00563

1
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO DE FARMACOCINETICA DE ARSENICO EN RATONES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

(B I O F A R M A C I A)

P R E S E N T A:

MARIA ESTHER DE ITA MORALES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F. 1987.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCION	5
II. GENERALIDADES	
2.1 Propiedades físicas y químicas	9
2.2 Métodos de análisis	10
2.3 Usos	11
2.4 Niveles ambientales y exposición	12
2.4.1 Niveles de arsénico en alimentos	12
2.4.2 Niveles de arsénico en agua	13
2.4.3 Niveles de arsénico en suelo	14
2.4.4 Niveles de arsénico en el medio ambiente	14
2.5 Farmacocinética	15
2.5.1 Absorción	15
2.5.2 Distribución	18
2.5.3 Metabolismo	22
2.5.4 Eliminación	24
III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Farmacocinética de arsénico en ratones	25
3.1.1 Determinación de arsénico en sangre	25
3.1.1.1 Instrumentos	26
3.1.1.2 Reactivos	26
3.1.1.3 Método	27
3.1.1.4 Linearidad y exactitud	28
3.1.1.5 Repetibilidad	30

3.1.2 Estudio de Farmacocinética 30
3.1.2.1 Instrumentos 30
3.1.2.2 Reactivos 30
3.1.2.3 Método 30

3.2 Dosis dependencia de arsénico en ratones 31
3.2.1 Instrumentos 32
3.2.2 Reactivos 32
3.2.3 Método 34

3.3 Distribución de arsénico en ratones 35
3.3.1 Determinación de arsénico en tejidos 37
3.3.1.1 Instrumentos 37
3.3.1.2 Reactivos 37
3.3.1.3 Método 37
3.3.1.4 Linearidad y exactitud 40
3.3.1.5 Repetibilidad 40

3.3.2 Estudio de distribución 41
3.3.2.1 Instrumentos 41
3.3.2.2 Reactivos 41
3.3.2.3 Método 41

3.4 Excreción de arsénico en ratones 43
3.4.1 Determinación de arsénico en orina 43
3.4.1.1 Instrumentos 43
3.4.1.2 Reactivos 43
3.4.1.3 Método 44
3.4.1.4 Linearidad y exactitud 46
3.4.1.5 Repetibilidad 46

3.4.2 Estudio de excreción de arsénico 46
3.4.2.1 Instrumentos 46

3.4.2.2 Reactivos 47
3.4.2.3 Método 47

3.5 Metabolismo de arsénico en ratones 48
3.5.1 Instrumentos 48
3.5.2 Reactivos 48
3.5.3 Método 49
3.5.3.1 Separación de metabolitos de arsénico en orina 50
3.5.3.2 Identificación de metabolitos de arsénico en orina 51

IV. RESULTADOS
4.1 Determinación de arsénico en sangre 53
4.1.1 Linearidad y exactitud 53
4.1.2 Repetibilidad 54

4.2 Estudio de farmacocinética 54
4.3 Estudio de dosis dependencia 56
4.4 Determinación de arsénico en tejidos 57
4.4.1 Linearidad y exactitud 58
4.4.2 Repetibilidad 59

4.5 Estudio de distribución 59
4.6 Determinación de arsénico en orina 60
4.6.1 Linearidad y exactitud 60
4.6.2 Repetibilidad 61

4.7 Estudio de excreción 62
4.8 Metabolismo de arsénico en ratones 63
4.8.1 Separación de los metabolitos de arsénico en orina 63

4.8.2 Identificación de los metabolitos en arsénico en orina 63

V. TABLAS Y GRAFICAS 66

VI. DISCUSION

5.1 Determinación de arsénico en sangre 109

5.1.1 Linearidad y exactitud 109

5.1.2 Repetibilidad 109

5.2 Farmacocinética de arsénico 110

5.3 Dosis dependencia 111

5.4 Determinación de arsénico en tejidos 114

5.4.1 Linearidad y exactitud 114

5.4.2 Repetibilidad 114

5.5 Distribución de arsénico 114

5.6 Determinación de arsénico en orina 115

5.6.1 Linearidad y exactitud 115

5.6.2 Repetibilidad 116

5.7 Excreción de arsénico 116

5.8 Metabolismo de arsénico 117

5.8.1 Separación de metabolitos 117

5.8.2 Identificación de metabolitos 118

VII. CONCLUSIONES 120

VIII. BIBLIOGRAFIA 122

RESUMEN

El resultado de numerosos estudios epidemiológicas en humanos después de la exposición crónica al arsénico inorgánico, sugieren que el arsénico es un carcinógeno de piel y pulmones. Sin embargo, investigaciones realizados en animales no han reproducido dichas observaciones.

Estudios previos indican la existencia de marcadas diferencias en la absorción, distribución, metabolismo y excreción del arsénico entre algunas especies animales y el humano, lo cual puede explicar en parte la falta de carcinogenicidad del arsénico en esos estudios.

Es necesario identificar un modelo animal apropiado para probar los efectos biológicos del arsénico.

Por lo tanto, el presente estudio fue llevado a cabo en ratón para determinar la farmacocinética, metabolismo y excreción del arsénico y compararlo con los datos reportados en humanos.

El estudio de farmacocinética se llevó a cabo en 5 ratones machos CD_1 que recibieron 0.250 mCi/kg de ^{74}As por vía intravenosa. Se tomaron muestras sanguíneas durante 24 horas, la radioactividad de cada muestra se determinó en un contador de centelleo gama.

Los datos se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimentos con un tiempo de vida media de 2.28 horas.

Se encontró que a dosis mayores de 7 mg/kg de peso, el arsénico presenta una farmacocinética no-lineal, el tiempo de vida media de eliminación para una dosis de -

9 mg/kg de peso es de 15.48 horas.

El estudio de distribución se llevó a cabo usando un ratón para cada tiempo de muestreo, quienes recibieron - 0.250 mCi/kg de ^{74}As, se colectaron muestras de tejido durante 24 horas. Se encontró que la distribución del arsénico es rápida encontrándose la mayor concentración en hígado y riñón.

El metabolismo y excreción del arsénico se determinó después de administrar intravenosamente 0.500 mCi/kg de ^{74}As. Para cada ratón se colectaron muestras de orina en intervalos de 24 horas durante 5 días usando cajas metabólicas. Una alícuota de la muestra de orina se pasó a - través de una columna de intercambio iónico para la separación e identificación de los metabolitos.

La excreción del arsénico después de su administración intravenosa es por vía renal, el porciento de dosis excretada durante 5 días fue de 63-89%. Se encontraron en la orina del ratón ácido monometil arsénico, ácido dimetil arsénico y arsénico inorgánico, siendo el principal - metabolito el derivado dimetilado.

ABSTRACT

The results of numerous epidemiological studies in humans following cronic exposure to inorganic arsenic have suggested that arsenic is a skin and lung carcinogen. However, the investigations in animals, have failed to reproduce these observations. Previous studies indicate that marked differences in the absorption, tissue distribution, metabolism and excretion of arsenic exist between animals and humans, which may explain the lack of carcinogenicity of arsenic in these animals studies.

The need of identity an apropiated animal model to test the biological effects of arsenic as they are observed in humans became apparent.

Therefore the present study were undertaken in the mouse to determinate the pharmacokinetic, metabolism and excretion of arsenic and compare with the available data in humans.

The pharmacokinetic study was carried out with 5 male mice CD_1 who recieved 0.250 mCi/kg of ^{74}As (0.4 ug/kg) by intravenous administration.

Blood samples were collected during 24 hours. The radioactivity of each sample was measured in a Beckman gamma scintillation counter.

Data were fitted to a two compartment open model with a half-period of elimination of 2.28 hours.

It was found out that to higher doses of 7 mg/kg of

weeth the arsenic present a non-linear pharmacokinetic, the half - period of elimination for the doses from 9 mg/kg is 15.48 hours.

The distribution study was carried using one mouse for for each time who recieved 0.250 mCi/kg of ^{74}As, tissues samples were collected during 24 hours. It was found that the distribution of arsenic is fast and the higher concentrations were obtained in liver and kidney.

The metabolism and excretion of arsenic were determinated following intravenous administration of 0.500 mCi of ^{74}As. For each mouse, 24 hours collections of urine during 5 days were obtained using metabolism cages. An aliquot of the urine was then passed through an ion exchange column for the separation and identifications of metabolites.

The excretion of arsenic following intravenous dosing is via the kidney; the percent of excreted doses during 5 days were 63-89% . Monomethylarsenic acid, dimethylarsinic acid and inorganic arsenic were found in the urine of the mouse, but the major metabolite is the dimethylarsinic acid.

I. INTRODUCCION

El arsénico es un elemento que se encuentra ampliamente distribuído en la naturaleza y en la corteza terrestre, su concentración va de menos de 1 ppm, siendo el valor promedio de 2 ppm (1).

En algunas regiones de la tierra en donde existen depósitos de azufre, el arsénico está presente como sulfuro de arsénico y como arseniuro de plomo, plata, cobre, oro, etc., y contamina las aguas subterráneas llegando a alcanzar concentraciones de hasta 1100 ug de arsénico/litro - siendo a concentración máxima permisible de arsénico en el agua potable de 50 ug/litro ó 50 ppb (b).

El arsénico se libera al medio ambiente a través de diversos procesos industriales, durante la fundición de metales básico no ferrosos y durante la combustión de carbón mineral (3).

En la agricultura, un gran número de compuestos de arsénico se usan como plaguicidas, fungicidas y herbicidas contaminando tanto los alimentos como el aire.

El hombre por lo tanto, puede estar expuesto al arsénico a través del aire, el agua y de alimentos contaminados.

Además de lo anteriormente expuesto, el arsénico se ha usado extensamente en el tratamiento de algunas enfermedades como anemia, pelagra, asma, reumatismo, etcétera.

Para la población general, la exposición al arsénico

ocurre principalmente a través de la ingestión de alimentos que contienen arsénico inorgánico y orgánico. El nivel de arsénico en los alimentos generalmente es menor a 1 mg/kg, excepto en el pescado que normalmente contiene entre 1 y 10 mg/kg (4). El promedio de ingestión oral diarios en adultos expuestos no ocupacionalmente varía de 0.5 a 4.2 mg/día, dependiendo de los hábitos dietéticos.

La inhalación de arsénico del medio ambiente generalmente es baja, menos de 1 ug/día (1).

Como se indicó anteriormente en ciertas áreas, la ingestión de agua contaminada con arsénico inorgánico representa la mas importante fuente de exposición. En México, en algunas regiones de la comarca lagunera que comprende los Estados de Durango y Coahuila, la concentración de arsénico en el agua de beber es de 0.5 ppm, 10 veces mayor a la concentración máxima permitida, en esta región el hidroarsenisimo crónico es endémico.

La intoxicación aguda por concentraciones altas de arsénico produce alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares severas que conducen al shock, al estado de coma y en casos extremos a la muerte.

La intoxicación crónica se manifiesta principalmente por hiperqueratosis palmo-plantar, dermatitis, alteraciones cardiovasculares, hepáticas y hemáticas que en muchas ocasiones son irreversibles. Este tipo de intoxicación se presenta en zonas donde el grado de contaminación de arsénico en el agua es elevada y en menor grado en trabajadores que han estado expuestos a él.

El arsénico además de ser un tóxico general, es un

agente genotóxico es decir, capaz de producir daños mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (5). Estudios epidemiológicos en humanos muestran que la exposición crónica al arsénico provoca cáncer de piel y cáncer broncogénico. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar experimentalmente en animales el efecto carcinogénico del arsénico.

Existen diversos informes sobre las marcadas diferencias observadas en el comportamiento del arsénico en el humano y en algunas especies animales; se han encontrado diferencias en la absorción, distribución, metabolismo y excreción del arsénico, lo cual puede explicar en parte, las diferencias en la toxicidad según la especie estudiada.

Para valorar el riesgo que representa para el hombre la exposición crónica a concentraciones bajas de diversos contaminantes se utilizan modelos animales. En la extrapolación a partir de estos modelos, es esencial conocer la relación entre la dosis administrada y la dosis efectiva en el órgano blanco, lo cual implica conocer la absorción, distribución y eliminación de la substancia en el organismo, es decir, la farmacocinética del agente en el organismo.

En general, con respecto al arsénico no existen datos suficientes para diferenciar su comportamiento farmacocinético. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la farmacocinética y metabolismo del arsénico en ratones y compararlo con el reportado en otras especies animales incluyendo el hombre.

Posteriormente, determinar la distribución tisular del arsénico exógeno y determinar la cantidad de dicho arsénico que llega a testículo.

II. GENERALIDADES

2.1 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

El arsénico (As) es un metaloide con un peso atómico de 74.9 y número atómico de 33, los estados de valencia que presenta son -3, 0, +3 y +5. Su calentamiento en presencia de aire dá un humo blanco de trióxido de arsénico.

Desde el punto de vista tanto biológico como toxicológico, los compuestos de arsénico pueden clasificarse en tres grupos principales:

1) Compuestos de arsénico inorgánico
2) Compuestos de arsénico orgánico
3) Gas arsina

Los compuestos de arsénico inorgánico trivalente más comunes son trióxido de arsénico, arsenato de sodio y tricloruro de arsénico. Compuestos de arsénico pentavalentes son pentóxido de arsénico, ácido arsénico y arsenatos tales como arsenato de plomo y arsenato de calcio. Los compuestos orgánicos también existen en el estado trivalente y pentavalente.

Los compuestos orgánicos pentavalentes más comunes son ácido arsanílico, ácido metilarsónico y ácido dimetil arsónico (ácido cacodílico).

En el medio ambiente natural, el arsénico raramente se encuentra como el elemento libre, frecuentemente se encuentra como sulfuro con otros metales como níquel, cobalto, hierro, etecétera.

2.2 Métodos de análisis

Existe una gran variedad de métodos para determinar en forma cualitativa o cuantitativamente la cantidad de arsénico presente en una muestra.

Entre estos se encuentran métodos espectrofotométricos como el de dietil-ditiocarbamato de plata y el método de azul de molibdeno con un límite de detección de 1-50 ug/litro (Vasak y Sedivec, 1952; Sandell, 1959) (7); el método de absorción atómica que tiene un límite de detección de 0.04 ug (Holak, 1969) (8); el método de activación de neutrones que detecta cantidades de 0.1 ng de arsénico (Smith, 1959, 1964; Liebseher y Smith, 1968) (9); el método de emisión de Rayos-X, con un límite de detección de 0.1 mg/kg y que puede utilizarse para la determinación simultánea de diversos elementos en muestras biológicas (Walter, et al., 1974; Fowler, et al., 1975) (9, 10). En estos métodos se determina la cantidad de arsénico total en la muestra y en todos ellos excepto para el método de análisis por activación de neutrones, se requiere un tratamiento previo de la muestra para generar la arsina.

Para determinar los diferentes compuestos y estados de valencia del arsénico existen también métodos cuantitativos, uno de ellos es el método polarográfico, con un límite de detección de 0.3 ug As/litro de agua y que detecta tanto el As III como el As V (Myers y Osteryoung, 1973) (11). Otro método que permite determinar As III, As V, ácido metil arsénico y el ácido dimetil arsénico es el método descrito por(Braman y Foreback, 1973) (12); en el cual se combina la reducción pH selectiva de las diferentes formas del arsénico y absorción atómica para determi-

nar el arsénico con un límite de detección de 1 ng.

Existen métodos para separar los diferentes compuestos de arsénico como el método de intercambio iónico Lunde, 1975 (13); Tam, et al., 1978 (14), electroforesis de papel (Reay y Asher, 1977) (15); cromatografía en papel (Miketukova, 1968) (17). Estos procedimientos permiten separar los compuestos de arsenico rápida y selectivamente, para posteriormente cuantificarlos por cualquiera de los métodos antes mencionados.

Uno de los métodos más utilizados en los últimos años para determinar arsénico, tanto en fluídos biológicos y tejidos como en organismos completos, es el método radioactivo utilizando ^{74}As. Este método determina la cantidad total de arsénico en la muestra. Es un método rápido en el que la muestra no requiere un pretratamiento la determinación es directa. El límite de detección de este método es de 1 ng.

2.3 Usos

Desde el siglo XIX la solución de Fowler que contiene arsénico inorgánico, se ha utilizado para el tratamiento de leucemia, asma bronquial crónica y como tónico (Martindale, 1977) (18). Existen también compuestos de arsénico orgánico que fueron usados para el tratamiento de la sífilis y trepanematosis antes de la introducción de los antibióticos.

En la actualidad existen algunos compuestos arsenicales que se emplean principalmente como fármacos antiparasitarios en humanos. Sin embargo, el principal uso del ar

sénico es en la agricultura donde se emplean diversos compuestos de este metal como pesticidas y herbicidas. Dentro de los pesticidas más utilizados se encuentran el arsenato de plomo, arsenato de calcio y arsenito de sodio; el ácido dimetil arsénico que se usa como desfoliante del algodón.

Finalmente existen compuestos como el arsenato de cromo y zinc que se utilizan como conservadores de madera. El arsénico también se utiliza como bronceador o agente decolorante en la fabricación de vidrio.

2.4 NIVELES AMBIENTALES Y EXPOSICION

2.4.1 NIVELES DE ARSENICO EN LOS ALIMENTOS

Con la excepción de algunos tipos de peces y crustáceos, la mayoría de los alimentos contienen bajos niveles de arsénico, normalmente menores a 0.25 mg/kg (19). En la tabla 1 se muestran los niveles de arsénico expresados como trióxido de arsénico en diferentes clases de alimentos.

TABLA 1

NIVELES DE ARSENICO (As_2O_3) EN ALIMENTOS

CLASE DE ALIMENTO	ppm As promedio (rango)
Productos lácteos	0.004 (0.08)
Carne, pescados y aves	0.19 (0.03 - 0.046)
Granos y cereales	0.02 (0.03 -0.10)
Legumbres	0.004 (0.07)
Frutas	0.005 (0.10)
Aceites y grasas	0.002 (0.04)
Bebidas (incluyendo agua potable)	0.008 (0.15)

Por lo tanto, la cantidad de arsénico ingerido diariamente por el hombre a través de los alimentos se verá afectada grandemente por sus hábitos alimentarios. Pero se estima que la ingestión diaria promedio de arsénico a través de los alimentos varía de 0.01-0.02 mg/día (Johnson, et al; 1981 a) (20).

Hasta el momento no se ha podido determinar la forma química en la que se encuentra el arsénico presente en los alimentos.

2.4.2 NIVELES DE ARSENICO EN AGUA

La concentración máxima permisible de arsénico en el agua potable es de 0.05 mg/litro ó 50 ppb (U.S. Public Health Service, 1962) (21) generalmente como arsénico pentavalente debido al proceso de clorinación y aereación.

El agua de mar generalmente contiene de 0.001 a 0.005 mg/litro (Kappana, et al., 1976) (22) principalmente como arsénico pentavalente.

En lagunas y ríos el nivel de arsénico varía considerablemente, en muchos la concentración es menor a 0.01 mg/litro, pero existen regiones donde los niveles de arsénico llegan a 1 mg/litro (Durum, et al., 1971) (23).

El contenido de arsenico en el agua depende del contenido de éste en el suelo y su naturaleza química es tanto orgánica como ácido metil arsénico y dimetil arsénico, como inorgánica presente como arsenito o arsenato, encontrándose en menor proporción las formas metiladas que las inorgánicas (Braman y Foreback, 1973) (12).

El promedio de ingestión diaria de arsénico a través del agua de beber varía dependiendo de la fuente de agua así, en regiones donde la concentración es de 0.01 mg/litro (nivel inferior al máximo permisible) y asumiendo que se ingiere 1.5 litros de agua al día, la ingestión será de 0.015 mg de arsénico/día.

2.4.3 NIVELES DE ARSENICO EN EL SUELO

El contenido de arsénico en la corteza terrestre es menor a 2 mg/kg (N.A.S., 1977: Woolson, 1977; Walsh, et al., 1977) (1, 24, 25). El suelo no contaminado contiene menos de 40 mg/kg, mientras que el contaminado puede contener cientos de mg por kilogramo (Walsh, 1977) (24) y la importancia radica en el grado de movilidad y transformación del arsénico en este medio para pasar al agua, aire y alimentos (a través de los vegetales).

En el suelo, el arsénico se une a superficies que contienen óxidos de hierro o aluminio amorfo. El grado de adsorción de este metal está en función del tipo de suelo, pH, niveles de fosfato, etcétera.

2.4.4 NIVELES DE ARSENICO EN EL MEDIO AMBIENTE

El arsénico se libera al medio ambiente a través de diversos procesos industriales, entre los cuales se encuentra; la fundición de metales, la combustión del carbón y el uso de compuestos arsenicales como pesticidas.

Durante la manufactura de insecticidas se han encontrado concentraciones de 0.5 a 45 mg/m^3 de arsénico en el aire (Patty; 1962) (26) y de 0.06 a 2 mg/m^3 en industrias

fundidoras de metales (Kodame et al.) (27).

La naturaleza química del arsénico en el medio ambiente es poco clara, en muchas áreas urbanas y suburbanas el arsénico se encuentra como una mezcla de arsénico inorgánico tri y pentavalente, predominando principalmente el trióxido de arsénico (As_2O_3).

2.5 FARMACOCINETICA

2.5.1 ABSORCION

Como se mencionó en la sección anterior, existen diversas vías a través de las cuales el humano puede estar expuesto al arsénico, la importancia de éstas depende de factores tales como: las propiedades físicas y químicas del compuesto arsenical, su modo de exposición y del sujeto mismo.

Las dos vías de exposición de mayor interés para la Salud Pública son: la inhalación y la ingestión.

La ingestión es una vía directa y es la principal fuente de exposición para la población al consumir alimentos o agua contaminada. La inhalación es una vía indirecta pero constituye la más importante en el campo laboral.

ABSORCION RESPIRATORIA

Existe poca información acerca de la acumulación y absorción respiratoria del arsénico en humanos y en otras especies animales.

Holland y col. (28), en un estudio realizado en pacientes con cáncer pulmonar terminal demostraron que de una dosis total de arsénico adicionado en forma radioactiva a cigarrillos un 5.8% se deposita en los pulmones y de esta dosis hasta un 75-85% alcanza rápidamente el torrente circulatorio.

Pinto y col. (29), encontraron una correlación altamente significativa ($p < 0.01$) entre los valores de excreción urinaria de arsénico y los niveles de éste en el -- aire.

Existen algunos datos acerca de la absorción del arsénico a través del tracto respiratorio en animales.

Bencko y Syman (30), observaron un incremento de arsénico en los tejidos de ratones después su exposición a un aerosol sólido que contenía 180 ug/m^3 de arsénico.

De la misma manera, Dutkiewcz (31), encontró una rápida absorción y distribución del arsénico en los tejidos, cuando éste administró intratraquealmente como arsénico - pentavalente (arsenato de sodio Na_2HAsO_3-$7H_2O$) a ratas en unas dosis de 0.1-4.0 mg/kg.

ABSORCION GASTROINTESTINAL

Se ha demostrado que tanto en el hombre como en animales experimentales, existen diversos factores que determinan la absorción del arsénico del tracto gastrointestinal como lo son: la forma química del metal, sus propiedades físicas y su dosis.

Existen estudios en humanos y algunas especies anima

les que demuestran que el arsénico se absorbe bien del - tracto gastrointestinal.

Pomroy y col. (32), encontraron que el porcentaje de arsénico excretado en orina después de una administración oral simple a humanos en 7 días fue de 62% solamente un - 6% de arsénico se recuperó en heces.

Bettley y O'Shea (33), reportaron que un 25-56% de arsénico se elimina en orina en un período de 10 días, en pacientes con carcinomas, mientras que Coulson y col. (34), reportan un 75-100% en un período de tiempo similar. Estos valores son similares al valor reportado por Mealey y col. (35), Mealey reporta un valor de 57-99% de la dosis recuperada en orina en 10 días después de una administración intravenosa de arsénico inorgánico a humanos.

Existen también estudios de absorción oral del arsénico en algunas especies animales, las cuales generalmente concuerdan con lo reportado en el humano.

Charbonneau y col. (36), encontraron que en monos se recupera en orina el 75% de la dosis de arsénico inorgánico en 10 días, y únicamente un 2% en heces.

Hollins y col. (37), reportaron una recuperación en orina del 90% en 4 días y del 99% en 10 días después de la administración oral de 0.3 ug de arsénico a perros beagle. Después de una administración oral de 0.01 y 0.1 mg de ^{74}As como As (V) ó As (III) a ratones de la cepa CBA, más de un 60% de la dosis se recuperó en orina y menos del 6% se recuperó en heces, indicando que la absorción del arsénico del tracto gastrointestinal es muy alta tanto pa

ra As (V) como para As (III) (38).

Otros estudios demuestran que existen marcadas diferencias en la absorción, distribución y excreción del arsénico entre el humano y algunas especies animales.

Dutkiewicks (39),encontró que después de la administración oral de arsenato de sodio a ratas, el 30% de la dosis se recupera en heces indicando una mala absorción del arsénico en esta especie.

Existen diferencias también en la distribución de arsénico en ratas. Lanz y col. (40), demostraron una marcada unión del arsénico a los eritrocitos de rata, fenómeno no observado en el humano.

Charbonneau y col. (41), reportan un 70% de arsénico excretado en heces después de la administración oral de 0.01 ug de ^{74}As a hamsteres y un 6% después de la administración intravenosa.

Estos datos sugieren que después de la administración oral del arsénico en dichas especies, la mayoría no se absorbe, lo cual puede explicar en parte la falta de toxicidad observada en estas especies.

2.5.2 DISTRIBUCION

El arsénico administrado intravenosamente se distribuye rápidamente a diversos tejidos (42).

Mealey y col. (35), encontraron que después de la administración intravenosa de arsénico trivalente, éste desa

parece rápidamente del torrente circulatorio y se distribuye en diversos tejidos encontrándose en mayor concentración en hígado y riñón durante las primeras horas después de su administración.

La tabla 2 muestra el porciento de arsénico por kilogramo de tejido en muestras de autopsia de 11 pacientes tratados.

El volumen de distribución del arsénico en humanos es de 14.2 litros (35) indicando la reclusión de éste en algún tejido. No existen datos que indiquen la distribución de arsénico pentavalente en humanos.

En ratas, el arsénico se distribuye rápidamente a diversos tejidos encontrándose en mayor concentración en hígado, riñón, pulmón, bazo y sangre.A pesar de que la eliminación del arsénico de la mayoría de los tejidos es muy rápida, tarda en eliminarse de 60-90 días debido a que cerca del 80% del arsénico total se une a eritrocitos (39).

Existen diferencias en la distribución del arsénico inorgánico según el estado de valencia. Vahter y col. (38), encontraron que después de la administración oral de 0.1 mg de arsénico y arsenato de sodio en ratones, la retención del arsénico trivalente (As III), en diversos tejidos es mayor que la del arsénico pentavalente.

La tabla 3 muestra la concentración de arsénico en ug por gramo de tejido en diferentes órganos después de la administración oral del arsénico en ratones.

En hamster el arsénico atraviesa la placenta cuando

TABLA 2
CONCENTRACION DE ARSENICO RADIOACTIVO EN MUESTRAS DE AUTOPSIA DE PACIENTES TRATADOS

C A S O No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO	1 hr.	17 hrs.	33 hrs.	43 hrs.	4 días	7 días	9 días	9.5 días	18 días
CORAZON	4.92	- -	1.37	0.62	0.32	0.31	0.25	0.05	0.18
A O R T A	- -	- -	0.50	- -	- -	- -	0.18	0.03	- -
B A Z O	8.35	2.67	5.14	0.76	0.58	0.34	0.35	0.09	- -
HIGADO	12.10	6.18	7.35	2.96	1.39	1.13	0.75	0.30	0.83
R I Ñ O N	38.88	16.71	5.60	2.81	2.10	1.15	1.19	0.23	0.27
PANCREAS	3.76	2.23	1.75	0.61	- -	0.36	0.22	0.082	0.13
MUSCULO	0.68	0.79	0.90	0.59	- -	- -	0.48	0.16	- -
H U E S O	- -	1.05	0.77	- -	- - -	- -	0.24	0.02	0.14
PULMON	- -	- -	2.12	0.70	0.31	0.21	0.21	0.10	- -
CEREBRO	0.16	0.77	0.28	0.195	0.13	0.15	0.15	0.05	0.06
C U E R O CABELLUDO	0.32	0.56	0.71	- -	- -	1.77	0.03	0.33	0.34
TESTICULO	- -	- -	1.19	1.14	- -	- -	0.23	0.094	- -
INTESTINO	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0.42	0.104	- -
TIROIDES	- -	- -	2.31	0.42	0.64	1.01	0.87	- -	- -

TABLA 3

ARSENICO EN ORGANOS (ug As/g) DE RATONES DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE 0.1 mg As/RATON (4 mg/kg) DE ^{74}As

TIEMPO (hr)	0.5 hr		2 hr		6 hr		24 hr	
T E J I D O	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)
R I Ñ O N	7.24	7.41	8.73	7.44	4.33	4.37	0.06	0.78
H I G A D O	2.71	6.43	3.52	6.72	0.92	3.19	0.04	0.39
VESICULA BILIAR	4.01	12.3	7.18	23.8	2.16	15.19	0.1	0.1
C E R E B R O	0.09	0.06	0.54	0.17	0.39	0.28	0.01	0.05
H U E S O	0.62	0.72	1.00	0.97	0.58	0.87	0.01	0.03
P I E L	0.44	0.64	0.94	1.10	0.37	1.10	0.04	0.76

éste se administra a dosis altas (43).

Kadowaki (44), reporta un incremento en los niveles de arsénico en el feto humano conforme avanza el embarazo.

2.5.3 METABOLISMO

Los principales metabolitos del arsénico inorgánico en el humano son el ácido dimetil arsénico y el ácido monometil arsénico, siendo el principal metabolito el derivado dimetilado.

Después de la administración oral del arsénico, se recupera en orina de un 60-80% del derivado dimetilado seguido de ácido monometil arsénico que se elimina de un 8-25% y un 9-22% como arsénico inorgánico inalterado, (45, 46, 47). Este proceso de metilación es una vía de metabolismo del arsénico inorgánico más tóxico (45,51).

El ácido dimetil arsénico es un metabolito terminal, el cual se forma y elimina rápidamente. Después de la administración oral del ácido dimetil arsénico en humanos, el 75% de la dosis se recupera en orina después de 96 hrs. en forma inalterada. Asimismo, cuando se administra el derivado monometilado, el 80% se elimina en forma inalterada en orina y un 13% de la dosis se elimina como ácido dimetil arsénico (48).

La metilación del arsénico inorgánico es independiente tanto de la vía de exposición como de la dosis administrada. En un estudio realizado en trabajadores expuestos a trióxido de arsénico en el medio ambiente, Smith y col. (49), reportan que la especie dominante en la orina es el

ácido dimetil arsénico seguida por el metil arsénico, arsénico trivalente y arsénico pentavalente.

Buchet y col. (50), después de vigilar la excreción urinaria al administrar repetidamente meta arsenito de sodio a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 g en humanos, reportan para todas las dosis un 74-93% de derivados metilados (mono y dimetil arsénico).

La metilación es un proceso de biotransformación que también se ha demostrado en algunas especies animales. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha podido demostrar la presencia del ácido mono metil arsénico.

Lakso y Peoples (52), detectaron formas metiladas de arsénico en la orina de perros y vacas alimentadas con arsenito de potasio y arsenato de sodio, sin embargo, no indican si se trata de ácido dimetil o monometil arsénico.

En perros después de la administración oral o intravenosa de arsénico inorgánico (^{74}As) el único metabolito que se recupera en plasma, eritrocitos y orina es el ácido dimetil arsénico (51, 53). Resultados similares los reporta Charbonneau y col. en un estudio realizado en hámsteres (41).

En ratones, este proceso de biotransformación depende de la dosis administrada. Vahter (54), encontró que después de la administración oral de arsénico trivalente o pentavalente a ratones a las dosis de 0.04, 0.4, 2 y 4 mg/kg de peso, el principal metabolito de ambos estados de valencia es el derivado dimetilado. Sin embargo, este porcentaje es menor al aumentar la dosis.

2.5.4 ELIMINACION

La principal vía de eliminación del arsénico en humanos es la vía renal y en menor grado la vía fecal. Existen otras rutas de eliminación del arsénico que son de menor importancia, éstas incluyen: piel, pelo, uñas y tracto respiratorio.

En humanos, después de la administración intravenosa de arsénico, del 57-97% se recupera en orina y menos de un 2% se recupera en heces (35). Similarmente, después de la administración oral del arsénico, se elimina a través del riñón de un 25-100% de la dosis y menos del 6% se elimina en heces (32, 33, 34, 35).

La depuración renal del arsénico en humanos es de 3.54 litros/hora (35).

Hasta el momento existen pocos estudios que indican el comportamiento farmacocinético del arsénico en el humano. De acuerdo a la literatura, después de una administración oral, el arsénico presenta una farmacocinética que se explica mejor mediante un modelo abierto de tres compartimientos con tiempos de vida media de 2.1, 9.5 y 38.4 días (32) para cada una de las fases respectivamente.

Estudios en monos (36), perros (37), ratones (38) y hamster (41), muestran que la principal vía de eliminación del arsenico en estas especies es la vía renal recuperándose del 60-90% de la dosis en orina y menos del 5% en heces.

En el perro y hámsteres, la eliminación del arsénico

sigue una cinética biexponencial con tiempo de vida media de 5.9 ± 0.9 hrs. para el primer componente y de 2.4 ± 0.6 días para el segundo componente en el perro, y de 9.6 ± 0.96 hrs. y 4.5 ± 0.3 días para el hamster respectivamente (37, 41).

En ratas el porcentaje de arsénico eliminado en orina y heces depende de la vía de administración. Después de la administración intravenosa, el porcentaje recuperado en orina y heces es de 39 y 5% respectivamente, cuando se administra por vía oral el porciento eliminado en orina es del 20%, y un 30% se elimina en heces (39). La cinética de eliminación que sigue el arsénico es triexponencial con tiempos de vida media de 2.5, 10 y 690 hrs. (39).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 ESTUDIO DE LA FARMACOCINETICA DE ARSENICO EN RATONES

Este estudio se llevó a cabo con el objeto de caracterizar el comportamiento farmacocinético del arsénico en ratones. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron a partir de los datos obtenidos de muestras sanguíneas después de la administración intravenosa de 0.250 mCi/kg de peso de arsénico marcado radioactivamente (0.4 ug/kg de peso) y se compararon con los datos obtenidos en otras especies animales incluyendo al humano.

3.1.1 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN SANGRE

Existen diversos métodos para la determinación de arsénico a concentraciones bajas. Sin embargo, muchos depen

den de la reducción del arsénico inorgánico a la arsina y posteriormente su determinación por colorimetría (6, 7), absorción atómica (8), cromatografía de gases (12), etc. Estos procedimientos son largos y requieren de gran cuidado para eliminar interferencias y especialmente para evitar la pérdida de compuestos volátiles de arsénico durante la generación, destilación y retención.

La metodología radioisotópica ha tenido gran impacto en la solución de numerosos problemas relacionados al análisis de compuestos y sus metabolitos en fluídos biológicos, ya que permite hacer determinaciones directamente en las muestras evitándose así manipulaciones y pérdidas del compuesto por analizar.

En base a lo anteriormente mencionado, el método utilizado para la determinación de arsénico en sangre fue un método radioquímico, el cual se seleccionó en base a la sensibilidad para detectar este compuesto en fluídos biológicos.

3.1.1.1. INSTRUMENTOS

- Contador de centelleo gamma. Beckman.
- Potenciómetro Beckmann Zeromatic II.
- Autoclave CASA M.A.C. Muebles y equipos para hospitales y laboratorios de 120 volts, 20 amperes, 50-60 ciclos SERIE P420180.
- Balanza analítica METTLER H35 AR.

3.1.1.2 REACTIVOS

^{74}As Libre de acarreador (Radiochemical Centre Ltd.

Amershan/Searle, Arlington Heights, IL), en forma de ácido arsénico en HCl 0.04M . Actividad específica:

1.0 mCi ^{74}As	2.6 MBq ^{73}As	0.43 ug As/ml (solución 1)
0.07 mCi ^{73}As	1.0 mCi As/ml al 6 de mayo de 1982	
37 MBq ^{74}As	1.0 ml	

2.- Solución salina isotónica estéril. Se pesaron 0.900 g de cloruro de sodio (J.T. Beaker), se aforaron a 100 ml con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

3.- Solución buffer TRIS pH 7.35 . Se pesaron 0.625 g de TRIS MERCK, se aforaron a 100 con solución salina - isotónica estéril; se ajustó el pH de esta solución a pH 7.35

4.- Sangre libre de fármacos.

3.1.1.3 METODO

Curva patrón de arsénico en sangre.

Se tomó 1 ml de la solución de ^{74}As conteniendo 1.0 mCi ^{74}As/ml y 0.43 ug As/ml (solución 1) y se aforó a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35 para obtener una concentración de 0.1 mCi/ml equivalentes a 0.043 ug/ml (solución 2).

De esta solución se tomaron 100 ul y se llevaron a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35, para obtener una concentración de 0.43 ng/ml (solución 3).

Se transfirieron alícuotas de 2, 10, 20, 40, 60, 80

y 100 ul a tubos de ensayo y se aforaron a 100 ul con sangre, para obtener concentraciones de: 0,086, 0.43, 0.86, 1.72, 2.58, 3.44 y 4.30 pcg/ml de arsénico equivalentes a 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mCi/ml de (^{74}As), este intervalo de concentraciones es el mismo que se espera obtener en sangre después de una administración de 0.250 mCi ^{74}As/kg de peso.

En la tabla 4 se resumen las diluciones efectuadas para obtener la curva patrón de arsénico en sangre.

La radioactividad de las muestras se determinó en el contador de centelleo gamma midiendo los fotopicos de ^{74}As de 0.0450 a 0.550 MeV durante 100 segundos. Los valores obtenidos de radioactividad en cuentas por minuto (cpm) se corrigen por decaimiento radioactivo según la ecuación (1) y eficiencia, usando como estándar de ^{74}As 100 ul de la solución 2 descrita anteriormente.

$$A = A_o e^{-\lambda t} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

donde: A= Actividad

A_o= Actividad inicial

$\lambda = 0.693/t_{\frac{1}{2}}$

$t_{\frac{1}{2}}$ = tiempo de vida media del ^{74}As = 17 días

3.1.1.4 LINEALIDAD Y EXACTITUD

Con el fin de observar si la relación entre las concentraciones de arsénico y las lecturas obtenidas en cuentas por minuto (cpm) era lineal, se determinó la radioactividad de las muestras sanguíneas conteniendo arsénico en el intervalo de concentración de 0.086 a 4.30 pcg/ml.

TABLA 4
DILUCIONES DE LA CURVA PATRON DE ARSENICO EN SANGRE A PARTIR DE LA SOLUCION DE 0.43 ng/ml DE ARSENICO (SOLUCION 3)

DILUCION	ul ^{74}As (SOLUCION 3)	ul SANGRE	CONCENTRACION nCi ^{74}As	CONCENTRACION As pcg/ml
1	2	98	1	0.086
2	10	90	5	0.43
3	20	80	10	0.86
4	40	60	20	1.72
5	60	40	30	2.58
6	80	20	40	3.44
7	100	0	50	4.30

1.0 mCi ^{74}As 37 MBq ^{74}As

0.07 mCi ^{73}As 2.6 MBq ^{73}As

1.0 mCi As/ml al 6 de mayo de 1982

1.0 ml

0.43 ug As/ml (solución 1)

Se obtuvo el promedio de 5 curvas de referencia analizadas sucesivamente en el mismo día..

Con el objeto de determinar la exactitud del método analítico para la cuantificación de arsénico en sangre, - se prepararon 5 curvas patrón el mismo día bajo las mismas condiciones de aparatos, reactivos, laboratorio, etc, se determinó el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones utilizadas.

3.1.1.5 PRECISION DEL METODO ANALITICO: REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del método analítico, tanto el mismo día, como en diferentes días, bajo las mismas condiciones de operador, instrumentos, laboratorio, etc, se efectuaron determinaciones de arsénico en sangre a concentraciones de 0.086 a 4.3 pcg/ml en 9 ocasiones diferentes como se describe en la sección 3.1.1.3 determinándose el coeficiente de variación para cada una de las curvas patrón.

3.1.2 ESTUDIO DE FARMACOCINETICA: ADMINISTRACION INTRAVENOSA

3.1.2.1 INSTRUMENTOS

Los mencionados en 3.1.1.1 y balanza granataria.

3.1.2.2 REACTIVOS

Los mencionados en 3.1.1.2

3.1.2.3 METODO

El estudio de farmacocinética se llevó a cabo en 5 ratones machos de la cepa CD_1 de 10-14 semanas de edad y de 25-30 gramos de peso, los animales se mantuvieron bajo supervisión 4 semanas antes de iniciar el estudio durante las cuales la ingestión de agua y alimento fue ad libitum.

A cada ratón se le administró intravenosamente, una dosis de 0.250 mCi ^{74}As/kg de peso de una solución conteniendo ^{74}As (solución 2, sección 3.1.1.3).

Las dosis administradas intravenosamente fueron equivalentes a 8-9 uCi ^{74}As/ratón y a 12.0-13.0 ng As/ratón con un volumen de dosificación de 0.1 a 0.3 ml. La administración se realizó a través de la vena caudal.

Después de la administración, se tomaron 150 ul de sangre por la misma vena a los siguientes tiempos: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 24 horas. Las muestras se colocaron en tubos previamente heparinizados y se mantuvieron en congelación a -10°C hasta el momento de su análisis (no más de 48 horas).

El análisis cuantitativo de cada muestra se realizó por duplicado utilizando el método radioactivo descrito en la sección 3.1.1.3, efectuando al mismo tiempo una curva patrón de arsénico en sangre y tomando como estándar de referencia la solución de ^{74}As de concentración 0.1 mCi/ml equivalentes a 0.043 ug As/ml (solución 2).

3.2. DOSIS DEPENDENCIA

El estudio de Dosis Dependencia se realizó con el objeto de determinar si la farmacocinética del arsénico en

ratones se ve modificada cuando se aumenta la dosis.

Este estudio se realizó a partir de muestras sanguíneas después de la administración intravenosa de una solución que contenía arsénico marcado (^{74}As) y arsénico no - marcado (arsenato de sodio). Las dosis estudiadas fueron: 0.5, 1.0, 5.0, 7.0 y 9.0 mg/kg de peso.

A partir de los datos obtenidos se determinaron los parámetros farmacocinéticos para cada una de las dosis estudiadas y se compararon con los datos obtenidos en el estudio de Farmacocinética mencionados en la sección 3.1.2 .

3.2.1 INSTRUMENTOS

Los mencionados en 3.1.1.1 y 3.1.2.1

3.2.2 REACTIVOS

1.- Arsenato de sodio (sal disódica): $Na_2HAs_5O_4 \cdot 7H_2O$ grado reactivo analítico. (Sigma Chemical Company).

2.- Se pesaron 0.625 g de TRIS MERCK, se aforaron a 100 ml con solución salina isotónica estéril, se ajustó el pH a 7.35 .

3.- Se pesaron 0.900 g de cloruro de sodio (J.T. Beaker), se aforaron a 100 ml con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

4.- ^{74}As libre de acarreador (Radiochemical Centre Ltd, Amersham/Searle, Arlington Heights, II) en la forma de ácido arsénico en HCl 0.04M con actividades específicas:

1.0 mCi ^{74}As
0.20 mCi ^{73}As
37 MBq ^{74}As
7.4 MBq ^{73}As
1.22 mCi ^{74}As/ml al 13 de enero de 1983
2.21 ug As/ml

(solución 1a.)

5.- De esta solución se tomó 1 ml y se aforó a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35 para obtener una solución con concentración de 0.1 mCi ^{74}As/ml equivalente a 0.221 ug As/ml (solución 2a.). Esta solución se empleó para la administración intravenosa de las dosis: 1, 2 y 3 (0.5, 1 y 5 mg/kg de peso).

6.- ^{74}As libre de acarreador con actividad específica:

1.03 mCi ^{74}As
0.10 mCi ^{73}As
38.1 MBq ^{74}As
3.7 MBq ^{73}As
1.03 mCi ^{74}As/ml al 10 de marzo de 1983
0.77 ug de As/ml

(solución 1b)

7.- Se tomó 1 ml de la solución 1b y se aforó a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35 obteniéndose una solución de concentración 0.077 ug/ml equivalentes a 0.103 mCi ^{74}As/ml (solución 2b). Esta solución se utilizó para la administración intravenosa de arsénico. Dosis: 4 y 5 (7 y 9 mg/kg de peso).

8.- Solución de ácido arsénico: Se pesaron 10 mg de arsenato de sodio (As^{5+}) grado radioactivo y se aforaron a 100 ml con buffer TRIS pH 7.35, obteniéndose una solución de ácido arsénico con una concentración de 0.1 mg/ml (solución 3). Esta solución se utilizó para la administración de la dosis 1 (0.5 mg/kg de peso).

9.- Solución de ácido arsénico. Pesar 10 mg de arsenato de sodio (As^{5+}) y aforar a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35 para dar una concentración de 1 mg/ml (solución 4). Tomar 1 ml de esta solución y aforar a 5 ml, para obtener una concentración de 200 ug/ml (solución 5). La solución 5 se utilizó para la administración de la dosis 2 (1 mg/kg de peso).

10.- Solución de ácido arsénico. Se pesaron 20 mg de arsenato de sodio (As^{5+}), y se disolvieron en 10 ml de buffer TRIS pH 7.35, para obtener una solución de ácido arsénico con una concentración de 2 mg/ml de arsenico (solución 6). Esta solución se empleó para la dosis 5 de 9 mg/kg de peso.

3.2.3 METODO

El arsénico preparado comercialmente en HCl 0.04M se diluyó en buffer TRIS pH 7.35 como se describe en la sección 3.2.2 .

El estudio de dosis dependencia se realizó empleando un grupo de ratones para cada dosis, cada grupo formado por 5 ratones machos de la cepa CD_1 de 10-14 semanas de edad y de 25-30 g de peso, mantenidos bajo control 4 semanas antes de iniciar el estudio y con libre acceso al -

agua y alimento.

A los 5 grupos de ratones se les administró intravenosamente la mezcla de arsénico marcado (^{74}As), 0.250 mCi/kg de peso (soluciones 2a ó 2b) y arsénico no marcado (soluciones 3, 4, 5 y 6) para obtener las dosis de 0.5, 1, 5, 7 y 9 mg/kg de peso de arsénico total, el volumen total inyectado fue de 0.2 a 0.3 ml a través de la vena caudal.

En la tabla 5 se muestran las dosis y soluciones empleadas en el estudio.

Se tomaron muestras de 150 ul de sangre de la vena caudal a los siguientes tiempos: 0.25, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 24 horas. Las muestras fueron colocadas en tubos previamente heparinizados y se mantuvieron en congelación hasta el momento de su análisis.

El análisis cuantitativo de cada muestra se realizó por duplicado utilizando el método descrito en la sección 3.1.1.3 . Se realizó al mismo tiempo la curva patrón de arsénico en sangre, tomando como estándares de referencia las soluciones conteniendo 0.221 ug As/ml (solución 2a) y 0.077 ug As/ml (solución 2b) según el caso.

3.3 ESTUDIO DE DISTRIBUCION DE ARSENICO EN RATONES

El objetivo de este estudio fue determinar la distribución del arsénico en los tejidos y en especial su acceso a gónadas.

Para realizar este estudio se tomaron muestras de diferentes tejidos después de la administración intravenosa de arsénico marcado radioactivamente (^{74}As) a una dosis de

TABLA 5
DOSIS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE DOSIS DEPENDENCIA

D O S I S	mg/kg DE PESO	SOLUCION EMPLEADA*	CONCENTRACION DE LA SOLUCION	SOLUCION DE REFERENCIA EMPLEADA
1	0.5 mg/kg	3	0.1 mg/ml	2a
2	1.0 mg/kg	5	200 ug/ml	2a
3	5.0 mg/kg	4	1 mg/ml	2a
4	7.0 mg/kg	4	1 mg/ml	2b
5	9.0 mg/kg	6	2 mg/ml	2b

* Solución de Arsenato de sodio empleada para la administración intravenosa en ratones.

0.250 mCi/kg de peso.

3.3.1 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN TEJIDOS

El método utilizado para la determinación de arsénico en tejidos fue el método radioquímico descrito en la sección 3.1.1.3 .

3.3.1.1 INSTRUMENTOS

Los mencionados en 3.1.1.1

3.3.1.2 REACTIVOS

Los mencionados en la sección 3.1.1.2 y ^{74}As libre de acarreador (Radiochemical Centre Ltd, Amershan/Searle, Arlington Heights, IL) en forma de ácido arsénico en HCl 0.04M.

Actividad específica:

1.0 mCi ^{74}As	1.1 mCi ^{74}As
0.00 mCi ^{73}As	0.3 mCi ^{73}As
37 MBq ^{74}As	40.7 MBq ^{74}As
2.6 MBq ^{73}As	11.0 MBq ^{73}As
1.0 mCi As/ml al 6 de mayo de 1982	0.99 mCi ^{74}As/ml al 4 de noviembre de 1982
0.43 ug As/ml	1.2 ug As/ml
(solución 1)	(solución 1d)

3.3.1.3 METODO

Curva patrón de arsénico en tejidos.

La validación del método radioquímico para la deter-

minación de arsénico en tejidos se efectuó tanto en tejidos como en solución; los tejidos utilizados fueron hígado (tejido de alta irrigación sanguínea) y testículo (tejido de menor irrigación sanguínea); la solución utilizada fue buffer TRIS pH 7.35 .

Se tomó 1 ml de la solución No. 1 de arsénico que contenía 1.0 mCi ^{74}As/ml equivalentes a 0.43 ug/ml y se diluyó en una proporción 1:1000 con buffer TRIS pH 7.35 . Se obtuvo una solución con concentración de 1 uCi ^{74}As/ml equivalentes a 0.43 ng/ml (solución 3).

Se tomaron alícuotas de 4, 20, 40, 80, 120, 160 y 200 ul de esta solución y se colocaron en tubos de ensaye que contenían: 100 mg ± 5% de hígado de ratón; 200 mg ± 10% de tejido testicular y buffer TRIS pH 7.35 .

Las concentraciones estudiadas fueron: 1.72, 8.6, 17.2, 34.4, 51.6, 68.8 y 86.0 pcg As/200 ul correspondientes a: 0.9, 4.5, 9.0, 18.0, 27.0, 36.0 y 45.0 mCi ^{74}As/200 ul, este es el intervalo de concentraciones que se espera obtener después de una administración de 0.250 mCi ^{74}As/kg de peso a los ratones.

Con el objeto de facilitar la validación del método y disminuir el número de animales en el estudio de distribución, se validó el método determinando la concentración de arsénico a partir de una curva patrón de arsénico en solución buffer TRIS pH 7.35 en el intervalo de concentración de 1.72-86.0 pcg As/200 ul de arsénico.

La tabla 6 presenta las diluciones utilizadas en esta curva patrón de arsénico en solución.

TABLA 6

DILUCIONES DE LA CURVA PATRON DE ARSENICO EN TEJIDOS
A PARTIR DE LA SOLUCION DE 0.43 ng/ml DE ARSENICO
(SOLUCION 3)

DILUCION	ul ^{74}As (SOLUCION 3)	ul buffer TRIS pH 7.35	CONCENTRACION nCi ^{74}As	CONCENTRACION As pcg/200 ul
1	4	196	0.9	1.72
2	20	180	4.5	8.6
3	40	160	9.0	17.2
4	80	120	18.0	34.4
5	120	80	27.0	51.6
6	160	40	36.0	68.8
7	200	0	45.0	86.0

La radioactividad de las muestras de las cuatro curvas patrón se determinó por el método radioquímico descrito anteriormente.

3.3.1.4 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Con el objeto de determinar si la relación entre la concentración de arsénico en tejidos y las lecturas obtenidas en cuentas por minuto (cpm) correspondientes era lineal, se determinaron las cuentas obtenidas en el rango de concentración de arsénico de 1.72 a 86.0 pcg As/200 ul. Se obtuvo el promedio de cinco curvas patrón analizadas sucesivamente en el mismo día.

Para determinar la exactitud del método bajo las mismas condiciones de tiempo, reactivos, operador, instrumentos y laboratorio, se efectuaron cinco curvas patrón y se determinó el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones utilizadas.

3.3.1.5 PRECISION DEL METODO ANALITICO: (REPETIBILIDAD)

Con el objetivo de determinar la repetibilidad del método, tanto en el mismo día como en diferentes días, bajo las mismas condiciones de operador, instrumentos y laboratorio, se realizaron curvas patrón de arsénico en tejidos (solución) en un rango de concentración de 4.8 a 240 pcg/200 ul en 5 ocasiones diferentes.

Para la repetibilidad del método, las soluciones de ^{74}As empleadas fueron: la solución con concentración de 1.2 ug As/ml (solución ld), y la solución con concentración de 0.43 ug As/ml (solución l) descritas anteriormente.

3.3.2 ESTUDIO DE DISTRIBUCION: ADMINISTRACION INTRAVENOSA

3.3.2.1 INSTRUMENTOS

Los mencionados en la sección 3.1.2.1, bisturí para disección, tijeras para disección, pinzas de disección - con dientes y sin dientes, tabla para fijación de animales, cámara de anestesia.

3.3.2.2 REACTIVOS

1.- ^{74}As libre de acarreador (Radiochemical Centre Ltd, Amershan/Searle, Arlington Heights, IL) en forma de ácido arsénico en HCl 0.04M .
Actividad específica:

1.04 mCi ^{74}As	1.1 mCi ^{74}As
0.13 mCi ^{73}As	0.3 mCi ^{73}As
38.5 MBq ^{74}As	40.7 MBq ^{74}As
4.8 MBq ^{73}As	11.0 MBq ^{73}As
1.04 mCi ^{74}As/ml al 17 de octubre 1982.	0.99 mCi ^{74}As/ml al 4 de noviembre 1982.
0.43 ug As/ml (solución 1c)	1.2 ug As/ml (solución 1d)

2.- Eter etílico grado reactivo analítico (S.R. Beaker).

3.- Alcohol etílico al 96% grado reactivo analítico (J.T. Beaker).

3.3.2.3 METODO

El estudio de distribución de arsénico en tejidos se

realizó en ratones machos de la cepa CD_1 con las características descritas en la sección 3.1.2.3, los cuales se mantuvieron bajo supervisión dos semanas antes de iniciar el estudio, en las que la ingestión de agua y alimento fue ad libitum.

El estudio de distribución se llevó a cabo utilizando 5 ratones para cada tiempo de muestreo. A cada ratón se le administró intravenosamente una dosis de 0.250 mCi/kg de peso de arsénico marcado (^{74}As) de una solución de ^{74}As como ácido arsénico preparada de la siguiente manera:

De las soluciones de referencia de ^{74}As (soluciones 1c y 1d) descritas, se tomó 1 ml de cada una de ellas y se aforó a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35, obteniéndose dos soluciones con concentraciones de 0.104 y 0.099 mCi ^{74}As/ml equivalentes a 0.043 y 0.12 ug As/ml respectivamente (soluciones 2c y 2d). Estas soluciones se emplearon para la administración intravenosa de ^{74}As a los ratones.

Las dosis administradas fueron equivalentes a 4.7 uCi ^{74}As/ratón y de 2.5 a 4.0 ó de 12-22 ng As/ratón dependiendo de la solución empleada, de la cual se utilizó un volumen de 0.3 ml a través de la vena caudal. Después de la administración, se anestesiaron con éter etílico y se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, los tiempos de muestreo fueron: 0.083, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 24.0 horas.

Después de tomar las muestras sanguíneas, los ratones se sacrificaron por dislocación cerebral y se muestrearon los siguientes tejidos: testículo, páncreas, riñón, hígado y una muestra de piel.

Las muestras sanguíneas se centrifugaron inmediatamente separando las células rojas y el plasma. Los tejidos se pesaron y se colocaron en viales de plástico. Todas las muestras se mantuvieron en congelación a -10°C hasta el momento de su análisis.

El análisis cuantitativo de cada muestra se hizo por duplicado tomando 100 ul de plasma o células rojas y el peso equivalente a 200 mg de tejido realizando al mismo tiempo una curva patrón y tomando como estándar de referencia la solución respectiva.

3.4 ESTUDIO DE EXCRECION DE ARSENICO EN RATONES

Este estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar la principal vía de eliminación de arsénico en el ratón.

A partir de los datos obtenidos de muestras urinarias después de la administración intravenosa de 0.250 mCi/kg de peso (0.1 a 0.3 ug/kg de peso), se determinó la cantidad de arsénico eliminada en orina.

3.4.1 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN ORINA

La determinación cuantitativa de arsénico en orina se llevó a cabo por el método radioquímico descrito anteriormente.

3.4.1.1 INSTRUMENTOS

Ya descritos en la sección 3.1.1.1

3.4.1.2 REACTIVOS

- Los mencionados en la sección 3.1.1.2 y
- ^{74}As libre de acarreador (Radiochemical Centre Ltd, Amershan/Searle, Arlington Heignts, IL) en forma de ácido arsénico en HCl 0.04M con actividad específica:

1.0 mCi ^{74}As
0.07 mCi ^{73}As
37 MBq ^{74}As
2.6 MBq ^{73}As
1.0 mCi ^{74}As/ml al 6 de mayo de 1982.
0.43 ug As/ml

- Orina de ratón libre de fármacos.

3.4.1.3 METODO: CURVA PATRON DE ARSENICO EN ORINA

Se tomó 1 ml de la solución de ^{74}As que contenía 1.0 mCi ^{74}As/ml equivalentes a 0.43 ug de arsénico por cada mililitro y se aforó a 10 ml con buffer TRIS pH 7.35 para obtener una concentración de 0.1 mCi/ml (0.043 ng/ml) (solución 2).

Se transfirieron alícuotas de: 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 30 y 50 ul a tubos de ensayo, se aforaron a 100 ul con orina, para obtener concentraciones de: 0.43, 0.86, 1.72, 3.44, 5.16, 6.88, 8.60, 12.9 y 21.5 pcg/ml de arsénico equivalentes a: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 y 250 nCi/ml de ^{74}As. Este intervalo de concentraciones es el mismo que se espera obtener en orina después de la administración de 0.250 mCi/kg de peso de arsénico marcado.

La tabla 7 muestra las diluciones indicadas para la curva patrón de arsénico en orina.

DILUCIONES DE LA CURVA PATRON DE ARSENICO EN ORINA A PARTIR DE LA SOLUCION DE 0.043 ug/ml
(SOLUCION 2)

DILUCION	ul ^{74}As (SOLUCION 2)	ul DE ORINA	CONCENTRACION DE As en nCi/ml	CONCENTRACION DE As en pcg/ml
1	1	99	5	0.43
2	2	98	10	0.86
3	4	96	20	1.72
4	8	92	40	3.44
5	12	88	60	5.16
6	16	84	80	6.88
7	20	80	100	8.60
8	30	70	150	12.90
9	50	50	250	21.50

La radioactividad de las muestras se determinó en el contador de centelleo gamma como se indica en la sección 3.1.1.3 .

3.4.1.4 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Con el fin de observar si la relación entre las concentraciones de arsénico y las lecturas obtenidas en cuentas por minuto era lineal, se determinó la radioactividad de las muestras conteniendo arsénico en un intervalo de concentración de 0.43 a 21.50 pcg/ml.

Se realizaron cuatro curvas patrón analizadas sucesivamente el mismo día.

Para determinar la exactitud del método analítico, se efectuaron cuatro curvas el mismo día bajo las mismas condiciones de aparatos, reactivos, laboratorio, etc. y se determinó el coeficiente de variación para cada concentración utilizada.

3.4.1.5 PRECISION DEL METODO ANALITICO: REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del método analítico, tanto el mismo día como en diferentes días bajo las mismas condiciones de operador, instrumentos, laboratorio, etc., se hicieron determinaciones de arsénico en orina a concentraciones de 0.86 a 25.80 pcg/ml en siete ocasiones diferentes y se determinó el coeficiente de variación para cada una de las curvas.

3.4.2 ESTUDIO DE EXCRECION DE ARSENICO DESPUES DE UNA ADMINISTRACION INTRAVENOSA

3.4.2.1 INSTRUMENTOS

1.- Los mencionados en la sección 3.1.1.1
2.- Cajas metabólicas
3.- Dispositivo portafiltros SARTORIUS de 25 mm de diámetro para jeringas de policarbonato.
4.- Filtros de membrana blancos SARTORIUS acetato de celulosa de 0.2 um de porosidad y 25 mm de diámetro.
5.- Prefiltros de 20 mm de diámetro SARTORIUS.

3.4.2.2 REACTIVOS

Los mencionados en la sección 3.4.1.2

3.4.2.3 METODO

El estudio de eliminación de arsénico se llevó a cabo en 6 ratones machos de la cepa CD_1 de 10-14 semanas de edad y de 25-30 gramos de peso, los animales se mantuvieron bajo supervisión 4 semanas antes de iniciar el estudio, durante las cuales la ingestión de agua y alimento fue ad libitum.

A cada ratón se le administró intravenosamente una dosis de 0.250 mCi/kg de peso de arsénico marcado ^{74}As (solución 2, sección 3.4.1.3). Esta dosis fue equivalente a 3-7 uCi ^{74}As/ratón y a 4-12 ng de As/ratón. La administración se realizó a través de la vena caudal con un volumen de inyección de 0.1 a 0.3 ml.

Después de la administración, los ratones se colocaron en cajas metabólicas individuales y se colectaron mues

tras de orina en intervalos de 24 horas durante 5 días. El volumen excretado a cada tiempo de muestreo se midió cuidadosamente y se filtró por millipore, se colocó en tubos perfectamente etiquetados manteniéndose en congelación a -10°C hasta el momento de su análisis (antes de 72 horas).

El análisis cuantitativo de cada muestra se realizó por duplicado usando el método radioactivo descrito en la sección 3.1.1.3 . Al mismo tiempo, se elaboró una curva patrón de arsénico en orina, tomando como estándar de referencia una solución conteniendo 0.043 ng/ml (0.1 mCi/ml) de arsénico (solución 2).

3.5 METABOLISMO DE ARSENICO EN RATONES

El presente estudio se planteó con el objetivo de determinar si existen diferencias en el metabolismo del arsénico en ratones con respecto al reportado en otras especies animales, incluyendo al humano.

3.5.1 INSTRUMENTOS

1.- Los mencionados en la sección 3.4.2.1
2.- Columna de vidrio de 0.85 X 16.5 cm.
3.- Parrilla de calentamiento.

3.5.2 REACTIVOS

1.- ^{74}As libre de acarreador en la forma de ácido arsénico en HCl 0.04M (Radiochemical Centre Ltd, Amershan/Searle, Arlington, Heights, IL)
Actividad:

1.03 mCi ^{74}As
0.10 mCi ^{73}As
38.1 MBq ^{74}As
3.7 MBq ^{73}As
1.03 mCi ^{74}As/ml al 10 de marzo de 1983
1.0 ml
0.77 ug As/ml
(solución 1b)

2.- Resina de intercambio iónico Ag-50W-X8, forma H^+, malla 100-200 grado analítico. Laboratorios BIO-RAD.
3.- Cromatoplacas de celulosa F de 20 X 20 cm (MERCK).
4.- Nitrato de plata: grado reactivo: (MERCK).
5.- Arsenito de sodio: Na As O_2 PM: 129.9 . Sigma Chemical Company.
6.- Arsenato de sodio (sal disódica): $Na_2HAs_5O_4$. $7H_2O$ PM: 311.7, Sigma Chemical Company.
7.- Acido dimetl arsénico.- Acido cacodílico (sal disódica PM: 160.1, Sigma Chemical Company.
8.- Agua bidestilada desionizada.
9.- Acido clorhídrico grado reactivo analítico (J.T. Beaker).
10.- Hidróxido de amonio grado reactivo (J.T. Beaker).
11.- Metanol grado reactivo analítico (J.T. Beaker).
12.- Película de Rayos X para autoradiografía (KODAK).

3.5.3 METODO

El estudio se realizó en 5 ratones machos de la cepa CD_1 de las características mencionadas en la sección 3.4.2.3 .

Se tomó 1 ml de la solución de ^{74}As conteniendo 1.03 mCi/ml (0.77 ug As/ml); solución 1b y se aforó a 10 ml - con buffer TRIS pH 7.35 para obtener una concentración de 0.103 mCi/ml equivalentes a 0.077 ug de As/ml (solución 2b).

De esta solución se le administró intravenosamente a cada ratón una dosis de 0.500 mCi/kg de peso, equivalentes a 9-11 uCi ^{74}As/ratón (8-10 ng As/ratón), la administración se realizó a través de la vena caudal con un volumen máximo de inyección de 0.3 ml.

Para la colección de muestras urinarias, los ratones se colocaron individualmente en cajas metabólicas y se tomaron muestras cada 24 horas durante 5 días.

El volumen de las muestras se midió cuidadosamente y se filtró por millipore, estas muestras se emplearon para la separación e identificación de los metabolitos de arsénico en orina.

3.5.3.1 SEPARACION DE LOS METABOLITOS DE ARSENICO EN ORINA

Para la separación e identificación de los metabolitos se utilizó la muestra de orina obtenida en el intervalo de las primeras 24 horas después de la administración.

Se tomaron 500 ul de la muestra previamente filtrada

por millipore, la cual se pasó a través de una columna de intercambio iónico empacada con AG-50W-X8, previamente equilibrada con ácido clorhídrico 0.5N; la muestra se eluyó sucesivamente con 15 ml de ácido clorhídrico 0.5N, 15 ml de agua desionizada, 15 ml de hidróxido de amonio al 5% V/V, 15 ml de hidróxido de amonio al 20% y finalmente con 15 ml de agua desionizada. El flujo de la columna empleado fue 1 ml/min, se colectaron fracciones de 1 ml.

La separación de las muestras obtenidas durante las 24 primeras horas de los ratones tratados se realizó por duplicado, empleándose una columna para la muestra de cada ratón.

La radioactividad de cada una de las fracciones obtenidas se determinó por duplicado usando el método radioactivo descrito en la sección 3.1.4 . Las fracciones que mostraron mayor radioactividad (90%) de cada una de las soluciones eluídas (ácido clorhídrico 0.5N, agua desionizada, hidróxido de amonio al 5% V/V e hidróxido de amonio al 20% V/V), se concentraron a 0.2 ml en un baño de aceite. Estas fracciones se emplearon para la identificación de los metabolitos por cromatografía en capa delgada.

3.5.3.2 IDENTIFICACION DE METABOLITOS DE ARSENICO EN ORINA

Se pesaron 200 mg de sal disódica de arsenato de sodio ($Na_2HAsSO_4 \cdot 7H_2O$), 200 mg de arsenito de sodio ($NaAsO_2$) y 200 mg de ácido dimetil arsénico (sal disódica) grado reactivo analítico cada una de las cuales se disolvió en 10 ml de agua destilada, para obtener soluciones de concentración de 20 mg/ml, (soluciones A, B y C respectivamente).

De cada solución se tomaron 5 ml y se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, llevando al volumen con agua destilada, para obtener una solución con una concentración de 4 mg/ml de cada uno de los compuestos (solución D).

A las muestras radioactivas previamente concentradas a 0.2 ml, se les adicionaron 10 ul de esta solución como acarreador, las muestras se alcalinizaron con una solución de hidróxido de sodio al 10% hasta obtener un pH de 10 y se aplicaron 50 ul en cromatoplacas de celulosa F, y 20 ul de las soluciones A, B, C y D empleadas como estándares de referencia.

Los cromatogramas se desarrollaron en un sistema de eluyentes formado por 80 partes de metanol y 20 partes de hidróxido de amonio 1N V/V por un tiempo aproximado de 2 horas.

Para la identificación de los compuestos radioactivos de arsénico presentes en las muestras urinarias se dejó evaporar el eluyente y las cromatoplacas se expusieron directamente a una película de Rayos X durante una semana a 4°C.

Para la identificación de los compuestos de arsénico no-radioactivo se utilizó como revelador una solución de nitrato de plata 1N en hidróxido de amonio al 5% (V/V).

La identificación de los metabolitos del arsénico se realizó también a partir de las muestras de orina obtenidas durante las primeras 24 horas sin pasar por la columna de intercambio iónico; la identificación se realizó de la misma manera antes descrita aplicando 5 ul de muestra en

en las cromatoplacas.

IV. RESULTADOS

4.1 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN SANGRE

La determinación cuantitativa de arsénico se efectuó utilizando el método radioquímico descrito en la sección 3.1.1.3 . Los resultados de la validación del método se presentan a continuación:

4.1.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Para determinar la linearidad del método analítico utilizado, se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.1.1.4 .

En la figura 1 se presenta la gráfica promedio ± desviación estándar de cinco curvas patrón de arsénico en sangre en el intervalo de concentración de 0.086 a 4.30 pcg/mc.

La gráfica muestra una relación lineal entre la concentración de arsénico en sangre y las cuentas por minuto (cpm).

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la línea recta con pendiente de 3549.2, intercepto 105.09 y coeficiente de correlación de 0.9998.

En la tabla 1 se presentan los datos del análisis de regresión de las cinco curvas patrón y la curva patrón promedio.

Para determinar la exactitud del método se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.1.1.4 .

En la tabla II se presentan los datos individuales y los datos promedio de las cinco curvas patrón de arsénico en sangre. Al hacer el análisis estadístico, se encontró que el menor coeficiente de variación fue de 4.5% y el mayor de 14.12% en el intervalo de concentración estudiado.

4.1.2 PRECISION DEL METODO ANALITICO: REPETIBILIDAD

En la tabla III se presentan los resultados obtenidos al seguir los lineamientos de la sección 3.1.1.5, a partir de los cuales se calculó el coeficiente de variación en porciento (C.V.%) para el método de valoración de arsénico en sangre.

La figura 2 muestra la gráfica promedio de las nueve curvas patrón.

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente igual a 3503.9, intercepto = 127.805, coeficiente de correlación 0.9980 y coeficiente de determinación de 0.9960.

en la tabla IV se presentan los parámetros individuales y promedio de m, b, r y r^2, obtenidos de las nueve curvas patrón de arsénico en sangre.

4.2 ESTUDIO DE FARMACOCINETICA

El estudio de farmacocinética de arsénico en 5 rato-

nes a los cuales se les administraron 0.250 mCi de arsénico radioactivo por vía intravenosa siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.1.2.3 .

Las muestras sanguíneas tomadas durante el estudio se analizaron por el método radioquímico previamente validado.

En la tabla V se muestran los datos individuales y promedio de concentración de arsénico en sangre contra - tiempo de los 5 ratones.

Las figuras 3 y 4 correponden a las gráficas individuales y el promedio del logaritmo de la concentración de arsénico en sangre contra tiempo ± la desviación estándar. Estas gráficas muestran que después de la administración intravenosa, la concentración de arsénico en sangre disminuye con el tiempo de manera biexponencial, siguiendo un Modelo Abierto de Dos Compartimentos.

En la tabla VI se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos al ajustar los datos siguiendo tanto un modelo abierto de un compartimento (MAUC) como por un modelo abierto de dos compartimentos (MADC).

En base a los resultados obtenidos, los datos individuales se ajustaron al MADC utilizando el programa de la calculadora TI 59 para regresión no lineal (56).

La tabla VII presenta los datos ajustados de los ratones, así como el promedio y desviaciones estándar de los mismos.

Las figuras 6 y 7 muestran las gráficas individuales

y la gráfica promedio del logaritmo de la concentración de arsénico ± desviación estándar contra tiempo de los datos ajustados. A partir de estos datos se determinaron los parámetros farmacocinéticos, cuyos resultados se presentan en la tabla VIII.

4.3 DOSIS DEPENDENCIA

Con el fin de determinar si el arsénico sigue una cinética dosis dependiente, se determinó el comportamiento del arsénico en cinco grupos de cinco ratones a los cuales se les administró por vía intravenosa dosis de 0.5 a 9.0 mg/kg de peso siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.2.3.

La concentración de arsénico de cada muestra se determinó por el método radioquímico descrito anteriormente. En la tabla IX se muestran los resultados promedio de concentración de arsénico en sangre de las dosis estudiadas.

La figura 8 muestra las gráficas promedio del logaritmo de concentración de arsénico en sangre ± desviación estándar contra tiempo de las dosis estudiadas.

Estas gráficas muestran al igual que en el estudio de farmacocinética, que la concentración de arsénico en sangre disminuye con el tiempo de manera biexponencial siguiendo un modelo abierto de dos compartimentos.

En base a lo anterior, los datos individuales de concentración de arsénico en sangre de cada uno de los ratones se ajustaron usando el programa de la TI 59 para regresión no lineal.

La tabla X muestra los datos de concentración promedio ajustada ± desviación estándar obtenidos después de la administración intravenosa de arsénico a las dosis de: 0.5, 1.0, 5.0, 7.0 y 9.0 mg/kg de peso.

Utilizando el modelo abierto de dos compartimentos se calcularon los parámetros farmacocinéticos.

En la tabla XI se muestran los parámetros farmacocinéticos promedio para cada una de las 5 dosis administradas y el área bajo la curva de cero a infinito (ABC_0^∞) de la curva de concentración de arsénico contra tiempo.

En la figura 9 se presentan graficados los datos de concentración ajustados corregidos por la dosis administrada. En la figura se puede observar que la dosis de 9 mg/kg de peso (Dosis 5) presentan un área bajo la curva desproporcionada en relación a las otras dosis, lo cual hace pensar que el arsénico presente una farmacocinética dosis dependencia.

4.4 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN TEJIDOS

La determinación cuantitativa de arsénico en tejidos se efectuó utilizando el método radioquímico descrito en la sección 3.3.1.3 .

En la tabla XII se presentan los valores en cuentas por minuto (cpm) de arsénico radioactivo tanto en los tejidos como en solución en un intervalo de concentración de 1.72 a 86.0 pcg/200 ul. Los resultados muestran que la

concentración de arsénico es equivalente en las tres curvas estándar, lo que muestra que el método analítico para la determinación de arsénico es adecuado tanto para tejidos como para solución.

La tabla XIII muestra los datos obtenidos al realizar el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los valores obtenidos, estos datos indican que las gráficas son equivalentes y por lo tanto se procedió a la validación del método utilizando los datos de concentración de arsénico en solución.

4.4.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Para determinar la linearidad del método, se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.3.1.4 .

En la figura 10 se presenta la gráfica promedio ± desviación estándar de cinco curvas patrón de arsénico en solución en el intervalo de concentración de 1.72 a 86.0 pcg/ 200 ul. La gráfica muestra una relación lineal entre la concentración y las cuentas por minuto (cpm), obteniéndose una ecuación de la línea recta con pendiente de 364.39, intercepto de -9.86 y un coeficiente de correlación de r=0.9999.

En la tabla XIV se muestran los datos del análisis de regresión para las cinco curvas patrón analizadas, así como el de la curva patrón promedio.

Para establecer la exactitud del método, se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.3.1.4 .

En la tabla XV se presentan los datos individuales y

los datos promedio de las cinco curvas patrón de arsénico en solución. Al hacer el análisis estadístico para cada una de las concentraciones estudiadas, se obtuvo un buen coeficiente de variación excepto para la concentración menor.

4.4.2 PRECISION DEL METODO ANALITICO: REPETIBILIDAD

La tabla XVI presenta los resultados obtenidos al seguir los lineamientos explicados en la sección 3.3.1.5, a partir de los cuales se determinó el coeficiente de variación en porciento (C.V.%) para el método de valoración de arsénico en solución. Estos datos se muestran en la figura 11, la cual muestra la gráfica promedio de las cinco curvas patrón.

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los valores experimentales de concentración y el promedio de las cuentas por minuto, se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente igual a 261.346, intercepto = -746.50, coeficiente de correlación de 0.9996 y coeficiente de determinación de 0.9993 . Los resultados se presentan en la tabla XVII.

4.5 ESTUDIO DE DISTRIBUCION

La distribución del arsénico en tejidos se determinó después de la administración intravenosa de 0.250 mCi de arsénico radioactivo a ratones como se explicó en la sección 3.3.2.3 .

Las muestras tomadas durante el estudio se analizaron por el método radioquímico descrito anteriormente.

En las tablas XVIII y XIX se muestran los datos de distribución de arsénico en ratones, se presentan los datos promedio en cpm/mg en el caso de tejidos o cpm/ul para sangre contra tiempo. Los valores se agrupan en dos tablas ya que se administraron dos dosis diferentes de arsénico, la solución 1c con concentración de arsénico igual a 0.46 ug/ml y la solución 1d de 1.2 ug As/ml.

En la figura 12 se muestra la distribución de arsénico en tejidos de los dos ratones a los cuales se les administró la solución 1c. Los datos de sangre, paquete y testículo no se pudieron registrar en la gráfica debido a que los valores fueron muy pequeños.

Para los ratones que recibieron la solución 1d, se obtuvieron resultados similares.

4.6 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN ORINA

Para la determinación de arsénico en orina se utilizó el método radioquímico descrito en la sección 3.4.1.3, el cual fue validado como se describe a continuación.

4.6.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Para determinar la linearidad del método radioquímico se siguieron los lineamientos descritos en la sección 3.4.1.4 . En la figura 13 se presenta la gráfica promedio ± desviación estándar de las cuatro curvas patrón de arsénico en orina en el intervalo de concentración de 0.43 - 21.50 pcg/ml. En la gráfica se observa la relación lineal obtenida al graficar la concentración de arsénico contra las cuentas por minuto.

Al hacer el análisis de regresión de los datos se - obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente de 347.97, un intercepto de 141.99 y coeficiente de correlación 0.9999 . Los datos se muestran en la tabla XX.

Para establecer la exactitud del método siguiendo lineamientos de la sección 3.4.1.4, se prepararon cuatro curvas patrón de arsénico en orina en el rango de concentración de 0.43, 0.86, 1.72, 3.44, 5.16, 6.88, 8.60. - 12.90 y 21.50 pcg/ml.

En la tabla XXI se presentan los datos individuales y el valor promedio de las cuatro curvas patrón de arsénico en orina. Al hacer análisis estadístico se obtuvo un coeficiente de variación en porciento de 4.38% a 9.42% en el intervalo de concentración estudiado.

4.6.2 PRECISION DEL METODO ANALITICO: REPETIBILIDAD

En la tabla XXII se presentaron los resultados obtenidos al seguir los lineamientos explicados en la sección 3.4.1.5; a partir de estos datos se calculó el coeficiente de variación en porciento para el método de valoración de arsénico en orina, obteniéndose un valor de 3.56-7.37% en el rango de concentración de 0.86 -21.50 pcg/ml. La figura 14 muestra la gráfica promedio de las siete curvas.

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados en los diferentes días, se obtuvo la ecuación de una línea recta con: pendiente 580.61, intercepto = 345.12 y coeficiente de correlación de 0.9988.

En la tabla XXIII se muestran los parámetros: m, b,

r y r^2 obtenidos del análisis de regresión para las siete curvas patrón realizadas en diferentes días. El coeficiente de determinación de las curvas patrón estudiadas varió entre 0.9964 a 0.9998 .

4.7 ESTUDIO DE EXCRECION DE ARSENICO EN RATONES

Se determinó la eliminación de arsénico en 6 ratones después de la administración intravenosa de 0.250 mCi de arsénico marcado radioactivamente (^{74}As) siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.4.2.3.

Las muestras urinarias colectadas a intervalos de 24 horas durante 5 días se analizaron por el método radioquímico descrito en la sección 3.1.13 extrapolando los datos obtenidos en cuentas por minutos (cpm) en la correspondiente curva estándar de arsénico en orina.

En la tabla XXIV se muestra el porciento de dosis - excretada durante 5 días después de la administración intravenosa de arsénico.

Los datos muestran que el arsénico se elimina rápidamente durante las primeras 24 horas después de su administración, obteniéndose un valor promedio de 64.24 ± 9.32% y de 0.61 ± 0.32% después de 5 días, el total de dosis - excretada durante los 5 días fue de 75.77 ± 10.51% de la dosis.

En la tabla XXV se muestra el porciento de dosis acumulada excretada en orina para cada uno de los ratones estudiados. Las figuras 15 y 16 muestran las gráficas individuales y promedio ± desviación estándar del porcentaje excretado contra tiempo.

4.8 METABOLISMO DE ARSENICO EN RATONES

Con el fin de determinar el metabolismo del arsénico se efectuó el estudio en tres ratones machos de la cepa CD_1, a los cuales se les administró intravenosamente una dosis de 0.500 mCi de ^{74}As por kg de peso, se colectaron muestras urinarias durante las primeras 24 horas como se describe en la sección 3.5.3.

4.8.1 SEPARACION DE LOS METABOLITOS DE ARSENICO EN ORINA

Para la separación de los metabolitos del arsénico a partir de muestras urinarias, se utilizó la cromatografía de intercambio iónico descrita en la sección 3.5.3.1.

Una vez separadas las fracciones, se determinó la concentración de arsénico presente en cada una de ellas por el método radioquímico descrito anteriormente; todas las cuentas se corriegieron por el decaimiento radioactivo y el volumen de la muestra.

Al graficar las cuentas por minuto (cpm) de las fracciones eluídas, se observa que la mayor radioactividad se encuentra en las fracciones eluídas con hidróxido de amonio al 20% (V/V) y en menor grado en las eluídas con ácido clorhídrico 0.5 N.

Estos resultados se corroboraron con la identificación de los compuestos por la técnica de Cromatografía en capa delgada.

4.8.2 IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DEL ARSENICO EN ORINA

La identificación de los compuestos de arsénico no-radioactivo, se realizó revelando las cromatoplacas con la solución de nitrato de plata 1 N como se describe en la sección 3.5.3.2 . El valor promedio Rf obtenido para cada uno de los compuestos fue: 0.615 para arsenito de sodio, 0.264 para el arsenato de sodio y de 0.794 para el ácido dimetil arsénico.

La tabla XXVI muestra los datos comparativos entre los valores de Rf reportados en la literatura (55) y los obtenidos experimentalmente siguiendo el método de cromatografía en capa delgada para los diferentes compuestos de arsénico.

La identificación de los compuestos de arsénico radioactivo de las muestras urinarias se llevó a cabo a partir de las fracciones que presentaron mayor radioactividad por cromatografía en capa delgada, revelando la película de Rayos X expuesta a las cromatoplacas como se describe en la sección 3.5.3.2 .

El cromatograma del ratón No. 3 mostró la presencia en mayor proporción de un compuesto altamente polar en las fracciones eluídas con hidróxido de amonio al 20% (fracciones 61, 62 y 63) el Rf de este compuesto fue de 0.707 y en menor proporción un compuesto poco polar en las fracciones eluídas con ácido clorhídrico 0.5 N (fracciones 4 y 6) con un Rf de 0.165, correspondientes al ácido dimetil arsénico y el arsenato de sodio respectivamente. Se obtuvieron resultados similares para los ratones 1 y 2.

La tabla XXVII muestra los valores obtenidos para ca

da uno de los metabolitos del arsénico en la orina de los tres ratones estudiados.

V. TABLAS Y GRAFICAS

TABLA I
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN SANGRE

CURVA ESTANDAR	m	b	r	r^2
I	3806.3	-99.84	0.9988	0.9976
II	3484.0	272.18	0.9980	0.9960
III	3564.4	176.12	0.9983	0.9966
IV	3544.4	92.50	0.9987	0.9974
V	3346.6	84.54	0.9992	0.9984
Promedio	3549.2	105.09	0.9998	0.9996

TABLA II
EXACTITUD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN SANGRE

CONC. As (pcg/ml)	cpm (6-V-82)					$\overline{X}$	S	C.V.%	E.S.
	I	II	III	IV	V				
0.086	291	371	337	260	351	322	45.47	14.12	6.31
0.43	1,609	1,573	1,578	1,750	1,589	1,620	74.08	4.57	2.04
0.86	3,063	3,184	3,082	3,400	3,043	3,154	147.64	4.68	2.09
1.72	6,773	6,700	6,569	5,955	5,961	6,392	402.51	6.29	2.82
2.58	9,224	9,815	9,962	8,888	8,367	9,251	659.08	7.12	3.19
3.44	12,816	12,053	12,414	12,722	11,430	12,287	564.44	4.59	2.05
4.30	16,591	14,951	15,112	15,225	14,750	15,326	729.49	4.75	2.13

$\overline{X}$ = Valor promedio
S = Desviación estándar
C.V.% = Coeficiente de variación en porciento
E.S.= Error estándar

TABLA III
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN SANGRE

CURVA	CONCENTRACION DE ARSENICO (pcg / ml)						
	0.086	0.43	0.86	1.72	2.58	3.44	4.30
	RADIOACTIVIDAD (cpm)						
I	291	1609	3063	6773	9224	12816	16521
II	371	1573	3184	6700	9815	12053	14951
III	337	1578	3082	6569	9962	12414	15112
IV	260	1750	3400	5955	8888	12722	15225
V	351	1589	3043	5961	8367	11430	14750
VI	360	1274	2642	5258	9103	10246	14174
VII	363	1402	2982	6120	9620	13505	16291
VIII	209	1324	2796	5432	9304	11648	13340
IX	307	1499	2948	5261	8063	11534	14587
$\overline{X}$ (n=9)	316.55	1510.88	3015.55	6003.2	9149.55	12040.88	15002.33
S	54.913	151.78	217.09	596.70	634.150	958.762	995.89
C.V.%	17.34	10.04	7.19	9.93	6.93	7.96	6.63
E.S.	18.304	50.593	72.363	198.9	211.38	319.58	331.96

$\overline{X}$ = Valor promedio

S = Desviación estándar

C.V.% = Coeficiente de variación en porciento

E.S.= Error estándar

TABLA IV
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN SANGRE

C U R V A ESTANDAR	m	b	r	r^2
I	3806.3	- 99.84	0.9988	0.9976
II	3484.0	272.18	0.9980	0.9960
III	3564.4	176.12	0.9983	0.9966
IV	3544.4	92.50	0.9987	0.9974
V	3346.6	84.54	0.9992	0.9984
VI	3236.1	- 51.41	0.9951	0.9902
VII	3871.1	-235.56	0.9991	0.9982
IX	3427.5	- 83.48	0.9995	0.9990
Promedio	3503.9	127.805	0.9980	0.9960
± SD	222.53	80.50	0.0016	0.0032

TABLA V

CONCENTRACION DE ARSENICO EN SANGRE (pcg/ml) CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO (0.250 mCi ^{74}As/Kg) A 5 RATONES

RATON	1	2	3	4	5	$\bar{X}$
TIEMPO (hrs)	CONCENTRACION (pcg/ml)					
0.25	0.4803	0.5403	0.6748	0.5341	0.5076	0.5474
0.50	0.4397	0.4259	0.3901	0.2607	- -	0.3791
0.75	0.2291	0.3760	- -	- -	0.2624	0.2891
1.0	0.1660	0.2627	0.2576	0.1017	0.2508	0.2077
2.0	0.1344	0.1406	0.1415	0.0620	0.1398	0.1236
3.0	0.0713	0.0603	0.1282	0.0521	0.0735	0.0770
4.0	0.0397	0.0603	0.0686	0.0487	0.0439	0.0522
5.0	0.0352	0.0434	- -	0.0239	0.0338	0.0340
6.0	0.0577	- -	- -	- -	0.0372	0.0346
7.0	0.0341	0.0366	0.0205	0.0174	- -	0.0331
8.0	0.0397	0.0064	0.0239	0.0205	0.0124	0.0226
10.0	0.0420	- -	0.0124	0.0141	0.0273	0.0239
24.0	- -	- -	0.0239	- -	- -	- -

TABLA VI
PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO SIGUIENDO UN MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMENTO (MAUC) Y UN MODELO ABIERTO DE DOS COMPARTIMENTOS (MADC)

RATON	M A U C		M A D C		
	Kd (hrs^{-1})	r^2	(hrs^{-1})	(hrs^{-1})	r^2
1	0.2555	0.7113	0.1700	2.4181	0.54337
2	0.4807	0.9185	0.1378	1.0845	0.8932
3	0.1367	0.5009	0.3222	2.6630	0.9450
4	0.3169	0.7995	0.1949	3.3912	0.8881
5	0.2824	0.7587	0.3212	0.9072	0.9072

TABLA VII
DATOS DE CONCENTRACION DE ARSENICO EN SANGRE (pcg/ml) AJUSTADOS POR EL PROGRAMA NO LINEAR DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO (0.250 mCi As^{74}) A CINCO RATONES

RATON	1	2	3	4	5	$\bar{X}$	SD
TIEMPO (hrs)	CONCENTRACION EN pcg/ml						
0.25	0.5129	0.5435	0.6792	0.5302	0.5119	0.5555	0.0703
0.50	0.3565	0.4349	0.3938	0.2591	0.3759	0.3640	0.0654
0.75	0.2564	0.3500	0.2914	0.1485	0.2846	0.2661	0.0740
1.0	0.1921	0.2837	0.2455	0.1019	0.2226	0.2091	0.0686
2.0	0.0925	0.1328	0.1641	0.0594	0.1118	0.1121	0.0396
3.0	0.0691	0.0751	0.1143	0.0466	0.0749	0.0760	0.0243
4.0	0.0589	0.0501	0.0797	0.0370	0.0533	0.0558	0.0155
5.0	0.0515	0.0379	0.0556	0.0294	0.0419	0.0432	0.0105
6.0	0.0453	0.0307	0.0387	0.0283	0.0319	0.0349	0.0069
7.0	0.0399	0.0258	0.0270	0.0185	0.0243	0.0271	0.0078
8.0	0.0351	0.0219	0.0188	0.0147	0.0185	0.0218	0.0078
10.0	0.0273	0.0162	0.0091	0.0093	0.0108	0.0161	0.0078
24.0	0.0046	0.0020	0.00006	0.00004	0.0002	0.0014	0.0019

TABLA VIII
PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS DESPUES DE UNA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO A 5 RATONES TRATADOS

PARAMETRO	RATON 1	2	3	4	5	$\bar{X}$
A (pcg/ml)	0.66097	0.61140	1.2277	1.1106	0.5549	0.6305
± SD	0.0733	0.0828	0.2395	0.0390	0.0309	0.0294
α (hrs.$^{-1}$)	1.8254	1.0125	4.7892	3.6823	1.7214	2.1041
± SD	0.3986	0.2287	0.9826	0.1645	0.1890	0.2143
B (pcg/ml)	0.09713	0.07150	0.3376	0.0931	0.1617	0.1905
± SD	0.0515	0.0963	0.0425	0.0099	0.0349	0.0318
β (hrs.$^{-1}$)	0.1271	0.1487	0.3609	0.2307	0.2707	0.3037
± SD	0.1026	0.2332	0.0528	0.0293	0.0499	0.0437
$t_{\frac{1}{2}}\beta$ (hrs)	5.4523	4.6603	1.9201	3.0039	2.5600	2.2818
± SD						
$t_{\frac{1}{2}}\alpha$ (hrs)	0.3796	0.6844	0.1447	0.1881	0.4025	0.3293
± SD						
ABC_0^{∞} (pcgXhr/ml)	1.1579	1.1160	1.2622	0.7411	0.9457	0.9589
± SD	0.0059	0.0023	0.0013	0.0001	0.0006	0.0005
K_{21} (hrs^{-1})	0.3446	0.2391	0.3159	0.4976	0.5979	0.5990
K_{12} (hrs^{-1})	0.9346	0.2924	2.5208	1.7082	0.6148	1.21416
K_{10} (hrs^{-1})	0.6731	0.6296	1.3134	1.7072	0.7793	1.0205
Vd (litros)	16.449	18.890	8.241	10.716	18.001	14.459
Clp (lts/hr)	11.072	11.893	10.823	18.294	14.029	13.222
Clr (lts/hr)	2.08	2.808	2.974	2.472	4.872	4.381

TABLA IX
DATOS PROMEDIO DE CONCENTRACION DE ARSENICO EN SANGRE CONTRA TIEMPO, DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 0.5 - 9.0 mg/kg DE PESO

TIEMPO (horas)	DOSIS 1 (0.5 mg/kg)		DOSIS 2 (1 mg/kg)		DOSIS 3 (5 mg/kg)		DOSIS 4 (7 mg/kg)		DOSIS 5 (9 mg/kg)	
	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD
0.25	319.601	90.222	1105.216	161.242	2565.901	245.196	3291.596	826.131	6306.863	809.787
0.75	182.983	40.245	586.288	112.552	1389.93	462.652	1643.090	182.317	3868.013	573.943
1.0	156.218	20.990	547.847	120.974	882.70	284.357	1531.005	219.330	3367.534	648.816
2.0	107.425	37.190	437.080	96.912	754.054	202.697	1362.946	287.196	3010.951	348.861
3.0	78.725	34.435	375.728	100.057	634.801	173.124	1128.217	220.613	2620.432	241.031
4.0	53.148	18.104	308.130	64.348	462.12	174.649	907.259	85.904	2555.058	343.855
5.0	44.670	17.025	239.047	40.759	419.402	153.887	893.027	215.345	2324.274	378.435
6.0	35.312	15.759	210.639	48.177	353.863	143.138	608.035	106.316	2360.941	430.222
8.0	26.180	9.677	166.103	42.547	243.73	101.78	562.448	91.138	2058.366	482.228

TABLA X
DATOS PROMEDIO AJUSTADOS DE CONCENTRACION DE ARSENICO EN SANGRE CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 0.5 - 9.0 mg//kg DE PESO A RATONES

TIEMPO (horas)	DOSIS 1 (0.5 mg/kg peso)		DOSIS 2 (1.0 mg/kg peso)		DOSIS 3 (5.0 mg/kg peso)		DOSIS 4 (7.0 mg/kg peso)		DOSIS 5 (9.0 mg/kg peso)	
	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD	Conc. $\bar{X}$ (ng/ml)	SD
0.25	306.86	99.929	1128.08	175.42	2593.28	299.07	3115.92	609.66	6294.78	816.41
0.50	216.69	40.749	786.04	135.71	1833.87	535.36	2115.91	302.69	4643.81	776.97
0.75	170.38	24.572	646.83	129.93	1488.05	466.66	1739.31	173.82	3855.22	662.84
1.0	142.16	15.358	573.62	125.74	1278.74	368.98	1570.08	120.15	3443.56	543.45
1.5	108.30	8.299	493.72	115.33	1020.14	203.21	1398.28	86.43	3060.44	379.04
2.0	88.00	8.599	443.94	102.54	857.90	87.69	1277.73	108.84	2883.70	305.87
2.5	74.13	8.761	404.62	90.13	742.74	43.84	1170.68	72.06	2772.32	286.32
3.0	63.79	8.392	370.53	79.18	648.77	82.35	1073.37	68.64	2685.11	292.33
3.5	55.61	7.878	339.94	69.84	586.54	100.27	984.25	66.03	2609.18	308.29
4.0	48.84	7.432	312.15	62.01	530.58	115.53	902.54	63.93	2539.10	327.88
4.5	43.11	7.101	286.76	55.62	484.08	121.97	861.01	103.06	2472.68	348.40
5.0	38.17	6.863	263.53	50.18	444.63	122.61	759.04	60.67	2408.99	368.68
5.5	33.87	6.693	242.25	45.84	410.58	119.64	696.12	59.23	2347.53	388.23
6.0	30.10	6.551	222.75	42.32	380.75	114.61	638.44	57.81	2288.08	406.83
7.0	23.86	6.266	188.47	37.17	330.57	102.09	537.08	54.93	2214.65	440.93
8.0	18.99	5.910	159.63	33.71	289.59	89.78	451.87	51.88	2067.95	470.83
24.0	0.676	0.626	12.67	8.50	57.36	48.09	29.08	10.21	985.53	580.75

TABLA XI
PARAMETROS FARMACOCINETICOS PROMEDIO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.5 A 9.0 mg/kg DE PESO DE ARSENICO A RATONES

PARAMETRO	DOSIS mg/kg				
	0.5	1.0	5.0	7.0	9.0
A (ng/ml)	393.27	1676.17	4209.59	4207.88	6919.54
α (hrs $^{-1}$)	2.249	4.109	3.333	4.5007	3.0855
B (ng/ml)	127.81	620.175	839.97	1806.92	3137.69
β (hrs^{-1})	0.239	0.1675	0.1203	0.1736	0.0544
$t_{1/\beta}$ (hrs)	3.063	4.274	4.586	4.0113	15.480
$t_{1/\alpha}$ (hrs)	0.422	0.2063	0.4407	0.1547	0.2665
ABC_0^{∞} (ngXhr/ml)	727.103	4209.34	9670.55	11571.92	73256.15
K_{21} (hrs^{-1})	0.173	1.219	0.6676	1.5073	0.9802
K_{12} (hrs^{-1})	1.064	2.494	2.1771	2.639	1.9880
K_{10} (hrs^{-1})	0.7105	0.5631	0.6098	0.527	0.1713
Vd (ml)	44.25	16.51	36.26	37.973	28.407
Cl_p (ml/hr)	25.82	8.205	18.07	19.655	4.517
Cl_r (ml/hr)	12.34	2.615	3.663	6.569	1.460

TABLA XII
DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN TEJIDOS Y EN SOLUCION

Conc. ^{74}As (pcg/200 ul)	c p m (6 - V - 82)			$\overline{X}$	S	C.V.%	error STD
	En hígado	En testículo	En solución				
1.72	735	471	589	598	132.24	22.10	12.77
8.6	2665	2886	2735	2755	102.03	3.7	2.13
17.2	5631	6493	5823	5982	452.54	7.56	4.36
34.4	11751	10915	12220	11629	661.04	5.68	3.28
51.6	17589	17584	17499	17557	50.57	2.88	1.66
68.8	22284	22178	23140	22534	527.80	2.34	1.35
86.0	27437	26389	26515	26780	572.16	2.13	1.23

$\overline{X}$ = Valor promedio
S = Desviación estándar
C.V.% = Coeficiente de variación en porciento

TABLA XIII
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION POR MINIMOS CUADRADOS PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN TEJIDOS

TEJIDO	m	b	r	r^2
En hígado	321.43	263.36	0.9991	0.9982
En testículo	310.80	500.23	0.9976	0.9952
En solución	317.85	461.84	0.9969	0.9938

TABLA XIV
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN TEJIDOS

CURVA	m	b	r	r^2
I	360.53	425.77	0.9998	0.9996
II	358.23	120.41	0.9997	0.9995
III	373.35	-378.48	0.9993	0.9986
IV	364.13	- 81.55	0.9999	0.9998
V	365.71	-135.4	0.9993	0.9986
Promedio	364.39	- 9.9	0.9999	0.9998

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA XV
EXACTITUD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN TEJIDOS (SOLUCION)

Conc. ^{74}As (pcg/200 ul)	c p m (6 - V - 82)					$\bar{X}$	DS	C.V.%	E.S.
	I	II	III	IV	V				
1.72	769	685	308	700	446	582	195.62	33.63	15.08
8.6	3616	3185	3009	3147	3416	3275	240.52	7.34	3.29
17.2	6594	6186	6394	6117	6171	6292	198.81	3.15	1.41
34.4	13011	12911	11965	12173	11849	12382	542.48	4.38	1.96
51.6	19244	18343	18690	18705	18482	18693	343.06	1.83	0.82
68.8	25338	24599	24784	24583	25661	25047	438.51	1.75	0.78
86.0	31147	31055	32378	31439	31155	31435	546.58	1.73	0.77

$\bar{X}$ = Valor promedio
DS = Desviación estándar
C.V.% = Coeficiente de variación en porciento
E.S.= Error estándar

TABLA XVI
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN SOLUCION

CURVA	CONCENTRACION DE ARSENICO (pcg/200ul)						
	4.8	24.0	48.0	96.0	144.0	192.0	240.0
	RADIOACTIVIDAD (Cpm)						
I	620	4994	10390	20927	32713	40485	56796
II	948	5501	11126	21194	34710	46841	60102
III	1270	5259	11337	23509	35365	48545	61544
IV	1219	5641	11570	24056	36454	50475	63768
V	1362	6422	14551	28435	43487	57873	72365
$\bar{X}$ (n=5)	1084	5663	11795	23634	36546	48844	62915
S	301.61	745.41	1602.92	3021.76	4114.28	6288.03	5858
C.V.%	27.79	13.15	13.58	12.78	11.25	12.87	9.31
E.S.	10.66	5.89	6.08	5.73	5.04	5.77	4.17

$\bar{X}$ = Valor promedio

S = Desviación estándar

C.V.% = Coeficiente de variación en porciento

E.S. = Error estándar

TABLA XVII
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION
POR MINIMOS CUADRADOS PARA LA
DETERMINACION DE ARSENICO EN TEJIDOS

C U R V A	m	b	r	r^2
I	230.610	- 822.331	0.9971	0.9942
II	250.354	-1006.188	0.9990	0.9981
III	256.926	- 793.885	0.9996	0.9993
IV	266.542	- 914.814	0.9995	0.9991
V	302.298	- 195.155	0.9999	0.9999
Promedio	261.346	- 746.50	0.9996	0.9993

TABLA XVIII
DATOS PROMEDIO EN cpm/mg O cpm/ul DE ARSENICO EN TEJIDOS CONTRA TIEMPO
DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO
(0.250 mCi/kg) EQUIVALENTES A 2 RATONES

TEJIDO	TIEMPO (hrs.) 0.08	0.25	0.50	0.75	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	24.0
TESTICULO	2.675	2.940	1.426	1.515	1.6155	1.3635	0.857	1.030	0.5505	1.517	0.2065
SD	(0.453)	(0.864)	(0.240)	(0.043)	(0.963)	(0.400)	(0.387)	(1.014)	(0.193)	(0.989)	(0.027)
HIGADO	199.080	189.109	226.255	143.554	223.723	115.777	100.415	91.755	77.749	102.729	70.456
SD	(49.277)	(21.339)	(44.826)	(21.453)	(11.739)	(15.789)	(69.577)	(36.131	(58.591)	(36.318)	(3.051)
RIÑON	179.005	115.110	94.162	59.763	- - -	14.263	6.573	8.769	4.818	4.676	1.785
SD	(27.465)	(34.152)	(18.338)	(30.266)	- - -	- - -	(1.942)	(1.220)	(2.394)	- - -	(0.876)
PANCREAS	71.405	39.743	61.934	42.270	54.159	24.217	15.564	19.573	17.871	36.645	16.797
SD	(31.242)	(20.230)	(14.460)	(15.570)	(13.596)	(0.069)	(6.939)	(5.844)	(9.726)	(7.612)	(3.269)
PIEL	10.022	7.367	2.753	6.916	6.171	2.643	1.727	2.109	0.436	4.169	0.410
SD	(2.234)	(3.034)	(0.159)	(8.07)	(4.671)	(0.055)	(1.173)	- - -	(0.188)	(1.940)	- - -
SANGRE TOTAL	15.845	15.830	6.72	3.015	6.70	1.61	1.36	1.91	- - -	2.27	1.11
SD	(1.025)	(8.88)	(1.753)	(1.704)	(4.129)	(0.429)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
PLASMA	21.08	22.125	4.949	2.790	4.905	1.700	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
SD	(0.890)	(10.24)	(0.211)	(1.880)	(3.104)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
PAQUETE	7.09	17.295	5.63	2.40	6.245	1.135	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
SD	(0.014)	(14.927)	(1.796)	(1.541)	(3.62)	(0.035)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

TABLA XIX
DATOS PROMEDIO EN cpm/mg O cpm/ul DE ARSENICO EN TEJIDOS CONTRA TIEMPO
DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ARSENICO
(0.250 mCi/kg) EQUIVALENTES A 3 RATONES

TEJIDO	TIEMPO (hrs)										
	0.08	0.25	0.50	0.75	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	24.0
TESTICULO	14.937	9.136	5.855	6.996	7.861	7.626	6.410	3.827	2.682	2.898	0.619
SD	(1.415)	(3.760)	(1.398)	(2.914)	(1.395)	(1.104)	(2.108)	(0.925)	(0.374)	(0.846)	(0.24)
HIGADO	104.17	106.266	74.679	49.551	68.011	49.937	17.520	6.767	3.278	3.935	1.769
SD	(11.922)	(26.505)	(20.388)	(22.961)	(23.946)	(15.106)	(7.934)	(2.230)	(1.049)	(2.116)	(0.87)
RIÑON	1086.991	774.921	583.050	340.356	249.984	162.080	58.257	19.524	14.320	12.301	3.347
SD	(113.45)	(259.118)	(208.57)	(184.020)	(81.716)	(53.28)	(30.456)	(4.137)	(3.075)	(4.26)	(0.755)
PANCREAS	38.188	40.117	34.562	32.422	69.886	27.679	12.836	4.554	3.317	3.941	0.9023
SD	(3.767)	(9.455)	(7.151)	(10.460)	(53.050)	(7.172)	(5.815)	(0.940)	(0.908)	(1.581)	(0.631)
PIEL	45.556	45.404	47.930	26.694	24.965	23.103	16.626	10.051	7.637	7.141	4.243
SD	(22.604)	(8.458)	(24.381)	(10.852)	(8.601)	(4.004)	(7.543)	(7.026)	(3.355)	(1.389)	(0.981)
SANGRE TOTAL	67.04	39.786	25.740	17.336	22.536	10.176	4.976	1.233	2.256	1.033	0.320
SD	(5.412)	(13.74)	(7.487)	(7.975)	(6.825)	(2.419)	(2.809)	(0.610)	(2.172)	(0.279)	- - - -
PLASMA	93.323	44.90	26.05	15.233	15.743	9.26	3.17	1.20	0.895	1.675	0.140
SD	(15.58)	(6.685)	(6.96)	(6.69)	(5.540)	(3.691)	(2.205)	(0.716)	(0.742)	(1.407)	- - - -
PAQUETE	52.520	39.266	24.686	18.296	27.803	11.083	5.413	1.816	1.636	1.10	0.60
SD	(3.012)	(9.644)	(9.160)	(8.278)	(11.096)	(4.488)	(2.591)	(0.234)	(0.890)	(0.122)	(0.147)

TABLA XX
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR EL METODO DE MINIMOS CUADROS PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN ORINA

CURVA ESTANDAR	b	m	r	r^2
I	-121.46	354.43	0.9993	0.9986
II	387.37	338.51	0.9987	0.9974
III	-958.1	375.52	0.9989	0.9978
IV	1253.6	323.58	0.9982	0.9964
Promedio	141.99	347.97	0.9999	0.9998

TABLA XXI
EXACTITUD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA

CONC. DE ^{74}As (pcg/ml)	cpm (6 - V - 82)					S.D.	C.V.%	E.S.
	I	II	III	IV	$\bar{X}$			
0.43	1380	1500	1469	1717	1517	143	9.42	4.7
0.86	3105	3090	2889	2863	2989	131	4.38	2.1
1.72	6374	5962	5728	6245	6077	289	4.8	2.4
3.44	11798	11341	13456	12521	12279	923	7.5	3.7
5.16	19382	18248	17433	18174	18309	804	4.4	2.2
6.88	22922	24783	23133	25031	23967	1093	4.6	2.3
8.60	30747	28399	30342	31748	30309	1404	4.6	2.3
12.90	44278	46421	46681	42124	44876	2127	4.7	2.3
21.50	76865	71885	81157	69833	74925	5087	6.8	3.4

$\bar{X}$ = Valor promedio
S.D. = Desviación estándar
C.V.% = Coeficiente de variación en porciento
E.S. = Error estándar

TABLA XXII
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA

CURVA	CONCENTRACION DE ARSENICO (pcg/ml)							
	0.86	1.72	3.44	5.16	6.88	8.60	12.90	21.50
I	3105	6374	11798	19382	22922	30747	44278	76865
II	3098	5962	11341	18248	24783	28399	46421	71885
III	2889	5728	13456	17433	23133	30342	46681	81157
IV	2863	6245	12521	18174	25031	31748	42124	69833
V	3053	5977	14084	18526	27274	31488	44685	72622
VI	2863	6221	12521	18174	25031	31748	42124	69833
VII	3106	5055	12524	16355	22815	32033	42543	71945
$\overline{X}$ (n=7)	2996.71	6081.85	12606.42	18041.71	24427	30929.28	44122.28	73448.57
S	118.64	216.852	929.26	941.98	1607.26	1268.29	1943.04	4135.72
C.V.%	3.95	3.565	7.377	5.221	6.579	4.10	4.403	5.630
E.S.	1.493	1.347	2.789	1.973	2.487	1.550	1.664	2.128

$\overline{X}$ = Valor promedio
S = Desviación estándar
C.V.% = Coeficiente de variación en porciento
E.S.= Error estándar

TABLA XXIII
PARAMETROS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA

CURVA ESTANDAR	b	m	r	r^2
I	-121.83	354.43	0.9993	0.9986
II	387.37	338.51	0.9987	0.9974
III	-958.1	375.52	0.9989	0.9978
IV	141.99	347.97	0.9999	0.9998
V	1016.83	340.08	0.9985	0.9970
VI	700.496	333.47	0.9982	0.9964
VII	738.04	325.86	0.9986	0.9972
Promedio	580.61	345.12	0.9988	0.9977

TABLA XXIV
PORCENTAJE DE DOSIS EXCRETADA DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As/kg DE PESO A 6 RATONES DE LA CEPA CD_1

RATON / TIEMPO (días)	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	S D
	% DOSIS EXCRETADA							
1	49.18	75.64	71.28	64.91	65.38	59.05	64.24	9.32
2	14.69	8.09	13.49	2.446	3.723	2.102	7.423	5.60
3	4.36	2.32	2.62	1.251	0.838	0.829	2.036	1.366
4	3.31	1.81	1.28	0.644	0.977	0.727	1.461	0.998
5	1.19	0.202	0.580	0.507	0.637	0.554	0.6116	0.321
TOTAL	72.73%	88.06%	89.25%	69.77%	71.55%	63.26%	75.77%	10.51

TABLA XXV
DATOS DE PORCIENTO DE DOSIS ACUMULADA EXCRETADA DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As/kg DE PESO

	% DOSIS ACUMULADA EXCRETADA							
TIEMPO (días)	RATON 1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	SD
1	49.18	75.64	71.28	64.91	95.38	59.05	64.24	9.327
2	63.87	83.73	84.77	67.35	69.10	61.15	71.66	10.13
3	68.23	86.05	87.39	68.60	69.94	61.98	73.69	10.46
4	71.54	87.86	88.67	69.27	70.91	62.708	75.19	10.62
5	72.73	88.06	89.25	69.77	71.55	63.26	75.77	10.51

TABLA XXVI
CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA
COMPUESTOS DE ARSENICO

COMPUESTO	Rf ENCONTRADO	Rf REPORTADO	COLOR DE LA MANCHA
Arsenito de Sodio	0.615	0.54	Amarilla
Arsenato de Sodio	0.264	0.15	Café obscuro
Acido Dimetil Arsénico	0.794	0.68	Café-amarillento
Metil Arsenito de Sodio	-	0.36	Amarillo pálido
Metil Arsenato de Sodio	-	0.36	Amarillo pálido

Cromatoplacas de celulosa F para cromatografía en capa delgada

Sistema de solvente: MeOH: NH_4OH 1N 80:20

Revelador: Solución de $AgNO_3$ 1N/NH_4OH 5%

TABLA XXVII

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA DE LAS MUESTRAS URINARIAS DE 3 RATONES DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 0.500 mCi ^{74}As

R A T O N	Rf_1	Rf_2	Rf_3
1	0.2068	-	0.8275
2	0.2206	-	0.7241
3	0.2107	0.3769	0.706
$\overline{X}$	0.2127	0.3769	0.7525
^{74}As	0.0878	-	-

FIGURA No. 1
LINEARIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN SANGRE
(m = 3549.2; b= 105.09; r= 0.9998; r^2 = 0.9996; n=5)

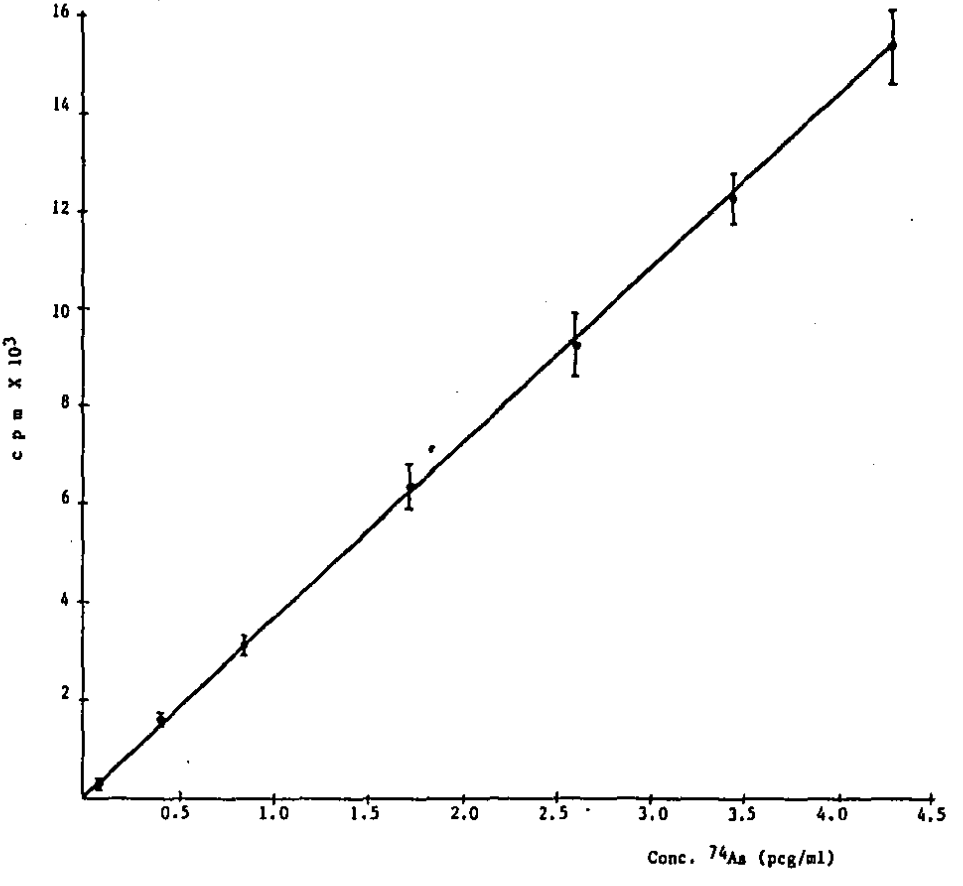


FIGURA No. 2
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN SANGRE

($m = 3503.9$; $b = 127.80$; $r = 0.9980$; $r^2 = 0.9960$; $n = 9$)

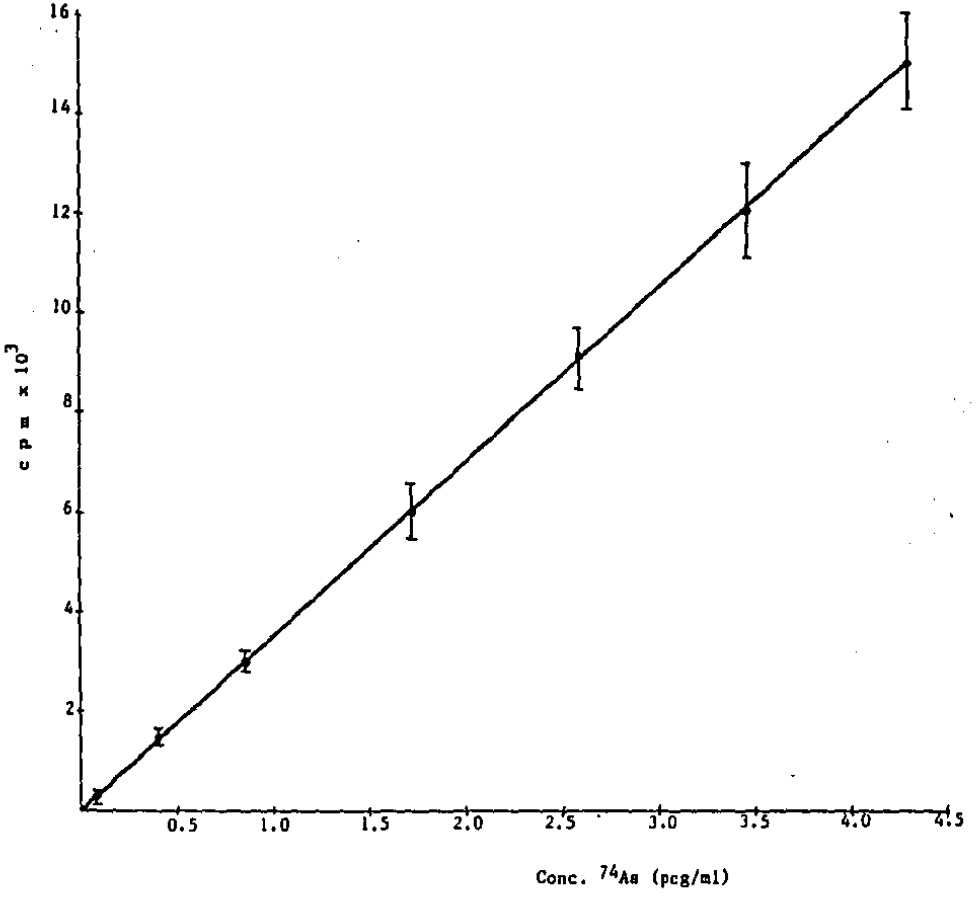


FIGURA No. 3
GRAFICA DEL LOGARITMO NATURAL DE CONCENTRACION DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As a 5 RATONES

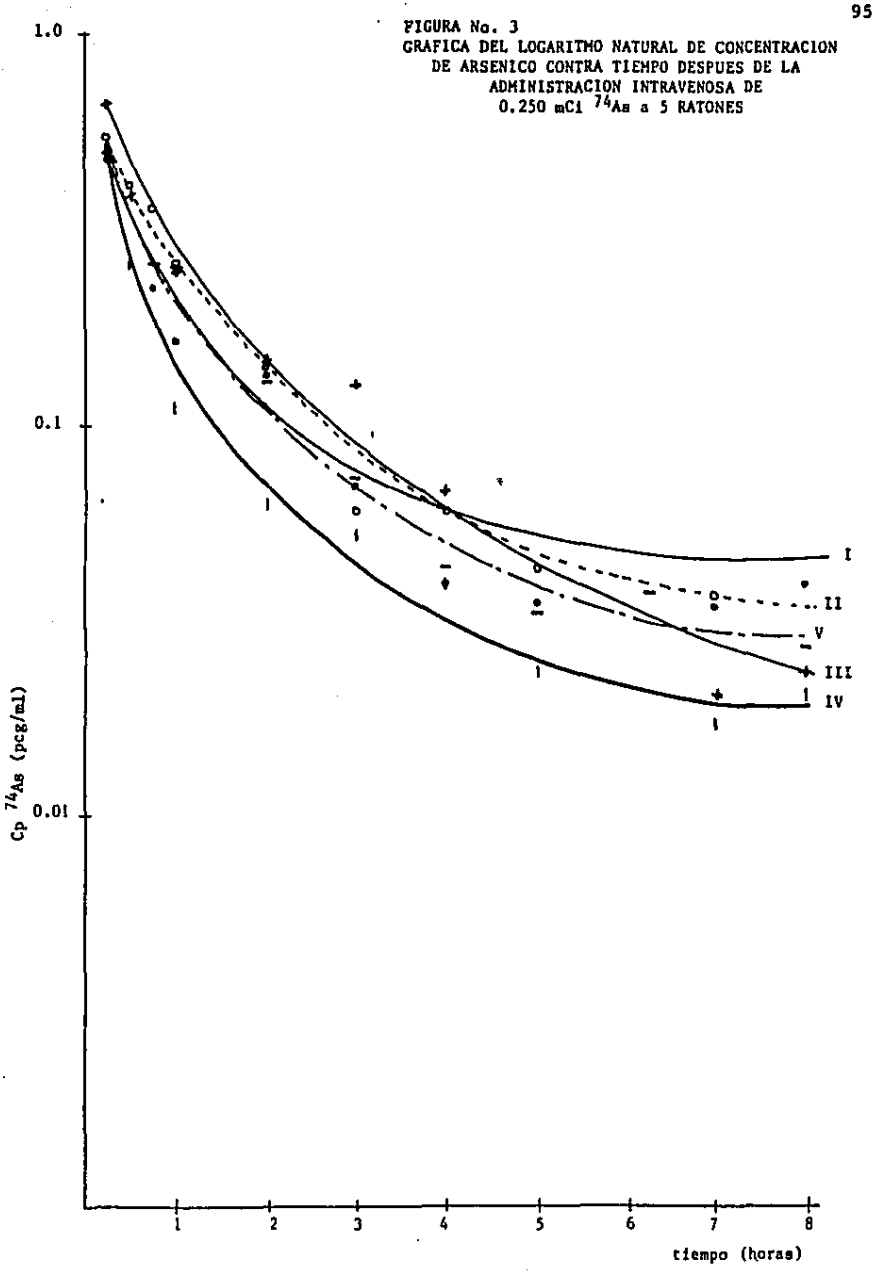


FIGURA No. 4
GRAFICA PROMEDIO DE LOGARITMO NATURAL DE CONCENTRACION DE ARSENICO ± SD CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As A 5 RATONES

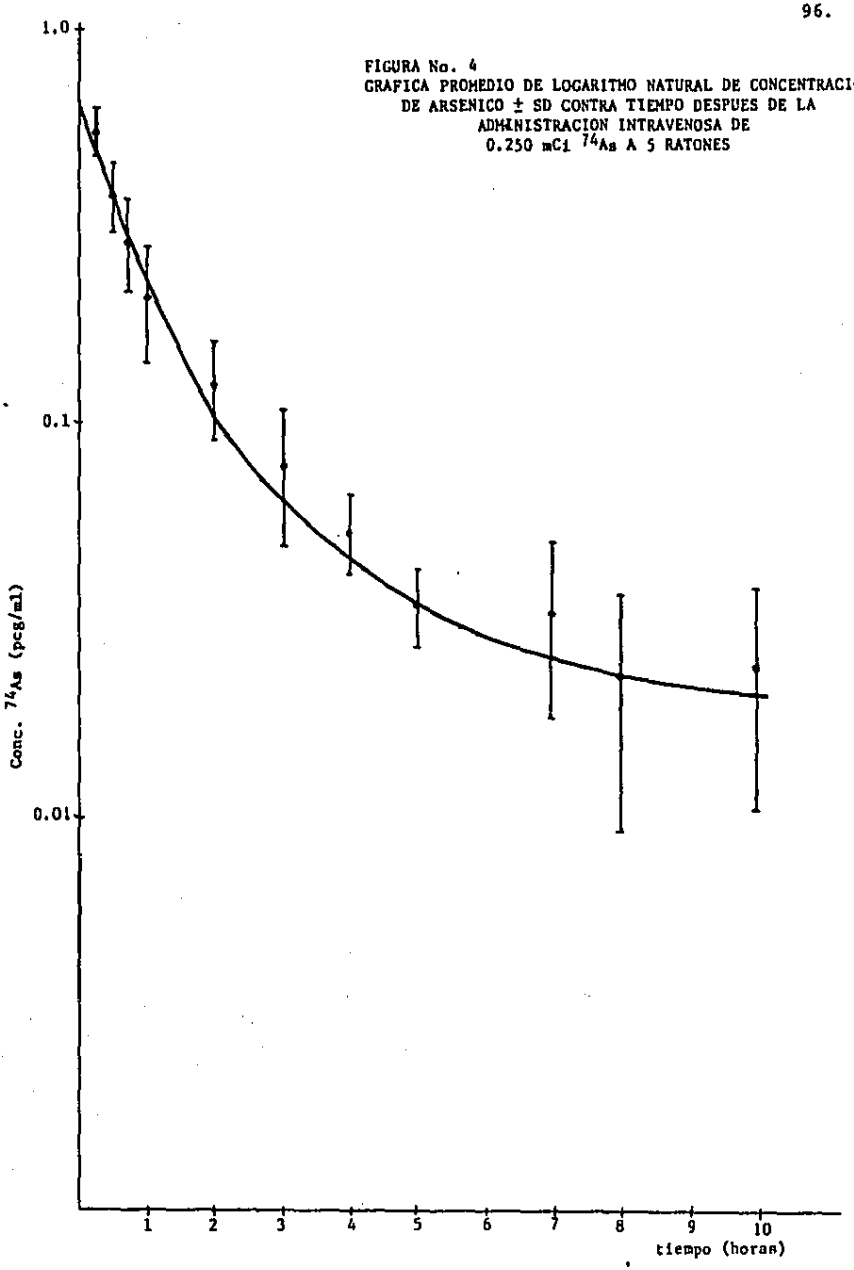


FIGURA No. 6
GRAFICA AJUSTADA DE LOGARITMO NATURAL DE CONCENTRACION DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As/kg DE PESO A 5 RATONES

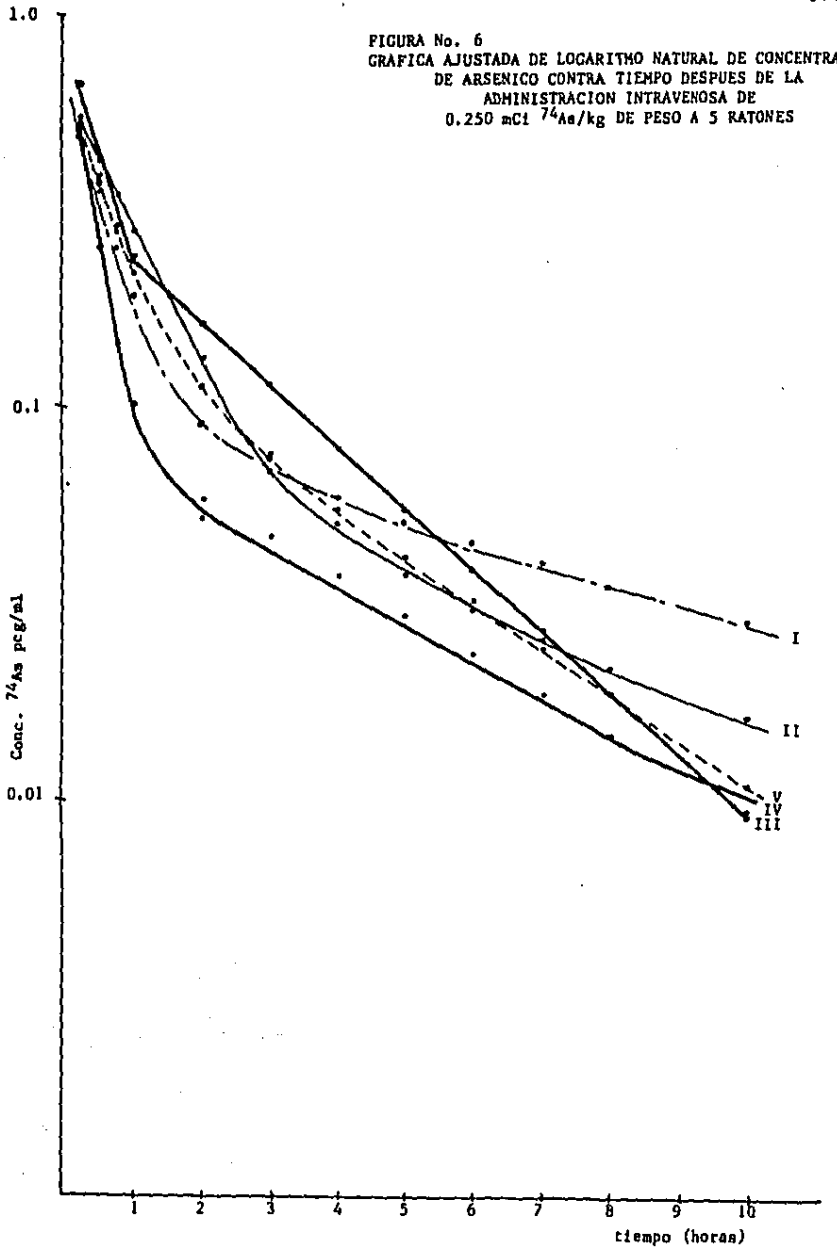


FIGURA No. 7
GRAFICA PROMEDIO DE LOGARITMO NATURAL DE LA CONCENTRACION DE ARSENICO ± SD CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As/kg A CINCO RATONES

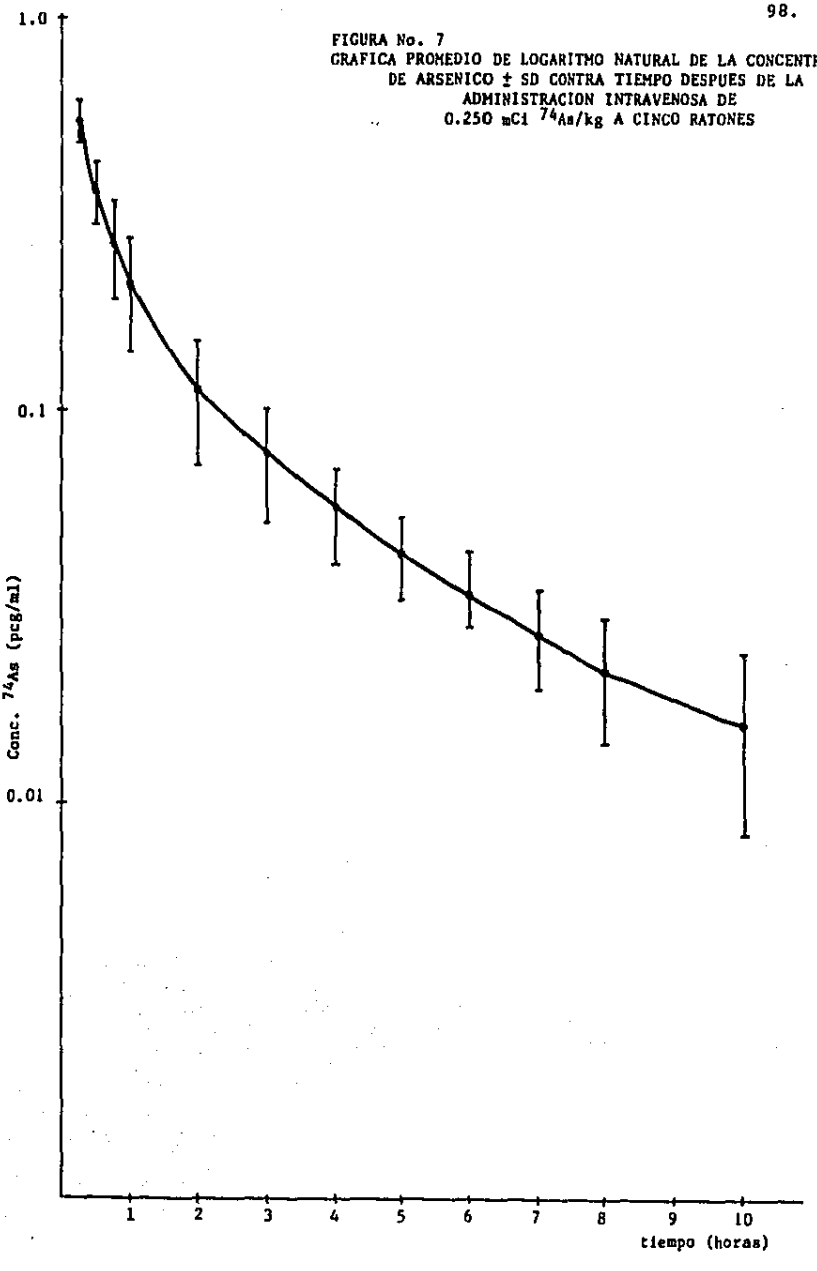


FIGURA No. 8
GRAFICA DEL LOGARITMO NATURAL DE CONCENTRACION DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.5 A 9.0 mg/kg DE PESO A RATONES

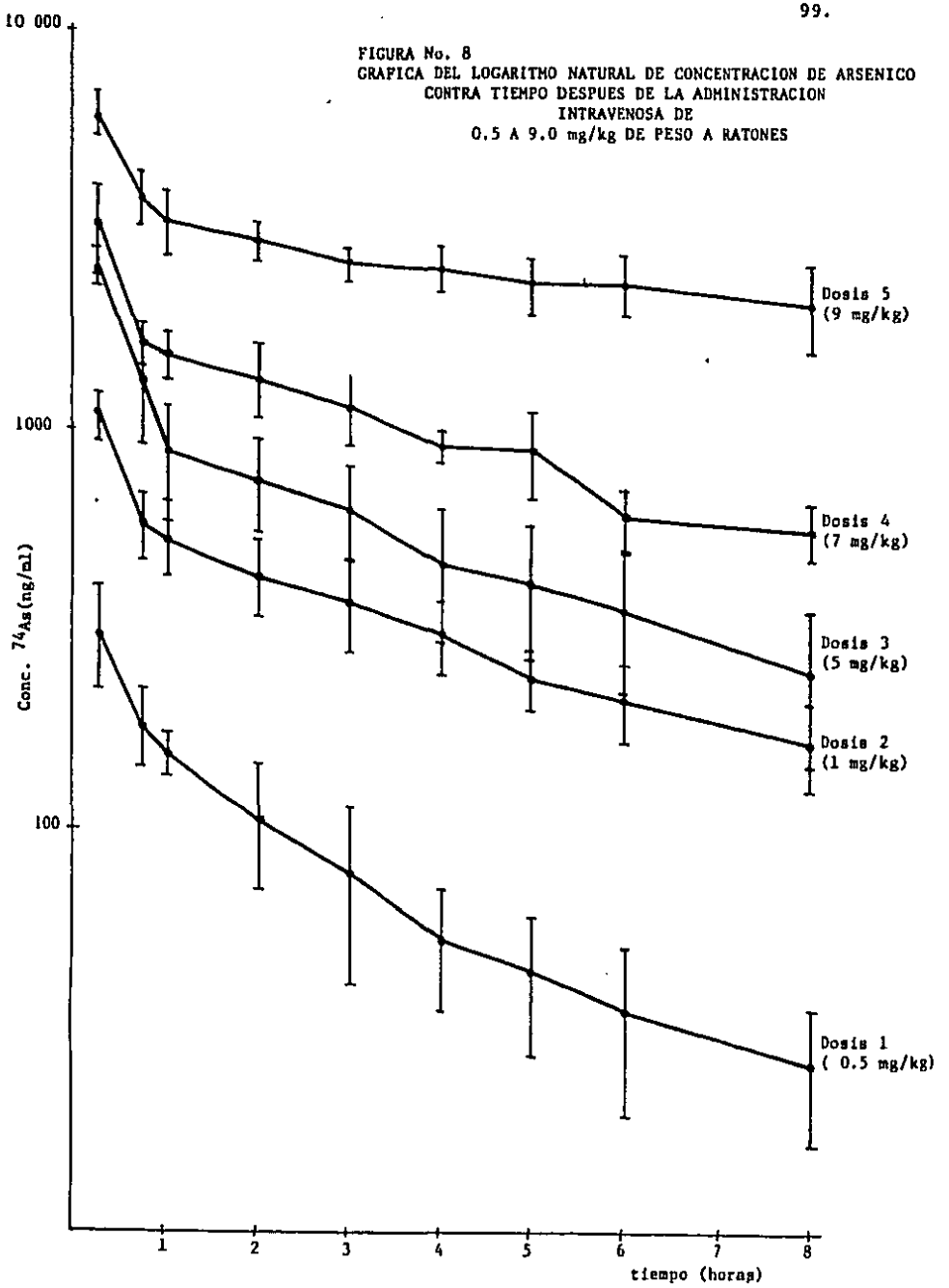
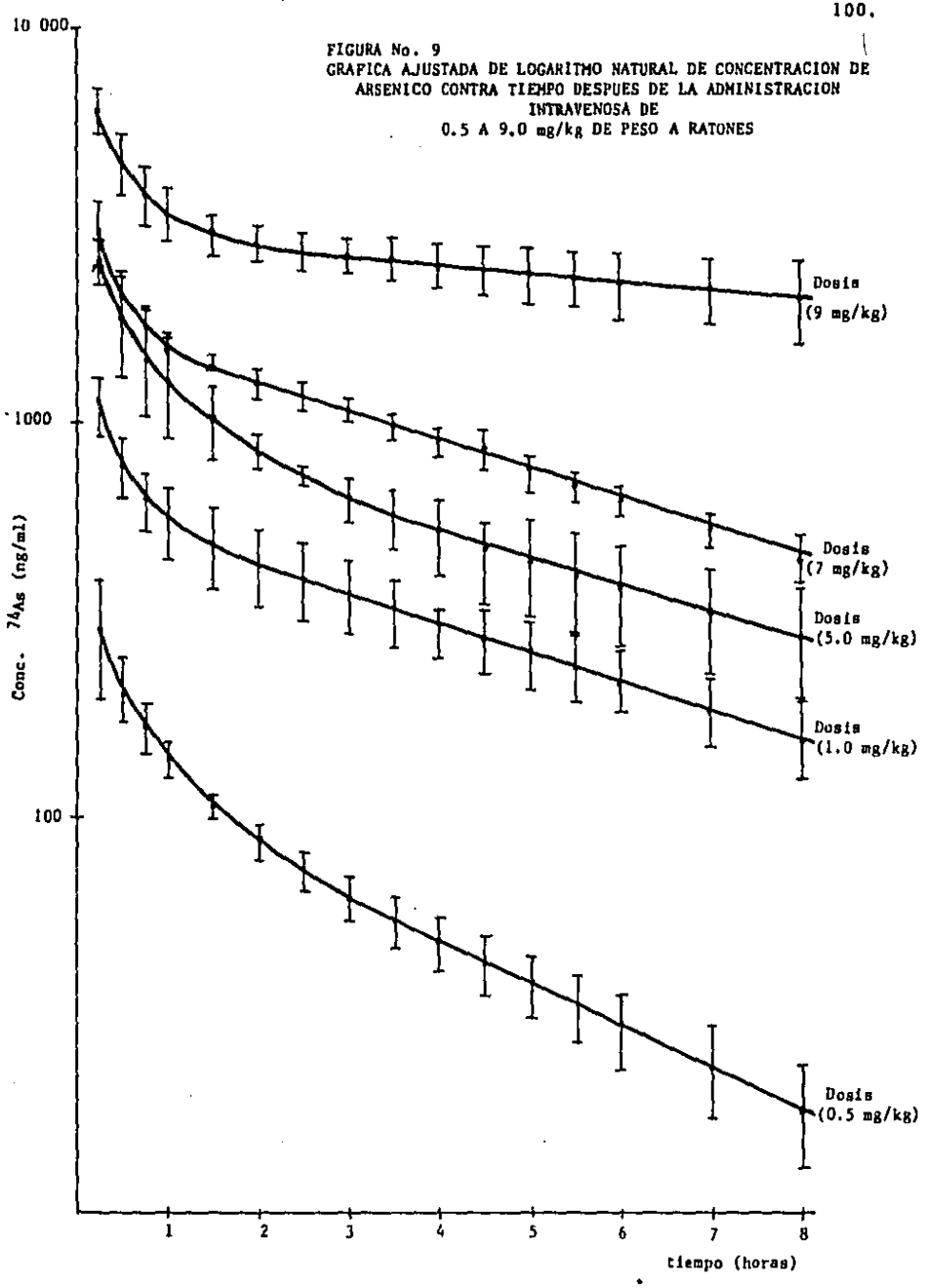


FIGURA No. 9
GRAFICA AJUSTADA DE LOGARITMO NATURAL DE CONCENTRACION DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.5 A 9.0 mg/kg DE PESO A RATONES



LINEARIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN TEJIDOS.
(m= 364.39; b= -9.86; r= 0.9999; r^2= 0.9998 n= 5)

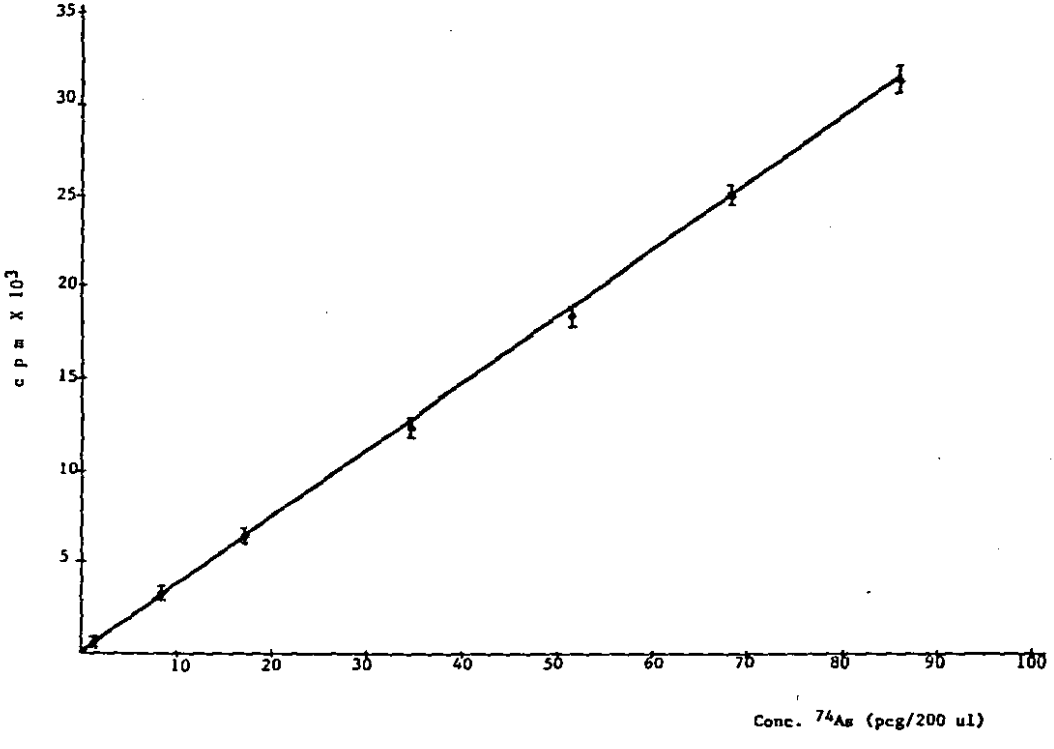


FIGURA No. 11
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN TEJIDOS

(m= 261.346; b= -746.50; r= 0.9996; r^2= -0.9993 n= 5)

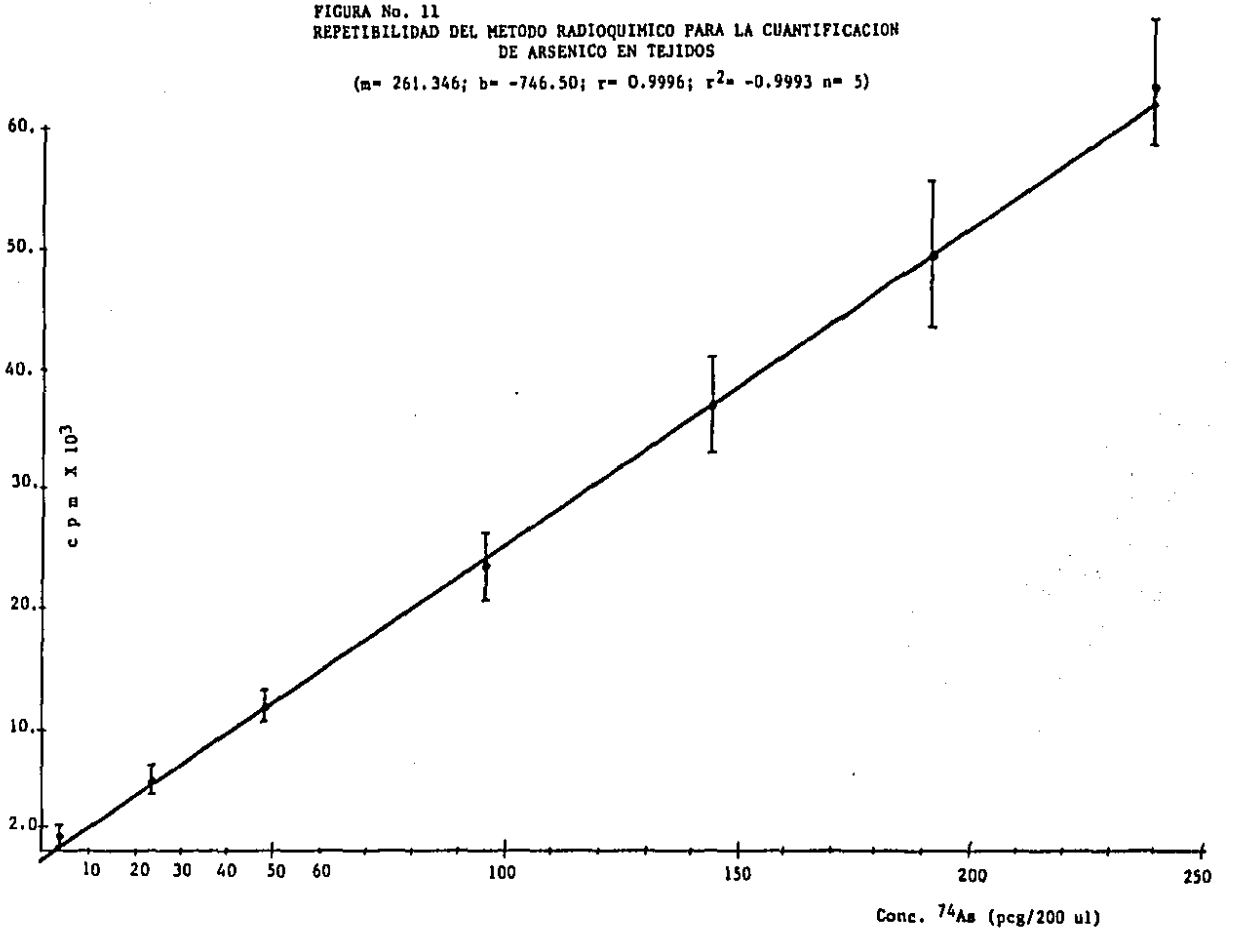


FIGURA No. 12
DISTRIBUCION DE ARSENICO EN TEJIDOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi/kg DE PESO A RATONES

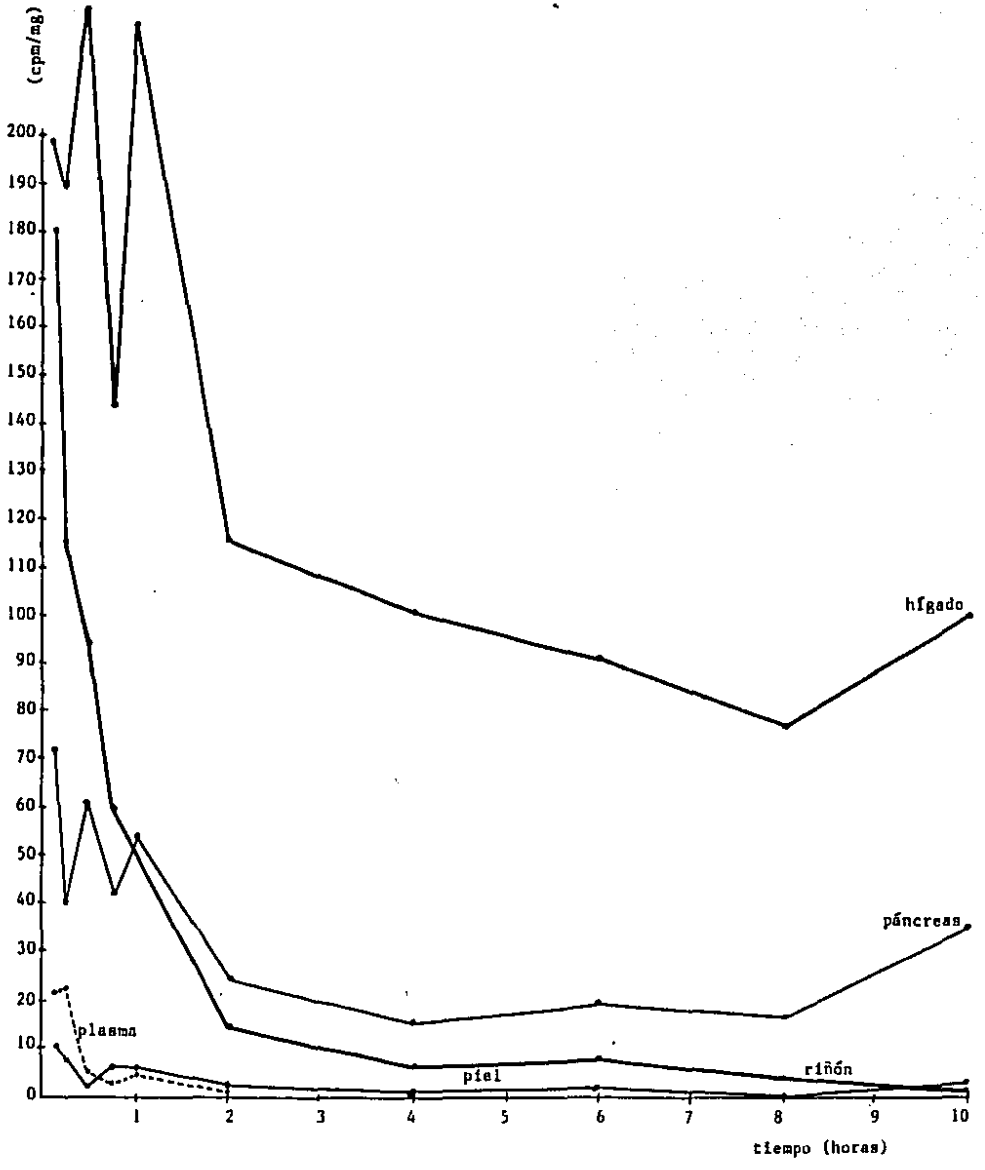


FIGURA No. 13
LINEARIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA

(m= 347.97; b= 141.99; r= 0.999; r^2= 0.9998; n= 4)

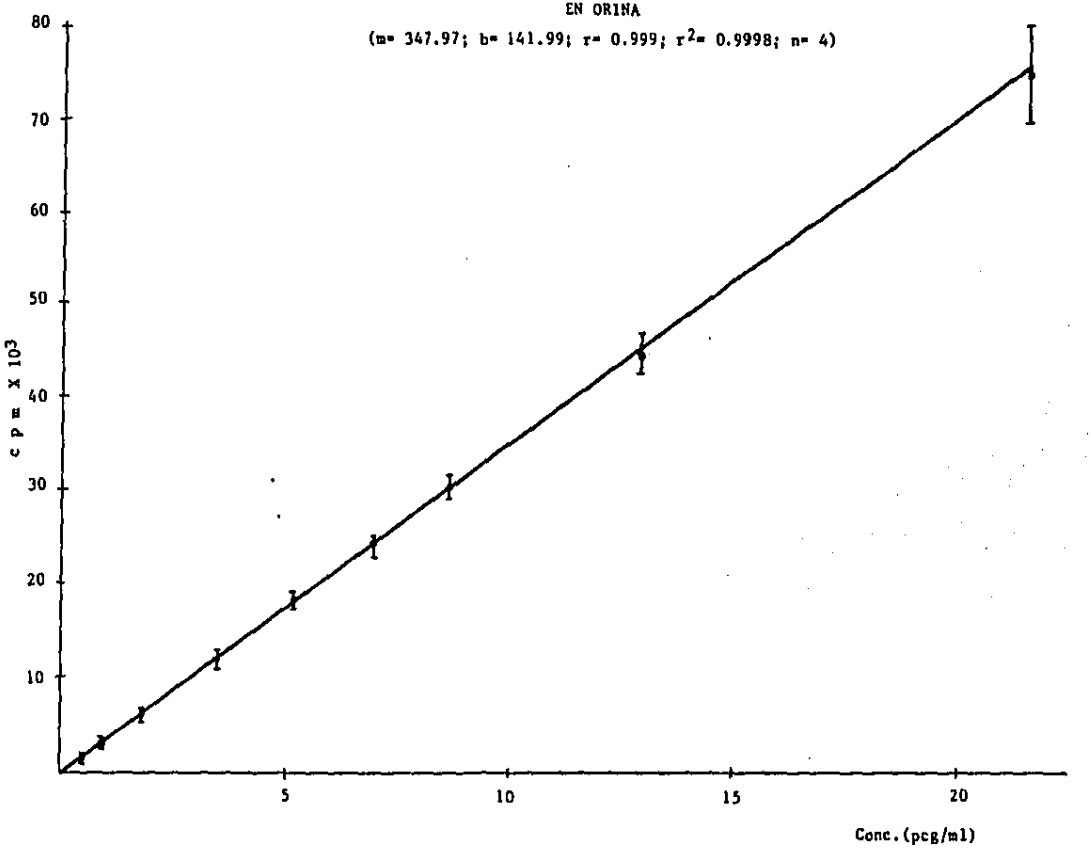


FIGURA No. 14
REPETIBILIDAD DEL METODO RADIOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN ORINA

(m= 345.12; b= 580.61; r= 0.9988; r^2= 0.9977; n= 7)

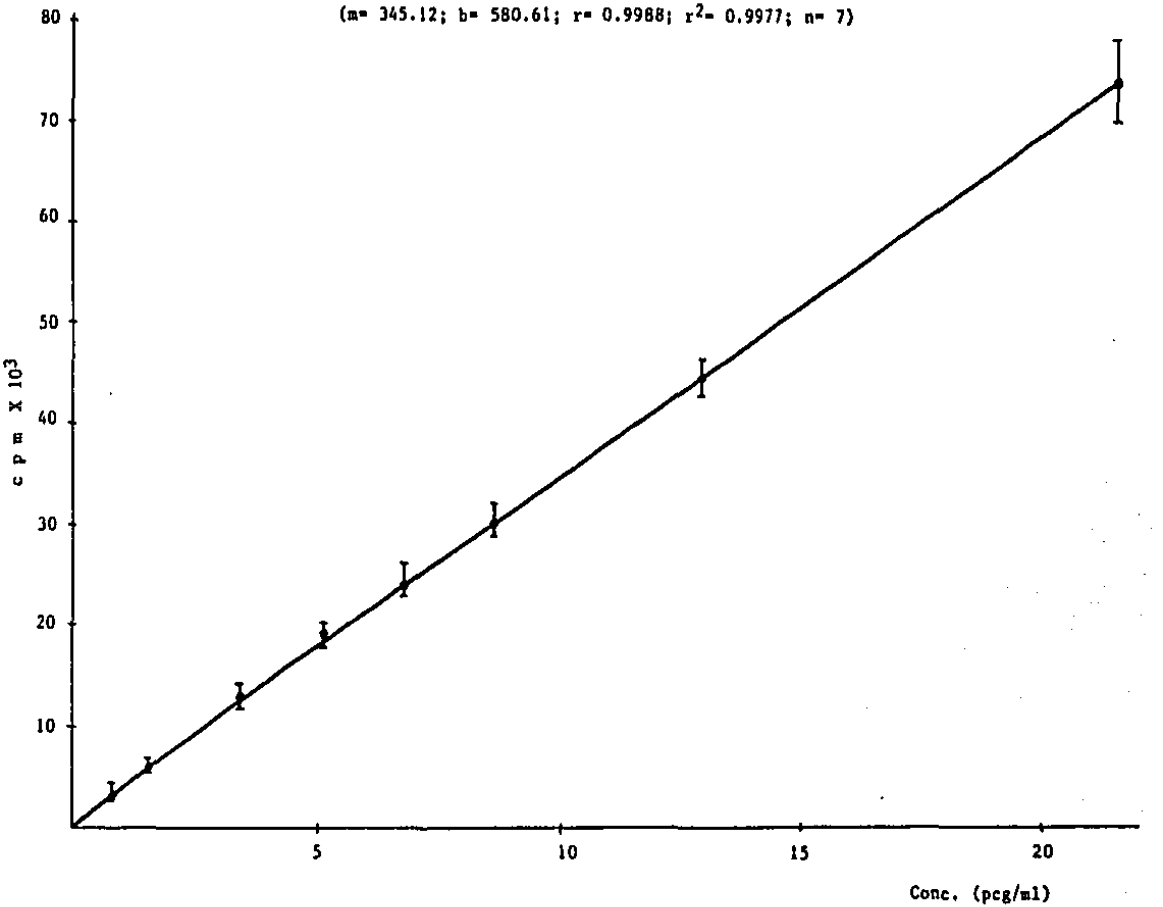


FIGURA No. 15
GRAFICA DE PORCIENTO DE DOSIS EXCRETADA DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As A 6 RATONES

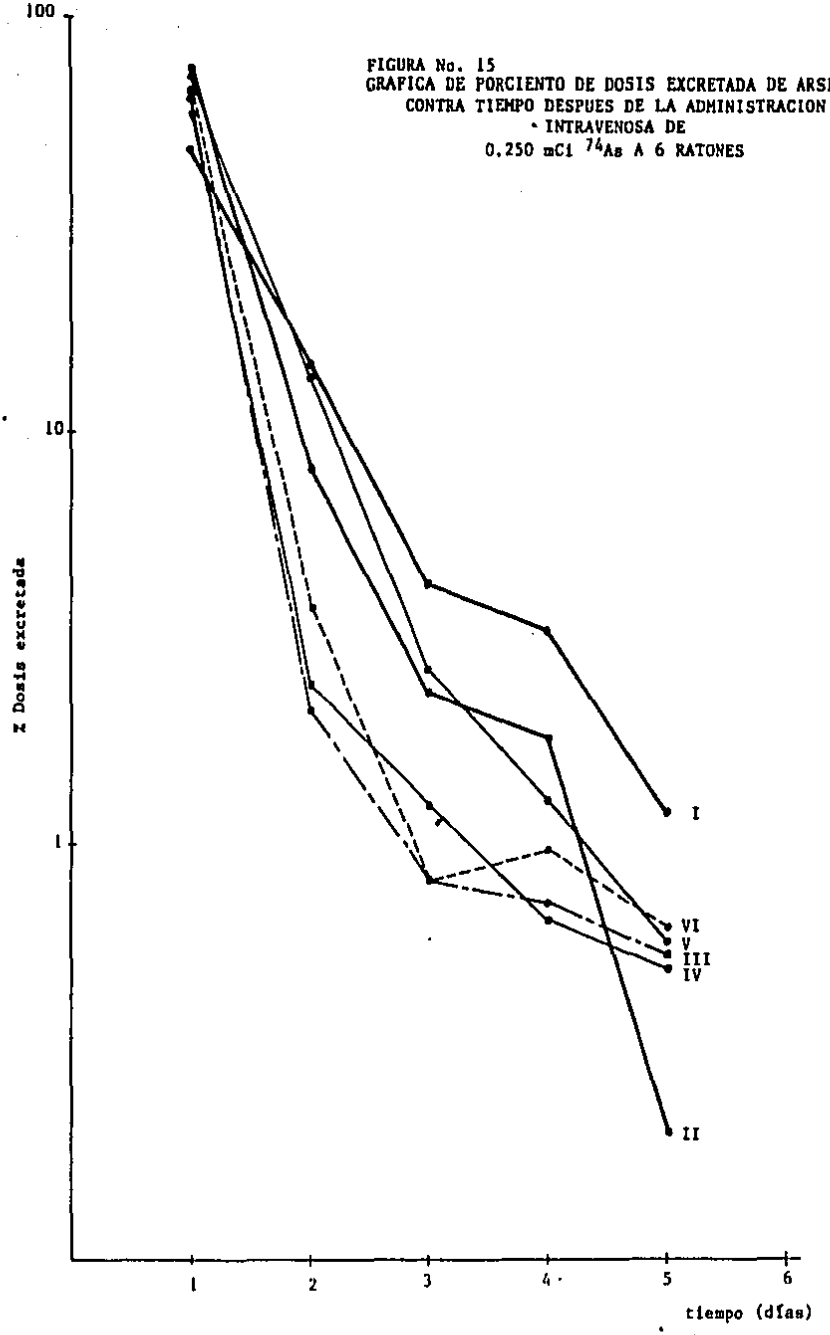


FIGURA No. 16

GRAFICA PROMEDIO DE PORCIENTO DE DOSIS EXCRETADA DE ARSENICO CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE 0.250 mCi ^{74}As

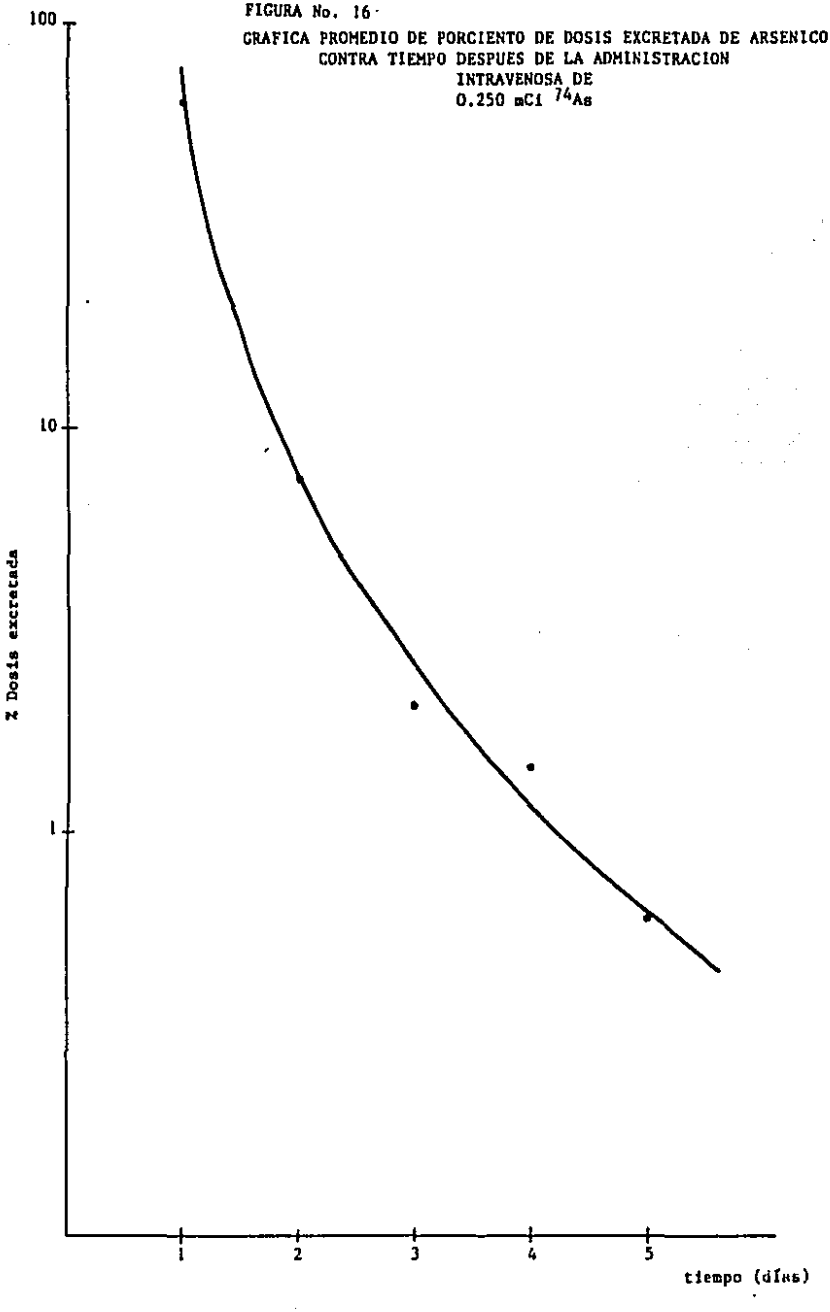
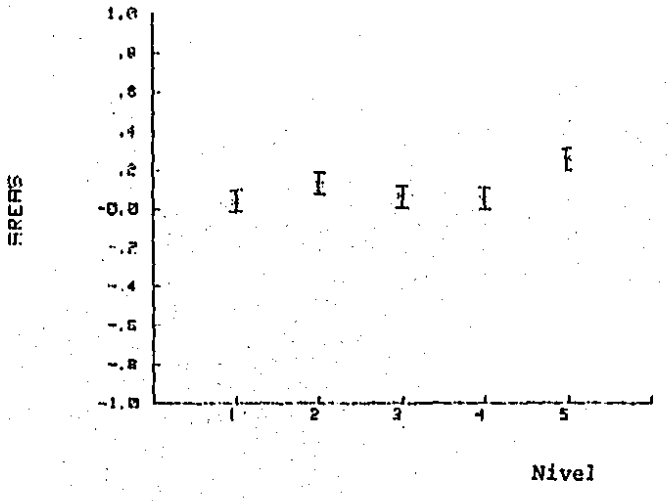


FIGURA No. 17
GRAFICA DE COMPARACION MULTIPLE: Prueba de Tukey
FARMACOCINETICA DEL ARSENICO



VI. DISCUSION

5.1 ARSENICO EN SANGRE

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en cada una de las secciones anteriormente presentadas.

DETERMINACION DE ARSENICO EN SANGRE

5.1.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Como se observa en la figura 1, la determinación de arsénico en sangre por el método radioquímico mostró una linearidad satisfactoria en el intervalo de concentraciones de 0.086 - 4.30 pcg/ml, con un rango en el coeficiente de determinación r^2 entre 0.996 a 0.999 (tabla I).

En la tabla II se puede ver que el coeficiente de variación se encuentra entre 4.57 y 14.12% en el intervalo de concentración estudiado.

5.1.2 REPETIBILIDAD

El método se evaluó considerando la repetibilidad de las determinaciones de concentraciones de arsénico preparadas en nueve ocasiones diferentes. La tabla III muestra que el menor coeficiente de variación fue de 6.63 y el mayor de 17.34%.

5.2 ESTUDIO DE FARMACOCINETICA

Como se observa en las figuras 3 y 4, después de la administración intravenosa del arsénico en ratones, la concentración de sangre disminuye de manera biexponencial.

La tabla VI muestra los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de los datos utilizando tanto un modelo abierto de un compartimento (MAUC) como por un modelo abierto de dos compartimentos (MADC), en la tabla se observa que en cuatro ratones el arsénico se ajusta a un MADC y sólo un ratón de los cinco presenta un MAUC. Por lo tanto se decidió describir al arsénico como un compuesto que se ajusta a un Modelo Abierto de Dos Compartimentos. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura. Vahter (38), en un estudio realizado en ratones utilizando arsénico trivalente y pentavalente encontró que la concentración de éste disminuye de manera biexponencial, eliminándose la mayor parte durante las primeras 24 horas después de su administración.

Una vez obtenido el modelo compartimental, se procesaron los datos en una calculadora TI-59 utilizando el programa para regresión no lineal. La vida media ($t_{\frac{1}{2}}$) que se obtuvo fue de 2.28 horas y el área bajo la curva de cero a infinito (ABC) fue de 0.959 pcg/hr/ml (Tabla VIII).

Otros parámetros calculados fueron el volumen de distribución y la depuración plasmática y renal. Los valores obtenidos son:

Vd = 14.459 litros Cl_p= 13.22 litros/hr
Cl_r= 4.38 litros/hr

Estos valores muestran que el arsénico es un compuesto en el que la eliminación a partir del compartimento central a más rápida que la eliminación del compartimento periférico, el valor de la constante de velocidad K_{12} es de 1.214 hrs^{-1} y el de K_{21} de 0.5990 hrs^{-1}.

El arsénico se elimina también a partir del compartimento central, K_{10} es igual a 1.020 hrs^{-1}.

Debido a esto a pesar de que el arsénico se distribuye ampliamente a tejidos profundos, Vd = 14.459 litros, la eliminación de éste es rápida con una vida media de 2.28 hrs., en cambio en el humano la eliminación del arsénico es muy lenta con un tiempo de vida media de 38.4 días (32).

Hasta el momento no existen en la literatura datos que reporten valores de dichos parámetros farmacocinéticos.

5.3 DOSIS DEPENDENCIA

Existe un gran número de compuestos que al administrarse a dosis altas o cuando se administran de manera crónica presentan desviaciones en su comportamiento farmacocinético lineal. Estas desviaciones se presentan cuando alguno de los procesos de absorción, distribución, metabolismo o excreción se saturan o bien porque se inhibe o induce la secreción de las enzimas que intervienen en la biotransformación. En estos casos la principal observación farmacocinética es un cambio en la constante de eliminación.

Para determinar si un compuesto sigue una cinética

dosis dependiente, éste deberá administrarse a varias dosis y obtener la curva de concentración plasmática contra tiempo para cada una de las dosis. Si las pendientes de dichas curvas no son paralelas, el compuesto sigue cinética no-lineal, y en consecuencia el tiempo de eliminación aumentará cuando se incrementa la dosis.

Los resultados obtenidos después de administrar el arsénico a cinco diferentes dosis muestran que la vida media de eliminación aumentó de 3 - 4.5 horas para las dosis de 0.5, 1.0, 5.0 y 7.0 mg/kg a 15.48 horas para la dosis de 9 mg/kg de peso. (Tabla XI).

Al efectuar el análisis de varianza de una vía para las vidas medias de eliminación obtenidas con las cinco dosis (Tabla XXVIII), se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas, lo cual hace pensar que a dosis altas el arsénico se ajusta a una farmacocinética no-lineal.

TABLA XXVIII
ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VARIABLE PARA EL TIEMPO TIEMPO DE VIDA MEDIA DE ELIMINACION DE ARSENICO DESPUES DE SU ADMINISTRACION INTRAVENOSA A DIFERENTES DOSIS

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD (df)	SUMA DE CUADRADOS (ss)	CUADRADO MEDIO (MS)	F
VIDAS MEDIAS	4	0.0738	0.01847	8.25
ERROR	13	0.02907	0.00224	
TOTAL	17	0.1029		

Nivel de significancia

$F_{0.95} = 3.18$

$F_{0.99} = 5.20$

Otro parámetro que nos permite determinar si un compuesto sigue una cinética no-lineal es el Area Bajo la Curva (ABC).

En compuestos que presentan dosis dependencia, el área bajo la curva no se proporcional a la dosis administrada.

Como se observa en la figura 9, después de la administración de arsénico a 5 diferentes dosis el Area Bajo la curva aumenta de manera proporcional hasta la dosis de 7 mg/kg de peso con un valor de 11571.92 ng/hr/ml. A partir de esta dosis el arsénico muestra una cinética no lineal ya que el ABC para la dosis de 9 mg/kg aumentó a 73256.15 ng/hr/ml.

El análisis de varianza de una vía para el área bajo la curva de las cinco dosis, muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las áreas, Tabla XXIX.

TABLA XXIX
ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VARIABLE PARA EL AREA BAJO LA CURVA DE ARSENICO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA A DIFERENTES DOSIS

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD (df)	SUMA DE CUADRADOS (ss)	CUADRADO MEDIO (MS)	F
AREA BAJO LA CURVA	4	0.1252	0.0313	12.98
ERROR	15	0.0362	0.0024	
TOTAL	19	0.1613		

Nivel de significancia

$F_{0.95} = 3.06$

$F_{0.99} = 4.89$

Con el objeto de determinar entre cual de las cinco dosis administradas se encuentra la diferencia, se realizó una prueba de comparación múltiple entre los valores de área bajo la curva obtenidos, los datos muestran que es la dosis de 9 mg/kg de peso. Figura 17.

5.4 DETERMINACION DE ARSENICO EN TEJIDOS

5.4.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Como se observa en la figura 10, la determinación de arsénico en tejidos mostró una linearidad satisfactoria en el rango de concentración de 1.72 a 86.0 pcg/ml, el coeficiente de determinación obtenido (r^2) fue de 0.998 a 0.999 (Tabla XIV).

En la tabla XV se puede observar que el coeficiente de variación obtenido se encuentra entre 1.73 y 7.34 para todas las dosis excepto para la concentración menor (1.72 pcg) cuyo valor es de 33.63%.

5.4.2 REPETIBILIDAD

Se evaluó la repetibilidad del método, la tabla XVI muestra que el coeficiente de variación va de 9.31% a 27.79% para la dosis más pequeña.

5.5 ESTUDIO DE DISTRIBUCION DE ARSENICO

Como se observa en las tablas XVIII y XIX, después de la administración intravenosa de arsénico, la mayor parte de éste desaparece rápidamente del torrente circulatorio y se distribuye a diversos tejidos encontrándose en

mayor proporción en hígado y riñón, y en menor cantidad en piel, páncreas, testículo, sangre, plasma y paquete. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura. Vahter y col. (38), encontraron que después de administrar arsénico como arsénico trivalente o pentavalente, éste se distribuye en mayor proporción en hígado, riñón y vesícula biliar, y en menor cantidad en cerebro, hueso y piel.

La figura 12 muestra que la distribución del arsénico muestra dos fases, una fase distribución rápida que ocurre durante los primeros minutos después de la administración de arsénico hasta las dos horas aproximadamente y una fase lenta que se presenta dos horas después y de donde la eliminación ocurre lentamente..

En la tabla XVIII se observa que la concentración de arsénico en plasma, sangre total y paquete celular disminuye rápidamente. En plasma y en paquete la concentración es tan pequeña que no se pudo determinar después de dos horas de la administración.

En la tabla XIX que corresponde al grupo de ratones que recibieron una dosis mayor de arsénico, se observa que en el arsénico desaparece rápidamente de estos fluídos y aunque aquí se detectaron concentraciones de arsénico en plasma hasta las 24 horas después de la administración, la concentración a este tiempo corresponde a un 0.15% de la concentración inicial.

5.6 DETERMINACION CUANTITATIVA DE ARSENICO EN ORINA

5.6.1 LINEARIDAD Y EXACTITUD

Como se observa en la figura 14, la determinación de

arsénico en orina mostró una linearidad satisfactoria en el rango de concentración de 0.43 - 21.50 pcg/ml, el coeficiente de determinación (r^2) obtenido fue de 0.996 a 0.999 (Tabla XX).

En la tabla XXI se puede ver que el coeficiente de variación del método se encuentra entre 4.4 y 9.42% en el intervalo de concentración estudiado.

5.6.2 REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó considerando las determinaciones de concentraciones de arsénico preparadas en siete ocasiones diferentes.

La tabla XXII muestra que el menor coeficiente de variación fue de 3.56% y el más alto de 7.37%. Estos valores indican que el método es repetible en las determinaciones realizadas en diferentes días, por lo tanto el método se consideró adecuado para realizar el estudio de excreción y metabolismo de arsénico en ratones.

5.7 ESTUDIO DE EXCRECION DE ARSENICO EN RATONES

En la tabla XXIV se muestra que el porciento de dosis excretada durante cinco días después de la administración intravenosa de arsénico. Los datos muestran que el arsénico se elimina rápidamente durante las primeras 24 horas después de su administración, obteniéndose un valor promedio de 64.24 ± 9.32% durante el primer día, éste valor representa el 84.7% del total de la dosis eliminada. El porciento eliminado después de cinco días de la administración es 0.61 ± 0.32%, que corresponde a un

0.80% del total eliminado.

El total de la dosis excretada durante los cinco - días fue de 75.77 ± 10.51% de la dosis.

Estos datos indican que la principal vía de eliminación del arsénico en ratones es la renal, en este estudio no se determinó la eliminación en heces.

Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura. Vahter y col. (38), reportaron que después de la administración oral de 0.4 mg/kg de peso arsénico en ratones, el porciento recuperado en orina durante las primeras 24 horas es de 66 ± 2.2% y en heces de 7.6 ± 1.6%.

En la figura 15 se muestran las gráficas individuales de la dosis excretada en orina contra tiempo de los seis ratones estudiados. Estas gráficas muestran que después de la administración intravenosa del arsénico, su cinética es biexponencial. Este perfil es consistente con la cinética de un modelo abierto de Dos Compartimentos mismo que se obtuvo en el estudio de farmacocinética.

5.8 METABOLISMO DE ARSENICO EN RATONES

5.8.1 SEPARACION DE LOS METABOLITOS DE ARSENICO EN ORINA

La mayor parte de la radioactividad de arsénico después de pasar las muestras de orina colectadas durante - las primeras veinticuatro horas a través de la columna - de intercambio se encuentra en las - - - - -

fracciones eluídas con hidróxido de amonio al 20% (V/V) y en menor grado las fracciones eluídas con ácido clorhídrico 0.5 N.

Unicamente para el ratón No. 1 se observa un ligero aumento en la radioactividad en las fracciones eluídas - con agua desionizada.

Estos perfiles de elución indican la presencia de arsénico inorgánico (arsenito o arsenato) en las fracciones obtenidas con el ácido clorhídrico 0.5 N, de ácido dimetil arsénico en las fracciones eluídas con hidróxido de amonio al 20% y de ácido monometil arsénico en las fracciones eluídas con agua desionizada.

5.8.2 IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DE ARSENICO EN ORINA

La tabla XXIV, muestra los valores de Rf obtenidos experimentalmente, estos valores concuerdan con los reportados en la literatura (55).

En el cromatograma de las muestras de orina del ratón No. 3, que fueron las muestras que presentaron mayor radioactividad, se presentan en mayor proporción un compuesto altamente polar en las fracciones eluídas con hidróxido de amonio al 20%; (fracciones 61, 62 y 63), el Rf de este compuesto fue de 0.707 y en menor proporción un compuesto poco polar en las fracciones 4 y 6, este compuesto mostró un Rf de 0.165 . Estos valores de Rf corresponden al ácido dimetil arsénico y el arsenato de sodio respectivamente.

Se obtuvieron resultados similares para los ratones

No. 1 y 2 .

El cromatograma de las muestras de orina eliminadas durante las primeras 24 horas, sin pasar las muestras por la columna de intercambio, se observa principalmente la presencia de dos metabolitos en las muestras, un compuesto con Rf de 0.7525 y el otro de Rf de 0.2127, estos valores corresponden al derivado dimetilado del arsénico y al arsénico inorgánico (As^{5+}) y en menor proporción pero detectable se observa la presencia de un compuesto de polaridad media con un valor de Rf de 0.3769, este valor concuerda con el valor reportado de 0.36 para el ácido monometil arsénico.

Este último compuesto no se detectó en las otras - muestras debido a que no se pudo contar con muestras concentradas de orina.

Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado. Vahter (54),reporta que después de la administración oral de 0.04 mg/kg de peso de arsénico pentavalente en ratones, se recupera en orina un 76.6% del derivado dimetilado, el 16.6% de arsénico inorgánico y un 0.8% de la dosis como derivado monometilado.

C A P I T U L O VIII

CONCLUSIONES

1.- De acuerdo a los resultados obtenidos, el método radioquímico utilizado para la cuantificación de arsénico en sangre, tejidos y orina mostró ser lineal y repetible en el rango de concentraciones estudiadas por lo cual se consideró adecuado para realizar los estudios de Farmacocinética.

2.- En el ratón el arsénico se ajusta a un modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC), con una vida media de eliminación de 2.28 horas. El volumen de distribución que presenta es alto, siendo de 14.45 litros y su depuración plasmática y renal de 13.22 y 4.38 litros/hora respectivamente.

Las microconstantes de transferencia que caracterizan a un Modelo Abierto de Dos Compartimentos fueron para K_{21} de 0.599 (hrs^{-1}), de 1.214 para K_{12} y de 1.0205 para K_{10}.

3.- A dosis mayores de 7 mg/kg de peso el arsénico sigue una farmacocinética no lineal. A dosis de 9 mg/kg de peso el tiempo de vida media de eliminación encontrado fue de 15.48 hrs.

4.- El arsénico es un compuesto que se distribuye ampliamente en el ratón, encontrándose en mayor proporción en hígado y riñon, y en menor cantidad en piel, plasma, páncreas, sangre, paquete y testículo.

La velocidad de distribución es rápida ya que a los 15 minutos, después de su administración, se detecta en los tejidos.

5.- La principal vía de eliminación del arsénico en ratones es la renal. Después de la administración intravenosa de arsénico del 63 al 89% se recupera en orina, eliminándose la mayor parte de la dosis durante las primeras 24 horas.

6.- Los metabolitos del arsénico inorgánico en ratones son el ácido dimetil arsénico, ácido monometil arsénico y arsénico inorgánico, siendo el principal metabolito el derivado dimetilado.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1.- NAS, Medical and Biologic effects of Environmental Polluants, Arsenic National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1977).

2.- U.S. Public Health Service, Drinking Water Standars, PHS Publ. No. 956, Washington, D.C. (1962).

3.- Lindberg, S.E., A.W. Andrews, R.J. Aridon and W. Fulkerson, Mass balance of trace elements in walker branch watershed. The relation of coal fired steam plants; Envirom. Health Perspect, 12: 9-18 (1975).

4.- Jelinek, C.F.; P.E. Corneliussen: Levels of arsenic in the United States food seeply; Envirom. Health Perspect, 19: 83-87 (1977).

5.- Vladimir, B: Carcinogenic, Teratogenic and Mutagenic effects of Arsenic; Envirom. Health Perspect, 19: 179-182 (1977).

6.- Sandell, E.B., Colorimetric determination of trace metals, Interscience Publisher, 3a. ed (1959).

7.- Peoples, S.A; J.V. Lakso; T. Lais: The simultaneus determination of methyl arsenic acid and inorganic arsenic in urine, Proc. West Pharmacol. Soc, 14: 178-182 (1971).

8.- Holak, W., Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectroscopy, Anal. Chem, 41: 1712-1713 (1969).

9.- Walter, R.L; R.D. Willis; W.F. Gutknecht; J.M. Joyce, Anal. Chem. 46: 843-855 (1974).

10.- Fowler, B.A; R.C. Fay; R.L. Walter: R.D. Willis; W.F. Gutknecht; Envirom. Health Perspect. 12: 71-76 (1975).

11.- Myers, D.J; J. Osteryoung; Anal. Chem, 45: 267-271 (1973).

12.- Braman, R.S; C.C. Foreback; Methylated forms of arsenic in the environment., Science 182: 1247-1249 (1973).

13.- Lunde, G., J. Sci. Food. Agric, 26: 1247-1255 (1975).

14.- Tam, K.H; S.M. Charbonneau; F. Bryce; G. Lacroix; Separation of arsenic of As^{74} metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection., Anal. Biochem. 86: 505-511 (1978).

15.- Reay, P.F; C.J. Asher; Preparation and purification of As^{74} labeled arsenate and arsenite for use in biological experiments; Anal. Biochem. 78: 557-560 (1977).

16.-Miketukova, V., Separation of arsenite and arsenate ions by paper chromatography. Study of a methanol-water system; J.Chromatogr. 34: 284-288 (1968).

17.- Lunde, G., The synthesis of fat and water soluble arseno organic compounds in marine and limnetic algae., Acta Chem. Skand. 27: 1586-1594 (1973).

18.- Martindale, W; The Extra Pharmacopeia, A. Wade and J.E.F. Reynolds Eds., 27th ed. 1721-1723, The Pharmaceutical Press, London; (1977).

19.- Jelineck, C.F; P.E. Corneliussen; Levels of arsenic in the Unites States food seeply; Envirom. Health Perspect; 19: 83-87 (1977).

20.- Johnson, R.D; D. Wanske; D. Pobrebarac; Pesticide, metal and other chemical residues in adult total diet samples. August 1975 - July 1976., Pesticides Mont. J. 15: 54-69 (1981).

21.- U.S. Public Health Service, Drinking Water Standars, P.HS Publ. No. 956 Washington, D.C. (1962).

22.- Kappanna, A.N; G.T. Gafre; H.M. Bhavnagard; J.M. Jeshi; Curr. Sci. 31: 273-274 (1967).

23.- Durum, W.H; J.D. Hem; S.G. Heidel: Geological Survey Circular 643 U.S. Department of Interior, Washington, D.C. (1971).

24.- Walsh, L.M; M.E. Summer; D.R. Keeney. Occurrence and distribution of arsenic in soils and plants; Envirom. Health Perspect. 19: 67-72 (1977).

25.- Woolson. E.A., Fate of arsenicals in different environmental substrates., Envirom. Health Perspect. 19: 73-81 (1977).

26.- Patty, F.A., Industrial Hygiene and Toxicology, 2nd edn., Interscience Publishers, John Wiley & Sons, New York (1962).

27.- Kodama, Y.; N. Ishinishi; E. Kunitake; T. Inamasu, and K. Nobutomo; Effects and dose-response relationships of toxic metals, G.F. Nordberg ed., pp. 464-470, Elsevier, Amsterdam (1976).

28.- Holland, R.H.; M.S. McCall; and H.C. Lanz; A study of inhaled arsenic 74 in man., Cancer Res. 19: 1154-1156 (1959).

29.- Pinto, S.S., M.O. Varner; K.W. Nelson; A.L. Labbe; and L.D. White; Arsenic trioxide absorption and excretion in industry., J. Occup. Med. 18: 677-680 (1976).

30.- Bencko, V. and K. Symon; The cumulation dynamics in some tissue of hairless mice inhaling arsenic., Atmos. Envirom. 4: 157-161 (1970).

31.- Dutkiewicz, T., Experimental studies on arsenic absorption routes in rats., Envirom. Health Perspect. 19: 173-177 (1977).

32.- Pomroy, C.; S.M. Charbonneau; R.S. McCullough; and G.K.H. Tam; Human retention studies with As^{74}, Toxicology and Applied Pharmacology 53: 550-556 (1980).

33.- Battley, F.R. and J.A. O'Shea, The absorption of arsenic and its relation to carcinoma, British J. of Dermatol. 92: 563-568 (1975).

34.- Coulson, E.J., R.E. Remington; and K.M. Lynch; Metabolism in the rat of the naturally occurring arsenic of shrimp as compared with arsenic trioxide., J. Nutr. 10: 255-270 (1935).

35.- Mealey, J., G.L. Brownell; and W.H. Sweet; Radioarsenic in plasma, urine, normal tissues and intracranial neoplasms., AMA Archives of Neurol. and Psychiatry 81: 310-320 (1959).

36.- Charbonneau, S.M., K. Spencer; F. Bryce; and E. Saeadi; Arsenic excretion by monkeys dosed with arsenic containing fish or with inorganic arsenic., Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 20: 470-477 (1978).

37.- Hollins, J.G., S.M. Charbonneau, F. Bryce, J.M. Ridgeway, G.K.H. Tam, and R.F. Willes, Whole body retention and excretion of (As^{74}) arsenic acid in the adult beagle dog., Toxicol. Letters 4: 7-13 (1979).

38.- Vahter, M., and H. Norin, Metabolism of As^{74}-laveled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice., Envirom. Research 21: 446-457 (1980).

39.- Dutkiewicz, T., Experimental studies on arsenic absorption in rats, Envirom. Health Perspect. 19: 173-177 (1977).

40.- Lanz, H., P.C. Wallace, and J.G. Hamilton, The metabolism of arsenic in laboratory animals using As^{74} as tracer., Univ. California Publ. Pharmacol. 2: 263-282 (1950).

41.- Charbonneau, S.M., J.G. Hollins, G.K.H. Tam, F. Bryce, J.M. Ridgeway, and R.F. Willes, Whole body retention, excretion and metabolism of (As^{74}) arsenic acid in the hamster., Toxicol. Letters 5: 175-182 (1980).

42.- Hunter, F.T., A.F. Kip and J.W. Irvine, Radioactive tracer studies on arsenic injected as potassium arsenite., J. Pharmacol. Exp. Ther. 76: 221-225 (1942).

43.- Ferm, V.H., Arsenic as an teratogenic agent., Envirom. Health Perspect. 19: 215-217 (1977).

44.- Kadowaki, K., Studies on the arsenic contents in organ-tissues of the normal japanese., Osaka City Med. J. 9: 2083-2099 (1960).

45.- Braman, R.S. and C.C. Foreback, Methylated forms of arsenic in the enviroment., Science 182: 1247-1249 (1973).

46.- Crecelius, E.A., Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man., Envirom. Health Perspect. 19: 147-150 (1977).

47.- Tam, G.K.H., S.M. Charbonneau, F. Bryce, C. Pomroy, and E. Sandi, Metabolism of inorganic arsenic (As^{74}) in humans following oral ingestion., Toxicol. and Pharmacol. 50: 319-322 (1979).

48.- Buchet, J.P., R. Lauwergs, and H. Roels, Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethyl arsenate or dimethyl arsenate in man., Int. Arch. Occup. Envirom. Health 48: 71-79 (1981).

49.- Smith, T.J., E.A. Crecelius, and J.C. Reading, Airborne arsenic exposure and excretion of methylated arsenic compounds., Envirom.Health Perspect. 19: 89-93 (1977).

50.- Buchet, J.P., R. Lauwergs, and H. Roels, Urinary excretion of inorganic arsenic acid and its metabolites after repeated ingestion of sodium meta-arsenite by volunteers., Int. Arch. Occup. Envirom. Health 48: 111-118 (1981).

51.- Charbonneau, S.M., G.K.H. Tam, F. Bryce, Z. Zawidzka, and E. Sandi, Metabolism of orally administered inorganic arsenic in the dog., Toxicol. Letters 3: 107-113 (1979).

52.- Lakso, J.U. and S.A. Peoples, Methylation of inorganic arsenic by mammals., J. Agric Food Chem. 23: 674-676 (1975).

53.- Tam, K.H., S.M. Charbonneau, F. Bryce, and G. Lacroix, Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of As^{74}., Analyt. Biochem. 86: 505-511 (1978).

54.- Vahter, M., Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats., Envirom. Res. 25: 286-293 (1981).

55.- Tam, K.H., S.M. Charbonneau, C. Lacroix, and F. Bryce, Confirmation of inorganic arsenic acid. Dimethylarsinic acid in urine and plasma of dog by ion-exchange and TLC., Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 21: 371-374 (1979).

56.- Muir, K.T; Non linear list squares regression analyses in pharmacokinetic: Application of a programable calculators in model parameter stimation. Comput. Biomed. Res. 13: 307-316 (1980).