
Determinación de polimorfismos del gen Arsénico 3 Metiltransferasa (*As3MT*) asociado al metabolismo del arsénico, en la población del Valle del Yaqui, Sonora, México

E.U. Cantú-Soto¹, R. Harris², J. Roberge², W.T. Klimecki³, A. Félix-Fuentes¹, M.M. Meza-Montenegro^{1*}

¹Laboratorio de Toxicología y Salud Pública, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México

²College of Public Health, University of Arizona, USA

³Department of Toxicology and Pharmacology, University of Arizona, USA

Polymorphisms in the gene Arsenic 3 Methyltransferase (As3MT) associated to arsenic metabolism in the population of the Yaqui Valley, Sonora, Mexico

Abstract

Chronic arsenic exposure increases risk for the development of diabetes, vascular disease, and cancers of the skin, lung, kidney and bladder (Bredfeldt *et al.*, 2004). The goal of this study was to evaluate the genetic association between the concentrations of inorganic arsenic metabolites in urine [(arsenite (As^{III}), arsenate (As^{V}), metilarsinic acid (MMA^{V}) and dimetilarsinic acid (DMA^{V})] and the gene *As3MT* which is involved in the metabolism of arsenic in residents adults chronically exposed to low arsenic concentrations in the drinking water from the Yaqui valley in Sonora, Mexico. The period of study was August, 2005 - August, 2007. Two communities from the Yaqui valley were selected; an urban community with arsenic concentrations in their well water of 48.4 ppb, and the other with 3.4 ppb. 151 study subjects were included and urine samples were taken for arsenic analysis and its metabolites according to the procedure 3015 of the US-EPA and determined by HPLC/ICP-MS; also were sampled blood and buccal cells for DNA isolation and analysis of polymorphisms in the gene *As3MT* according to the technique described by Meza and collaborators (2005). STATA 9.0 software was used in order to realize the correlations of the urinary arsenic species with the polymorphisms detected. The results showed that the proportions of urinary arsenic metabolites were: 45.0% of inorganic arsenic, 8.0% of MMA^{V} and 46.2% of DMA^{V} . Inorganic arsenic had the highest proportion in urine compared to other reports. The frequency of the genotypes in *As3MT* in the study population was 2.8% CC, 21.1% CT and 76.0% TT. Was not found genetic association between the genotypes of the gene *As3MT* and the arsenic levels in urine of the population for both communities. However the variable sex showed a strong statistical association with the dependent variables studied.

Key words: arsenic, gene *As3MT*, polymorphisms, Yaqui Valley

Resumen

La exposición crónica a arsénico incrementa el riesgo de desarrollo de diabetes, enfermedades vasculares y cáncer de piel, pulmón, riñón y vejiga (Bredfeldt *et al.*, 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la asociación genética entre las concentraciones de los metabolitos de arsénico inorgánico en orina [(arsenito (As^{III}), arsenato (As^{V}), ácido metilarsínico (MMA^{V}) y ácido dimetilarsínico (DMA^{V})] y el gen *As3MT* involucrado en el metabolismo de este metaloide, en adultos residentes del Valle del Yaqui, Sonora, expuestos crónicamente a bajas concentraciones de arsénico en el agua de consumo. El periodo de estudio fue de agosto de 2005 - agosto de 2007. Se seleccionaron 2 comunidades del Valle del Yaqui; una comunidad urbana con

* Autor de correspondencia

E-mail: mmeza@itson.mx; Teléfono: (644) 4109000, fax (644) 4100910

concentraciones de arsénico de 48.4 ppb y una comunidad rural con concentraciones de 3.4 ppb del metaloide. Se reclutaron 151 personas y se tomaron muestras de orina para análisis de arsénico y sus metabolitos de acuerdo al procedimiento 3015 de la US-EPA utilizando HPLC/ICP-MS, así como muestras de sangre y células bucales para aislamiento de ADN y análisis de polimorfismos en el gen *As3MT*, de acuerdo a la técnica descrita por Meza *et al.* (2005). Se utilizó el software STATA 9.0 para realizar las correlaciones de las especies urinarias de arsénico con los polimorfismos encontrados. La investigación mostró que las proporciones de los metabolitos de arsénico urinario fueron del 45.0% de arsénico inorgánico, 8.0% de MMA^V y 46.2% de DMA^V, siendo las proporciones de arsénico inorgánico altas comparadas con otros reportes. La frecuencia de los genotipos en *As3MT* de la población bajo estudio fueron CC (2.8%), CT (21.1%) y TT (76.0%). No se encontró asociación genética entre los genotipos del gen *As3MT* y los niveles de arsénico en orina de la población en estudio de ambas comunidades. Sin embargo la variable sexo presentó una fuerte asociación estadística con las variables dependientes estudiadas.

Palabras clave: Arsénico, gen *As3MT*, polimorfismos, Valle del Yaqui.

Introducción

El arsénico inorgánico se considera que es la forma principal de arsénico en el agua subterránea, en el agua superficial, en la tierra, y en muchos alimentos (Meza *et al.*, 2004; WHO, 2001). De las diferentes fuentes de arsénico en el ambiente, el agua potable es la fuente natural de mayor preocupación para la salud del hombre, es por ello que en el mundo la contaminación de esta por arsénico se considera uno de los principales problemas de salud pública (Ng *et al.*, 2003). En algunos países de América Latina entre ellos México, Argentina, Chile y el Salvador, cuando menos 4 millones de personas beben en forma permanente agua con concentraciones altas de este tóxico que pone en riesgo su salud (Loffredo *et al.*, 2003). En el caso específico del Valle del Yaqui, Sonora, la exposición de la población a este metaloide es crónica, con concentraciones en el agua de consumo que van desde 3.91 hasta 48.37 ppb. (Meza *et al.*, 2004).

Un estudio realizado en el 2004 por Meza, en 43 residentes de poblados del valle del Yaqui (Esperanza, Cocorit, Pueblo Yaqui y Colonia Allende) mostró diferencias entre los niveles de exposición y los metabolitos del arsénico en orina, además reveló que estas diferencias pueden deberse a polimorfismos genéticos en las enzimas de los genes involucrados en la biotransformación del arsénico. Un aspecto muy importante es que en el valle del Yaqui solo se ha caracterizado la exposición y la excreción urinaria de este metaloide, sin embargo se desconoce si el metabolismo del arsénico (medido indirectamente por la proporción de metabolitos urinarios), como el arsénico

Inorgánico, ácido metilarsinico (MMA^V), ácido dimetilarsinico (DMA^V), ácido metilarsenoso (MMA^{III}), ácido dimetilarsenoso (DMA^{III}), en la población expuesta se deba a polimorfismos genéticos en las enzimas que metabolizan este metaloide en los sujetos de estudio (Meza *et al.*, 2004).

Meza *et al.* (2005), determinaron la asociación genética de 3 genes involucrados en el metabolismo del arsénico, en los cuales se incluyeron 23 sitios polimórficos, con los niveles de metabolitos de arsénico en orina en 135 sujetos de estudio residentes del Valle del Yaqui, y expuestos a concentraciones de arsénico en un rango de 5.5 a 43.3 ppb. Dichos genes fueron: PNP (Purine nucleoside phosphorylase), *GSTO* (glutathione-S-transferase y *CYT19* ó *AS3MT* (arsenic (III) methyltransferase) encontrando una asociación estadísticamente significativa entre *As3MT* y el % de MMA en niños. Debido a lo anterior en la presente investigación se pretende establecer si la población bajo estudio presenta los polimorfismos identificados en *As3MT*, y que pudieran estar involucrados en el metabolismo y carcinogénesis del arsénico.

Actualmente no se conoce el mecanismo exacto por el cual el arsénico induce cáncer, por lo que la determinación de biomarcadores de susceptibilidad asociados al probable desarrollo de esta enfermedad en las personas expuestas, pudiera dar la pauta para una mayor comprensión del mecanismo de carcinogénesis y así poder detectar en etapas tempranas o evitar el desarrollo de la misma en las poblaciones expuestas a bajos niveles de arsénico

en su agua de consumo.

Material y métodos

Selección de la zona de estudio

Las comunidades seleccionadas del Valle del Yaqui fueron: el poblado Tobarito el cual presentaba una concentración de arsénico en su agua de pozo de 48.37 ppb (excediendo lo establecido en la NOM-127-SSA1-1994), y el Ejido Guadalupe Victoria con una concentración de 3.91 ppb (por debajo de lo establecido en la mencionada norma).

Sujetos de estudio

Se incluyeron 151 participantes adultos de 18 a 65 años de edad. Las características de dicho grupo se presentan en la tabla 1. Todos los participantes tuvieron similares condiciones socioeconómicas. El estudio se desarrollo de agosto de 2005 a agosto de 2007. Los participantes de los hogares visitados fueron seleccionados al azar, posteriormente aceptaron a participar en el estudio de manera informada, obteniendo así la firma del consentimiento informado. Adicionalmente se aplicó a los participantes del estudio un cuestionario con el fin de obtener información demográfica, nutricional y de salud.

Muestras

A partir de 100 sujetos de estudio de ambas comunidades se extrajeron alícuotas de ADN a partir de sus muestras de sangre. Así mismo muestras de células bucales de 51 participantes fueron obtenidas para posterior aislamiento de ADN.

Identificación y análisis de polimorfismos

La secuencia de cromatogramas fueron procesados por el equipo analizador “base calling” y

“ensamblado” usando el programa y software phred, phrap and Consed (Gordon *et al.*, 1998). Los sitios de polimorfismos potenciales, identificados inicialmente por Polyphred fueron individualmente confirmados por inspección visual de las trazas de secuencias. El criterio establecido para confirmar el resultado fue que el polimorfismo debía ser observado en varios cromatogramas a partir de polimorfismos presentes en un solo sujeto o en múltiples sujetos. Para los sitios polimórficos confirmados, cada genotipo de cada sujeto fue también confirmado por inspección visual de los cromatogramas. Los sitios polimórficos y los genotipos identificados para cada sujeto fueron mostrados automáticamente en una base de datos, para posteriores análisis. Fueron seleccionados los polimorfismos con una frecuencia mínima de 0.10 para definir haplotipos relativamente comunes (Tishkoff *et al.*, 2000).

Contexto genético de los polimorfismos

El gen fue anotado gráficamente utilizando el programa y software Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). Las anotaciones incluyeron; localización del exón, sitio del polimorfismo, codificación de proteínas para cada grupo de exones, entre otros. Los polimorfismos fueron evaluados para cambios de codificación en el efecto de la secuencia de aminoácidos.

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software Intercooled Stata 9.0. La evaluación de los polimorfismos para probar la asociación genética con los metabolitos de arsénico en orina involucró también determinar la asociación entre factores tales como: sexo, tiempo de residencia, polimorfismos detectados y si es fumador o no, con las siguientes variables dependientes: Suma de especies, As

Tabla 1. Características y concentración urinaria de arsénico ($\mu\text{g/L}$) de la población del Tobarito y del Ejido Guadalupe Victoria.

	Tobarito	Ej. Guadalupe Victoria
No. de participantes	89	62
Edad (años)*	46.3	46
Tiempo de residencia (años)*	25.02	>2
Sexo	F= 51; M= 38	F= 53; M=9

F= femenino M= masculino

* Se reportan las medias aritméticas

inorgánico, MMA^V y DMA^V.

Resultados y discusión

Típicamente el arsénico inorgánico ingerido en humanos es excretado en orina con proporciones del 10-20% de arsénico inorgánico, del 10-15% de MMA y del 60-75% de DMA (Vather *et al.*, 2000). De acuerdo a lo anterior en la población bajo estudio de estas dos localidades del Valle del Yaqui, las proporciones fueron del 44.95 % de arsénico inorgánico, del 8.2 % de MMA y del 46.21% de DMA, porcentajes obtenidos a partir de las medias aritméticas de los niveles de arsénico en orina (Tabla 2). Es importante resaltar que los valores de As inorgánico se presentan altos, y los de DMA se presentan relativamente bajos según lo reportado en la literatura.

La tabla 3 muestra las frecuencias de polimorfismos en el gen As3MT involucrado en el metabolismo del arsénico para el total de la población incluida en la investigación. De acuerdo al valor de *P* no se encontró diferencia significativa entre ambos

poblados, en lo que ha frecuencia de polimorfismos se refiere.

Para la variable dependiente suma de las especies estadísticamente significativa en lo que a metabolismo de arsénico se refiere en la población bajo estudio con un valor de *P* de 0.049. El tiempo de residencia, polimorfismo y ser fumador, no demostraron ser estadísticamente significativos, con valores de *P* por encima de 0.05. De la misma manera cuando se utilizó el As inorgánico como variable dependiente la variable sexo fue la única que demostró ser estadísticamente significativo con un valor de *P* de 0.043. El resto de las variables fueron estadísticamente no significativas (Tabla 4). Al realizar el modelo de regresión para el metabolito ácido metilarsinico, se encontró que el sexo fue la variable estadísticamente significativa con un valor de *P* de 0.044 (Tabla 4). Las variables tiempo de residencia y ser fumador resultaron ser estadísticamente no significativos, al relacionarlos con el metabolismo de MMA^V en la población de ambas localidades bajo estudio. Sin embargo para

Tabla 2. Características y promedios de la distribución de especies urinarias de arsénico en la población en estudio.

	Población total	Mujeres	Hombres
No. de participantes	151	104	47
% de participación	- - -	68.8	31.1
Edad (años)	46.2	44	52.4
As ^{III} (µg l ⁻¹)*	26.8 (0.57-718.3)	18.46 (0.57-160.4)	44.95 (1.06-718.3)
As ^V (µg l ⁻¹)*	1.8 (0.10-80.6)	2.03 (0.10-80.6)	1.19 (0.10-9.21)
As in (µg l ⁻¹)*	28.5 (0.9-720.7)	20.2 (0.9-163.9)	46.4 (1.2-720.7)
MMA ^V (µg l ⁻¹)*	5.2 (0.4-42.5)	4.7 (0.6-25.0)	6.4 (0.4-42.5)
DMA ^V (µg l ⁻¹)*	28.8 (2.9-158.6)	26.7 (3.6-120.7)	33.2 (2.9-158.6)

* Se reportan las medias aritméticas.

Tabla 3. Frecuencia de polimorfismos por pueblo en el gen As3MT.

Poblado	Frecuencia de polimorfismos			Total
	CC	CT	TT	
Tobarito	63 44.4	18 12.7	2 1.41	83 58.4
Guadalupe Victoria	45 31.7	12 8.5	2 1.41	59 41.6
Total	108 76.1	30 21.1	4 2.8	142 100

Pearson chi2(2) = 0.1479 Pr = 0.929

este mismo metabolito la variable polimorfismo presentó valores de *P* de 0.064, lo cual nos indica que la excreta de este metabolito identificado en la orina de la población del Valle del Yaqui pudiera estar asociado a la presencia de los polimorfismos mencionados anteriormente.

La tabla 4 muestra que para el modelo de regresión tomando como variable dependiente el metabolito DMA^V, se encontró que ninguna variable independiente incluida en esta investigación fue

investigación fue estadísticamente significativa para los niveles del metabolito encontrados en las muestras de orina analizadas. No se encontró asociación genética estadísticamente significativa entre los genotipos del gen *As3MT* y los niveles de arsénico en orina de la población en estudio de ambas comunidades, siendo la variable sexo la que presentó una asociación estadística fuerte para las variables dependientes estudiadas.

Tabla 4. Modelo de regresión para la población estudiada del Valle del Yaqui utilizando la suma de las especies de arsénico, As in, ácido metilarsinico (MMA^V), ácido dimetilarsinico (DMA^V) como variables dependientes.

Log	Valor de P (IC 95%)			
	Suma de especies As	As in	MMA ^V	DMA ^V
Sexo	0.05	0.04	0.04	0.10
Tiempo de residencia	0.67	0.98	0.85	0.778
Polimorfismo	0.53	0.93	0.06	0.53
Fumador	0.48	0.64	0.67	0.44

IC= Intervalo de confianza

Suma especies As = (As^V + As^{III} + DMA^V + MMA^V)

As in = (As^V + As^{III})

MMA^V = ácido metilarsinico

DMA^V = ácido dimetilarsinico

estadísticamente significativa para los niveles del metabolito encontrados en las muestras de orina analizadas.

Conclusiones

Las proporciones de los metabolitos en orina para el total de la población fueron del 45% de arsénico inorgánico, del 8 % de MMA^V y del 46% de DMA^V; los valores de As inorgánico se presentan altos, y los de DMA^V se presentan relativamente bajos según lo reportado en la literatura. No se encontró diferencia significativa entre los poblados estudiados en la frecuencia de los polimorfismos detectados. Para las variables suma de especies, arsénico inorgánico y MMA^V, solamente el sexo del participante resultó ser estadísticamente significativo para el metabolismo del arsénico. Además para MMA^V también la variable polimorfismos presentó valores de *P* de 0.064, lo cual indica que la excreta de este metabolito identificado en la orina de la población del Valle del Yaqui pudiera estar asociado a la presencia de los polimorfismos mencionados anteriormente. Para la variable DMA^V ninguna variable incluida en esta

Agradecimientos

Este trabajo de investigación formó parte del proyecto de investigación SPORE in GI cancer (CA95060), apoyado por el Instituto Nacional de Cancer, USA (NCI).

Bibliografía

- Bredfeldt Tiffany G., Micheal J. Kopplin, and A. Jay Gandolfi. 2004. Effects of arsenite on UROtsa cells: low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins that is enhanced by reduction in cellular glutathione levels. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198:412– 418
- Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8(3):195-202.
- Loffredo C. A., H. V. Aphoshian, M. E. Cebrian, H. Yamaguchi, E. K. Silbergeld. 2003. Variability in human metabolism of arsenic. *Environmental Research*. 92: 85 - 91.
- Meza M.M, L. Yu, Y. Y. Rodriguez, M. Guiad, D. Thompson, J. Gandolfi and W.T. Klimecki. 2005. Developmentally Restricted Genetic Determinants of Human Arsenic Metabolism: Association between Urinary Methylated Arsenic and CYT19 Polymorphisms in Children. *Environmental Health Perspectives*. 113: 775 – 781.
- Meza M. M. M. 2004. Determinación de biomarcadores moleculares en residentes crónicamente expuestos a bajos niveles de arsénico en el Valle del Yaqui Sonora, México, Tesis Doctor en Ciencias en Biotecnología (ITSON).

- Meza M.M., M. J. Kopplin, J. L. Burgess, A. J. Gandolfi., 2004. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, México. *Environmental Research*. 96: 119 - 126.
- NOM-127-SSA1-1994 (MODIFICACION) a la Norma Oficial Mexicana, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Ng. J.C., J. Wang, A. Shraim. 2003. A Global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*. 52: 1353 - 1359.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, horsnell T, Rice P, Rajandream MA, et al. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16(10):944-945.
- Tishkoff SA, Pakstis AJ, Ruano G, Kidd KK. 2000. The accuracy of statistical methods for estimation of haplotype frequencies: an example from the CD4 locus. *Am J Hum Genet* 67(2):518-522.
- Vahter, M. 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.* 112-113: 209-217.
- WHO. 2001. Arsenic and arsenic compounds. *Environmental Health Criteria* 224. Geneva, World Health Organization.