



## Presencia de altos niveles de arsénico en tejidos cardiovasculares de pacientes de áreas contaminadas en Chile

Carlos Solar<sup>1</sup>, Isabel Pizarro<sup>2</sup>, Domingo Román<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Cirugía Cardiovascular. Clínica Antofagasta.

<sup>2</sup> Laboratorio de Química Bioinorgánica y analítica ambiental. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Antofagasta.

Recibido el 28 de noviembre 2012 / Aceptado el 15 de enero 2012

Rev Chil Cardiol 2012; 31: 41-47

**Introducción y objetivos:** En la Región de Antofagasta – Chile la contaminación crónica por arsénico es causa de numerosas patologías donde se destacan las enfermedades cardiovasculares. El presente estudio detalla la concentración de arsénico total y sus principales especies encontradas en tejidos cardiovasculares de pacientes que han requerido cirugía cardíaca. Se relacionan los niveles de As con hallazgos histológicos.

**Métodos:** Se analizaron muestras de tejidos obtenidos en el momento de la cirugía coronaria. Se recolectaron muestras de vena safena (VS), aurícula derecha (AD), arteria mamaria interna (AMI) y tejido adiposo (TA) de 250 pacientes autóctonos, vecindados de la Región de Antofagasta, (Grupo Expuesto) y de 25 pacientes de la Región Metropolitana, (Grupo no Expuesto). El arsénico total se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica y las especies presentes en dichos

tejidos por cromatografía iónica acoplada a espectrometría de masas. Se realizó un estudio histológico en cortes de bloques de parafina teñidos con Hematoxilina – Eosina, Tricrómico de Masson y Orceína Giesson.

**Resultados:** La concentración total de arsénico encontrada en la AD fue de  $6,06 \pm 1,90 \mu\text{g/g}$  en el Grupo Expuesto, y de  $2,26 \pm 1,30 \mu\text{g/g}$  en el Grupo no Expuesto ( $p < 0,05$ ). En la AD se encontraron las especies inorgánicas, mientras que en la VS y AMI se encontraron especies metiladas de arsénico. En el grupo expuesto, la VS presentó fibrosis intimal concéntrica en diferentes grados.

**Conclusiones:** La presencia de especies inorgánicas, la alta concentración total de arsénico y el daño encontrado en los tejidos cardiovasculares encontrados en el grupo expuesto, reflejan el gran impacto de la contaminación de arsénico sobre tejidos cardiovasculares de pacientes de la Región de Antofagasta.

### Correspondencia:

Isabel Pizarro V.

Avenida Angamos 0601055- 637884

E-mail: [ipizarro@uantof.cl](mailto:ipizarro@uantof.cl)



## High levels of Arsenic in cardiovascular tissues of residents from contaminated areas of northern Chile

**Introduction:** Chronic contamination from arsenic observed in Antofagasta (northern Chile) has been related to increased prevalence of different health problems, foremost among them cardiovascular disease. The present work describes concentrations of arsenic and derived species in cardiovascular tissues obtained at the time of cardiac surgery. The relation of arsenic concentrations and histological damage is described

**Method:** Tissues obtained during performance of coronary artery surgery including saphenous vein (SV), mammary artery (MA), right atrium (RA) and adipose tissue (AT) were obtained from 250 subjects living in Antofagasta (exposed group) and 25 patients from central Chile (non exposed group). Total As levels were determined through atomic absorption spectrometry, and species found in different tissues were identified by

ionic chromatography associated to mass spectrometry. Histological samples were stained with H-E, Masson trichromic and Giesson orsein.

**Results:** Arsenic concentrations in the RA were  $6,06 \pm 1,90 \mu\text{g/g}$  and  $2,26 \pm 1,30 \mu\text{g/g}$  in the exposed and no exposed groups, respectively ( $p < 0,05$ ). Inorganic species of AS were found in the RA whereas methylated species were found in SV and MA. In exposed subject's SV, different grades of concentric intimal fibrosis were observed.

**Conclusion:** The presence of inorganic species, the high As concentration and cardiovascular tissue damage represent the serious contamination affecting the Antofagasta region.

**Key words:** Arsenic, human chronic contamination, cardiovascular tissue levels

### Introducción:

Históricamente los habitantes de la Región de Antofagasta – Chile han estado expuestos a metales pesados<sup>1</sup>, entre los que destaca el arsénico<sup>2,3</sup>(As), por contaminación de suelos, aire, agua y alimentos<sup>4</sup>. Las características epidemiológicas de las enfermedades de esta zona difieren del resto del país. El cáncer es una de las causas más frecuentes de mortalidad; se destaca la incidencia de los cánceres broncopulmonar, laríngeo, piel y vejiga, todos presumiblemente asociados a la exposición a As por vía digestiva o aérea<sup>5</sup>. El cáncer broncopulmonar<sup>6</sup> presenta la más alta incidencia de la región llegando a triplicar el promedio nacional. En la ciudad de Antofagasta fue la primera causa de defunción en 1994<sup>7</sup>, después del infarto al miocardio, siendo este último 2,5 veces mayor<sup>8</sup> que el promedio nacional, a edades de aparición más tempranas<sup>9</sup>.

Desde 1952, al riesgo de la población por exposición a As del agua por vía digestiva<sup>5</sup> se sumó el riesgo de exposición por vía aérea, producto de la contaminación del aire por las fundiciones mineras<sup>1</sup>.

Varios estudios revelan una relación positiva entre el contenido de As en el agua de bebida y la prevalencia de enfermedades cardiovasculares (ECV), con infarto al miocardio en individuos jóvenes<sup>10-12</sup>.

En general, aun es insuficiente lo que se sabe sobre los factores que influyen la toxicidad y el metabolismo del As en humanos. El As inorgánico es la fracción química más tóxica, se encuentra en dos estados de oxidación 3 y

5. El As inorgánico es metilado a formas menos tóxicas, Monometilarsenato (MMA) y Dimetilarsinato (DMA), que además son excretables<sup>13,14</sup>. Sin embargo, se presentan considerables variaciones entre la concentración de estas especies químicas en poblaciones grupales<sup>15</sup>. A pesar que los efectos sobre la salud humana por la exposición al As se estudian intensamente en varias partes del mundo<sup>16</sup>, todavía los tejidos biomarcadores (pelo, uña, orina y sangre) no son totalmente claros<sup>17</sup>, principalmente en el caso de exposición a As por agua de consumo humano a niveles crónicos menores que  $50 \mu\text{g/L}$ <sup>18</sup>.

Desde el punto de vista de las formas químicas de As presentes en tejidos humanos<sup>19</sup>, la mayoría de los trabajos se refieren exclusivamente al As inorgánico<sup>20</sup> y sus formas metiladas. El As orgánico tiene formas no tóxicas, que se encuentran presentes en tejidos biológicos humanos; posiblemente son consecuencia de especies más estabilizadas de As que provienen exclusivamente de la ingestión de alimentos, como es el caso de la Arsenocolina (AsC) y Arsenobetaina (AsB), asociadas generalmente con los alimentos de origen marino<sup>21</sup>, los cuales siguen un mecanismo de biotransformación conocido en mamíferos<sup>22,23</sup>. La información disponible indica que un porcentaje mayor de estos organometálicos es excretado<sup>13,14</sup>. Parece no ser necesario poner atención en otros organometálicos además de MMA y DMA, en relación con su eventual asociación con el riesgo de ECV.<sup>24-26</sup>

El presente estudio detalla la determinación de As total



y las principales especies inorgánicas y organoarsenicales encontradas en la vena safena (VS) y en tejidos del corazón: aurícula derecha (AD), arteria mamaria interna (AMI) y tejido adiposo (TA), de pacientes de la Región de Antofagasta – Chile que han requerido cirugía de revascularización coronaria.

### Métodos:

**Muestras:** En este estudio se analizaron 831 muestras, de 250 pacientes que corresponden a trozos de AMI, VS y de pacientes autóctonos, avecindados y pasantes en la II Región, los cuales forman el Grupo Expuesto, y 97 muestras de 25 pacientes que corresponden al grupo control, entre los cuales 10 provenían del centro y 15 del sur del país; todos estos pacientes fueron intervenidos en el Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile, en Santiago (Grupo No Expuesto), en los cuales se determinó la concentración total de As. Además, se realizó una encuesta a estos pacientes, en las cuales se consideraron factores relacionados con el trabajo desarrollado, hábitos, lugares de residencia y permanencia en la ciudad.

La determinación de los niveles basales de As se efectuó analizando 16 idénticos tejidos de 4 pacientes provenientes de zonas no mineras de España y sin contaminación ambiental por As, con análogas ECV intervenidos en la Clínica Puerta de Hierro, en Madrid.

El estudio de especies de As se realizó en tres muestras del grupo expuesto a As y en tres muestras del grupo control.

El protocolo para Seres Humanos donantes de muestras fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Antofagasta y Clínica Antofagasta, sustentado en el Reglamento Orgánico de los Servicios de Salud.

**Determinación de As total:** La mineralización de los tejidos cardiovasculares (TCV) se realizó por vía húmeda. Se pesaron entre 0,5-1,0 g de muestra en reactores de teflón, se adicionó 1 mL de agua desionizada Milli-Q, 10 mL de ácido nítrico, 500  $\mu$ L de ácido sulfúrico y 300  $\mu$ L de ácido perclórico de calidad Suprapur (Merck). Luego se llevó a un horno con un riguroso programa y control de temperatura externa entre 170 -180° C por 2 horas.

La concentración total de As en las muestras se determinó por Generación de Hidruros, en la que se utiliza ácido clorhídrico de calidad suprapur 3M, (Merck), Hidróxido de Sodio al 1,5% (Merck) y Borohidruro Sódico al 3% (Aldrich).

Las mediciones de As se realizaron en un espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo GBC 909 PBT acoplado a un Generador de Hidruros GBC HG-3000, equipado con una manta electrotermal modelo GBC EHG – 3000. Como fuente de excitación se utilizó una lámpara de cátodo hueco BDL (Photron).

**Determinación de las especies de As:** En tubos de centrifuga se pesaron entre 0,5 – 1,0 g de muestra. Las especies inorgánicas y metiladas de As presentes en los tejidos cardiovasculares se extrajeron en 10 mL de metanol-agua 1:1. La mezcla se agitó mecánicamente por 3 horas y se mantuvo a 55°C por 10 horas y finalmente se sometieron a ultrasonido focalizado (Bandelin Sonopuls HD-2200, Fungilab S.A., USA) por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas (Eppendorf 5804 R, Alemania) por 15 minutos a 6000 rpm. Después de la centrifugación el extracto fue removido con una pipeta Pasteur y preconcentrado en rotavapor (UNIEQUIP, USA) a 40 °C. El residuo se disolvió en agua desionizada y se microfiltró en una membrana de 0,45  $\mu$ m para su posterior análisis.

Se inyectaron en la columna de intercambio iónico PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA), a través de una válvula (Rheodyne 9125 USA), 100  $\mu$ L de la muestra microfiltrada la que fue transportada por una solución de Fosfato de Amonio 10 mM a pH 6. La separación cromatográfica se realizó ayudada por un sistema de alta presión HPLC (LDC División, Riviera Beach, Florida, USA).

Las especies inorgánicas y metiladas de As presentes en los TCV, luego de ser separadas, se detectaron por Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (HP – 4500 (Yokogawa Analytical System, Tokio, Japan). La señal analítica se monitoriza a m / z 75. La validación del método se realizó con los Materiales de Referencia DORM-1 y LUTS-1.

**Estudio Histológico:** Se estudiaron cuatro casos. Cada uno de ellos incluye muestras de AMI, VS, y AD. Se analizaron los tejidos de 3 pacientes procedentes de Antofagasta y de un paciente procedente de la V Región. Los tejidos se estudiaron en cortes de bloques de parafina teñidos con Hematoxilina –Eosina, Tricrómico de Masson y Orceína Giesson.

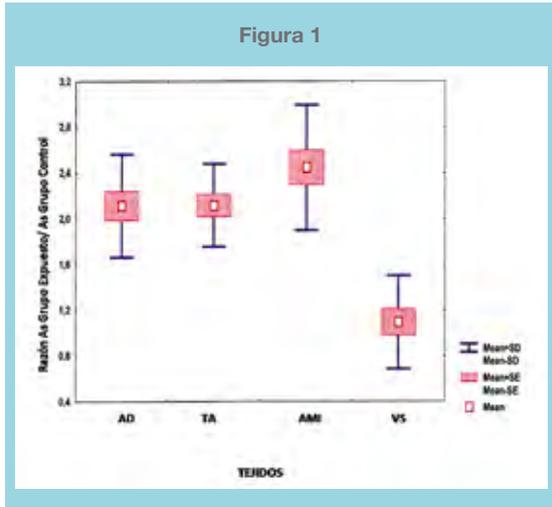
**Estudio Histoquímico:** Para la localización histoquímica del As se utilizó el método basado en la fijación e impregnación simultánea de las piezas en una solución de formol y sulfato de cobre que produce la precipitación “in situ” del As bajo la forma de hidrogenarsenito. Se realizaron estudios histoquímicos para relacionar los niveles de As con los hallazgos histológicos.

**Estadística:** El Análisis estadístico se realizó mediante el programa STATISTICA 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA); Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0.05$ .

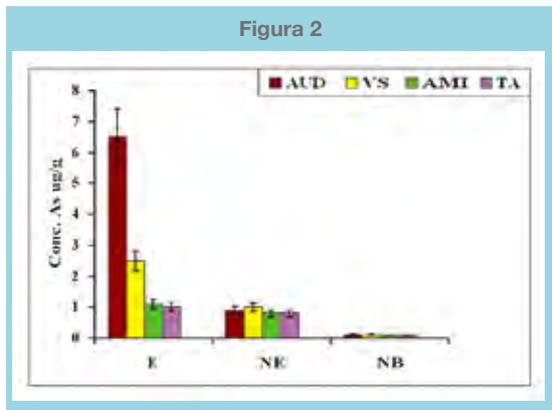
### Resultados:

**As total:** En la Figura 1 se muestran las concentraciones de As en cuatro tipos de tejidos provenientes de cirugía cardíaca de residentes en la Región de Antofagasta, respecto a las mismas matrices de la población control. El

gráfico relaciona la magnitud de la razón grupo expuesto/grupo no expuesto y discriminación por tipo de tejido. Se observa que la concentración de As en AD, AMI y TA fue entre 2 y 2.5 veces mayor en personas expuestas que en el grupo control ( $p < 0,05$ ). En cambio, en VS el factor de concentración de As obtenido fue semejante entre expuestos y controles.



Relación de niveles de As entre sujetos expuestos y sujetos control en diferentes tejidos cardiovasculares. (AD: Aurícula Derecha, TA: Tejido Adiposo, AMI: Arteria Mamaria Interna, VS: Vena Safena)

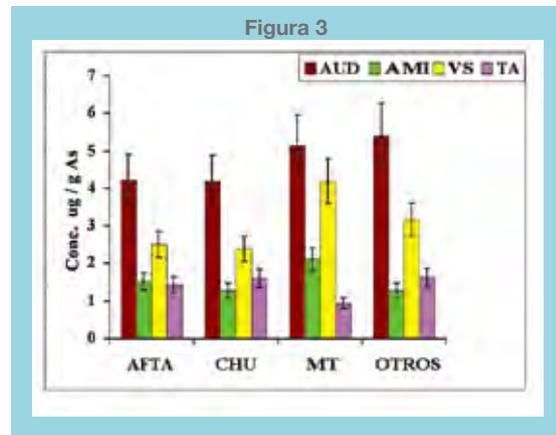


Comparación de la concentración de As total entre el Grupo Expuesto, Grupo No Expuesto y en sujetos con niveles basales (Madrid).

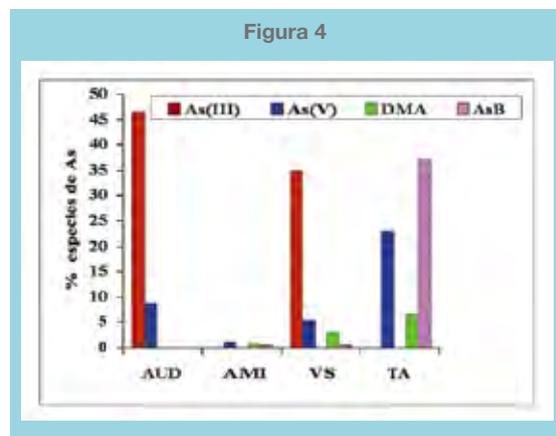
En la Figura 2 se observan las concentraciones totales de As para cada tipo de tejido en la población expuesta, no expuesta y pacientes de Madrid. En población expuesta, la concentración de As en AD fue  $6,06 \pm 1,90 \mu\text{g/g}$ , superior a la encontrada en los otros tejidos ( $P < 0,05$ ). La VS también presenta contenidos altos de As  $4,14 \pm 1,50 \mu\text{g/g}$  ( $P < 0,05$ ). En AMI y TA los niveles de As fueron  $1,98 \pm 0,90 \mu\text{g/g}$  y  $2,53 \pm 0,82 \mu\text{g/g}$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ).

En cambio, la concentración total de As encontrada en los tejidos del grupo No Expuestos, para AD fue de  $2,26 \pm 1,30 \mu\text{g/g}$ , VS  $3,25 \pm 2,0 \mu\text{g/g}$ , AMI  $0,78 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  y TA  $0,89 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$  ( $P < 0,05$ ). A niveles basales (pacientes de España) las concentraciones de As encontradas en los tejidos son significativamente inferiores, AD  $0,032 \pm 0,007 \mu\text{g/g}$ ; AMI  $0,040 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$ ; VS  $0,026 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$  y TA  $0,020 \pm 0,008 \mu\text{g/g}$ . Hubo una significativa gradiente de concentraciones al comparar los niveles de As de los grupos de pacientes expuestos, no expuestos y los pacientes de Madrid ( $p < 0,05$ ).

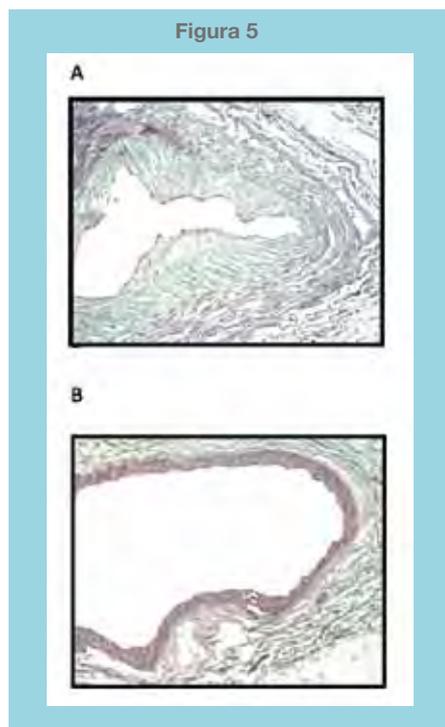
En la Figura 3 se observan concentraciones totales de As de pacientes provenientes de distintas localidades de la región de Antofagasta (Antofagasta, Chuquicamata, Mantos Blancos, Pedro de Valdivia, María Elena, Taltal y Tocopilla). Las concentraciones de As fueron similares en las localidades mencionadas. Se puede apreciar que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de As de un tipo de tejido cardiovascular de pacientes provenientes de las distintas localidades de la región.



Comparación de la concentración de As total en tejido de pacientes provenientes de distintos lugares geográficos de la región de Antofagasta.



Rendimiento de la distribución de especies de As (%) en los tejidos cardiovasculares expuestos.



A) Vena safena de paciente del Grupo expuesto. Se observa fibrosis intimal concéntrica con engrosamiento importante de la capa íntima que llega a ser mayor que la capa media. Tricrómico de Masson X 40.  
B) Vena safena de paciente del grupo no expuesto, sin lesiones patológicas. Tricrómico de Masson X 40.

**Especies de As:** La Figura 4 muestra la distribución promedio de las especies de As en los tejidos cardiovasculares de 3 personas del grupo Expuesto que han vivido a lo menos 5 años en la ciudad de Antofagasta. En AD y VS predomina el arsenito (As (III)) con un 46% y 35% del As total respectivamente. En el TA están presente el arseniato (As (V)) 23 % y la AsB 37,3%. La especie organoarsenical Monometilarsenato no se detectó en los tejidos cardiovasculares estudiados.

**Estudio Histológico:** En las muestras correspondientes a AMI y VS se encontró patología vascular de tipo fibrosis concéntrica de la intima. Se observa un engrosamiento de la capa íntima, a expensas de miofibroblastos, que afecta a toda la circunferencia de la luz. En las muestras correspondientes a VS también se demuestra fibrosis intimal concéntrica; la lesión está presente en diferentes grados. En pacientes Expuestos a altas concentraciones de As, el caso más grave presenta fibrosis intimal concéntrica (Figura 5A) con engrosamiento importante de la capa íntima que llega a ser mayor que la capa media. En el estudio histoquímico la presencia de As en la VS Expuesta, se observa por pequeños granulocitos de color verde azulado, procedente de la precipitación del As con el sulfato de co-

bre en solución. La concentración del elemento necesaria para producir la lesión se desconoce.

En pacientes No Expuestos, la VS presenta la capa íntima de menor grosor que la capa muscular (Figura 5B). La AMI sólo se encuentra afectada en 1 paciente Expuesto. Los cortes de pared de AD no tienen lesiones objetivables.

### Discusión:

Las concentraciones significativamente altas de As encontradas en el Grupo Expuesto, en relación al grupo control dan una idea inequívoca del gran impacto del elemento en dicha población. Los niveles bajos de As del Grupo No Expuesto pueden ser considerados como la concentración media de la población Chilena. Sin embargo dichos niveles son significativamente mayores que los de individuos de Madrid para AD y AMI, pero no para VS y TA.

Las concentraciones más altas de As en los tejidos cardiovasculares, tanto del Grupo Expuesto como del Grupo No Expuesto, fueron encontradas en la AD y VS, respectivamente, pero las concentraciones de As en la VS de ambos grupos de pacientes no fueron significativamente diferentes. Las concentraciones de As de pacientes provenientes de distintas localidades de la región de Antofagasta fueron semejantes, por lo cual se puede afirmar que el efecto del As en los tejidos cardiovasculares de pacientes cardíacos de la región de Antofagasta es independiente del lugar donde viven o trabajan.

La concentración total de As en la AD y la VS fue superior ( $p < 0,05$ ) a la encontrada en los otros tejidos. Niveles de As semejantes se encontraron en la AMI y TA. La comparación entre el Grupo Expuesto de la Región de Antofagasta y el Grupo control, muestran concentraciones similares. Sin embargo, los niveles de As en el Grupo de la Región de Antofagasta son bastante altos, 2 veces mayores que los controles chilenos y 3 veces mayor que en los españoles.

La distribución de las especies de As en los tejidos ha mostrado que en la AD solo predominan especies inorgánicas, siendo la concentración de As (III) mayor ( $P < 0,05$ ) que la concentración de As(V) y no está favorecido el paso a MMA y DMA. Es interesante resaltar que en el caso de la AD, no existe metilación pero sí reducción a As (III). Quizás en esta reducción hacia la formación de una especie más tóxica radica el problema que se presenta en el tejido. No se puede olvidar que solo As (V) es la especie predominante en el agua de bebida y medio ambiente. Un hecho sorprendente es que el DMA y MMA están ausentes en los tejidos de la AD. Este hecho lo podemos atribuir a los cambios metabólicos del As, donde los tioles endógenos tienen un papel crítico en la conversión de As (V) a As (III). Las formas de As (III) pueden metilarse, al aceptar el grupo funcional de la S- adenosilmetionina, sin



embargo, en el tejido auricular se formarían especies tóxicas intermedias que inhiben la acción de la glutatión reductasa, enzima clave para mantener las reacciones redox propias de las células y la eficiencia de los mecanismos de metilación. En la VS se encuentran mayoritariamente las especies inorgánicas As (III) y As (V), y la concentración de DMA es baja, mientras que en AMI y TA las especies presentes son fundamentalmente AsB y As (V).

La presencia de especies inorgánicas tóxicas asociadas al daño de los tejidos en individuos expuestos refrenda la importancia de la contaminación con As como agente causal de patología cardiovascular.

Este trabajo puede considerarse como un primer paso en la investigación de la acumulación de As y de la

respuesta bioquímica del TCV que contiene As. Este tema se deberá seguir estudiando para explicar el efecto a largo plazo de la exposición a As en el sistema cardiovascular en pacientes de la Región de Antofagasta.

### Agradecimientos:

Se agradece el financiamiento de esta Investigación a Asistencia Técnica Universidad de Antofagasta – Chile. El aporte de los Tejidos Cardiovasculares en estudio a Clínica Antofagasta - Chile, Hospital Clínico de la Universidad Católica Santiago – Chile y Clínica Puerta de Hierro Madrid – España.

### Referencias:

1. CORREA JA, RAMÍREZ MA, DE LA HARPE JP, ROMÁN D, RIVERA L. Copper, copper mining effluents and grazing as potential determinants of algal abundance and diversity in Northern Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* 2000; 61: 265 – 81.
2. FERRECCIO C, SANCHAM. Arsenic exposure and its impact on health in Chile. *J Health Popul Nutr.* 2006; 24: 164 – 75.
3. FERRECCIO C, GONZÁLEZ PC, MILOSAVJEVIC SV, MARSHALL GC, SANCHAM. Lung cancer and arsenic exposure in drinking water: a case – control study in Northern Chile. *Cad. Saude Publica.* 1998; 14: 193 – 98.
4. PIZARRO I, GÓMEZ MM, PALACIOS MA, CÁMARA C. Distribution of arsenic species in environmental samples collected of northern Chile. *Intern J Environ Anal Chem.* 2003; 83: 879 – 90.
5. SMITH AH, ERCUMEN A, JUAN J, STEINMAUS CM. Increased lung cancer risks are similar whether arsenic is ingested or inhaled. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology.* 2009; 9:343 – 48
6. SMITH AH, GOYCOLEA M, HAQUE R, BIGGS M. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol.* 1998; 147: 660 – 69.
7. MARSHALL G, FERRECCIO C, YUAN Y, BATES MN, STEINMAUS C, SELVIN S, et al. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 920 – 28.
8. ENGEL RR, HOPENHAYN-RICH C, RECEVEUR O, SMITH AH. Vascular effects of chronic Arsenic exposure. *Epidemiol. Rev.* 1994; 16: 184 – 209.
9. HERTS-PICCIOTTO I, ARRIGHI HM, HU SW. Does arsenic exposure increase the risk for circulatory disease? *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 174 – 81.
10. ROMÁN DA, PPZARRO I, RIVERA L, CÁMARA C, PALACIOS MA, GÓMEZ MM, et al. An approach to the arsenic status in cardiovascular tissues of patients with coronary heart disease. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 30: 1150 – 64.
11. PI J, YAMAUCHI H, SUN G, YOSHIDA T, AIKAWA H, FUJIMOTO W, et al. Vascular dysfunction in patients with chronic arsenosis can be reversed by reduction of arsenic exposure. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 339 – 41.
12. FERRÁNDIZ J, ABELLÁN J, GÓMEZ – RUBIO V, LÓPEZ -QUILLES A, SAN MARTÍN P, ABELLÁN C, et al. Spatial analysis of the relationship between mortality from cardiovascular and cerebrovascular disease and drinking water hardness. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 1037 – 44.
13. KENYON EM, DEL RAZO LM, HUGHES MF. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate. *Toxicol Sci.* 2005; 85: 468 – 75.
14. LI J, WATERS SB, DROBNA Z, DEVESA V, STYBLO M, THOMAS DJ. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2004; 204:164 – 9.
15. STEINMAUS C, YUAN Y, KALMAN D, ATAILLAH R, SMITH AH. Intraindividual variability in arsenic methylation in a U.S. Population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 919 – 24.
16. RAHMAN M. International research on arsenic contamination and health. *J. Health Popul Nutr.* 2006; 24: 123 – 8.



17. CHRIS L.X, MINGSHENG M, XIUFEN L, CULLEN WR, Aposhian HV, Zheng B. Determination of monomethylarsonous acid a key arsenic methylation intermediate in human urine. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108: 1015 – 8.
18. LEWIS RD, SOUTHWICK WJ, HELLSSTROM QR, RENCH J, CALDERON RL. Drinking Water Arsenic in Utah: A Cohort Mortality Study. *Environ. Health Perspect.* 1999; 107: 359 – 65.
19. BENRAMDANE L, ACCOMINOTTI M, FANTON L, MAILICIER D, VALLON J. Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning - a case report. *Clin Chem.* 1999; 45: 301 – 6.
20. HUGHES MF. Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 1790 – 6.
21. GOESSLER W, MAHER W, IRGOLIC KJ, KUEHUELT D, SCHLAGENHAUFEN C, KAISE T. Arsenic compounds in a marine food chain. *Fresenius J Anal Chem.* 1997; 359: 434 – 7.
22. TSENG CH. Metabolism of inorganic arsenic and non – cancerous health hazards associated with chronic exposure in humans. *J Environ Biol.* 2007; 28: 349 – 57.
23. STYBLO M, DROBNA Z, JASPERAL LIN S, THOMAS DJ. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: A research update. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: 767 – 71.
24. LEE MY, JUNG BI, CHUNG SM, BAE ON, LEE JY, PARK JD, et al. Arsenic-Induced dysfunction in relaxation of blood vessels. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 513 – 17.
25. NAVAS – ACIEN A, RICHEY SHARRET A, SILBERGELD EK, SCHUARTZ BS, NACHMAN KE, BURKE TA, et al. Arsenic exposure and cardiovascular disease: A systematic review of the epidemiologic evidence. *Am J Epidemiol.* 2005; 162: 1 – 13.
26. PIZARRO I, GÓMEZ M, CÁMARA C, PALACIOS MA, ROMÁN – SILVA DA. Evaluation of arsenic species – protein binding in cardiovascular tissues by bidimensional chromatography with ICP – MS detection. *J Anal At Spectrom.* 2004; 19: 292 – 6.