismos genéticos, asociados muchos de ellos a diferentes patologías (Panduro, 2000).

### **2.7.2 RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)**

Se basa en la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) donde un simple primer de PCR amplifica aleatoriamente diferentes regiones en el genoma (Griffiths *et al*, 1999), a temperaturas relativamente bajas (36°C), lo que permite una interacción mas laxa (Feria *et al.*, 2007), sin embargo la reproducibilidad es un obstáculo en el análisis RAPD, el cual puede ser muy sensible a la calidad del ADN (Makedonka *et al.*, 2006). RAPD puede ser usado para caracterizar genomas enteros, cromosomas individuales, o menos comúnmente genes específicos (Glick y Pasternak, 2003), donde los fragmentos amplificados son separados por electroforesis y las bandas con diferente peso molecular representarán diferentes *loci* de herencia dominante (Feria *et al.*, 2007).

### **2.7.3 AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).**

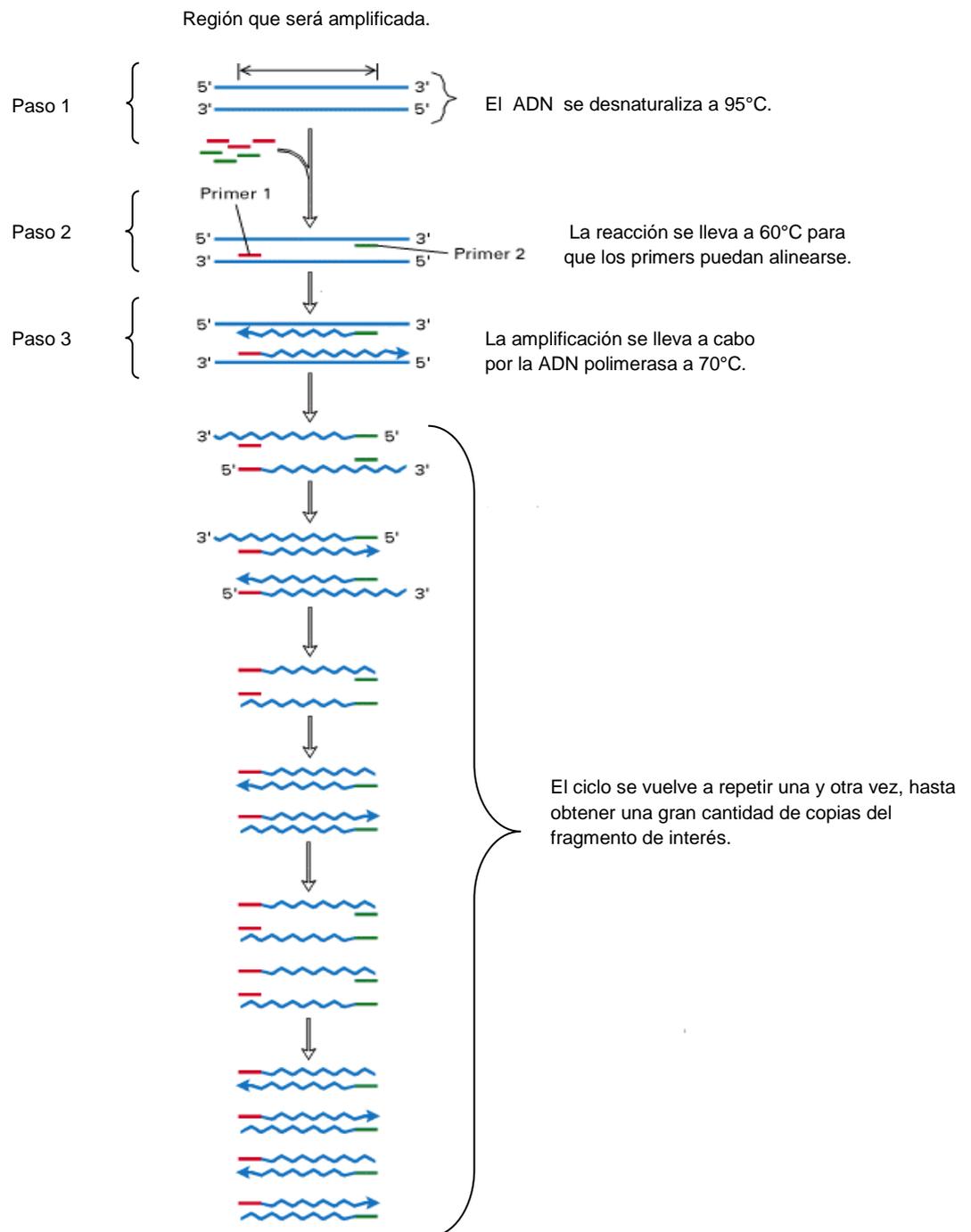
Es una técnica que combina la digestión de ADN empleando diferentes enzimas de restricción (Feria *et al*, 2007). Esta nueva técnica utiliza moléculas adaptadas que son ligadas a los fragmentos producidos por las enzimas de restricción y subsecuentemente son usados como sitios blanco por los primers de PCR (Mobley *et al.*, 2001).

Esta técnica se ha empleado en el estudio de la diversidad genética de diferentes plantas, en la elaboración de mapas genómicos y en la identificación de fragmentos ligados a genes de interés comercial (Feria *et al*, 2007).

#### 2.7.4 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica para amplificar dramáticamente cantidades de segmentos de ADN específico (Garrett y Grisham, 1999). La diferencia de clonar una molécula a aplicar PCR está en que no se utilizan células vivas como en el caso de la clonación (Brown, 1992). Esta técnica consiste en mezclar los primers (Walker y Gingold, 1993) (alrededor de 20 nucleótidos de longitud) (Hartl y Jones, 1998) los cuales son secuencias de ADN complementarios al ADN de interés, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), magnesio y una polimerasa termoestable (Walker y Gingold, 1993) la mas ampliamente usada es la *Taq* polimerasa, aislada de una arqueobacteria termofila, *Thermus aquaticus* (Hartl y Jones, 1998). Los primers son necesarios para iniciar la reacción de síntesis por la *Taq* polimerasa. Tal como se observa en la figura 4, en el primer paso, el DNA de doble cadena de la muestra se desnaturaliza por calentamiento a 95°C (McKee y McKee, 2003), a esta temperatura la doble cadena se separa en dos polinucleótidos (Brown, 1992). En el segundo paso la temperatura de la muestra es llevada a 55°C (Glick y Pasternak, 2003), donde se alinean los primers específicos que sirven como cebadores para la síntesis de ADN (Garrett y Grisham, 1999). El cebador hibrida con las secuencias complementarias de los extremos de las dos cadenas. Durante el paso 3, se eleva la temperatura a 75 °C la cual es la temperatura óptima para el funcionamiento de la *Taq* ADN polimerasa e iniciar la síntesis de ADN (Glick y Pasternak, 2003).

El ciclo de calentamiento y enfriamiento es repetido de 25 a 30 veces (Lehninger, 1995). En el primer ciclo de PCR se obtienen cadenas idénticas de las cadenas madres, después de 30 ciclos llegan a obtenerse alrededor de 250 millones de copias (Brown, 1992).



**Figura 4.** Pasos que se llevan a cabo para una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Paso1: Desnaturalización a 95°C, Paso2: Alineación de Primers a 60°C, Paso 3: Extensión de la cadena a 70°C.

Fuente: Lodish *et al.*, 1999.

### **2.7.5 Secuenciación**

El método de secuenciación fue desarrollado por Fred Sanger, para conocer la secuencia de un fragmento de ADN (Brown, 1992). Este método es basado en la síntesis de ADN (Griffiths *et al.*, 1999), por la ADN polimerasa (Brown, 1992), en la presencia de didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) los cuales difieren de los normales desoxinucleótidos (dNTP's) en que ellos carecen un grupo hidroxilo (OH) en el extremo 3' (Griffiths *et al.*, 1999). Al incorporarse un ddNTP a la síntesis de ADN se provoca una abrupta terminación de la cadena por carecer el grupo hidroxil (Stranchan y Read, 1999). El resultado es un grupo de nuevas cadenas todas de diferente tamaño, las cuales se visualizan en el gel de poliacrilamida (Brown, 1999).

## **2.8 Extracción de ADN**

Técnicas como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), clonación, identificación molecular, etc. requieren de ADN como materia prima inicial. Por lo tanto, el método de extracción de ADN que se utilice deberá ser eficiente en rendimiento y producir moléculas de alta calidad y pureza (Smith *et al.*, 2003).

En la actualidad ya se cuenta con métodos de extracción de DNA más fáciles de llevar a cabo, ya que el método está contenido en un kit de extracción de ADN el cual con una serie de lisis, lavados y precipitaciones se puede obtener ADN de alta calidad y pureza en un corto periodo de tiempo.

Actualmente existen sistemas comerciales que permiten la extracción del ADN a partir del material fresco y una vez extraído el ADN se corrobora la integridad del material genético (Feria *et al.*, 2007), por medio de una de las técnicas más usadas, la electroforesis de ADN la cual se basa en los

movimientos de iones en un campo eléctrico (Garrett y Grisham, 1999), creado por un aparato llamado fuente de electroforesis. La carga negativa del ADN es debido a los grupos fosfato así que tienden a moverse hacia el polo positivo del campo eléctrico (Puertas, 1999). Generalmente la electroforesis es llevada a cabo en solución libre pero en una matriz porosa tales como la poliacrilamida o agarosa (Garrett y Grisham, 1999). El gel de agarosa al 1% separa moléculas de doble cadena de ADN en un rango de 600 a 10,000 pb. El gel de poliacrilamida al 20% separa moléculas de ADN como de seis bases y que difieren de las otras por un nucleótido (Glick y Pasternak, 2003). El ADN se hace visible en el gel con la adición de bromuro de etidio el cual se une solo al ADN y que fluoresce cuando el gel es iluminado con luz ultravioleta (Hartl y Jones, 1998).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Muestreo de agua en Hermosillo, Sonora.**

Se hizo un muestreo previo de agua en Hermosillo, Sonora para determinar los niveles de arsénico en agua potable y seleccionar aquellas zonas de altas y bajas concentraciones de arsénico, para lo cual se estudiaron los mapas de Hermosillo para localizar cada tanque de abastecimiento de agua potable y la colonia a la que abastece.

Cada muestra de agua fue colectada en un tubo de polipropileno Corning de fondo cónico de 50 ml de capacidad, las muestras de agua fueron almacenadas en el laboratorio a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente transportadas en hielo seco ( $\text{CO}_2$  sólido) a la Universidad de Arizona (Tucson, Arizona, EUA) donde se llevó a cabo el análisis de arsénico.

#### **3.2 Reclutamiento de casos y controles**

De acuerdo al INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática), Hermosillo está dividido en AGEBS (Áreas Geo Estadísticas Básicas) y estos a su vez subdivididos en zonas. Se seleccionaron al azar dos AGEBS correspondientes a las zonas de mayor y menor concentración de As en agua de Hermosillo y a partir de ellas se eligieron también aleatoriamente 50 casas de cada una de ambas zonas. Se les invitó a participar en el estudio a las personas mayores de 18 años y quienes aceptaron participar aportaron cinco muestras, complementadas con un cuestionario de hábitos alimenticios, un historial médico y preguntas sobre los materiales usados para la construcción del hogar.

### **3.3 Obtención de muestras**

Las personas participantes aportaron cinco muestras: Agua del hogar, sangre, orina, uñas y células bucales, cada una de las cuales se describen a continuación.

#### **3.3.2 Agua**

El agua fue colectada del hogar de todas las fuentes abastecedoras ya sea embotellada, de la llave y de filtro en caso de que hubiera, a las cuales simultáneamente se les midió el pH con papel Phydrión y la temperatura se midió con un termómetro Brannan. En el caso del agua de la llave se dejó correr 2 minutos para después ser colectada usando tubos estériles de polipropileno Corning de 50 ml con fondo cónico, para ser procesada en el laboratorio de la cual se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C para el análisis de arsénico. El procesamiento de la muestra se describe en el apéndice 1.

El análisis de arsénico total en agua se realizó por medio de espectrometría de masas utilizando un ICP-MS Agilent 7500 (Agilent Technologies, Inc.) con un nebulizador MicroMist (Extensión de vidrio) por un auto muestreador ASX500 (CETAC Technologies). El procedimiento del análisis de arsénico en agua se describe en Ríos (2007)

#### **3.3.3 Sangre**

La muestra de sangre fue tomada de la vena del brazo del participante en dos tubos, el primero con EDTA y de aproximadamente 10 ml de capacidad fue almacenado para posteriormente hacer la extracción de ADN de la cual se hicieron alícuotas y fueron almacenadas para ser utilizadas en el análisis genético. En el segundo tubo sin EDTA se colectó la sangre y fue procesado en el laboratorio para separar el paquete celular del

suero, este último fue almacenado en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis de arsénico en futuras investigaciones. El procesamiento del suero se describe en el apéndice 2.

### **3.3.4 Orina**

La primera orina de la mañana fue colectada por el participante usando un recipiente estéril de polipropileno de 120 ml libre de cualquier metal incluyendo arsénico. La muestra fue centrifugada por 12 minutos a 2,400 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se hicieron alícuotas las cuales fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis de arsénico. El procesamiento de la muestra en el laboratorio es descrito en el apéndice 3.

Las muestras de orina fueron digeridas con ácido nítrico de acuerdo al método 3015 de la US-EPA, el cual es descrito por Ríos (2007). Para la separación de las especies de As se utilizó HPLC 110 series con una columna C18 de fase reversa (ODS (octadecilsilano unido al sustrato Gemini 5u C18 110A), 150 x 4.60 mm, Phenomenex, Torrance, CA). Para el análisis de las especies de arsénico (AsIII, As V, DMA y MMA), la muestra pasó al ICP-MS Agilent 7500 (Agilent Technologies, Inc.) con un nebulizador MicroMist (Extensión de vidrio) por un auto muestreador ASX500 (CETAC Technologies).

### **3.3.5 Células bucales**

Las células bucales se colectaron por el mismo participante con la ayuda de un cepillo estéril y nuevo, con el cual la persona cepillaba por dentro de las mejillas aproximadamente 20 veces de un lado y del otro y posteriormente el cepillo era recogido por un miembro del equipo para enjuagarlo y recuperar las células en una solución de buffer PBS (0.1 M, pH= 7.2) y penicilina / estreptomina (5u/ml / 5mg/ml) que ayudaba a

preservar las células hasta su procesamiento. La muestra fue centrifugada 5 minutos a 5000 rpm. para separar las células de la solución, estas fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras investigaciones. El procesamiento de la muestra se describe en el apéndice 4.

### **3.3.6 Uñas**

Las muestras de uñas fueron de los pies para la mayor comodidad del participante. Las uñas fueron colectadas por cada participante usando material totalmente nuevo proporcionado por el personal de investigación, el cual consistía en un cortauñas y dos sobres para separar las uñas de los dedos grandes de los dedos chicos, después de haber colectado las uñas en los sobres estos fueron sellados y almacenados en el laboratorio a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras investigaciones.

## **3.4 Aplicación de cuestionarios**

Las muestras de cada participante fueron completadas con cuestionarios que incluyen preguntas sobre su historial residencial, fuente de agua más usada para cocinar y beber en cada residencia, alimentos que se consumieron dentro de 24 horas y que frecuentemente se consumen en un tiempo no mayor de un año, además de un cuestionario de información sobre la historia ocupacional y preguntas sobre exposición a arsénico.

## **3.5 Extracción del ADN**

La extracción del ADN se realizó mediante el protocolo del kit de Pax Gen, el cual inicia con la lisis de las células contenidas en el tubo de almacenamiento por medio de un buffer de lisis (BG1). Posteriormente se utilizó un buffer de lavado (BG2) y centrifugación por 3 minutos a  $2500 \times g$  por medio de una centrifuga Beckman Coulter Allegra 63R, para deshechar los restos celulares. El precipitado se resuspendió con un buffer de digestión

con proteasa proporcionado por el kit (BG3) para degradar toda aquella proteína que se encontraba unida al ADN y se incubó a 65°C por 10 min para que la reacción se llevara a cabo, la participación del isopropanol fue esencial para la precipitación del ADN, el cual puede ser visualizado después de haberse formado las hebras del ADN al invertir el tubo 20 veces. Por último, se utilizó etanol para hidratar al ADN y se resuspendió con buffer TE (Tris-HCl- EDTA), también llamado BG4, el cual sirvió para mantener al ADN en solución y facilitar el almacenamiento a -80°C para su posterior análisis. El procedimiento de la extracción de ADN se describe en el apéndice 5.

### 3.5.1 Estimación de concentración y pureza del ADN

La estimación de concentración de ADN de las muestras sanguíneas se realizó mediante lecturas de absorbancia a 260 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman Coulter DU 530, considerando que 1.0 unidad de  $A_{260}$  dsDNA = 50 µg/ml. Para ello se empleó la fórmula:

$$\text{Concentración ADN (mg/ml)} = A_{260} \times \text{Coeficiente de Extinción} \times \text{factor de dilución} \times \text{recorrido óptico ("pathlength")}$$

y bajo las condiciones experimentales de esta investigación:

$$\text{Concent. ADN (mg/ml)} = A_{260} \times 50 \times 100 \times 1$$

La estimación de pureza de ADN se realizó mediante lecturas de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ . La integridad de las moléculas de ADN se registró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (Sambrook y Russell, 2001), 70 V, 1 hora, teñidos con bromuro de etidio (5µg/ml) y visualizado en un transiluminador UV Gel Logic 200 Imaging system Kodak.

### 3.6 Amplificación del gen MTHFR

Para la amplificación del fragmento del gen MTHFR que contiene el SNP (polimorfismo de nucleótido simple) C677T se utilizaron los primers sentido 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3' y antisentido 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG- 3' (Skibola *et al.*, 1999). Cada 50 µl de mezcla de PCR contuvo 100 ng de ADN genómico, buffer de PCR [50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>], 200 µM de cada deoxinucleotido trifosfato, 50 ng de cada primer y 1.25 unidades de *Taq* polimerasa (5 unidades/µl). La mezcla de la reacción fue inicialmente llevada a 94°C por 5 min. La PCR se realizó en 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 72°C por 30 seg y 72°C por 30seg (Modificado de: Skibola *et al.*, 1999), por medio del termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient.

Para el SNP A1298C se utilizaron los primers sentido 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C -3' y antisentido 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG - 3' (Skibola *et al.*, 1999). La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue llevado a 40 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 1 min y 72°C por 7 minutos (Modificado de: Skibola *et al.*, 1999), por medio del termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient. El procedimiento de la amplificación por PCR se describe en el apéndice 6.

### 3.7 Análisis de restricción

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Mbo* II para C677T y A1298C, respectivamente. La digestión para la mutación C677T fue hecha usando 25 µl de volumen total, 2.5 µl de buffer de la enzima, 20 µl del producto de PCR y 10 unidades de la enzima, seguido por incubación a 37°C por 8 horas (Modificado de: Skibola *et al.*, 1999). La mezcla de reacción fue incubada a 37°C. La digestión fue visualizada en electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de

etidio (5µg/ml) y visualizado con un transluminador UV Gel Logic 200 Imaging system Kodak.

La digestión para la mutación A1298C fue hecha en un volumen total de 25 µl, 2.5 µl de buffer de la enzima, 20 µl del producto de PCR y 2.5 unidades de la enzima y por último la mezcla de reacción fue incubada a 37°C por 8 horas (Modificado de: Skibola *et al.*, 1999). Los fragmentos digeridos fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con un transluminador UV Gel Logic 200 Imaging system Kodak. Se utilizaron las enzimas de restricción reportadas por Skibola (*et al.*, 1999) (ver tabla 3). El procedimiento sobre el análisis de restricción se describe en el apéndice 7.

### **3.8 Análisis estadístico**

Se utilizaron las proporciones relativas de cada especie de arsénico (%As III, %As V, %MMA y %DMA), las cuales fueron calculadas dividiendo cada especie de arsénico entre la sumatoria de todas estas (As total). Se aplicaron análisis de varianza para evaluar los efectos de zona, género, genotipo MTHFR 677, MTHFR 1298 y diplotipo MTHFR 677/1298. Se evaluó previamente la normalidad de los datos utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XV. Las proporciones de las especies de arsénico MMA y DMA fueron datos normales. Las variables As total urinario y AsIII fueron datos normalizados mediante la función log. Solamente la variable As V fue normalizada mediante la transformación arco seno de la raíz cuadrada

Se utilizó el programa estadístico Statistica 98´ para obtener la correlación de Spearman y para los resultados de graficación. Para las gráficas de As V y arsénico total urinario se utilizaron datos normalizados.

**Tabla 3.** Resumen de las enzimas utilizadas en el análisis de restricción

Enzima	Mutación	Sitio de restricción que reconoce
<i>Hinf</i> I	C677T	G ANTC CTNA G
<i>Mbo</i> II	A1298C	GAAGA(N)8 CTTCT(N)7

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Selección de las zonas de estudio

Como se observa en la tabla 4, las concentraciones de arsénico total en el agua potable de Hermosillo, Sonora fueron de 4.525  $\mu\text{g/l}$  a 37.51  $\mu\text{g/l}$  con una media de 16.59  $\mu\text{g/l}$  y un intervalo de confianza al 95% de (13.31 – 19.88  $\mu\text{g/l}$ ), donde las mayores concentraciones fueron en el norte de la ciudad. Según menciona Ríos (2007) esto se debe al abastecimiento de los tanques que suministran agua potable a Hermosillo, con agua subterránea provenientes de diferentes pozos construidos a consecuencia de una disminución de aportación de agua de la presa Abelardo L. Rodríguez. Los pozos Tronconal y La Victoria al norte de la ciudad han mostrado tener concentraciones de arsénico consistentemente altas y más aún en épocas de sequía (Meza, com, pers., citado por: Ríos, 2007). El resultado de estas observaciones se ve reflejado en nuestros resultados de arsénico en agua potable, los cuales muestran un claro gradiente de norte a sur, de mayor a menor concentración de As.

Tomando en cuenta las diferentes concentraciones de arsénico en agua potable, para este estudio se seleccionaron dos zonas: 1) la Colonia Olivos (zona 1) localizada al sur de la ciudad (ver figura 5), la cual tuvo la menor concentración de arsénico en agua (4.525  $\mu\text{g/L}$ ) y 2) la colonia Bachoco (zona 2) localizada al norte de la ciudad, la cual tuvo una concentración de arsénico (37.5  $\mu\text{g/L}$ ) mayor de lo permitido por la NOM-127-SSA1 (25  $\mu\text{g/L}$ ) (1994) y US-EPA, MCL (10 $\mu\text{g/L}$ ) (Tseng *et al.*, 2000). Se encontró una diferencia estadística significativa ( $t= 23.73$ ,  $p < 0.001$ ), entre las concentraciones de arsénico en agua potable de ambas zonas (Bachoco y Olivos), tal y como se observa en la figura 6.

**Tabla 4.** Concentraciones de arsénico total en los tanques de abastecimiento de agua potable de Hermosillo, Sonora.

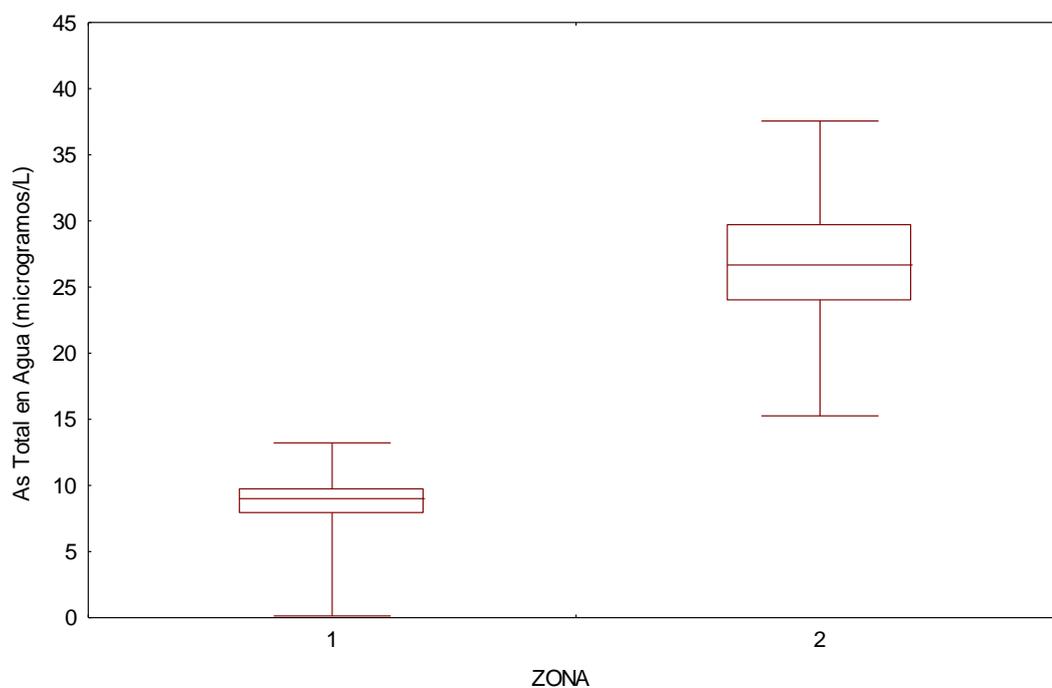
<b>Tanque</b>	<b>µg/L</b>	<b>Tanque</b>	<b>µg/L</b>
5 de Febrero	12.02	San Francisco	13.09
Penitenciaria	7.59	Fracc. Plaza Real	24.88
Puebla I y Puebla II	11.22	La Victoria	33.5
Campana	10.27	Sahuaro	26.2
Kino	22.67	Valle Dorado	24.19
Olivos	24.24	La Manga	9.39
<b>Bachoco I y II</b>	<b>37.51</b>	El Llano	9.96
Perifericos I, II y III	28.27	Colonia de los maestros	13.1
Café Combate	36.6	Capistrano Residencial	10.26
<b>Palo Verde</b>	<b>4.53</b>	Las Granjas	10.67
Cementería	12.14	Santa Fe	12.12
Piedra Bola	8.24	Las Quintas	10.64
Constitución	7.95	Fuentes del Mezquital	10.93
Akiwiki	6.97	Y Griega	5.34
San Luis	26.9	Primero Hermosillo	30.71
Potabilizadoras I y II	7.89	Norberto Ortega	31.99
Caja Repartidora	33.99	Solidaridad	5.73
San Pedro	9.77	La Marqueza	7.76
Ranchito	10.22	Cuahutemoc	7.72
Rebombeo de aguas negras	33.19	Pueblitos	4.95
Sahuaro Final	25.06		

NOM-127-SSA1 (25 µg/L) (1994); US-EPA, MCL (10 µg/L) (Tseng *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Localización de las zonas Olivos y Bachoco. La zona 1 (Olivos) se encuentra al sur de la ciudad y la zona 2 (Bachoco) se encuentra al norte de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

Modificado de: <http://cosmos.astro.uson.mx/meetings/cna2004/hermo.jpg>



**Figura 6.** Diferencias entre zonas: la Zona 1 (Olivos) tuvo menor concentración de Arsénico Total en agua a diferencia de la zona 2 (Bachoco) la cual tuvo la mayor concentración de Arsénico en agua potable.

-  Valores máximos y valores mínimos
-  Mediana
-  Rango intercuartil

## **4.2 Selección de los participantes en el estudio**

Como se muestra en la tabla 5, 229 casas fueron seleccionadas para el estudio (107 de Olivos y 122 de Bachoco), de las cuales solo participaron 50 casas de cada zona con un total de 110 personas participantes en el estudio. Debido a que hubo personas que no proporcionaron muestras de sangre lo cual era esencial para la extracción de ADN y genotipo, el grupo de estudio se redujo a noventa y cinco, 49 personas de la colonia Olivos (14 hombres y 35 mujeres) entre los 20 y los 74 años de edad y 46 personas de la colonia Bachoco (12 hombres y 34 mujeres) entre los 20 y los 75 años de edad. Todas las personas seleccionadas para el estudio proporcionaron muestras de células bucales, uñas, sangre, la primera orina de la mañana y agua de todas las fuentes abastecedoras (baño, jardín, cocina). Las muestras de uñas y células bucales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

## **4.3 Especiación de arsénico en orina**

La distribución de las especies de arsénico en orina de los sujetos participantes se muestran en la tabla 6 donde se observa que no hay ninguna diferencia entre los niveles de las especies de arsénico en orina de ambas zonas (Olivos y Bachoco) pero si hay diferencias entre el arsénico total urinario. A pesar de que la colonia Olivos tuvo la menor concentración de arsénico en agua potable, esta tuvo mayores concentraciones de arsénico total en orina (a diferencia de la colonia Bachoco), esto posiblemente se debe a que las personas que están expuestas a las altas concentraciones de arsénico en agua potable (Bachoco) solo beban agua embotellada ya que éstas a su vez contienen niveles de arsénico por debajo de lo permitido por NOM-127-SSA1 (25  $\mu\text{g/L}$ ) (1994) y US-EPA, MCL (10  $\mu\text{g/L}$ ) (Tseng *et al.*, 2000).

**Tabla 5.** Participación de los sujetos en el estudio.

	<b>Zona 1</b>	<b>Zonas 2</b>
Casas seleccionadas para el reclutamiento	107	122
Casas reclutadas	50	50
Casas que rechazaron participar	41	59
Casas con participantes no elegibles	3	1
Casas sin respuesta	13	12
Porcentaje de participación	55%	46%
Personas aptas para el estudio*	49	46
Mujeres participantes en el estudio	35	34
Hombres participantes en el estudio	14	12

\* Personas que aportaron muestras biológicas

**Tabla 6.** Niveles de Arsénico en orina de los participantes de Olivos y Bachoco (Media y entre paréntesis intervalo de confianza).

	<b>Olivos (n=49)</b>	<b>Bachoco (n=46)</b>
	<b>Media (95% IC)</b>	<b>Media (95% IC)</b>
<b>As Total (µg/L)</b>	75.09 (55.64 – 94.53)	48.13 (35.67 – 60.59)
<b>Proporciones Relativas</b>		
<b>%AsIII</b>	37.0 (29.35 – 43.67)	39.0 (31.23 – 46.59)
<b>%As V</b>	1.6 (0.92 – 2.35)	1.7 (1.09 – 2.27)
<b>%DMA</b>	53.0 (46.60 – 58.85)	51.0 (44.62 – 57.36)
<b>%MMA</b>	9.1 (7.59 – 10.65 )	8.4 (6.90 – 9.93)

Según Tapio y Grosche (2006) normalmente los humanos expuestos a arsénico excretan 10-30% de arsénico inorgánico, 10–20 % de MMA y 60-80% de DMA. Como se muestra en la tabla 7, se aprecia que el arsénico inorgánico está ligeramente incrementado en ambas zonas (Olivos y Bachoco). Ahsan *et al.* (2007) comentan que un incremento en la proporción de arsénico inorgánico posiblemente se deba a una inhibición de la enzima metiltransferasa, la encargada del paso de As inorgánico a arsénico orgánico (MMA y DMA) (ver figura 2), por lo que esto se ve reflejado en un incremento de arsénico inorgánico en orina y puede estar asociado también con un alto riesgo de padecer cáncer de piel. Se puede observar en la tabla 7 que los porcentajes de excreción de DMA están ligeramente disminuidos y al igual que Ahsan *et al.* (2007), Yu *et al.* (2000) afirman que un bajo porcentaje de DMA está asociado con un alto riesgo de cáncer de piel.

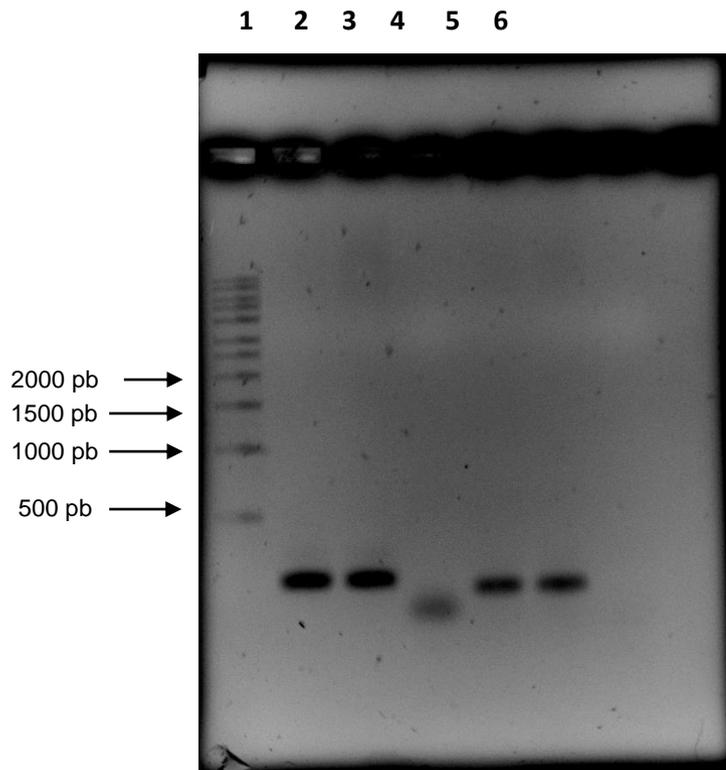
#### **4.4 Análisis de los genotipos MTHFR 677 y 1298**

Se extrajeron 95 muestras de ADN (49 muestras de Olivos y 46 muestras de Bachoco) de las muestras de sangre de los participantes. Los fragmentos amplificados por PCR fueron de 198 pb para C677T y de 163 pb para A1298C y se muestran en la figura 7. Los fragmentos amplificados de 198 pb fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinf* 1 y en la figura 8 se observan las bandas de diferentes pesos moleculares que se obtuvieron; los homocigotos silvestres (677CC) se identifican por una sola banda de 198 pb, los heterocigotos (677CT) se identifican por 3 bandas de 198, 175 y 23 pb y los homocigotos mutantes (677TT) por 2 bandas de 175 y 23 pb. El fragmento de 23 pb no fue retenido en el gel, por lo que recomendamos utilizar un gel más grande para lograr observar todas las bandas. Por otro lado, para definir el genotipo de la muestra sólo fue necesario detectar la presencia o ausencia de las bandas de 198 y 175 pb.

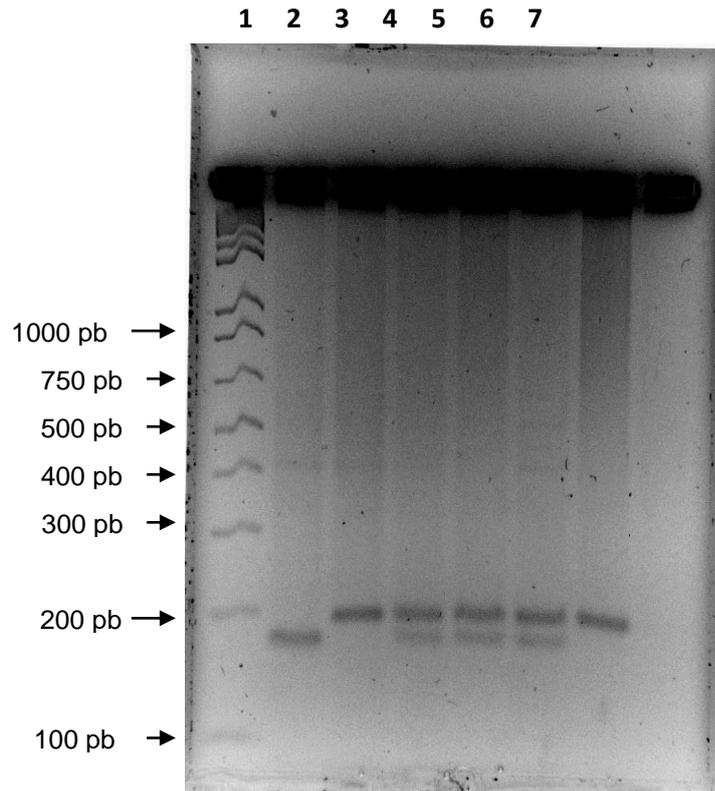
**Tabla 7.** Porcentajes promedio de excreción de arsénico en ambas zonas (Olivos y Bachoco).

<b>Rangos normales</b> (Tapio y Grosche, 2006)	<b>Olivos (n=49)</b>	<b>Bachoco (n=46)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>10-30% As Inorg.*</b>	38.14	40.60
<b>60-80% DMA</b>	52.73	51.00
<b>10-20% MMA</b>	9.13	8.40

\* As Inorgánico = As III + As V



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1) Estándar de peso molecular; carriles 2 y 3 ) fragmento de 198 pb (C677T), amplificado con los primers sentido 5´- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3´ y antisentido 5´- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG- 3´; carriles 5 y 6) fragmento de 163 pb (A1298C), amplificado con los primers sentido 5´- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C -3´ y antisentido 5´- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG – 3´. Se utilizó ADN extraído de sangre.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Fragmentos digeridos con enzima *Hinf*I: Carril 1) Estándar de peso molecular; carril 2) fragmento de 175 y 23 pb (677TT) homocigoto mutante; carril 3 y 7) fragmento de 198 pb (677 CC) homocigoto silvestre; carril 4, 5 y 6) fragmentos de 198, 175 y 23 pb (677CT) heterocigoto. El fragmento de 23 pb no fue retenido en el gel.

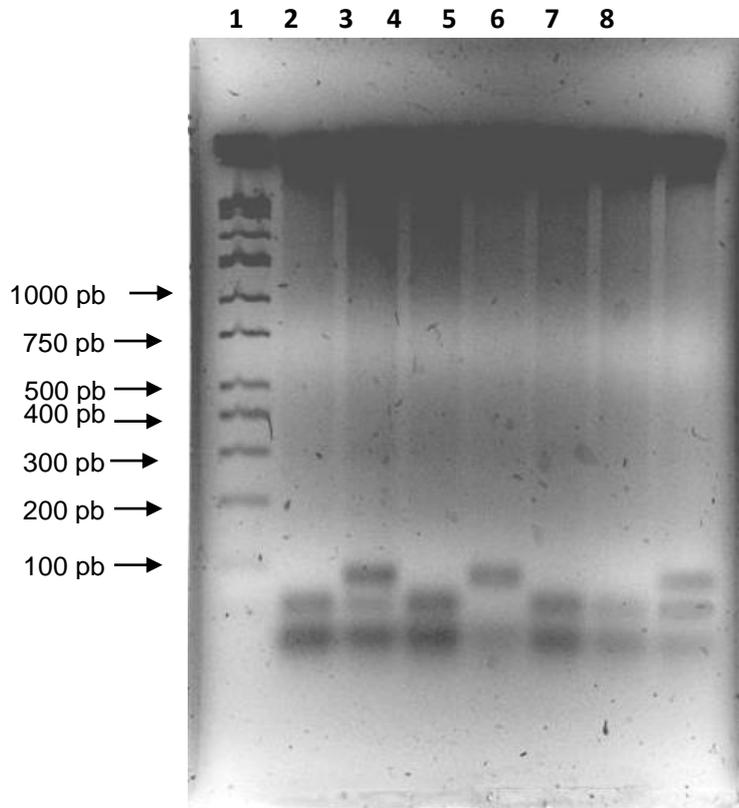
Los fragmentos amplificados de 163 pb fueron digeridos con la enzima de restricción *Mbol*I, como se observa en la figura 9 los homocigotos silvestres (1298AA) produjeron cinco fragmentos (56, 31, 30, 28 y 18 pb), los heterocigotos (1298AC) produjeron seis fragmentos (84, 56, 31, 30, 28 y 18 pb) y los homocigotos mutantes (1298CC) produjeron cuatro fragmentos (84, 31, 30 y 18 pb).

El resumen de las frecuencias de los genotipos se observan en la tabla 8, donde no se aprecian diferencias entre zonas, pero si entre los mismos genotipos ya que para los genotipos de la mutación C677T los heterocigotos 677CT tuvieron el mayor porcentaje de frecuencia seguida por los homocigotos silvestres 677CC y por último los homocigotos mutantes 677TT, Dávalos *et al.* (2005) estudiaron una población de mujeres con preclampsia, en Guadalajara, México, donde tampoco se observaron diferencias entre las frecuencias de los genotipos de la mutación C677T de casos y controles. Por otra parte, no se encontró ningún reporte sobre la mutación A1298C en la población Mexicana. Mtiraoui *et al.* (2006) estudiaron una población Africana con nefropatía diabética, donde tampoco se observaron diferencias entre las frecuencias de los genotipos de casos y controles y al igual que nosotros ellos tuvieron una mayor frecuencia de homocigotos silvestres (1298AA), seguida por los heterocigotos (1298AC) y por último los homocigotos mutantes (1298AC).

#### **4.5 Efectos de zonas, género y genotipos sobre las especies de arsénico.**

##### **4.5.1 Efectos de zona.**

En la tabla 9 se observan los resultados de los análisis de varianza de zona, género, genotipo MTHFR (677, 1298) y diplotipo 677/1298 sobre las especies de arsénico donde hubo una diferencia de zona sobre arsénico total en orina ( $p < 0.01$ ). En la figura 10 se observa que a diferencia de Bachoco Olivos tuvo niveles mas elevados de arsénico total urinario, a



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 4%. Fragmentos digeridos con enzima *Mbol*I: Carril 1) Estándar de peso molecular; carril 2, 4 ,6 y 7) fragmentos de 56, 31, 30,28 y 18 pb, (1298 AA) homocigoto silvestre; carril 3 y 8) fragmentos de 84, 56, 31,30, 28 y 18 pb, (1298AC) heterocigoto; carril 5) fragmentos de 84, 31, 30 y 18 pb, (1298 CC) homocigoto mutante. Los fragmentos de 31, 30, 28 y 18 pb se observan como una sola banda.

**Tabla 8.** Frecuencias de los genotipos MTHFR 677 y 1298 en Olivos y Bachoco.

	<b>OLIVOS N=49</b>	<b>BACHOCO N=46</b>
<b>MTHFR 677</b>		
CC	14 (28.47%)	12 (26.08%)
CT	29 (59.18%)	26 (56.52%)
TT	6 (12.24%)	7 (15.21%)
<b>MTHFR1298</b>		
AA	33 (67.35%)	32 (69.57%)
AC	15 (30.61%)	14 (30.43%)
CC	1 (2.04%)	-----

MTHFR C677T:

CC=Genotipo silvestre, CT= Heterocigoto, TT= Homocigoto mutante

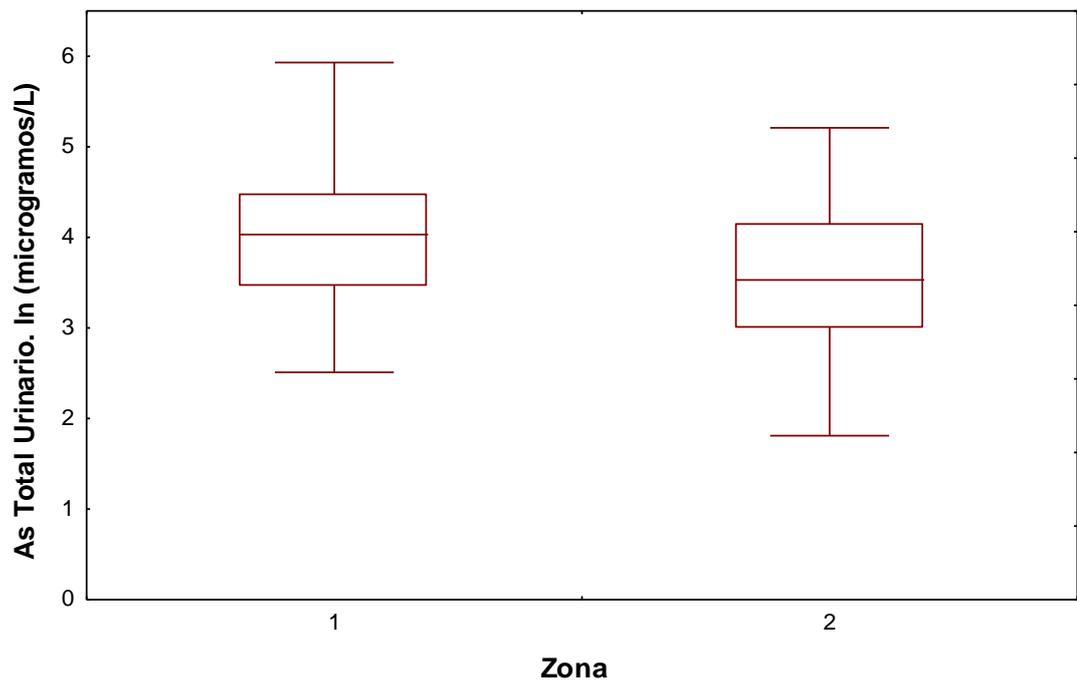
MTHFR A1298C:

AA=Genotipo silvestre, AC=Heterocigoto, CC=Homocigoto mutante

**Tabla 9.** Efectos de zona, género, genotipo (C677T, A1298C) y diplotipo MTHFR 677/1298 sobre las especies de arsénico en la población mixta

	Zona	Género	677	1298	677/1298
	Valor de F (probabilidad)				
<b>As III</b>	0.1360 (0.7132)	0.0133 (0.9084)	1.2181 (0.3005)	1.4452 (0.2410)	1.7074 (0.1873)
<b>As V</b>	0.0123 (0.9118)	<b>4.7473</b> <b>(0.0319)*</b>	0.1747 (0.8400)	<b>3.6802</b> <b>(0.0290)*</b>	0.0137 (0.9864)
<b>DMA</b>	0.1367 (0.7125)	0.1544 (0.6952)	1.2389 (0.2945)	1.5181 (0.2246)	0.9340 (0.3968)
<b>MMA</b>	0.4861 (0.4874)	0.3734 (0.5427)	0.6048 (0.5483)	2.2682 (0.1093)	<b>4.5933</b> <b>(0.0127)*</b>
<b>As Total en orina</b>	<b>7.9556</b> <b>(0.0058)*</b>	0.0655 (0.7986)	0.7327 (0.4834)	1.2550 (0.2900)	1.8737 (0.1596)

\*Datos significativos  $p < 0.05$



**Figura 10.** Diferencias de Arsénico Total en Orina entre la Zona 1 (Olivos) y la zona 2 (Bachoco).

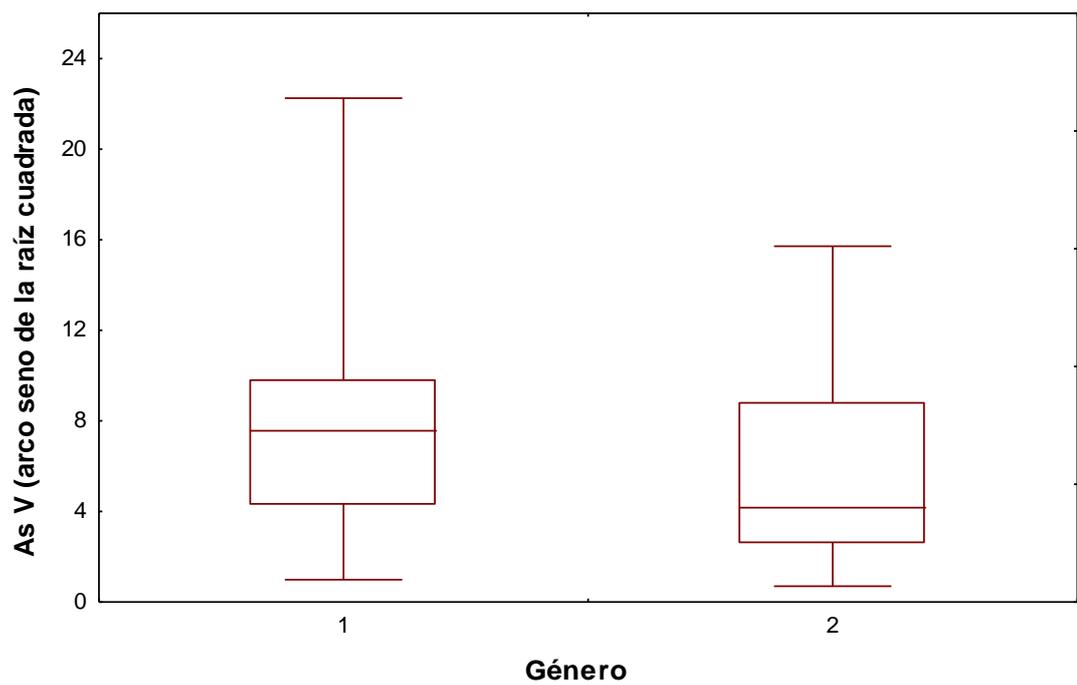
pesar de que esta fue la zona control o de baja concentración de arsénico en agua potable, probablemente exista otra fuente de contaminación de arsénico diferente a la del agua ó como ya se mencionó anteriormente posiblemente sea influencia de que en Bachoco solo consumen agua embotellada, la cual contiene niveles muy bajos de As.

#### **4.5.2. Efecto de género.**

Hubo un efecto significativamente alto de género sobre arsénico V ( $p=0.0319$ ), por lo que en la figura 11 se observa que hombres y mujeres tienen diferencias en metabolizar o eliminar este tóxico. Los hombres presentaron mayor promedio de As V en orina (ver tabla 10). No se encontró ningún trabajo que reporte el efecto de género sobre As V, pero Heck *et al.* (2007) encontraron diferencias en una población de Bangladesh entre hombres y mujeres al momento de excretar arsénico orgánico en orina, ya que concluyeron que los hombres excretan mas MMA que las mujeres y éstas excretan mas DMA que los hombres, lo cual según Tapio y Grosche (2006), esto posiblemente se deba a factores tales como consumo de alcohol o tipo de trabajo.

#### **4.5.3. Efecto de genotipos.**

Como se muestra en la tabla 9, también se obtuvo un efecto significativo de la mutación A1298C sobre As V ( $p=0.0290$ ) y por otra parte también se encontró un efecto cruzado entre los diplotipos MTHFR 677/1298 sobre MMA ( $p=0.0127$ ), pero al hacer el mismo análisis separando hombres y mujeres (ver tabla 11), se encontró que las mujeres eran las que aportaban dichos efectos ya que en hombres no se presentó el mismo resultado, posiblemente debido al número tan pequeño de participantes hombres ( $n=26$ ).



**Figura 11.** Diferencia de Arsénico V entre hombres y mujeres.

Hombres (1), n=26.

Mujeres (2), n=69.

**Tabla 10.** Medias e intervalos de confianza al 95% de las especies de arsénico urinarios de hombres y mujeres.

	<b>Hombres n=26</b>	<b>Mujeres n=69</b>
	<b>Media (IC 95%)</b>	
<b>%As III</b>	37.7 (27.57 – 47.84)	37.7 (31.53 – 43.79)
<b>%As V</b>	2.52 (1.21 – 3.83)	1.33 (0.935 – 1.73)
<b>%DMA</b>	50.5 (42.27 – 58.65)	52.4 (47.19 – 57.65)
<b>%MMA</b>	9.32 (7.18 – 11.45)	8.60 (7.33 – 9.82)

**Tabla 11.** Efecto de Genotipo MTHFR 677 y 1298 y diplotipo 677/1298 sobre las especies de arsénico en orina, en hombres y mujeres.

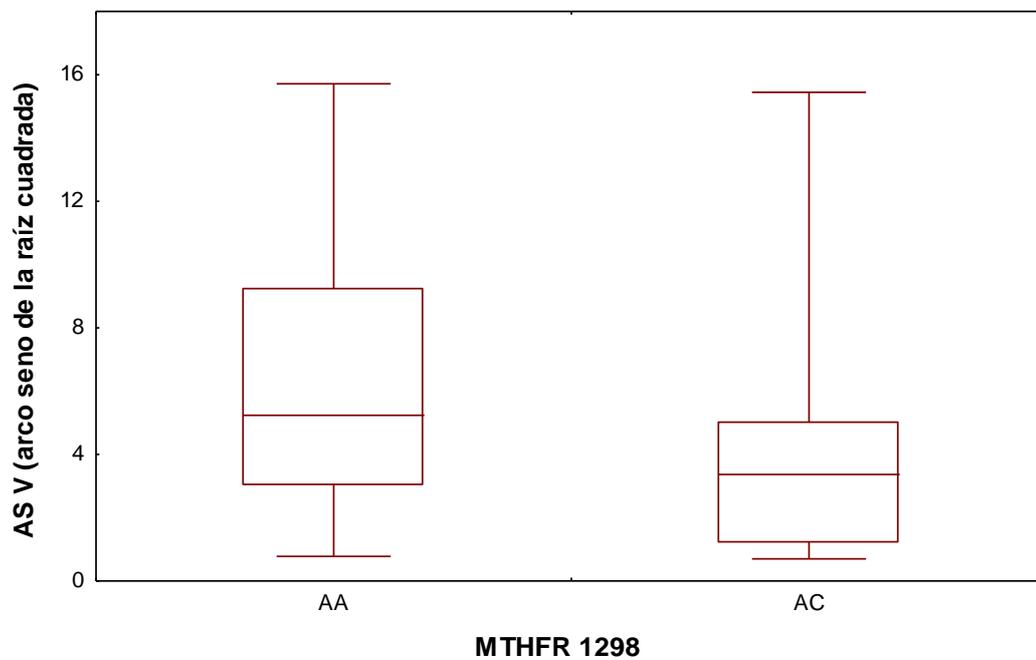
	<b>MTHFR 677</b>	<b>MTHFR 1298</b>	<b>DIPLOTIPO 677/1298</b>
	<b>Valor de F (probabilidad)</b>		
<b>Hombres n=26</b>			
<b>As III</b>	1.0884 (0.3535)	0.8758 (0.4300)	2.7438 (0.1132)
<b>As V</b>	0.6993 (0.5072)	0.9819 (0.3898)	0.0655 (0.8006)
<b>DMA</b>	1.4888 (0.2466)	1.1772 (0.3260)	<b>4.5763 (0.0450)*</b>
<b>MMA</b>	1.6125 (0.2211)	1.3163 (0.2876)	1.7037 (0.2066)
<b>As Total</b>	0.2557 (0.7765)	0.9878 (0.3876)	0.4908 (0.4916)
<b>Mujeres n=69</b>			
<b>As III</b>	0.4376 (0.6474)	1.4844 (0.2274)	1.0402 (0.3594)
<b>As V</b>	0.1505 (0.8605)	<b>4.9470 (0.0295)*</b>	0.1405 (0.8692)
<b>DMA</b>	0.4138 (0.6628)	1.4689 (0.2298)	0.5602 (0.5739)
<b>MMA</b>	0.8979 (0.4124)	1.7091 (0.1956)	<b>4.4321 (0.0158)*</b>
<b>As Total</b>	0.4900 (0.6148)	1.3003 (0.2582)	1.9874 (0.1456)

\*Datos significativos  $p < 0.05$ .

El efecto de genotipo de la mutación A1298C en mujeres sobre As V ( $p=0.0295$ ) se observa en la figura 12, donde se aprecia que los homocigotos silvestres (1298AA) tuvieron una concentración de As V mayor que la de los heterocigotos (1298AC). En mujeres no se presentó el genotipo homocigoto mutante (1298CC), en hombres sólo hubo un caso.

Los homocigotos silvestres tuvieron una media de 1.55, con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%), de 1.07 – 2.04 y los heterocigotos tuvieron una media de 0.89, con un IC 95% de 0.17 – 1.62. Nosotros esperaríamos que los homocigotos mutantes (1298CC) tengan los niveles más elevados de arsénico V en orina ya que esta mutación hace más deficiente la actividad de la enzima MTHFR, por lo que hay menos disponibilidad de grupos metilos para la biotransformación del arsénico hacia las especies orgánicas (MMA y DMA), pero los niveles más elevados de As V lo tuvieron los homocigotos silvestres (1298AA), lo cual nos da la idea de que no sólo la enzima MTHFR participa en el metabolismo del arsénico, si no también otras enzimas como GSTO1 y MMA reductasa.

También posiblemente las mujeres que tuvieron altas concentraciones de As V no tuvieron una alimentación rica en ácido fólico ya que según Ahsan *et al.* (2007) las personas que tienen una dieta rica en ácido fólico presentan elevados niveles de DMA en orina y disminuidos niveles de MMA y arsénico inorgánico (As V y As III), lo cual es importante para disminuir el riesgo de presentar un efecto tóxico a nivel celular, ya que según Hugues (2006), el arsénico V o arseniato tiene una forma similar al fósforo, el cual puede sustituir al fosfato en importantes procesos bioquímicos. No se encontró ningún otro reporte que relacione As V ó As inorgánico con los genotipos de la mutación A1298C.

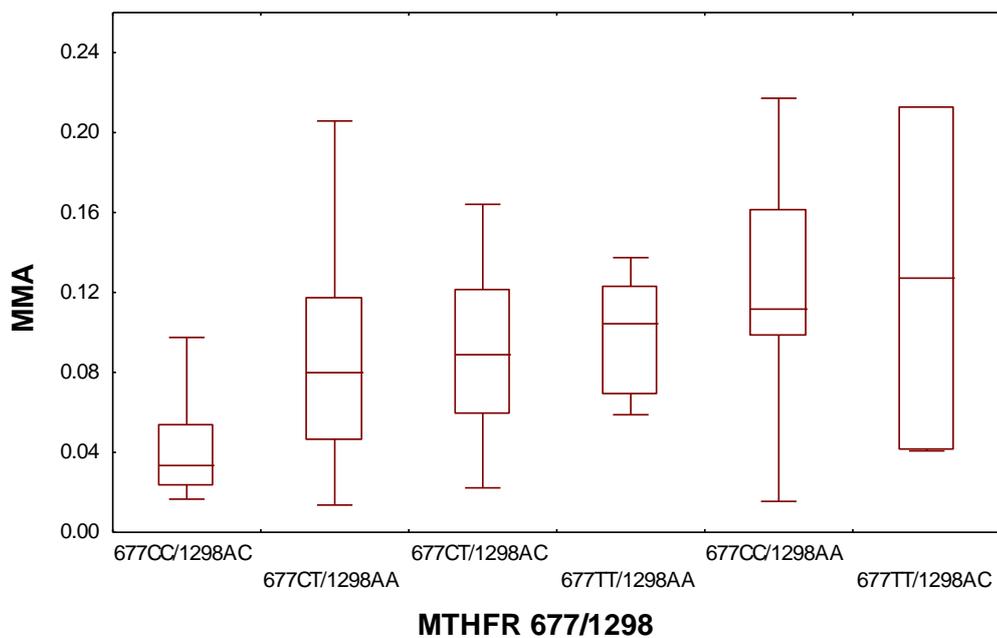


AA (Homocigoto silvestre); n=46  
AC (Heterocigoto); n=23

**Figura 12.** Diferencias de As V entre los genotipos 1298AA y 1298AC en mujeres (datos combinados de Bachoco y Olivos).

Ahsan *et al.* (2007) observaron que en su población de estudio (Bangladesh) las lesiones de piel fueron positivamente asociadas al porcentaje de MMA y que las personas con los diplotipos 677TT/1298AA y 677CT/1298AA presentaron alto riesgo de padecer cáncer de piel, aunque estos últimos no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, no detectaron ningún efecto directo entre los niveles de MMA y estos diplotipos. En este estudio sí se detectó un efecto cruzado entre los diplotipos MTHFR 677/1298 sobre %MMA ( $p= 0.0158$ ) y como se muestra en la figura 13 hay diferencias entre los niveles de %MMA de los diferentes diplotipos (677/1298), donde los diplotipos 677TT/1298AC y 677CC/1298AA presentaron los niveles más altos de %MMA (ver tabla 12). Yu *et al.* (2000) y Del Razo *et al.* (1997) mencionan que sujetos con un alto porcentaje de MMA en orina tienen alto riesgo de padecer lesiones de piel, mientras que DMA es inversamente asociado, por lo cual las mujeres que tuvieron este diplotipo posiblemente sea más susceptibles a padecer este tipo de lesiones.

Por último se observa en la tabla 11 que en hombres hubo efectos altamente significativos entre los diplotipos MTHFR 677/1298 sobre DMA ( $p=0.0450$ ). En la figura 14 se observan las diferencias entre los diplotipos 677/1298 sobre los niveles de DMA, donde el diplotipo 677CT/1298AA presentó el más alto nivel de %DMA y el diplotipo 677CC/1298AC tuvo el más bajo promedio de %DMA en orina (ver tabla 13), por lo cual estos últimos pudieran ser más susceptibles al cáncer, ya que según Ahsan *et al.* (2007) menciona que los hombres tuvieron más bajo promedio de DMA urinario, el cual es inversamente asociado con cáncer de piel y vejiga, pero a diferencia de este estudio, no encontraron ningún efecto entre los diplotipos MTHFR 677/1298 sobre los niveles de DMA.



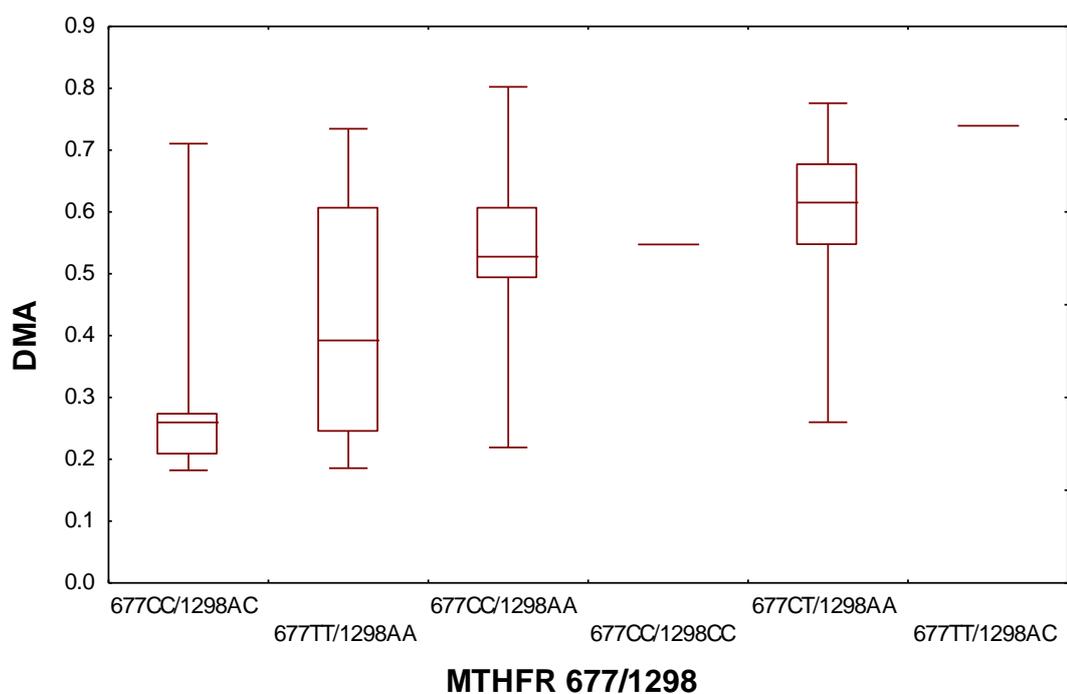
**Figura 13.** Diferencias en las proporciones de MMA en orina entre los diplotipos MTHFR 677/1298 en mujeres (datos combinados de Bachoco y Olivos).

677CC= Homocigoto silvestre	1298 AA= Homocigoto silvestre
677CT= Heterocigo	1298AC= Heterocigo
677TT= Homocigoto mutante	1298 CC= Homocigoto mutante

Nota: No se presentaron los diplotipos 677CC/1298CC, 677TT/1298CC y 677CT/1298CC.

**Tabla 12.** Medias e intervalos de confianza al 95% de %MMA entre los diferentes diplotipos MTHFR 677/1298 en mujeres.

<b>Diplotipos 677/1298</b>	<b>n</b>	<b>%MMA (IC 95%)</b>
<b>CC/AC</b>	9	4.21 (2.16 – 6.25)
<b>CT/AA</b>	33	8.44 (6.64 – 10.24)
<b>CT/AC</b>	12	8.96 (6.11 – 11.82)
<b>TT/AA</b>	6	9.90 (6.59 – 13.21)
<b>CC/AA</b>	7	11.92 (6.20 – 17.64)
<b>TT/AC</b>	2	12.67 (6.20 – 17.64)



**Figura 14.** Diferencias en las proporciones de DMA en orina entre los diplotipos MTHFR 677/1298 en hombres.

Nota: En este análisis no se presentaron los diplotipos MTHFR 677TT/1298CC, 677CT/1298CC y 677CT/1298AC.

677CC= Homocigoto silvestre  
 677CT= Heterocigo  
 677TT= Homocigoto mutante

1298 AA= Homocigoto silvestre  
 1298AC= Heterocigo  
 1298 CC= Homocigoto mutante

**Tabla 13.** Medias e intervalos de confianza al 95% de %DMA entre los diferentes diplotipos MTHFR 677/1298 en hombres.

<b>DiploTipos 677/1298</b>	<b>n</b>	<b>% DMA (IC 95%)</b>
<b>CC/AC</b>	5	32.57 (5.47 – 59.67)
<b>TT/AA</b>	4	42.53 (4.47 – 80.60)
<b>CC/AA</b>	5	52.88 (26.65 – 79.10)
<b>CC/CC</b>	1	54.39
<b>CT/AA</b>	10	58.67 (48.63 – 68.69)
<b>TT/AC</b>	1	73.55

#### **4.6 Correlaciones entre especies de As**

Como se muestra en la tabla 14 hubo una alta correlación de spearman entre Alll:MMA, AsIII:As Tot., DMA:MMA, DMA:AsTot. y entre MMA:As Tot.; por otra parte, también hubo correlación entre AsIII:AsV, AsV:DMA, AsV:MMA, AsV:As Tot., As Tot.:As Tot en agua. Tal como se indica en la figura 2, según el metabolismo del arsénico estas asociaciones se deben a que cada metabolito es la transformación del anterior.

**Tabla 14.** Coeficientes de correlación Spearman entre las especies de arsénico y arsénico total en agua potable.

	<b>AsIII</b>	<b>AsV</b>	<b>DMA</b>	<b>MMA</b>	<b>AsTot</b>	<b>AsTot Agua</b>
<b>AsIII</b>	1.000000	-0.359994 (0.000339)	-0.958525 (0.000000)	-0.667049 (0.000000)	0.571013 (0.000000)	-0.070550 (0.496897)
<b>AsV</b>		1.000000	0.262388 (0.010206)	0.411058 (0.000035)	-0.296243 (0.003558)	0.115015 (0.267055)
<b>DMA</b>			1.000000	0.518393 (0.000000)	-0.557526 (0.000000)	0.048755 (0.638931)
<b>MMA</b>				1.000000	-0.503508 (0.000000)	0.078361 (0.450358)
<b>AsTot</b>					1.000000	-0.295877 (0.003601)
<b>AsTot Agua</b>						1.000000

Nota: Entre paréntesis se presentan los valores de probabilidad.

## 5. CONCLUSIONES

- 1.- Existe una mayor concentración de Arsénico en agua potable en la zona norte de Hermosillo, con respecto a la zona sur.
- 2.- A pesar de existir una mayor concentración de As en agua potable en la zona norte, la zona sur presentó las más altas concentraciones de As en orina, debido tal vez a una fuente de contaminación distinta del agua.
- 3.- Ambas zonas presentaron porcentajes ligeramente altos de As inorgánico y ligeramente bajos de DMA, en comparación a valores normales de excreción.
- 4.- Se trabajó con una población homogénea para el gen MTHFR, ya que no hubo diferencias entre las frecuencias de los genotipos 677 y 1298 entre Olivos y Bachoco.
- 5.- Se encontró un efecto de género sobre As V. Sin embargo, al separar hombres y mujeres en el análisis estadístico, se vió que dicho efecto es principalmente aportado por mujeres, quizás debido al número muestral pequeño de hombres en el estudio.
- 5.- En mujeres el genotipo MTHFR 1298 tuvo un efecto sobre los niveles urinarios de Arsénico V, mientras que el diplotipo MTHFR 677/1298 mostró un efecto significativo sobre los niveles de MMA, lo cual no había sido observado en otras investigaciones.
- 6.- En hombres el diplotipo MTHFR 677/1298 tuvo un efecto sobre los niveles urinario de DMA, resultado no antes reportado en la literatura.
- 7.- Las frecuencias genotípicas MTHFR 677 y 1298 de la población de Hermosillo, son semejantes a las reportadas para otras poblaciones humanas.

8.- Las correlaciones encontradas entre las diversas especies de As pudieron ser explicadas en función del esquema teórico propuesto para el metabolismo del arsénico.

9.- Confirmamos lo reportado en otras investigaciones en cuanto a que el gen MTHFR está involucrado en una vía del metabolismo del As; por lo cual las personas expuestas a este contaminante presentan un metabolismo diferencial afectado por los diversos genotipos de este gen (polimorfismo genético).

10.- La presente investigación representa el primer reporte de polimorfismo genético para el SNP MTHFR 677 en Sonora y el primero para el SNP MTHFR 1298 en México.

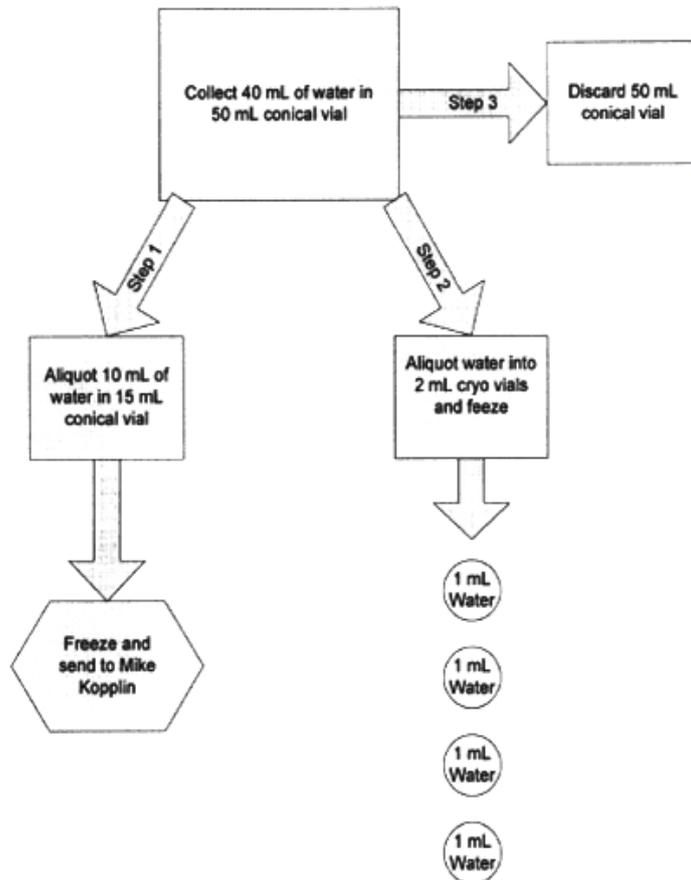
## 6. RECOMENDACIONES

- 1.- Para futuras investigaciones sobre polimorfismo del gen MTHFR, se recomienda incluir tamaños muestrales mayores en hombres.
- 2.- Se propone también en estudios posteriores correlacionar los niveles dietarios de ácido fólico con los niveles de especies de arsénico urinario.
- 3.- Se recomienda a la población de Hermosillo consumir y cocinar preferentemente sólo agua purificada, ya que contiene niveles de arsénico por debajo de los establecido por la NOM-127-SSA1 (25  $\mu\text{g/L}$ ) y por la US-EPA, MCL (10  $\mu\text{g/L}$ ).
- 4.- A las personas con altas concentraciones de arsénico urinario, se les recomienda consumir 400  $\mu\text{g}$  al día de ácido fólico (principalmente en vegetales verdes, entre otros) para reducir este tóxico en orina (Ahsan *et al.*, 2007).

## **7. APÉNDICES**

## 7.1 APÉNDICE 1

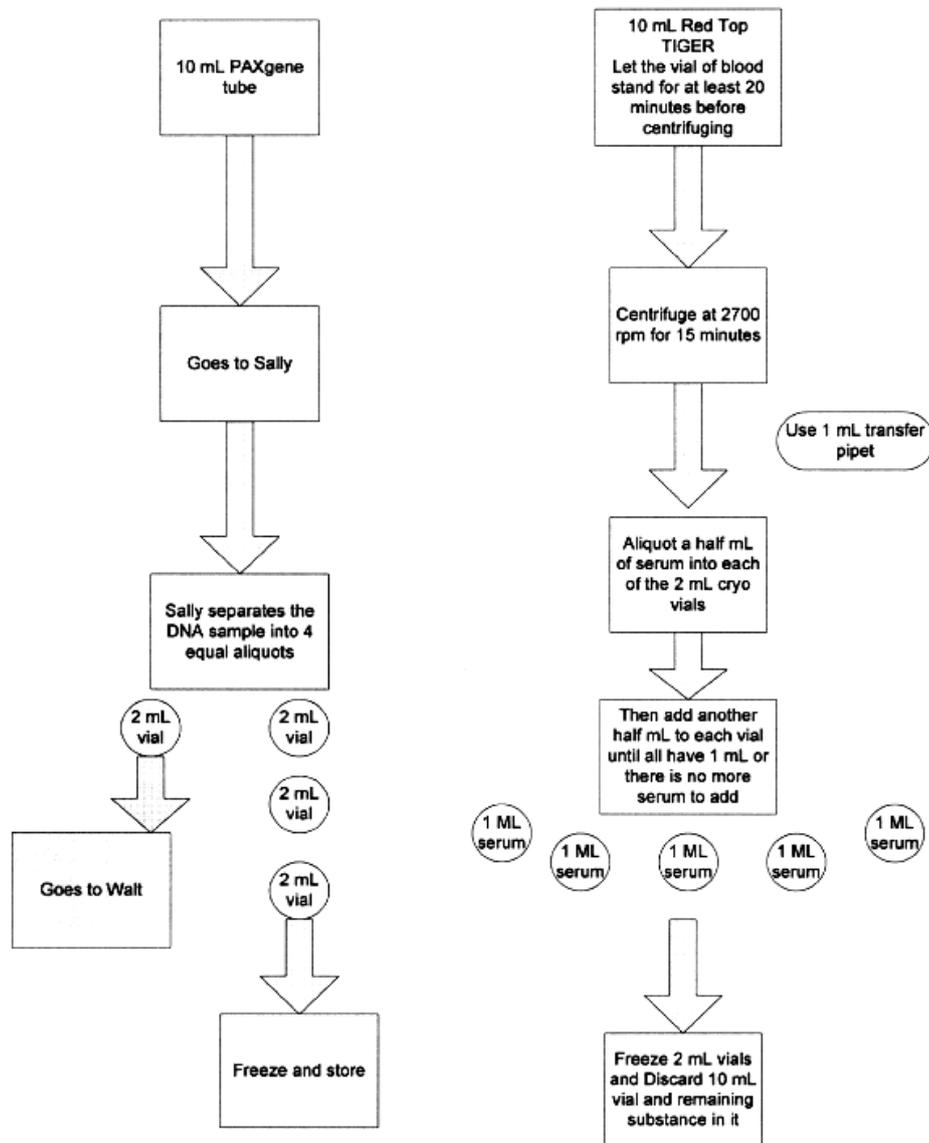
### Procesamiento de agua en el laboratorio



**Proyecto:** *proyecto No. 3 P50 CA095060-03S1 Arsenic Supplement – México: “Exploring Relationship Between Arsenic and Cancer”.*

## 7.2 APÉNDICE 2

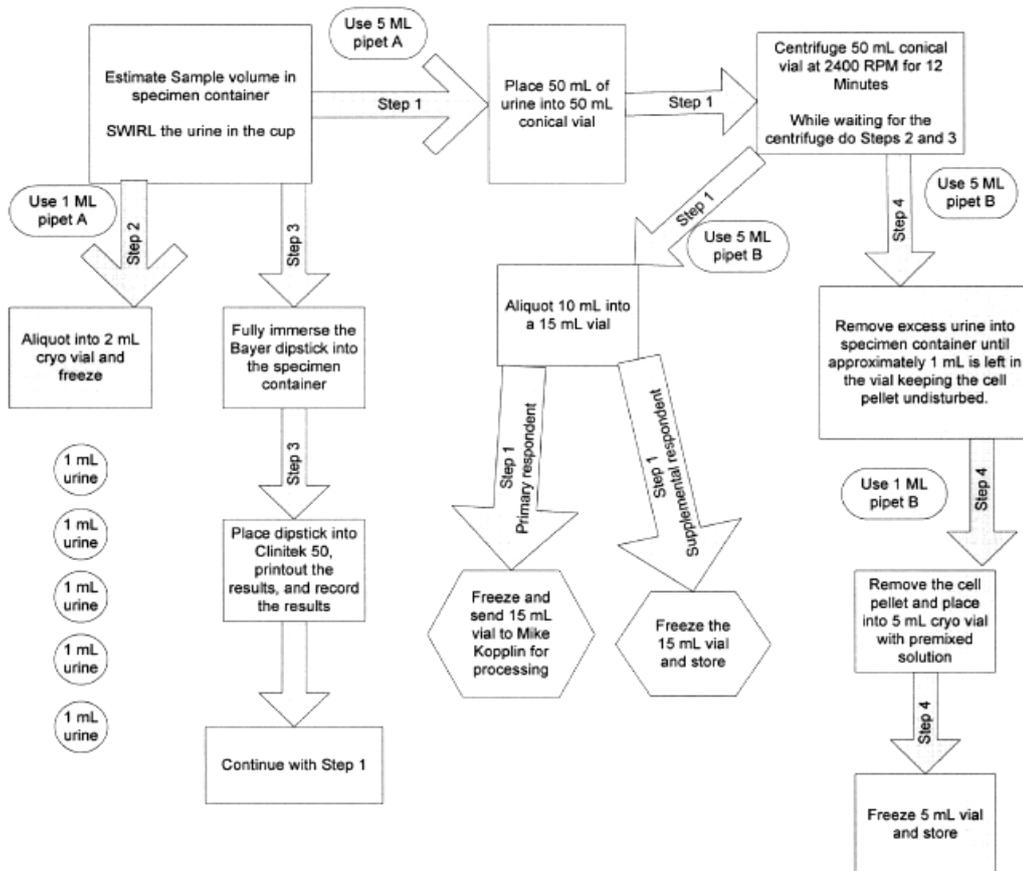
### Procesamiento de sangre en el laboratorio.



**Proyecto:** proyecto No. 3 P50 CA095060-03S1 Arsenic Supplement – México: “Exploring Relationship Between Arsenic and Cancer”.

### 7.3 APÉNDICE 3

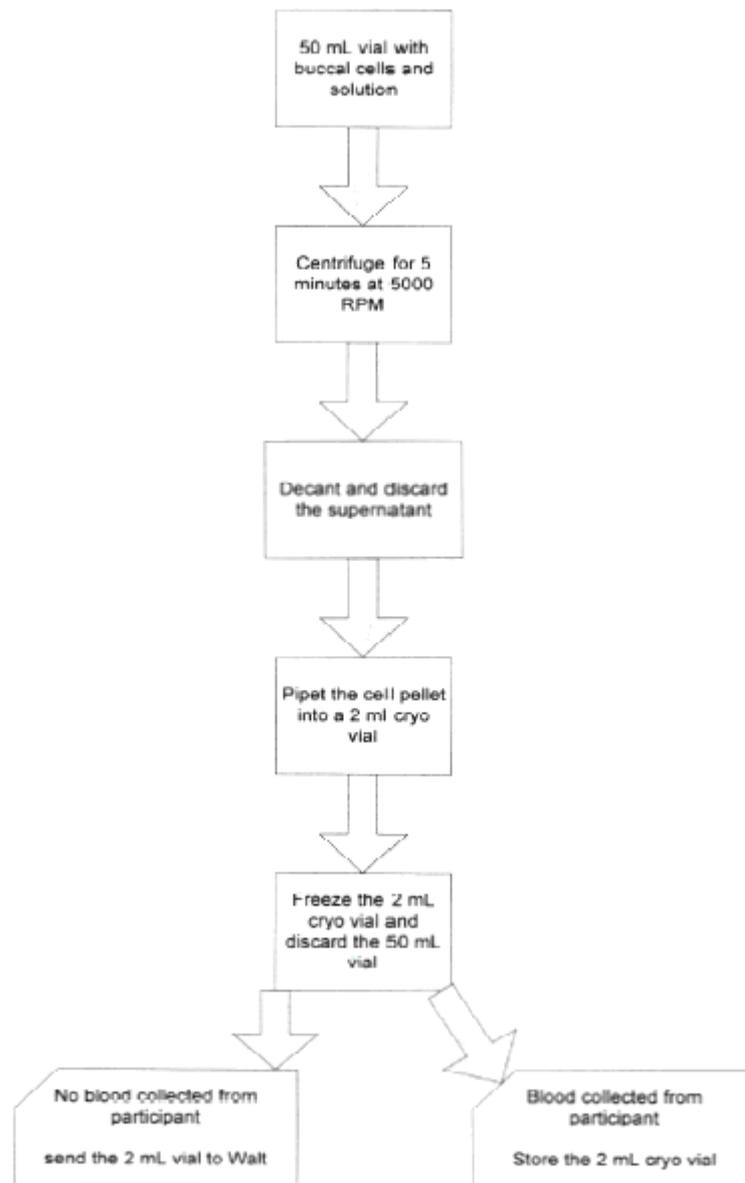
#### Procesamiento de orina en el laboratorio



**Proyecto:** proyecto No. 3 P50 CA095060-03S1 Arsenic Supplement – México: “Exploring Relationship Between Arsenic and Cancer”.

## 7.4 APÉNDICE 4

### Procesamiento de células bucales en el laboratorio



**Proyecto:** *proyecto No. 3 P50 CA095060-03S1 Arsenic Supplement – México: “Exploring Relationship Between Arsenic and Cancer”.*

## 7.5 APÉNDICE 5

### Extracción de ADN

- 1.- Obtener una muestra sanguínea con el tubo del Kit PAXgene.
- 2.- Adicionar la sangre al tubo de 50 ml (25 ml buffer BG1). Invertir 5 veces.
- 3.- Centrifugar por 5 ml a 2500xg
- 4.- Descartar el sobrenadante y poner el tubo en la gradilla
- 5.- Adicionar 5 ml de buffer BG2 y ponga en el vortex por 5 segundos
- 6.- Centrifugar por 3 minutos a 2500 x g
- 7.- Descartar el sobrenadante y poner el tubo en la gradilla
- 8.- Adicionar 5 ml buffer BG-/proteasa, vortex por 20 segundos (5ml BG- y 50 µl de proteasa)
- 9.- Incubar por 10 minutos a 65°C
- 10.- Poner en el vortex por 5 segundos
- 11.- Adicionar 5 ml de isopropanol e invertir 20 veces
- 12.- Centrifugar por 3 minutos a 2500 x g
- 13.- Descartar el sobrenadante, poner el tubo invertido en una pieza de papel 1 minuto
- 14.- Adicionar 5 ml de etanol al 70% y poner en el vortex 1 segundo
- 15.- centrifugar por 3 minutos a 2500 xg
- 16.- Descartar el sobrenadante e invertir el tubo en una pieza de papel
- 17.- Dar pequeños golpes al tubo para secar el alcohol y reposar 5 minutos
- 18.- Adicionar 1 ml de buffer BG4 y disolver el ADN en baño de agua a 65°C  
1 hora seguido de incubación toda la noche a temperatura ambiente.

PAXgene Blood DNA Kit Handbook 09/2002.

## 7.6 APÉNDICE 6

### Amplificación por PCR

- 1.- En un microtubo para PCR adicionar 200 $\mu$ M de cada dNTP (ATP, GTP, CTP y TTP).
- 2.- En el mismo microtubo adicionar 50 ng de cada primer (sentido 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3' y antisentido 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG- 3', para amplificar el fragmento MTHFR 677 y sentido 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C -3' y antisentido 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG - 3', para amplificar el fragmento MTHFR 1298).
- 3.- mezclar con 100 ng de DNA genómico y 1.25 unidades de Taq. DNA polimerasa.
- 4.- La mezcla se llevará a un volumen final de 50 $\mu$ l para lo cual se usará agua libre de DNasas.
- 5.- A toda la mezcla se le dan unos ligeros golpecitos para asegurar una mezcla homogénea procurando que no queden restos de la mezcla en las paredes ni en la tapa.
- 6.- Por último la mezcla se llevara a un termociclador con las siguientes condiciones:
  - para el fragmento MTHFR 677 5 min de desnaturalización a 94°C y 40 ciclos de: 94°C por 30 seg., 72 °C por 30 seg., 72°C por 30 seg, y 7 min. de extensión a 72°C.
  - para el fragmento MTHFR 1298 5 min. de desnaturalización a 95°C y 35 ciclos de: 94°C por 1 min., 62°C por 1 min., 72°C por 1 min., y 7 min. de extensión a 72°C.

Modificado de Skibola *et al.*, 1999.

## 7.7 APÉNDICE 7

### Análisis de restricción

- 1.- En un Vial de 1.5 ml. mezclar 20  $\mu$ l de producto para PCR ,
- 2.- Adicionar buffer de digestión 1 X para *Hinf* 1 ó *Mbo* II, cual sea el caso.
- 3.- para el caso de C677T adicionar 10 unidades de la enzima *Hinf* 1
- 4.- Para el fragmento A1298C adicionar 2.5 unidades de *Mbo* II
- 5.- Cada una de la reacciones se llevan a 25  $\mu$ l de volumen final ajustando con agua libre de DNAsas e incubar por 8 horas a 37 °C.

Modificado de Skibola *et al.*, 1999.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy, C., Liu, Y., Longfellow, D., Aposhian, H., Beck, B. y Fowler, B., Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues. *Environ Health Perspect.* 1999. vol. 107: 593 –597.
- Ahsan, H., Chen, Y., Kibriya, M., Slavkovich, V., Parvez, F., Jasmine, F., Gamble, M. y Graziano, J. Arsenic Metabolism, Genetic Susceptibility and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2007. no. 6. vol. 16:1270 – 1278.
- Aposhian, V., Zakharyan, R., Avram, M., Sampayo, A. y Wollenberg, M. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2004. vol. 198: 327-335.
- Bolufer, P., Barragán, E., Collado, M., Cervera, J., López, J. y Sanz, M. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leukemia research.* 2006. vol. 30: 1471-1491.
- Brown, T. GENETICS a molecular approach. Segunda edición, Chapman Hall. E.U.A. 1992.
- Campbell, I., Baxter, S., Eccles, D. y Choong, D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast cancer research.* 2002. Vol.14:1-4.
- Dávalos, I., Moran, E., Martínez, A., González, M., Flores, S., Machorro, V., Sandoval, L., Figuera, L., Mena, J., Oliva, J., Tlacuilo, J., Sánchez, J. y Salazar, M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood cells, Molecules and Diseases.* 2005. vol. 35: 66 – 69.
- Del Razo, L., Garcia, G., Vargas, H., Albores, A., Gonsebatt, M., Montero, R., Ostrosky, P., Kelsh, M. y Cebrian, M. Altered profile of urinary arsenic

- metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch. Toxicol.* 1997. vol. 71: 211–217.
- Duker, A., Carranza E. y Hale, M. Arsenic geochemistry and Elath. *Environmental International.* 2004. vol. 31: 631-641.
- EPA (US Environmental Protection Agency). Method 3015 (SW-846). Microwave assisted acid digestion of aqueous sample and extracts in test methods for evaluating solid waste. 3er edition. 3er update. ES EPA. 1995. Washington, D.C.
- Feria, R., López, M., Serrano, H., Orozco, S. y Lozoya, X. Aplicación de la biología molecular en el control de calidad de los fitoelementos, *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas.* 2007. no. 001. vol 38: 49–57.
- Fernández, C., Yebra, M., Aranda, J., Gómez, P., Martínez, J., Núñez, V. y Gómez, A., Effect of folic acid treatment on carotid intima-media thickness of patients with coronary disease. *International Journal of Cardiology.* 2006. 1-5.
- Gamble, M., Liu, X., Ahsan, H., Pilsner, R., Ilievski, V., Slavkovich, V., Pervez, F., Levy, D., Litvak, P. y Graziano, J. Folate, Homocysteine, and Arsenic Metabolism in Arsenic- Exposed Individuals in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives.* 2005. vol. 113: 1683-1688.
- Garrett, R. y Grisham, C. *Biochemistry.* Segunda edición. Thomson Brooks/cole. E.U.A. 1999.
- Glick, B. y Pasternak, J. *Molecular Biotechnology, Principles and applications of recombinant DNA.* Tercera edición. ASM Press. Washington, D.C. 2003.
- Griffiths, J., Gelbart, W., Miller, Jeffrey, H. y Lewantin, R. *Modern Genetic Analysis.* W.H. Primera edición. Freeman and Company. EUA. 1999.

- Hartl, D. y Jones, E. GENETICS Principles and Analysis. cuarta edición. Jones and Bartlett Publishers. EUA. 1998. pág. 146, 147, 174, 175, 202, 205, 207, 208, 487.
- Heck, J., Gamble, M., Chen, Y., Graziano, J., Slavkovich, V., Parvez, F., Baron, J., Howe, G. y Ahsan, H. Consumption of folate related nutrients and metabolism of arsenic in Bangladesh. *Am J Clin Nutr.* 2007. 1367 – 74.
- Hei, T., Liu, S. y Waldren, C., Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species. *PNAS.* 1998. Vol. 95: 8103-8107.
- Hopenhayn, R., Biggs, M., Smith, A., Kalman, D. y Moore, L. Methylation Study of a population Environmentally Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Research.* 1996. no. 6. vol. 10: 620 – 628.
- Hughes, M. Biomarkers of Exposure: A case Study with inorganic arsenic, *Environmental Health Perspectives.* 2006. No. 11. Vol. 114:1790- 1796.
- Karagas M., Park, S., Nelson H., Andrew, A., Schned, A., Mott, L., Schned, A. y Kelsey, K. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and bladder cancer: A population based case control study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2005. 321-327.
- Kathleen, M. y Escote, S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause.* Novena edición. Mc Graw Hill interamericana. EUA. 1998.
- Klug, W. y Cumming, M. *Conceptos de Genética.* Quinta edición. Prentice Hall. España. 1999.
- Kolling, K., Ndrepepa, G., Koch, W., Braun, S., Mehilli, J., Schomig, A. y Kastrati, A. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene C677T and A1298C Polymorphisms, Plasma Homocysteine, Folate, and Vitamin B12 Levels and the Extent of Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology.* 2004. Vol. 93: 1201-1206.
- Lambropoulos, A., Agorastos, T., Foka, Z., Chrisafi, S., Constantinidis, T., Bontis, J. y Kotsis, A. Methylenetetrahydrofolate reductase

- polymorphism C677/T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer Letters*. 2003. vol.191:187-191
- Lauwerys, R. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Primera edición. Masson. España. 1994.
- Lehninger, A. Bioquímica. segunda edición. ediciones omega. New York 1995.
- Lera, J., Napal, C., García, M., López, G., Abascal, L. y Vicente, F. Detección de mutaciones en el gen p53 en el cáncer de mama familiar y esporádica en la población Navarra. *ANALES Sis San Navarra*. 1997. vol. 20: 39-43.
- Lewin, B. Genes IV. Oxford. EUA. 1997
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. Molecular Cell Biology. Primera edición. W. H. Freeman & Co. New York. 1999.
- Makedonka, M., Biology and genome of *trichinella spiralis*. Worm Book. Org. Washington. 2006.
- Martí, J., Desoille, H. y Viñas, V. Medicina del trabajo. Segunda edición. Masson. España. 2002.
- Mathews, C., Holde, K. y Ahern, K. Bioquímica. 3ra edición. Editorial Addison Wesley. 2002.
- McKee, T. y McKee, J. BIOQUIMICA la base molecular de la vida. Tercera edición. Mc Graw Hill. Interamericana. Colombia. 2003.
- Meza, M., Kopplin, M., Burguess, J. y Gandolfi, J. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, México, *Environmental Research*. 2004. vol. 96:119-126.
- Mollerup, S., Rybeg, D., Skaug, V. y Haugen, A. Lung Cancer Susceptibility. *Norsk Epidemiolog*. 2002. no. 2. Vol. 12.: 137-143.

- Mondal, P., Majumder, C. y Mohanty, B. Laboratory based approaches for arsenic remediation from contaminated water: Recent developments, journal Hazardous Materials. 2006. 464–479.
- Mobley, H., Mendz, G. y Hazell, S. Helicobacter pylori: Physiology and Genetic. Primera edición. ASM Press. 2001.
- Mtiraoui, N., Ezzidi, I., Chaieb, M., Marmouche, H., Aouni, Z., Chaieb, A., Mahjoub, T., Vaxillaire, M. y Almawi, W. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphism and hiperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2diabetes patients. Diabetes Research and Clinical Practice. 2006. no.1.Vol. 75: 99 – 106.
- Norma Oficial Mexicana: Modificación a la NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad.
- Panduro, A. Biología Molecular en la Clínica. Primera edición. Mc Graw Hill. 2000.
- Plaschke, J., Uta, S., Steffen, P., Hans, D., Saeger, H. y Schackert. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. Cancer Letters. 2003. 179-185.
- Puertas, M. Genética Fundamentos y Perspectivas. Segunda edición. McGraw Hill Interamericana. España. 1999.
- Ríos, M. y Hernández, M. Los Genes Supresores de Tumores y el Cáncer. Revista Cubana Oncológica. 2001. vol. 17: 65-71.
- Ríos, B. Tesis de Licenciatura: Evaluación de la posible relación entre arsénico inorgánico en agua potable del sur de Hermosillo, Sonora México y los niveles de arsénico orgánico en la población residente, Universidad de Sonora, México. 2007. 37 – 41.
- Sachdev, P. Homocysteine and Brain Atrophy. Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2005. vol. 29: 1152-1161.

- Sambrook, J. y Russell, D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3a. edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 2001.
- Sasnauskas, G., Halford, S. y Siksnys, V. How the *Bfi* restriction enzymes uses one active site to cut two DNA strands. 2003. PNAS. no.11.vol. 100 : 6410 – 6415.
- Sharp, L., Little, J., Schofield, A., Pavlidou, E., Cotton, S., Miedzybrodzka, Z., Baird, J., Haites, N., Heys, S. y Grubb, D. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) *Cancer Letters*. 2002. vol. 181: 65-71.
- Shrubsole, M., Yu-Tang, G., Quiuyin, C., Xiao, O., Qi, D., James, H., Fan, J., y Wei, Z. MTHFR polymorphisms, Dietary Folate Intake, and Breast Cancer Risk: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiology*. 2004. vol. 13: 190-196.
- Skibola, C., Smith, M., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R. y Morgan, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. PNAS. 1999. vol. 96: 12810-12815.
- Smith, K., Diggle, M. y Clarke, S. Comparison of Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of Bacterial Genomic DNA from Whole-Blood Samples. *J Clin Microbiol*. 2003. no. 6. vol. 41: 2440-2443.
- Strachan, T. y Read, A. *Human Molecular Genetic 2*. Segunda edición. Garland Science. New York. 1999.
- Tapio, S. y Grosche, B. Arsenic in the etiology of cancer. *Reviews in Mutation Research*. 2006. vol. 612: 215-246.
- Tseng, C.H., Tai, T.Y., Chong, C.K., Tseng, C.P., Lai, M.S., Lin, B., Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Hsu, K.H. y Chen, C.J. Long term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort studying arseniasishyperendemic villages in Taiwan. *Environ. Health Perspect*. 2000. 108, 847-851.

Walker, J. y Gingold, E. Molecular Biology and Biotechnology. Tercera edición. Royal Society of Chemistry. E.U.A. 1993.

Watson, J., Hopkins, N., Jeffrey, R., Argetsinger, J. y Weiner, M. Molecular Biology of the Gene. Vol II. cuarta edición. The Benjamin Cummings. EUA. 2002.

Wyatt, C., Lopez, V., Olivas, R. y Mendez, R. Excretion of arsenic (As) in urine of children, 7-11 years, exposed to elevated levels of As in the city water supply in Hermosillo, Sonora, México. Environ Res. 1998. vol. 78:19- 24,.

Yi, P., Pogribny, I. y James, S. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677C→T and 1298 A→C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. Cancer Letters. 2002. vol. 181: 209- 213.

Yu, C., Hsu, K., Chen, C. y Froines, J. Arsenic methylation capacity and skin cancer. Cancer epidemiology. Biomarkers and prevention. 2000. Vol. 9:1259-1262.

<http://cosmos.astro.uson.mx/meetings/cna2004/hermo.jpg>

## ANEXO

Artículo relacionado con el presente trabajo de tesis enviado para  
publicación en la revista

**“Species of arsenic depending on the gene MTHFR polymorphism  
(C677T and A1298C) in a population of Hermosillo City, Sonora,  
Mexico”**

**Autores:** Yáñez-Chacón, S., Gutiérrez-Millán, L.E., Escamilla-Roldán, E.,  
Vasquez Del Castillo, D., Burboa-Zazueta, M.G., Valdés-Covarrubias, M.A.,  
Harris, R.B., Roberge, J. y Meza-Montenegro, M.M.