



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**EFFECTO AGUDO DEL ARSENITO DE SODIO SOBRE LA
BIOSINTESIS DEL GRUPO HEMO EN RATAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O**

**P R E S E N T A:
ARACELI HERNANDEZ ZAVALA**

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 10. de Febrero de 1995

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología: Araceli Hernández Zavala

titulado: "Efecto agudo del arsenito de sodio sobre la biosíntesis del grupo hemo en ratas".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M.en C. SERGIO GONZALEZ MORENO

M.en C. HECTOR BARRERA ESCORCIA

DR. GONZALO G. GARCIA VARGAS

Q.F.B. IRMA DELFIN ALCALA

BIOL. JOSEFINA VAZQUEZ MEDRANO

(Nombre completo)

Sergio Gonzalez Moreno
Hector Barrera Escorcía
Dr. Gonzalo G. García Vargas
Q.F.B. Irma Delfin Alcalá
Biól. Josefina Vázquez Medrano
(Firma)

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE MECANISMOS DE TOXICIDAD, SECCION DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL BAJO LA ASESORIA DEL DR. GONZALO G. GARCIA VARGAS Y EL DR. ARNULFO ALBORES MEDINA.

Quiero agradecer a Dios por haberme permitido lograr una de mis metas propuestas, mil gracias por acompañarme y no dejarme sola.

Agradezco a la U.N.A.M Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala por la oportunidad que me dió de realizar mi formación profesional muchas gracias a todos mis profesores, compañeros y amigos

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) por la colaboración y ayuda recibida para la realización de este trabajo.

Este trabajo no significa solamente el haber terminado la tesis, sino que es la culminación de muchos años de estudio ya que para llegar a esto tuve que pasar por muchos sacrificios y esfuerzos es por esto que quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron en mi formación, no quiero decir nombres porque serían muchos y no quiero dejar a nadie en el olvido, a todas aquellas personas que me ayudaron y me apoyaron dedico este trabajo, muchas gracias por todo y especialmente lo dedico a:

MIS PADRES

A tí papá

Gracias por todo el apoyo recibido, a pesar de que ya no estas aquí, se que tus enseñanzas y formación me ayudaron para la realización de este trabajo.

A tí mamá

A tí no tengo palabras con que agradecerte todo tu apoyo y comprensión, gracias por ser como eres y apoyarme día a día.

Los quiere

Araceli

A mis hermanos Fernando y Carlos:

Gracias por toda su ayuda recibida porque gracias a esto hoy veo realizado uno de mis propósitos, gracias por creer y confiar en mí, mi más sincero agradecimiento y todo mi respeto.

A mis hermanas Bertha, Geny, Lulú, Licha y Raquel:

No encuentro palabras para agradecerles todo su apoyo siempre estuvieron conmigo en los momentos que mas las necesite, de todo corazón mil gracias.

Con una gran gratitud y admiración al **Dr. Gonzalo G. García Vargas** ya que a pesar de la distancia siempre tuve su apoyo y sus consejos, mil gracias.

Al **Dr. Arnulfo Albores** por todo el apoyo y los consejos recibidos.

A todos mis compañeros de la sección de toxicología, pues siempre recibí su ayuda incondicional, en verdad los aprecio.

A mis compañeros de Iztacala por compartir buenos y malos momentos y especialmente a **Maricela** y **Rosa María** que han estado conmigo a lo largo de todo esto.

No puedo dejar en el olvido a una persona que significó mucho en mi vida al **Sr. Felipe Zavala García**, dedico este trabajo con todo mi amor y respeto en verdad que seras una persona inolvidable te quiere:

Araceli

RESUMEN

El arsénico es un metaloide que puede tener diversos efectos tóxicos, entre ellos destacan las alteraciones en la biosíntesis del hemo incrementando o disminuyendo la excreción de los metabolitos intermediarios de esta vía. Existen diversos estudios, en roedores y humanos, en los cuales al ingerir arsénico a través del agua de bebida en forma crónica o subaguda, el perfil de porfirinas urinario se altera.

En este trabajo se estudió el efecto de la exposición aguda a arsenito de sodio (As III) sobre la concentración de porfirinas en la orina y el riñón de ratas Wistar macho (200-250 g), así como su relación con parámetros de toxicología aguda. Las ratas fueron tratadas con una dosis única de As III (12.5, 25, 50, 75 y 90.0 μ moles subcutáneamente). La Dosis Letal-50 para As III fué de 36 mg/Kg de peso. Las porfirinas urinarias y renales se cuantificaron por HPLC empleando un sistema de elución por gradiente. La excreción urinaria de arsénico fue dependiente de la dosis. El tratamiento con As III provocó un aumento en el contenido de porfirinas totales urinarias, particularmente se observó un incremento significativo de coproporfirina-III urinaria respecto al valor control. Estos efectos pueden ser explicados como consecuencia de la inhibición de la coproporfirinógeno oxidasa. En el tejido renal, el contenido tisular de URO-III aumentó significativamente con respecto al control mientras que la concentración tisular de COPRO-III disminuyó con respecto al control, este fenómeno fue de una manera dosis-dependiente. Este comportamiento observado en las porfirinas renales trajo como

consecuencia que la relación coproporfirina/uroporfirina (COPRO/URO) renal disminuyera en forma dependiente de la dosis. Estos resultados muestran que el arsénico es un agente porfirinogénico, particularmente para el riñón, y que las alteraciones observadas en el contenido de sus metabolitos se refleja en la relación COPRO/URO renal probablemente como consecuencia de la inhibición de la uroporfirinógeno descarboxilasa. La vía metabólica del grupo hemo puede ser un instrumento útil para detectar tempranamente los efectos adversos de algún agente tóxico, para lo cual es necesario investigar más ampliamente los mecanismos enzimáticos por los cuales el As (III) ejerce su acción tóxica.

INDICE

	Página
Lista de abreviaturas	
1.- INTRODUCCION	1
1.1. GENERALIDADES DEL ARSENICO	2
1.1.1. Distribución del arsénico en el ambiente	2
1.1.2. Arsénico en el suelo	3
1.1.3. Arsénico en el aire	4
1.1.4. Arsénico en el agua	5
1.1.5. Presencia del arsénico en los alimentos y bebidas	6
1.1.6. Producción industrial del arsénico	7
1.1.7. Usos del arsénico	7
1.1.8. Metabolismo del arsénico	9
1.2. TOXICIDAD DEL ARSENICO	10
1.2.1. Efectos agudos del arsénico en el hombre	10
1.2.2. Efectos agudos del arsénico en animales	11
1.3. METABOLISMO DEL HEMO	11
1.3.1. Estructura de porfirinas	12
1.3.2. BIOSINTESIS DEL HEMO	12
1.3.3. Efectos de algunos agentes tóxicos sobre la biosíntesis del grupo hemo	14
1.3.4. Efectos de algunos metales sobre la biosíntesis del grupo hemo	15
1.3.5. Efecto del arsénico sobre la biosíntesis del grupo hemo	16
1.4. JUSTIFICACION	18
1.5. OBJETIVOS	20

2.-	MATERIALES Y METODOS	23
2.1.	EQUIPOS	24
2.1.1.	Material de Cristalería	25
2.1.2.	REACTIVOS	25
2.2.	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL-50)	26
2.2.1.	Tratamiento de los animales	26
2.3.	Determinación de porfirinas urinarias y renales	27
2.3.1.	Métodos de separación y cromatografía	27
2.3.1.1.	Extracción de porfirinas en orina	27
2.3.1.2.	Extracción de porfirinas en tejido	28
2.3.1.3.	Análisis de las muestras por HPLC	28
2.4.	Análisis Químicos	32
2.4.1.	Determinación de proteínas en homogenados de tejido	32
2.4.2.	Determinación de arsénico total en orina	34
2.4.2.1.	Soluciones patrón	34
2.4.2.2.	Gráfica de Calibración	35
2.4.2.3.	Procedimiento de digestión de las muestras	35
2.5.	Técnicas Estadísticas	37
3.-	RESULTADOS	38
3.1.	Determinación de la dosis letal-50 (DL-50)	39
3.2.	Cuantificación de porfirinas urinarias	39
3.3.	Cuantificación de porfirinas renales	40
3.4.	Determinación de arsénico total en orina	42

4.-	DISCUSION DE RESULTADOS	69
4.1.	Estudios generales de toxicidad aguda	70
4.2.	Efecto del As (III) sobre la excreción de porfirinas urinarias	70
4.3.	Efecto del As (III) sobre el contenido de porfirinas renales	73
4.4.	Excreción de arsénico total en orina	75
5.-	CONCLUSIONES	77
6.-	BIBLIOGRAFIA	79

Lista de abreviaturas

ALA	Acido 5-aminolevulínico
ALA-S	Acido 5-aminolevulínico sintetasa
As (III)	Arsenito de sodio
COPRO	Coproporfirina
COPRO-OX	Coproporfirinógeno-oxidasa
DL-50	Dosis letal 50
PBG	Porfobilinogeno
PROTO	Protoporfirina-IX
URO	Uroporfirina
URO-D	Uroporfirinógeno descarboxilasa

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES DEL ARSENICO

El arsénico es un elemento ubicuo clasificado químicamente como un metaloide, pertenece al grupo V-A de la tabla periódica y tiene un peso atómico de 74.9 (Friberg y col., 1979). Los estados de valencias del arsénico pueden ser 5+, 3+, 0 y 3-. (Tamaki y Frankerberger, 1992). Los compuestos del arsénico pueden ser clasificados en 3 grupos desde el punto de vista biológico y toxicológico: a) Compuestos de arsénico inorgánico. b) Compuestos de arsénico orgánico y c) El gas arsina (Friberg y col. 1979),

Los compuestos más comunes del arsénico inorgánico trivalente son: el trióxido de arsénico, el arsenito de sodio y tricloruro de arsénico. Los compuestos más comunes del arsénico pentavalente son: pentaóxido de arsénico, ácido arsénico y sales de arsenato. Estos compuestos son menos tóxicos que los compuestos de arsénico trivalente. (WHO, 1981).

Los compuestos de arsénico orgánico son: ácido mono metilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), ácido arsanílico, arsefenamina y carbasona entre otros. (WHO, 1981). Además arsenobetaína y arseno colina, que se encuentran en organismos marinos y son muy resistentes a la degradación química (Lauwerys y col., 1979).

1.1.1 Distribución del arsénico en el ambiente

El arsénico esta presente en la corteza terrestre en un promedio de 2-5 mg/Kg, asociado a rocas sedimentarias e ígneas en

la forma de arsénico inorgánico. El arsénico contenido en las rocas se libera formando sales, entre las que se encuentran arsenitos y arsenatos. (Tamaki y Frankerberger, 1992).

Los arseniuros de cobre, plomo y plata son los compuestos metálicos con los contenidos de arsénico más elevados, y las arsenopiritas (FeAsS), realgar (As_4S_4) y oropimento (As_2S_3) fueron los primeros minerales en donde se identificó el arsénico (WHO, 1981).

El nivel natural de arsénico en sedimentos ígneos se encuentra en un intervalo de 0.2 a 13.8 mg/Kg de peso seco. Los sedimentos de mayor profundidad pueden estar contaminados substancialmente con arsénico por fuentes antropogénicas (WHO, 1981).

1.1.2 Arsénico en el suelo

Las rocas son consideradas como la principal fuente natural de arsénico para suelos. Las dos formas de incorporación del arsénico en el suelo son: mediante la precipitación pluvial (natural) dispersando el arsénico contenido en el suelo y la aplicación de productos arsenicales en la agricultura (antropogénica) (Tamaki y Frankerberger, 1992). Los compuestos de arsénico pueden ser retenidos en el suelo o disueltos en agua para ser transportados y redistribuidos (Wakao y col., 1988). Las formas solubles de este elemento pueden ser absorbidos por partículas de arcilla en suelo y sedimentos

Los niveles de arsénico en suelos no contaminados generalmente se encuentran comprendidos en un intervalo de 0.2 a 40 mg/Kg, mientras que en suelos contaminados pueden alcanzarse concentraciones superiores a los 550 mg/Kg.

1.1.3 Arsénico en el aire

La emisión de arsénico dentro de la atmósfera puede ser de origen natural o antropogénica, con una proporción aproximada de 40 y 60% respectivamente. Las fuentes naturales incluyen emisiones volcánicas liberando un 88% de arsénico en forma natural, otras fuentes naturales importantes, incluyen erosión del arsénico contenido en los minerales y la quema de bosques (ATSDR, 1992). El 60% de las emisiones antropogénicas es generada por fundidoras de cobre, combustión de hulla, producción de metales no ferrosos, y aplicación de químicos arsenicales en la agricultura (Chilvers y Peterson, 1987).

En el aire se encuentran partículas aerotransportadas constituidas por trióxido de arsénico; sin embargo se ha mostrado que estas partículas pueden contener compuestos de arsénico orgánico e inorgánico (Johnson y Braman, 1975). En las áreas no contaminadas de Estados Unidos, la concentración de arsénico aerotransportado se encontraba en un intervalo de 1 a 3 ng/m³ y en áreas urbanas se reportó una concentración de 20 a 30 ng/m³. (ATSDR, 1992). Clarkson y col. en 1988, reportaron una concentración de arsénico en aire hasta de 10 µg/m³ en una región urbana de Estados Unidos.

1.1.4 Arsénico en el agua

El arsénico se encuentra presente en el agua en forma de sales inorgánicas y de compuestos orgánicos (Braman y Foreback 1973, Crecelius, 1974), el arsenato es la forma dominante y su contenido depende del contenido de arsénico en las rocas (Friberg y col., 1979). Los compuestos de arsénico inorgánico pueden ser asimilados por los organismos vivos, siendo generalmente metabolizados a compuestos metilados (Tamaki y Frankerberger, 1992).

La concentración de arsénico en agua de bebida va a depender del contenido de arsénico en el suelo cercano a la fuente de agua y del tratamiento del agua antes de su uso. Las concentraciones de arsénico en agua están localizadas en un rango de 0.1 - 4 mg/L en Taiwan, Argentina y México (Clarkson y col., 1988). Cebrian y col., (1983), reportaron niveles de arsénico en agua de bebida de 0.41 mg/L, en una población expuesta y de 0.007 mg/L en una población control en la Comarca Lagunera.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) había establecido la concentración máxima recomendada de arsénico para agua de bebida de 50 ug/L (Letey y col., 1986). Debido a las fuertes presiones y recomendaciones de diversos cuerpos gubernamentales y de agencias internacionales recientemente La Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una reunión con diversas agencias internacionales y se estableció recomendar como límite máximo, la concentración para arsénico en agua de bebida de 10 µg/L. (WHO, 1992).

1.1.5 Presencia del arsénico en los alimentos y bebidas

Los alimentos en general contienen pequeñas cantidades de arsénico, usualmente menos de 1 mg/Kg de peso húmedo, con excepción de los productos marinos cuyas concentraciones son mayores de 5 mg As/Kg (WHO, 1981). En la tabla 1 se muestra la concentración de arsénico en diferentes especies de pescados y mariscos.

Tabla 1.- Rango de concentración de arsénico (ppm) en diferentes especies de pescados y mariscos, analizados en muestra seca. (Lunde, G. 1977).

Muestra	Concentración de arsénico (ppm)
Bacalao	5.0 - 16.5
Tiburón	1.9 - 5.9
Atún	3.0 - 7.0
Camarón	2.0 - 40.0
Langosta	3.0 - 26.0
Cangrejo	2.0 - 80.0
Mejillón	1.3 - 70.0
Ostras	1.8 - 40.0

Crecelius, 1977, describió los niveles y especies químicas de arsénico en vino de Estados Unidos. Las concentraciones mayores fueron de 0.05 mg As/L y la mayor parte de arsénico presente se encuentra en su forma trivalente.

1.1.6 Producción industrial del arsénico

América Latina es uno de los principales productores mundiales de arsénico, generándose aquí el 23% de la producción mundial. Los principales productores de la región son México y Perú. (Galvao y Corey, 1987).

Según Minerals Yearbook, 1990, la producción mexicana de arsénico blanco en los años de 1984-88 se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Producción de arsénico blanco en México por año, expresados en toneladas métricas

Año	1985	1986	1987	1988	1989
Prod.	4,164	4,782	5,315	5,304	5,164

El trióxido de arsénico es el químico básico de la industria de arsénico, el cual es un subproducto de los procesos de fundición de cobre y plomo. (ATSDR, 1992).

1.1.7 Usos del arsénico

El arsénico y sus compuestos, principalmente sales y óxidos, están presentes en múltiples actividades industriales. Las industrias que presentan mayor riesgo por la presencia de arsénico son las de fabricación de cerámica, colorantes, joyería, farmacéutica, pinturas, juegos pirotécnicos, plaguicidas, vidrio y curtiduría (Galvao y Corey, 1987).

Algunos compuestos de arsénico se usan como plaguicidas en la agricultura, por ejemplo el arsenato de plomo, cobre y calcio, arsenito de sodio y compuestos de arsénico orgánico. El ácido metilarsónico y dimetilarsínico son usados como herbicidas selectivos, los cuales son particularmente necesarios para el control de *Sorghum halipense* en cultivos de algodón (WHO, 1981).

El arsenato de cobre, sodio y zinc también son usados como preservativos de la madera, para combatir el ataque de hongos e insectos (Dobbs y col, 1976).

Por otra parte algunos compuestos de fenilarsénico son usados como aditivos de alimentos para aves de corral y puercos y también para combatir ciertas enfermedades de pollos (WHO, 1981).

Los compuestos de arsénico orgánico e inorgánico fueron usados en la medicina, un ejemplo de ellos es la solución de Fowler que contiene trióxido de arsénico y que fue utilizada como tónico y en el tratamiento de leucemia, asma bronquial crónica.

El arsenato de sodio fue usado en el tratamiento de enfermedades crónicas de la piel, algunas enfermedades parasitarias y anemia (Martindale, 1977).

El arseniuro de galio es utilizado en la industria electrónica como semiconductor y en Estados Unidos aproximadamente 5 toneladas de arsénico se utilizan para este propósito. (ATSDR, 1992).

1.1.8 Metabolismo del arsénico

En humanos el arsénico y sus compuestos se incorporan principalmente por:

a) inhalación de polvos en el aire contaminado, se ha observado que en el pulmón se absorbe el 50% del compuesto inhalado. (Marafante y Vahter, 1987)

b) ingestión, en donde el sistema gastrointestinal absorbe en promedio el 90% del arsénico presente. (McKinney, 1992)

c) absorción a través de la piel, aunque no se tienen datos cuantitativos, de este proceso (ATSDR, 1992).

El arsénico, una vez absorbido, se distribuye a través de la sangre por todo el cuerpo. Algunas horas después se pueden encontrar altas concentraciones de arsénico en el hígado y en los riñones. Vahter y Norin, en 1980 observaron que al administrar arsenito, por vía oral en ratones, a las dos horas se observó una concentración de 7.44 $\mu\text{g/g}$ en riñón y de 6.7 $\mu\text{g/g}$ en hígado, mientras que Klassen (1974) observó que al administrar arsenito en forma intravenosa a ratas también se encuentran altos niveles de arsénico en el hígado (18 $\mu\text{g/g}$) y en los riñones (17 $\mu\text{g/g}$) después de 30 minutos de la administración. El nivel de arsénico tanto en la sangre como en el hígado y riñones disminuye rápidamente, a las 24 h después de una administración oral de arsenito los niveles de arsénico en el hígado se encuentran en 0.39 $\mu\text{g/g}$ y en el riñón de 0.78 $\mu\text{g/g}$, observándose que el arsénico ingerido sufre rápida eliminación. Con el tiempo, los principales depósitos de arsénico en el organismo son los huesos y los músculos. (Galvao y Corey,

1987).

El arsénico inorgánico absorbido sufre en el organismo un proceso de metilación, formando compuestos orgánicos que son excretados por la orina principalmente en la forma de ácido dimetilarsinico (DMA), ácido monometilarsonico (MMA) así como también arsénico inorgánico. (Vahter, 1986). La metilación de arsénico en el cuerpo es descrita en animales de laboratorio y en humanos, aunque los mecanismos exactos para esta metilación no son conocidos. (McKinney, 1992).

El arsenato es excretado a través de la orina más rápidamente que el arsenito debido a que tiene menos afinidad por los grupos tiol celulares (Tamaki y Frankerberger, 1992).

1.2 TOXICIDAD DEL ARSENICO

Los efectos tóxicos del arsénico se describen a continuación.

1.2.1 Efectos agudos del arsénico en el hombre

Los efectos agudos causados por la ingestión de compuestos de arsénico inorgánico son los siguientes: daño gastrointestinal severo, provocando vómito y diarrea frecuentemente con evacuaciones teñidas de sangre; calambres musculares, edema facial y anormalidades cardíacas. Alteraciones en el sistema respiratorio, disturbios nerviosos centrales (cefalea, crisis convulsivas y pérdida del conocimiento) y efectos sobre el sistema hematopoyético (WHO, 1981). La toxicidad del compuesto arsenical depende de su solubilidad. Así, en el caso de que el arsénico se

encuentra en estado sólido o formando complejos, sus efectos agudos se observaran horas después. (Done y Peart, 1971). Además los valores de DL 50 observada para compuestos de arsénico varían grandemente dependiendo de la forma química y de su estado de oxidación (Cebrian, 1986).

1.2.2 Efectos agudos del arsénico en animales

Los efectos observados en animales de laboratorio (rata y ratón) intoxicados agudamente son: gastroenteritis, diarrea, hipotensión (Nelsón y col., 1971).

La DL-50 para arsénico en ratas se encuentra en un rango de 15-293 mg As/Kg de peso (Schwartz 1922, Harrison y col., 1958 y Done y Peart, 1971). Franke y Moxon, 1936, reportan una dosis letal mínima de 4-5 mg As/Kg de peso para arsenito de sodio y de 14-18 mg As/Kg de peso para arsenato de sodio administrados a ratas intraperitonealmente.

La DL-50 para una inyección subcutánea, seguida de una exposición previa a arsénico en agua de bebida en ratón es de 14 mg As/Kg de peso (WHO, 1981). Tamaki y Frankerberger, 1992 reportan una DL 50 de 14 mg As/Kg para arsenito de potasio y de 20 mg As/Kg para arsenato de calcio en ratas; sin embargo no menciona la vía de administración.

1.3 METABOLISMO DEL HEMO

El hemo consiste de un complejo de fierro y protoporfirina IX y funciona como grupo prostético de numerosas

proteínas llamadas colectivamente hemoproteínas. Los sitios de mayor síntesis del grupo hemo son: la médula ósea en donde se sintetiza del 80-85% del hemo, el cual es requerido para la formación de hemoglobina y el resto es sintetizado principalmente en el hígado (Li, 1987), donde el hemo es requerido para la síntesis de hemoproteínas particularmente citocromo P-450. (Marks, 1984).

1.3.1 Estructura de porfirinas

Como se observa en la figura 1, las porfirinas son pigmentos que están estructuralmente formados por cuatro anillos pirrólicos unidos por puentes meteno. Las porfirinas se forman en el proceso de biosíntesis del grupo hemo. Las porfirinas individuales difieren entre sí de acuerdo a la naturaleza de los sustituyentes en las ocho posibles posiciones laterales, por esta razón cada porfirina presenta cuatro estereoisómeros (Molina y col., 1970).

1.3.2 BIOSÍNTESIS DEL HEMO

Como se muestra en la figura 2, la síntesis del grupo hemo se realiza en dos compartimentos celulares: La primera etapa en esta vía es la condensación de succinil CoA y glicina por la acción de la sintetasa del ácido 5-aminolevulinico (ALA-S), para formar el ácido 5-aminolevulinico (ALA), esta reacción requiere fosfato piridoxal y se lleva a cabo dentro de la mitocondria. El ALA pasa de la mitocondria al citoplasma donde una enzima

citoplasmática, la dehidratasa del ácido 5-aminolevulinico (ALA-D) cataliza la condensación de dos moléculas de ALA para formar el pirrol porfobilinógeno (PBG). La conversión de PBG al tetrapirrol uroporfirinógeno III, es catalizada por dos enzimas, las cuales actúan independiente y secuencialmente, una es la hidroximetilbilano sintetasa (llamada también porfobilinogeno desaminasa) la cual cataliza el arreglo de PBG a un intermediario inestable llamado hidroximetilbilano, para la conversión subsecuente a uroporfirinógeno III a través de un rearrreglo intramolecular del anillo D y catalizado por la uroporfirinógeno III sintetasa responsable de la isomería tipo III de los porfirinógenos. (Li, 1987). Los cuatro residuos del ácido acético del uroporfirinógeno III son descarboxilados secuencialmente a grupos metilos por una enzima citosolica llamada uroporfirinógeno descarboxilasa (UROG-D), esta enzima no es específica y puede descarboxilar los 4 isómeros de uroporfirinógeno, hepta-, hexa- y pentacarboxi-porfirinógenos.

En el proceso se forman los siguientes intermediarios metabólicos hepta-, hexa-, penta-porfirinógenos y por último el porfirinógeno tetracarboxílico (Coproporfirinógeno III), el cual es transportado a la mitocondria, donde dos de sus ácidos propiónicos son convertidos a grupos vinilo por la acción de coproporfirinógeno oxidasa (COPRO-OX); resultando el protoporfirinógeno IX. De este último se remueven seis átomos de hidrógeno por la enzima protoporfirinógeno oxidasa dando lugar a la protoporfirina IX, la cual se conjuga con el fierro, por acción de la enzima mitocondrial

ferroquelatasa formandose el hemo (Marks, 1984).

Los isómeros tipo I se desechan, ya que no son biológicamente activos aunque pueden acumularse en estados patológicos (Straka y col., 1990).

1.3.3 Efectos de algunos agentes tóxicos sobre la biosíntesis del grupo hemo

El sistema hematopoyético es altamente susceptible a sufrir alteraciones por muchas drogas y químicos ambientales, entre ellos los metales. Una de las manifestaciones de alteración del sistema hematopoyético son las porfirias, que son un grupo de desordenes bioquímicos del hemo caracterizados por una sobreproducción de porfirinas por defectos hereditarios en las enzimas de la vía del hemo, lo que conduce a anormalidades clínicas. (Li, 1987).

Un agente tóxico que altera la vía del hemo es el hexaclorobenceno, un hidrocarburo clorado, registrado como fungicida (Fries y Marrow, 1975). Se ha observado que en personas que ingirieron trigo contaminado con hexaclorobenceno excretan gran cantidad de uroporfirina en orina y también es acumulada en hígado. También se ha observado que después de la administración de hexaclorobenceno a varias especies de animales se incrementa la producción de uroporfirina hepática y heptacarboxiporfirina en orina (Marks, 1984).

San Martin y col., 1979, observaron una porfiria severa en ratas a las cuales se les administro 0.8 y 1.0 g/kg/día de

hexaclorobenceno, en donde hay un aumento de uroporfirinas y coproporfirinas urinarias y un incremento de uroporfirina hepática.

Los bifenilos policlorados (PCB_s), producen una porfiria similar a la de hexaclorobenceno en ratas conejos y aves. En Taiwan en 1979, fue identificada la presencia de PCB_s en el aceite para cocinar y se observo en 69 pacientes el incremento de ALA y uroporfirinas urinarias (Marks, 1984).

El Aroclor 1254, el cual consiste de una mezcla de PCB_s, produce porfiria hepática, ya que al administrar 100 mg/Kg de peso de Aroclor por intubación gástrica, se observó un aumento en la uroporfirina urinaria en un 73% y en menor cantidad la heptacarboxiporfirina y coproporfirina; se observa una acumulación de uroporfirina y heptacarboxiporfirina en hígado. (Goldstein y col., 1973).

Por otra parte se ha observado que las dioxinas afectan la síntesis del hemo, tal es el caso del TCDD el cual fue administrado a ratas hembras y se pudo observar que hubo un incremento en la excreción de uroporfirina y heptacarboxiporfirina, debido a que el TCDD es un potente inhibidor *in vivo* de la uroporfirinogeno descarboxilasa hepática.

1.3.4 Efectos de algunos metales sobre la biosíntesis del grupo hemo

Tomokuni e Ichiba, 1988 describieron el efecto que tiene el plomo sobre la vía del grupo hemo, observandose que en la exposición a plomo hubo un incremento de ALA urinario, así como

también fue inhibida la actividad de la ALA-D en eritrocitos.

Woods y col., 1984 describieron el efecto que tiene el cloruro de mercurio en la vía del hemo, administrado en una dosis aguda produciendo lo siguiente: disminuyó la actividad de la uroporfirinógeno descarboxilasa y provocó un aumento en la concentración de uroporfirina urinaria. Por otro lado se ha observado que en ratas expuestas a 10 ppm de hidroximetilmercurio (MMH) en agua de bebida aumenta la concentración de coproporfirina urinaria después de 5 semanas de exposición. (Woods y col., 1991)

Woods y col., 1981, observaron el efecto *in vitro* de varios metales traza sobre la actividad de UROG-D y comprobaron que el cloruro de cadmio, cobalto y mercurio inhiben la actividad de esta enzima.

1.3.5 Efecto del arsénico sobre la biosíntesis del grupo hemo

Existen varios autores que describen el efecto que tiene el arsénico sobre la síntesis del grupo hemo, entre ellos podemos citar a Woods y Fowler (1977), los cuales reportaron que la síntesis del hemo se vio afectada en ratas tratadas con arsenato de sodio, incrementando significativamente la excreción urinaria de porfirinas, dependiente de coproporfirinuria y uroporfirinuria.

Por otra parte Martínez, 1983, reportó que el arsénico en agua desionizada conteniendo 5, 50 y 100 ppm de arsénico como arsenito de sodio, administrado a ratas durante siete semanas, alteró la excreción de porfirinas observándose un incremento de uroporfirinas urinarias.

Woods y Fowler, 1978, describieron que la exposición prolongada a arsenato de sodio a 20, 40 y 85 ppm en el agua de bebida provocó una disminución de ácido 5-aminolevulinico sintetasa (ALA-S) hepático, así como también se vió un aumento en las concentraciones de uroporfirinas urinarias.

Woods y Fowler, 1989 reportaron que en ratas expuestas crónicamente a arsenato de sodio en agua de bebida (40 ó 85 ppm), se observó que hay un aumento de coproporfirina urinaria y una disminución de la actividad de la coproporfirinógeno oxidasa en riñón.

García-Vargas y col., 1991 reportaron que la exposición crónica a arsénico en humanos, altera el patrón de porfirinas de la vía del hemo aunque no se presente porfirinuria; sin embargo se ve una disminución en la relación coproporfirina/uroporfirina, la cual probablemente se ve afectada debido a que el arsénico este inhibiendo las actividades de la uroporfirinógeno descarboxilasa y/o la coproporfirinógeno oxidasa.

1.4 JUSTIFICACION

El desarrollo económico e industrial logrado por México, tiene como consecuencia mediata el incremento en los niveles de contaminación ambiental por agentes químicos y/o biológicos. Es también notable el impacto que este fenómeno ha tenido sobre la flora, la fauna, las poblaciones humanas y los ecosistemas en su conjunto. Si bien el monitoreo ambiental ofrece información sobre el posible impacto que la polución pueda tener en el ambiente y los seres vivos, este sistema de detección no significa necesariamente que los organismos expuestos sean deletereamente afectados.

Es en este sentido que las instituciones nacionales e internacionales, a cargo del cuidado del medio ambiente y salud ambiental, han propuesto la búsqueda de indicadores tempranos de daño a nivel bioquímico, genético e inmunológico, entre otros.

Para el establecimiento y la propuesta de un indicador de daño temprano, se requiere del conocimiento básico sobre la historia natural, de la patogenia y de los mecanismos de toxicidad mediante los cuales un agente tóxico causa la enfermedad.

En el caso particular del arsénico, como se ha citado en los antecedentes, se ha postulado que las alteraciones que este agente tóxico ocasiona sobre la biosíntesis del hemo, pueden ser utilizados como indicador de daño bioquímico.

Con el fin de caracterizar la toxicodinamia del arsénico y tomando como efecto tóxico a la excreción y acumulación tisular de porfirinas, en este estudio se propone evaluar la excreción urinaria de porfirinas en ratas tratadas en forma aguda con arsenito de sodio.

1.5 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta porfirinogénica renal y la excreción de porfirinas en la orina de ratas expuestas en forma aguda a arsenito de sodio.

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar la dosis letal 50 (DL-50) del arsenito de sodio en ratas.

b) Cuantificar el contenido de arsénico total en orina de ratas intoxicadas con arsenito de sodio en forma aguda.

c) Determinar cuantitativamente la concentración de porfirinas en la orina de ratas intoxicadas en forma aguda con arsenito de sodio.

d) Determinar cuantitativamente la concentración tisular de porfirinas en riñón.

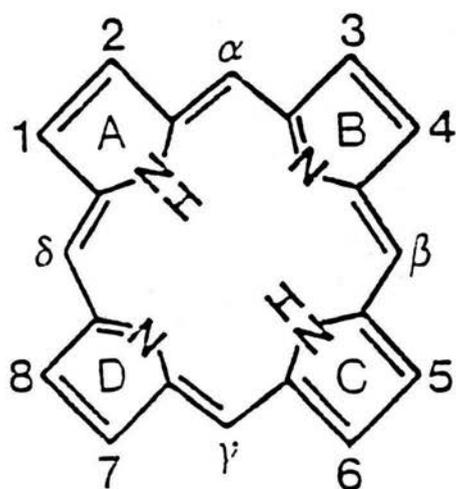


Fig. 1 Estructura química de las porfirinas

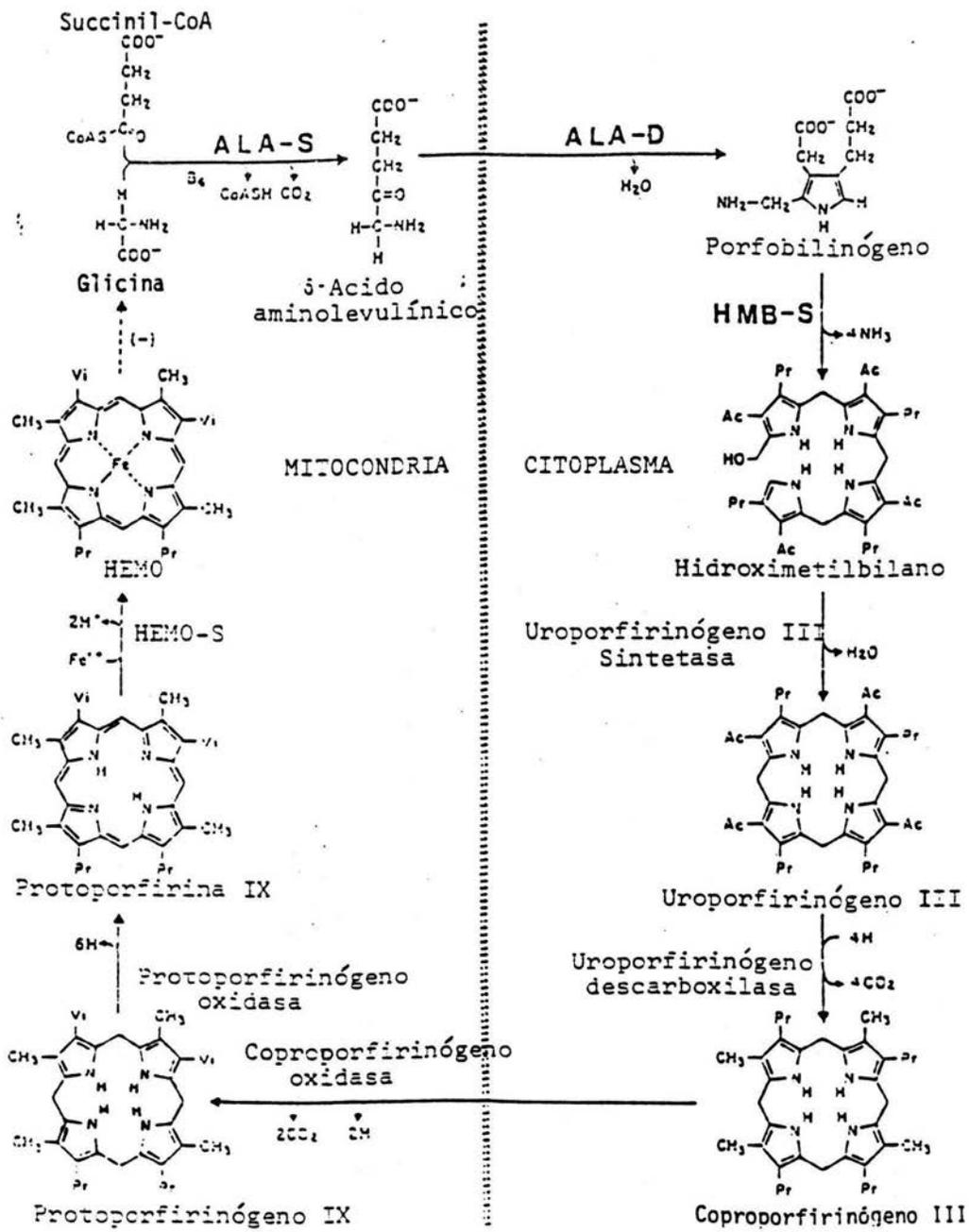


Fig. 2 Vía biosintética del HEMO

II.- MATERIALES Y METODOS

II.- MATERIALES Y METODOS

2.1 EQUIPOS

- Sistema binario de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Serie 700, BIO-RAD.
- Detector de fluorescencia, Modelo Fluorichrom TM, VARIAN.
- Potenciómetro, Modelo Selection 2000, BECKMAN.
- Microcentrífuga Micro-MB, IEC.
- Parrilla de temperatura regulada, Thermolyne Modelo 2200, Sybron.
- Balanza analítica, Modelo GMBH, Sartorius-Werke.
- Homogenizador, Polytron Modelo PCN 1, BRINKMAN - Instruments.
- Espectrofotómetro, Modelo Spectronic 20 D, Milton Roy Company.
- Jaulas metabólicas, Modelo 650-0100 (150-300 g), NALGENE.
- Balanza para animales, Modelo XD-8XD, Fisher Scientific.
- Espectrofotómetro de absorción atómica, Modelo AA-175, VARIAN.
- Generador de hidruros MHS, Modelo 65, VARIAN.
- Lámpara de cátodo hueco para arsénico, VARIAN.
- Lámpara de descarga sin electrodo para arsénico VARIAN.

2.1.1 Material de Cristalería

- Vasos de precipitados (50 y 100 ml).
- Matraces volumétricos diferentes capacidades.
- Matraz Kitasato de 2500 ml.
- Tubos de ensayo de diversas medidas.
- Tubos de microcentrífuga Ependorff (1 ml).
- Vidrios de reloj.

2.1.2 REACTIVOS

De la compañía de Merck de México se compraron los siguientes reactivos:

- Metanol, Grado HPLC.
- Acido acético, Grado reactivo.
- Acetato de amonio, Grado reactivo.
- Dimetil sulfóxido (DMSO), Grado reactivo.

De la compañía J.T. Baker de México se compraron los siguientes reactivos

- Acetonitrilo, Grado HPLC
- Acido clorhídrico, Grado reactivo.
- Acido tricloroacético (TCA), Grado reactivo.
- Cloruro de sodio, Grado reactivo.
- Acido sulfúrico, Grado reactivo.
- Acido nítrico, Grado reactivo.
- Acido perclórico, Grado reactivo.
- Yoduro de potasio, Grado reactivo.

De la compañía Sigma Chemical de San Louis. USA se compraron los siguientes reactivos:

- Arsenito de sodio, Grado analítico.
- Albúmina sérica bovina, Grado analítico.
- Azul de Coomassie, Grado reactivo.
- Acido monometilarsónico (MMA).
- Acido dimetilarsinico (DMA).
- Mezcla de isómeros I de 8-, 7-, 6-, 5-, 4- y 2 carboxiporfirinas (Marker Kit Acid) Porphyrin Products. Logan, UT, USA.
- Borohidruro de sodio (Tabletas) Alfa división. Ventron

2.2 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL-50)

2.2.1 Tratamiento de los animales

Para la determinación de la DL-50 se utilizaron 105 ratas Wistar macho, con un peso de 150 - 220 g, las cuales se dividieron en 7 grupos de 15 ratas cada uno. En todos los experimentos se permitió la ingesta de agua desionizada y alimento (Cubos de purina Lab Diet manufacturado por PMI Feeds, Inc, Hanley Rd., St. Louis) *ad libitum*. Las dosis empleadas fueron: 25, 50, 75, 100, 110, 125 y 150 μ moles de arsenito de sodio/Kg de peso, el arsenito se disolvió en solución salina y se administró por vía subcutánea en un volumen final de 200 μ l.

El período de observación de las ratas inyectadas fue de 48 horas. Después de la inyección de arsenito se levanto un registro de ratas vivas y muertas a las 24 y a las 48 horas.

2.3 Determinación de porfirinas urinarias y renales

Se emplearon 30 ratas macho Wistar, (180 - 220 g). Se formaron 6 grupos de 5 animales cada uno (5 grupos tratados y 1 grupo control), los cuales recibieron una inyección subcutánea (s.c) con 12.5, 25, 50, 75 y 90 μ moles de arsenito de sodio/Kg de peso en un volúmen final de 200 μ l, los controles recibieron una administración de solución salina en un volúmen final de 200 μ l. Después de la inyección las ratas se colocaron en su jaula metabólica individual y se colectó orina de 24 horas. Las ratas consumieron agua *ad libitum*, pero se dejaron en ayuno las 24 horas que estaban en las jaulas metabólicas. En seguida las ratas fueron anestesiadas con éter, obteniéndose el hígado y el riñón los cuales se perfundieron con solución salina a 4 °C . La orina y los órganos se envolvían con papel aluminio y se congelaron a -70°C.

2.3.1 Métodos de separación y cromatografía

2.3.1.1 Extracción de porfirinas en orina

La orina se acidificó con 40 μ l de HCl concentrado por 1 ml de orina. La mezcla se agitó y se tomó 1 ml de orina, el cual se colocó en un tubo Ependorff se centrifugó a 1800 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se colectó para el análisis por HPLC.

2.3.1.2 Extracción de porfirinas en tejido

Reactivos

a) Mezcla de extracción de porfirinas

Se preparó ácido tricloroacético (TCA) al 20%, para lo cual se pesaron 5 g de TCA y se disolvieron en agua desionizada aforando a un volúmen de 25 mL. Posteriormente se agregaron 25 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para que quede una solución TCA/DMSO 1:1 P/V.

Metodología

Se pesaron 250 mg de tejido (riñón), se agregaron 750 μ L de la mezcla de extracción y se homogenizó en un homogenizador Polytron; el homogenado se colocó en un tubo Ependorff y se centrifugó a 1800 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se colectó para el análisis por HPLC.

2.3.1.3 Análisis de las muestras por HPLC

Reactivos.

a) Buffer de acetato de amonio 1M pH=5.16

Se pesaron 154.17g de acetato de amonio y se disolvieron en 1500 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 5.16 con ácido acético glacial. El volumen se aforó 2000 mL con agua desionizada. Se filtró a través de un filtro millipore de 0.45 μ m.

b) Buffer de acetato de amonio en acetonitrilo al 9%

Se midieron 750 mL de buffer de acetato de amonio y se agregaron 90 mL de acetonitrilo, se aforó a 1000 mL con el mismo buffer.

c) Metanol al 90% en acetonitrilo al 10%

Se midieron 750 mL de metanol, se agregaron 100 mL de acetonitrilo y se aforó a 1000 mL con metanol.

d) Estandar Marker Kit

Se tomó un vial de *Porphyrin acids kit*, el cual contenía 10 ± 1 nmol de cada una de las 8, 7, 6, 5, 4 y carboxiporfirinas, isómeros I protegido de la luz con papel aluminio. Al vial se le agregaron 9 mL de HCl 0.1 N, así como también se agregaron 10 y 20 μ L de uroporfirina y coproporfirina III y se llevó a un volumen de 10 mL con el mismo HCl 0.1 N. La cantidad que se agregó de los isómeros III va a depender de la concentración de estos que se midió por el coeficiente de extinción molar y al final el estándar quedó a una concentración de 1 nmol/mL de cada porfirina. Se almacenó a 4°C y en la obscuridad.

Tabla 3. Coeficientes de extinción para uroporfirina-I y III y coproporfirina-I y III.

PORFIRINAS	DISOLVENTES	Longitud de onda máxima (nm)	ϵ mM
Uroporfirina I y III	HCl 0.5 N	405.5	541
Coproporfirina I y III	HCl 0.1 N	399.5	489

Fuente (Fuhrhop y Smith, 1975).

Para hacer los cálculos de los estándares de URO-III y COPRO-III se hacía lo siguiente: para URO-III se ajustaba a cero con HCl al 0.5N y después se hacía un barrido de 400 a 410 nm con

el estándar de URO-III y se tomaba la máxima absorbancia lo mismo se hacía para COPRO-III solamente que se ajustaba a cero con HCl 0.01N y el barrido se hacía de 395 a 405 nm. Para calcular el valor de la concentración de los estándares se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Uroporfirina} = \frac{\text{Abs.}}{0.541} \times \frac{1 \text{ nmol}}{\text{ml}} \times \frac{V_f}{V_i} = \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$$

$$\text{Coproporfirina} = \frac{\text{Abs.}}{0.489} \times \frac{1 \text{ nmol}}{\text{ml}} \times \frac{V_f}{V_i} = \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$$

en donde:

Abs. = absorbancia
Vi = volumen inicial
Vf = volumen final

Procedimiento

Tanto las muestras de orina como de tejido fueron analizadas por HPLC a través de un sistema de elución isocrática para obtener el patrón completo de porfirinas. El procedimiento fue el siguiente, en el recipiente de la bomba A se colocó buffer de acetato de amonio 1M pH=5.16 con acetonitrilo al 9% y metanol:acetonitrilo (90:10) al 8% durante 10 minutos, posteriormente se cambiaron los porcentajes de metanol:acetonitrilo a diferentes tiempos, como se muestra en la tabla A. El sistema se equilibró con elución isocrática durante 10 minutos; con la solución contenida en la bomba A para equilibrar el sistema, luego se procedió a inyectar la muestra a través de un inyector Rheodyne con un loop de 500 μL (BIO-RAD) y se inicia el gradiente con las siguientes características:

Inyección	TIEMPO	FLUJO	% Met:Acn
	0	1 mL/min	8
	10	1 mL/min	22
	25	1 mL/min	31
	31	1 mL/min	46
	42	1 mL/min	55
	51	1 mL/min	64

Condiciones: Columna Spherisorb-ODS (LDC analytical), con una longitud de 25 cm, tamaño de la partícula 5 μm . Detector Fluorichrom TM (VARIAN), rango de longitud de onda de los filtros 405 nm (excitación) y 600 nm (emisión). Volúmen de inyección estándar 100 μL , muestra 250-500 μL .

Antes de empezar a analizar las muestras se analiza la mezcla de estandares que contiene 8, 7, 6, 5 y 4 carboxiporfirinas y los isómeros I y III de 8 y 4 carboxiporfirinas,

CALCULOS

Para determinar la concentración de porfirinas en orina y tejido se emplearon los siguientes algoritmos, de acuerdo a la técnica de estandares externos.

a) Orina

$$\frac{A \text{ de la muestra}}{A \text{ del St.}} \frac{\text{mm}^2}{\text{mm}^2} \times 100 \text{ pmoles} \times \frac{1000}{500} \times \frac{\text{Vol. de orina}}{24 \text{ hrs}} = \text{pmol}/24\text{h}$$

donde:

- 100 pmoles = cantidad inyectada del estandar
- 1000 = Volumen final de la muestra
- 500 = Volumen de inyección
- A = Area

b) Tejido

$$\frac{\text{Area de la muestra mm}^2}{\text{Area del St mm}^2} \times 100 \text{ pmoles} \times \frac{1000}{250} \times \frac{1}{\text{mg de proteína de 250 mg de tejido}}$$

donde:

- 100 pmoles= cantidad inyectada del estandar
- 1000 = Volumen final de la muestra
- 250 = Volumen de inyección

2.4 Análisis Químicos

2.4.1 Determinación de proteínas en homogenados de tejido

Reactivos

a) Azul de Coomassie

Se pesaron 100 mg de colorante azul de Coomassie y se colocaron en un matraz volumétrico de 1000 mL, se agregaron 50 mL de etanol al 95% y se agitó hasta que se disolvió el colorante, se agregaron 100 mL de ácido fosfórico al 85%, aforando a volumen con agua destilada.

b) Albúmina sérica bovina 1 mg/mL

Se pesaron 0.5 g de albúmina y se colocaron en un matraz volumétrico de 500 mL, se aforó a volumen con agua destilada.

Metodología

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976), esta técnica se basa en la unión del azul brillante de Coomassie a los grupos $-\text{NH}_2$ de las proteínas y su cambio de banda espectral.

a) Procedimiento para la curva tipo

Se realizó la preparación de una curva tipo de la siguiente manera, de la solución de albúmina sérica de 1 mg/mL se tomaron las siguientes alícuotas:

VOLUMEN DE ALBUMINA (μ L)	AGUA DESTILADA (μ L)	COLORANTE (mL)	CONCENTRACION (mg/mL)
10	90	2.5	0.010
25	75	2.5	0.025
50	50	2.5	0.050
75	25	2.5	0.075
100		2.5	0.1
Blanco	100	2.5	

Se agitaron muy bien y se leyeron a 595 nm ajustando con blanco de reactivo. En la Figura 3 se muestra la curva de calibración.

b) Procedimiento para las muestras

Del homogenado que se hizo para extraer porfirinas, se tomaron 100 μ L, de aquí se tomaron 10 μ L y se agregaron 90 μ L de agua y 2.5 mL del colorante, se agitaron y se leyeron a 595 nm ajustando con blanco de reactivo. Se hicieron por duplicado cada una de las muestras y todos los puntos de la curva.

CALCULOS

El valor de absorbancia obtenido se sustituye en la ecuación de la curva tipo $X = \frac{y-b}{x}$ y se calcula el valor que corresponde a la concentración en mg de proteína / 10 μ L de muestra.

2.4.2 Determinación de arsénico total en orina

Esta técnica tiene como fundamento la formación de arsina (AsH_3) al reaccionar el arsénico con un agente reductor que es el borohidruro de sodio. La digestión de las muestras se hace con ácidos (nitríco, sulfúrico y perclórico) para asegurar la descomposición de compuestos orgánicos de arsénico, especialmente ácido dimetilarsínico (Cox, 1980).

2.4.2.1 Soluciones patrón

Para hacer la determinación de arsénico total en orina, fué necesario realizar una curva de calibración, para lo cual se tuvieron que preparar soluciones patrón a una concentración conocida para que de estas soluciones se tomaran las alícuotas para la preparación de la curva.

- a) Solución patrón de arsenito de sodio 1000 mg As/L

En un matraz volumétrico de 100 mL se colocaron 0.1743 g de arsenito de sodio y se aforó a volúmen con HCl 0.2 N.

- b) Solución patrón de ácido monometilarsónico (MMA) 1000 mg As/L

En un matraz volumétrico de 100 mL se colocaron 0.1867 g de MMA y se aforó a volúmen con agua tridestilada

- c) Solución patrón de ácido dimetilarsínico (DMA) 1000 mg As/L

En un matraz volumétrico de 100 mL, se colocaron 0.2792 g de DMA y se aforó a volúmen con HCl 0.2 N.

2.4.2.2 Gráfica de calibración

De las soluciones patrón de arsénico inorgánico, MMA y DMA, se tomó una alícuota de 500 μL , colocándose cada una de las alícuotas en un matraz volumétrico de 50 mL y se aforaron con HCl 0.2 N, las soluciones quedaron a una concentración de 10 mg/L, de esta solución se colocó una alícuota de 1 mL en un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó a volúmen con agua tridestilada, quedando a una concentración de 0.2 mg/L.

De la solución de 0.2 mg/L se tomaron las siguientes alícuotas:

As III (μL)	MMA (μL)	DMA (μL)	CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{AsT}$)
25	50	100	0.035
50	100	200	0.070
100	200	400	0.140
200	400	800	0.280
400	800	1600	0.560

2.4.2.3 Procedimiento de digestión de las muestras

1.- Se colocó la orina en un vaso de precipitados de 100 mL (2 mL de orina de rata control y 0.5 mL de ratas expuestas).

2.- Se adicionaron a la muestra 5 mL de HNO_3 concentrado y 1 mL de H_2SO_4 concentrado.

3.- Los vasos se cubrieron con vidrios de reloj y se colocaron en la parrilla previamente calentada a 100°C durante una hora.

4.- Los vasos se retiraron de la parrilla y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

5.- Se agregaron 2.5 mL de HNO_3 concentrado y se colocaron en la parrilla.

6.- Se fué aumentando la temperatura poco a poco hasta que quedó un volúmen aproximado de 1 mL.

7.- Se retiraron los vasos de la parrilla y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

8.- Se agregaron 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado y se colocaron en la parrilla a una temperatura de 250°C .

9.- Cuando se colocaron los vasos en la parrilla la muestra es incolora, al contacto con el calor cambia a un color amarillo verdoso la cual se va a tornar incolora otra vez; en el momento en que la muestra perdió el color, se retiraron los vasos de la parrilla y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

10.- Se transfirió cuantitativamente de los vasos de precipitados a matraces volumétricos de 10 mL enjuagando el vaso y el vidrio de reloj con agua destilada varias veces.

11.- Se transfirió el contenido del matraz a vasos de precipitados de 50 mL y de ahí se tomaron 5 mL, se adicionó 1 mL de yoduro de potasio al 20% y se esperaron 45 minutos.

12.- Se determinó el contenido de arsénico en un equipo de espectrofotometría de absorción atómica equipado con un generador de hidruros, a una longitud de onda de 193.7 nm y con un slit de 1.

2.5 Técnicas Estadísticas

La diferencia de las medias de los parámetros estudiados, entre los grupos control y los tratados se evaluaron por el análisis de varianza simple y posteriormente se realizaron comparaciones múltiples de medias empleando la prueba de Tukey. El experimento se realizó una vez, con una $n=5$ para los grupos tratados y el grupo control.

III.- RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1 Determinación de la dosis letal-50 (DL-50)

La relación dosis/respuesta del arsenito de sodio, administrado por vía subcutánea a ratas Wistar macho, se muestra en la Figura 4. Los resultados de este experimento fueron analizados como se citó en Material y Metodos, la dosis letal al 50% de respuesta (DL-50) fué de 36 mg As/Kg de peso. Los límites fiduciales al 95% fueron de 27-48 mg/Kg; esta relacion mostro ser significativa con un valor de $r^2=0.7926$ ($p < 0.05$).

3.2 Cuantificación de porfirinas urinarias

En la Tabla 4 (Figuras 5-9) se muestran los valores de la excreción urinaria de porfirinas, en las ratas tratadas y su comparación con los animales control. En las ratas tratadas con diferentes dosis de As (III), la excrecion urinaria de ambos isómeros de uroporfirinas, heptacarboxiporfirinas, hexacarboxiporfirinas, pentacarboxiporfirina I y de coproporfirina I, no fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) a los valores de excreción de estas porfirinas en las ratas control.

Por otra parte, en las ratas tratadas con 90 μ moles de As/kg de peso, la excrecion urinaria de pentacarboxiporfirina III fue mayor a 10 veces el valor obtenido en los animales control (Figura 8), este incremento fue estadisticamente significativo ($p \leq 0.01$).

Con respecto a la excreción urinaria de coproporfirina III, los animales tratados con 25, 50 y 90 μ moles de As/Kg de peso

presentaron incrementos significativos ($p \leq 0.05$) en el contenido urinario de esta porfirina, con respecto al grupo de ratas control. (Figura 9).

La administración de As (III) causó un incremento en los valores de la relación COPRO/URO urinario con respecto al valor control (Tabla 5). Este incremento mostro una relacion dosis-respuesta significativa para las dosis de 12.5, 25.0, y 50.0 μ moles de As/Kg de peso (Fig. 10). Sin embargo, la respuesta porfirinúrica disminuye en la dosis de 90 μ moles de As/kg de peso (Fig. 11), aunque continuo siendo superior al valor control.

3.3 Cuantificación de porfirinas renales

En la Tabla 6, se muestran los valores de la concentración de porfirinas renales, en las ratas tratadas y su comparación con los animales control.

En la Figura 12 se puede observar que en las ratas tratadas con 75 μ moles de As/Kg de peso, se presentó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en el contenido renal de URO-I, por otra parte se puede observar que en las ratas tratadas con diferentes dosis de As (III) presentaron un aumento en el contenido renal de URO-III con respecto a los animales control; sin embargo este incremento sólo fué estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) en las dosis de 75 y 90 μ moles de As/Kg de peso, observandose que este aumento mostro una relación dosis-respuesta (Figura 13).

Respecto al contenido renal de heptacarboxiporfirina (Figura 14), en las ratas tratadas con 75 μ moles de As/Kg de peso

se presentó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en el contenido renal de esta porfirina con respecto a los valores del grupo control. El comportamiento de esta porfirina mostro una relación dosis-respuesta como se puede observar en la Figura 15.

En la Figura 16 se muestra el contenido renal de hexacarboxiporfirina-I, en los animales tratados con diferentes dosis de As (III) en donde se observa una disminución de esta porfirina, sin embargo esta disminución no fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los animales control, pero si se observó que el contenido renal de hexacarboxiporfirina-I era inversamente proporcional a la dosis administrada.

En cuanto a hexacarboxiporfirina-III (Figura 16), se pudo observar que las ratas tratadas con 12.5 y 25 μ moles de As/Kg de peso incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido renal de esta porfirina respecto a los valores del grupo control. Sin embargo a pesar de que la concentración de hexacarboxiporfirina-III aumentó en estas dos dosis, los niveles de esta porfirina tendieron a disminuir conforme se incrementaba la dosis de arsenito de sodio.

En relación a la pentacarboxiporfirina-III (Figura 17), se pudo observar que en las ratas tratadas con diferentes dosis de As (III), el contenido renal de pentacarboxiporfirina-III no fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) a los valores del contenido renal de esta porfirina en los animales control.

En cuanto a COPROS, únicamente la COPRO-III es el isómero presente en riñón, pues solo se presentó un pico cromatográfico cuando éste se comparó con un estándar externo quedó establecido

de que isómero se trataba. En la Figura 18 se puede observar que en las ratas tratadas con 90 μ moles de As/Kg de peso el contenido renal de COPRO-III disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto a los valores del grupo control.

Por otra parte, la disminución en la concentración de COPRO-III renal estaba inversamente relacionada con la dosis de As (III) administrada (Figura 19).

La administración de As (III) causó una disminución en los valores de la relación COPRO/URO renal con respecto al valor control (Tabla 7). Esta disminución fué dependiente de la dosis (Figura 20). En la Figura 21 se muestra la gráfica de la relación COPRO/URO en donde se puede observar claramente como aumenta la concentración renal de URO-III y como disminuye la concentración renal de COPRO-III.

3.4 Determinación de arsénico total en orina

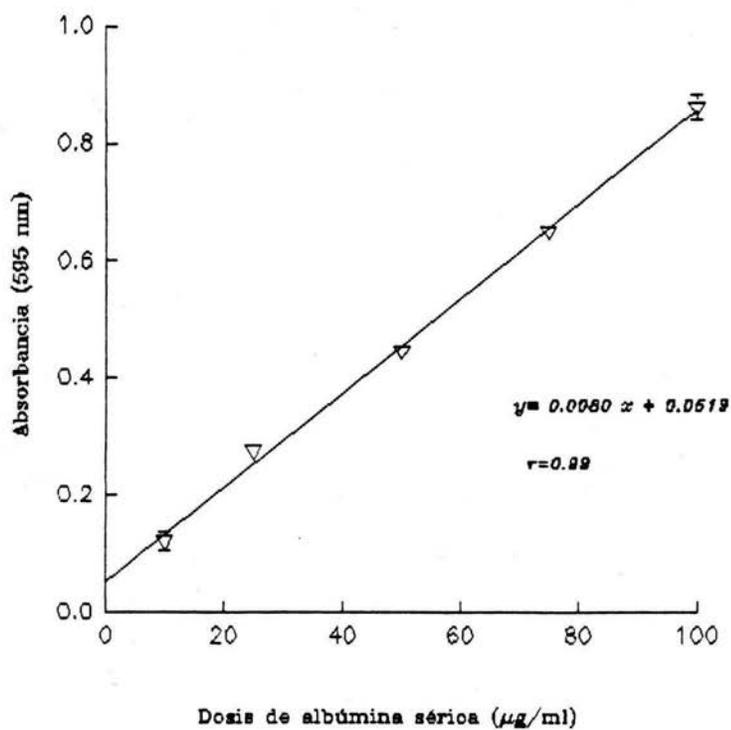
En la Tabla 8 se muestran los resultados de arsénico total en orina, en donde pueden observarse las diferencias en el contenido urinario de arsénico total en los grupos tratados con respecto al control (10 -114 veces), observándose que la diferencia del valor control con respecto a los grupos tratado es muy notoria (Figura 22). El aumento de la concentración de arsénico total en orina estaba directamente correlacionado con la dosis. El porcentaje de excreción de arsénico en orina respecto a la dosis administrada estuvo en un intervalo de 11 - 17.7%, observándose que la dosis más alta es la que presenta un mayor porcentaje de excreción (Figura 23).

Tabla 4. Efecto de la administración subcutánea de arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de porfirinas en ratas.

Porf.	Control	TRATAMIENTO			
		Dosis de As (III) $\mu\text{moles} / \text{kg peso}$ (Media \pm desv. estándar)			
		12.5	25.0	50.0	90.0
URO-I pmol/24 h	636 \pm 361	862 \pm 57	811 \pm 321	374 \pm 183	1042 \pm 440
URO-III pmol/24 h	1191 \pm 813	832 \pm 686	1410 \pm 800	618 \pm 212	912 \pm 307
Heptacarboxi porfirina pmol/24 h	4386 \pm 2684	5223 \pm 1400	8315 \pm 3692	2669 \pm 732	3029 \pm 2151
Hexacarboxi porfirina pmol/24 h	329 \pm 272	206 \pm 236	290 \pm 108	697 \pm 300	383 \pm 172
Pentacarboxi porfirina-I pmol/24 h	264 \pm 127	512 \pm 213	469 \pm 252	1175 \pm 901	1012 \pm 314
Pentacarboxi porfirina- IIIpmol/24 h	265 \pm 80	841 \pm 308	1024 \pm 359	1685 \pm 721	2926 \pm 1288 ^J
COPRO-I pmol/24 h	478 \pm 133	507 \pm 144	735 \pm 195	567 \pm 329	510 \pm 390
COPRO-III pmol/24 h $\times 10^3$	24.4 \pm 9.8	33.2 \pm 11	60.3 \pm 19 ^J	51 \pm 21 ^J	48 \pm 25 ^J
Porfirinas Totales pmol/24 h	31989	42183	73354	58785	57814

^J Difs. significativas respecto al control $p < 0.05$
n=5

Fig. 3 Curva de calibración para la determinación de proteínas



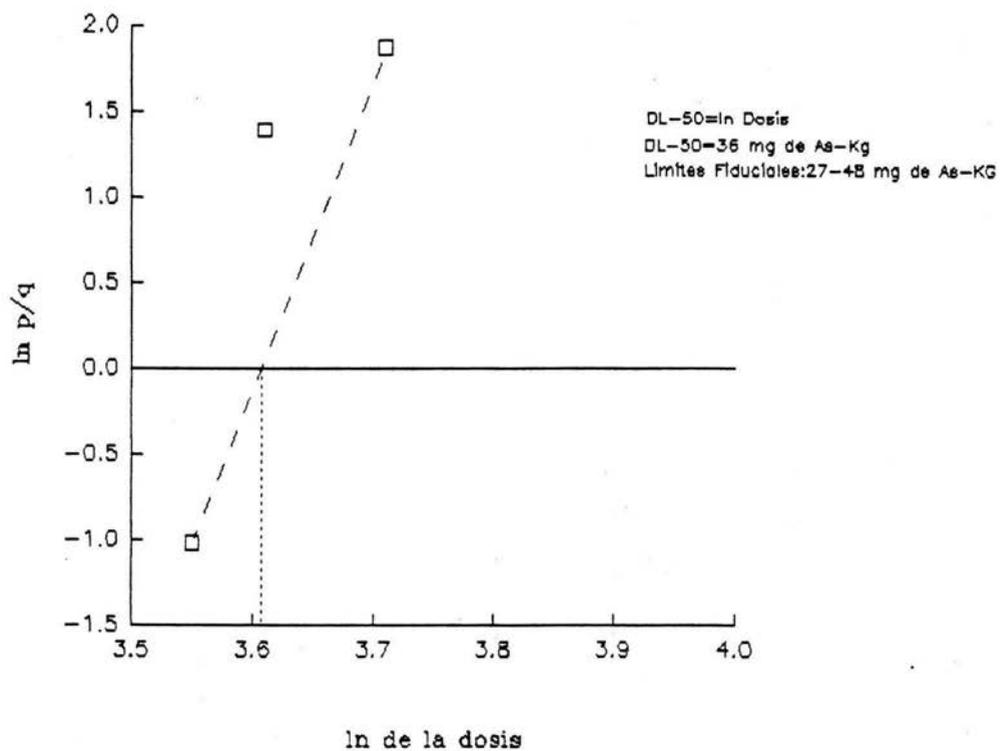


Fig. 4 Determinación de la DL-50 de arsenito de sodio expresada en ln de la Dosis. Determinada por el método de logit.

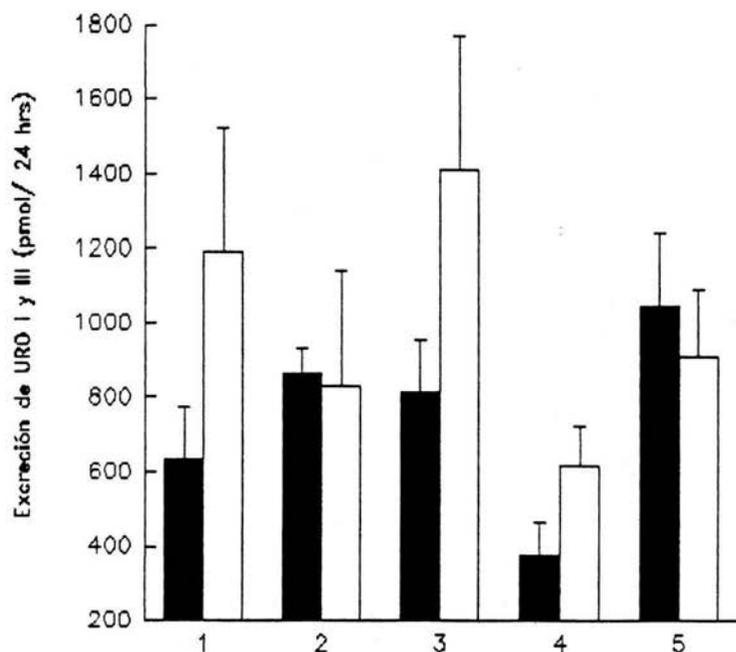


Fig. 5. Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de Uroporfirina I y III, determinadas por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e (n=5).

■ URO-I □ URO-III.

1:Control, 2 :12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles

5: 90 μ moles

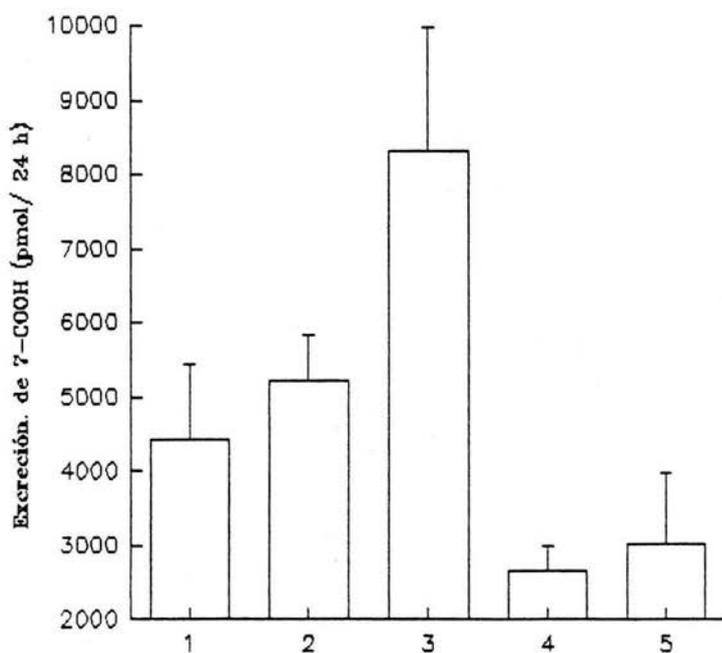


Fig. 6 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de Heptacarboxiporfirina, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e. (n=5).
1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles
5: 90 μ moles

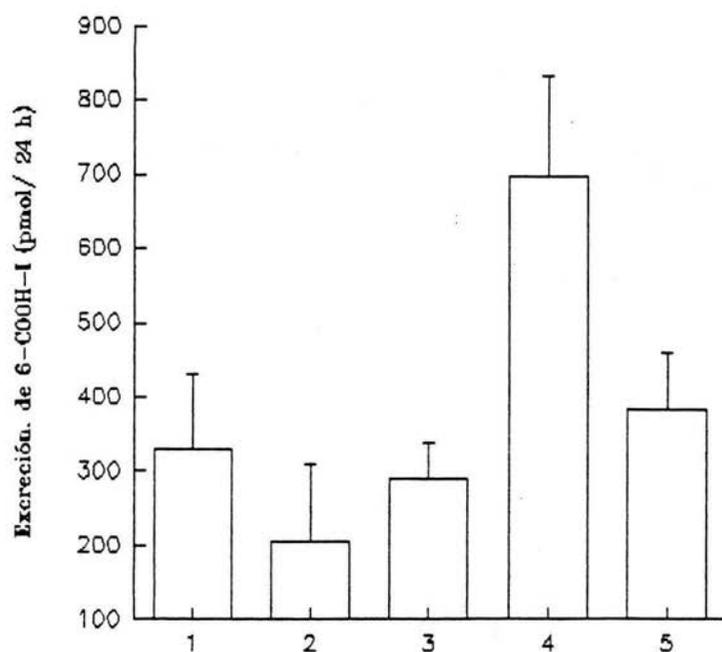


Fig. 7 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de Hexacarboxiporfirina, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e. (n=5).
 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles 5: 90 μ moles

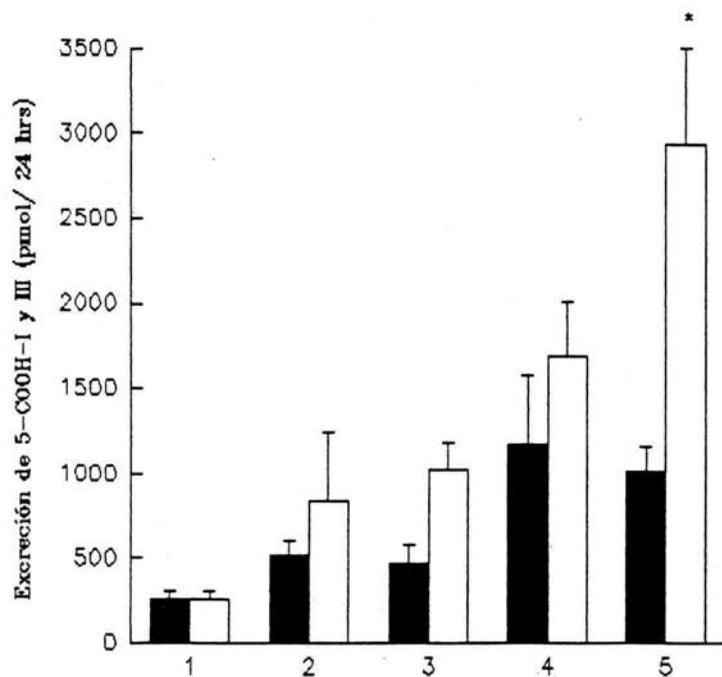


Fig. 8 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de Pentacarboxiporfirina I y III, determinadas por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e (n=5). * significativamente diferentes con respecto al control de acuerdo a la prueba de análisis de varianza $p \leq 0.05$ 5-COOH-I 5-COOH-III. 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3 :25 μ moles 4: 50 μ moles y 5: 90 μ moles.

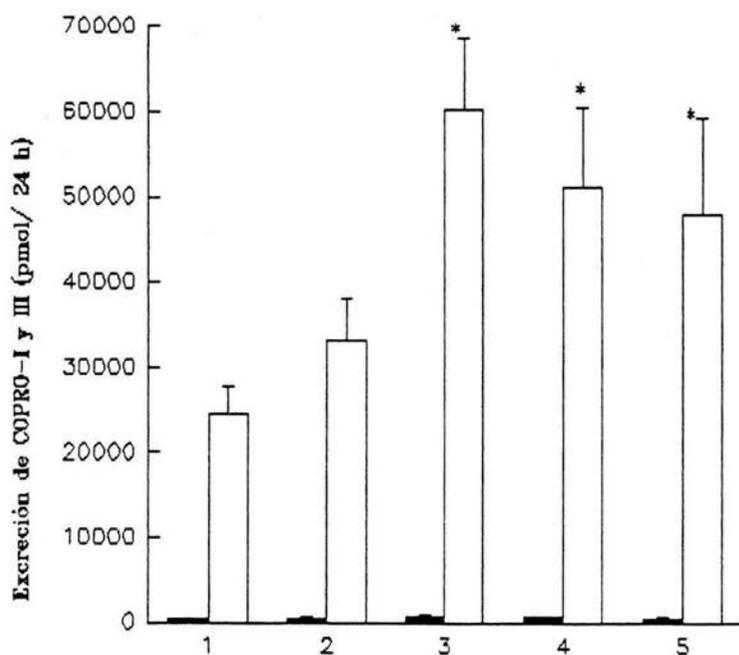


Fig. 9 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de Coproporfirina I y III, determinadas por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e. (n=5). * significativamente diferentes respecto al control de acuerdo a la prueba de análisis de varianza $p \leq 0.01$. ■ COPRO-I □ COPRO-III. 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles y 5: 90 μ moles

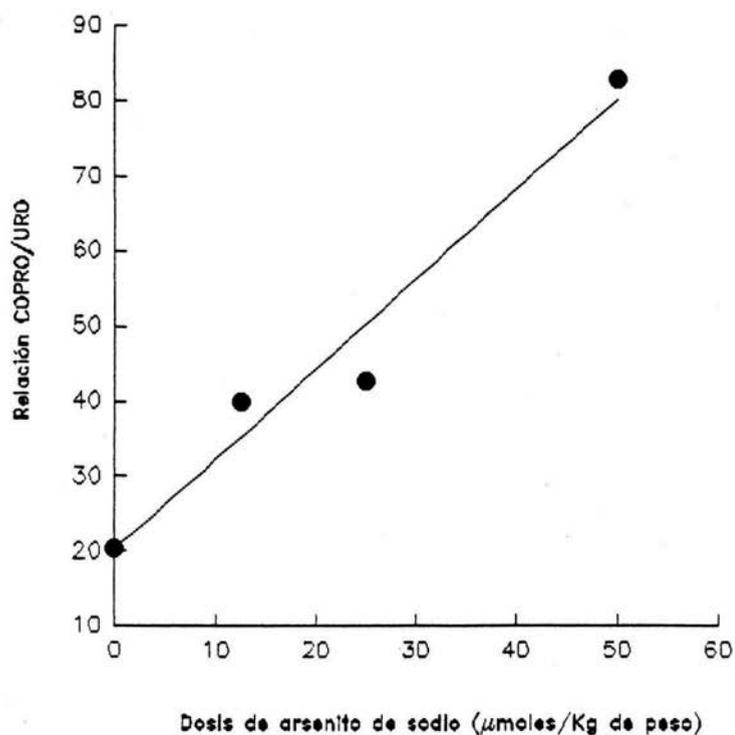


Fig. 10 Curva dosis—respuesta de la relación COPRO/URO urinaria en ratas tratadas con arsenito de sodio. $n=4$.

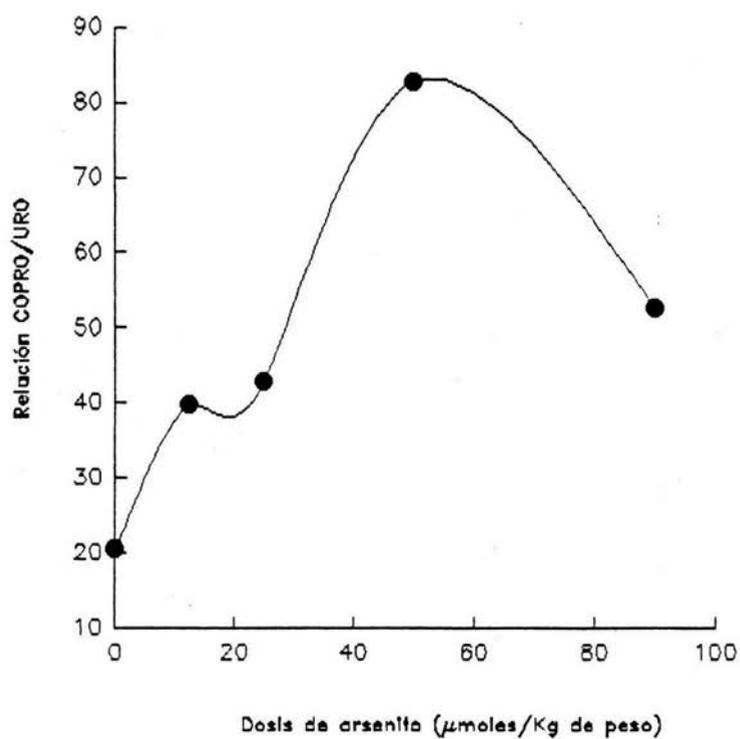


Fig. 11. Curva dosis-respuesta de la relación COPRO/URO urinaria en ratas tratadas con arsenito de sodio. $n=5$.

Tabla 5.- Efecto de la administración de As (III) en la relación COPRO/URO en porfirinas urinarias.

Grupo	Relación COPRO/URO	Número de veces arriba del control
Control	20.52	
12.5 μ moles	39.86	1.4
25.0 μ moles	42.75	2.0
50.0 μ moles	82.68	3.8
90.0 μ moles	52.63	1.8

En esta tabla se presenta la relación media de COPRO/URO de porfirinas urinarias, mostrándose el número de veces que aumenta en los grupos tratados respecto al grupo control (n=5 para cada dosis).

Tabla 6.- Efecto del arsenito de sodio sobre el contenido de porfirinas renales en ratas expresadas en pmol/mg de proteína en 250 mg de tejido.

T R A T A M I E N T O						
Porfirinas	Control	Dosis de As (III) μ moles/Kg de peso. Media \pm Desviación Estándar				
		12.5	25.0	50.0	75.0	90.0
URO-I	43 \pm 26	81 \pm 52	55 \pm 16	95 \pm 25	129 \pm 63 ^{&}	90 \pm 68
URO-III	139 \pm 49	262 \pm 150	213 \pm 37	226 \pm 47	527 \pm 87 ^{&}	585 \pm 46 ^{&}
Heptacarboxiporfirina III	687 \pm 373	1103 \pm 499	807 \pm 397	938 \pm 180	3346 \pm 2410 ^{&}	2624 \pm 1570
Hexacarboxiporfirina I	3.5 \pm 2.7	8.71 \pm 3	7.5 \pm 3.9	5.02 \pm 1	5.5 \pm 2.7	2.4 \pm 1.2
Hexacarboporfirina III	38 \pm 17	119 \pm 32	87 \pm 18	44 \pm 11	56 \pm 17	31 \pm 11
Pentacarboxiporfirina III	3.8 \pm 3.0	5.1 \pm 2.1	3.6 \pm 2.7	4.3 \pm 3.1	3.4 \pm 1.9	1.7 \pm 0.8
COPRO-III	116 \pm 58	158 \pm 56	128 \pm 19	63 \pm 18	46 \pm 24	28 \pm 9.5 ^{&}

& Difs. significativas respecto al control $p < 0.05$
 n=5

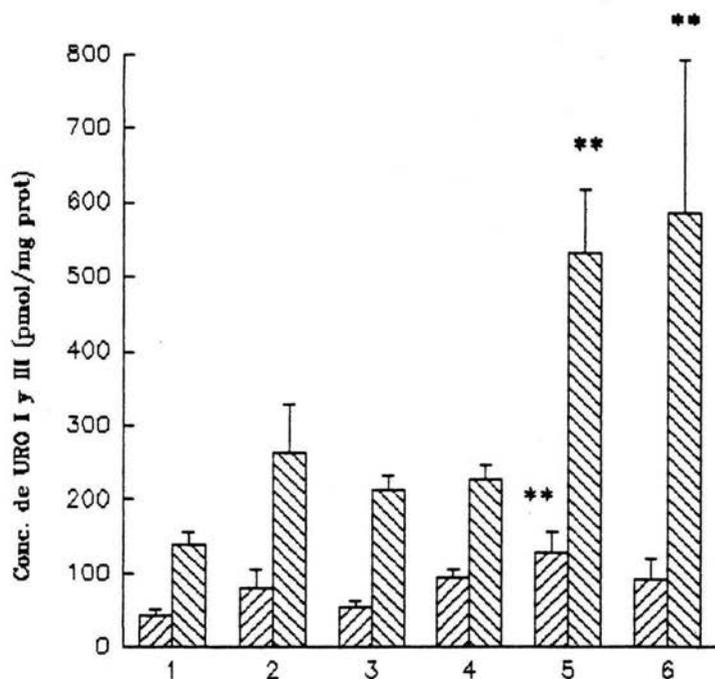


Fig. 12 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre el contenido renal de Uroporfirina I y III, determinadas por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e. (n=5) * significativamente diferentes con respecto al control $p \leq 0.05$.  URO-I  URO-III.
 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles, 5: 75 μ moles 6 :90 μ moles

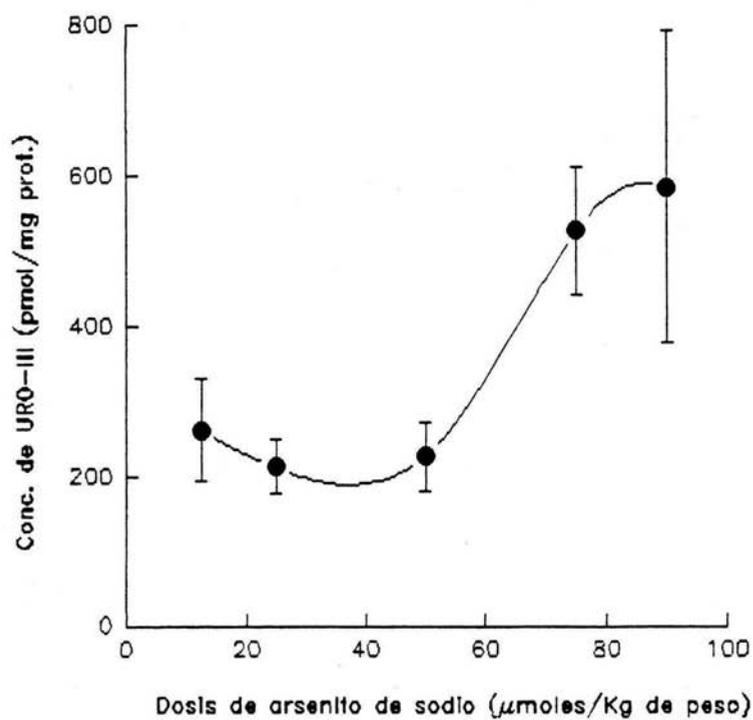


Fig. 13 Curva dosis-respuesta de uroporfirina III renal de ratas tratadas con arsenito de sodio, observándose que conforme aumenta la dosis aumenta la concentración de URO-III determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la concentración media ($n=5$).

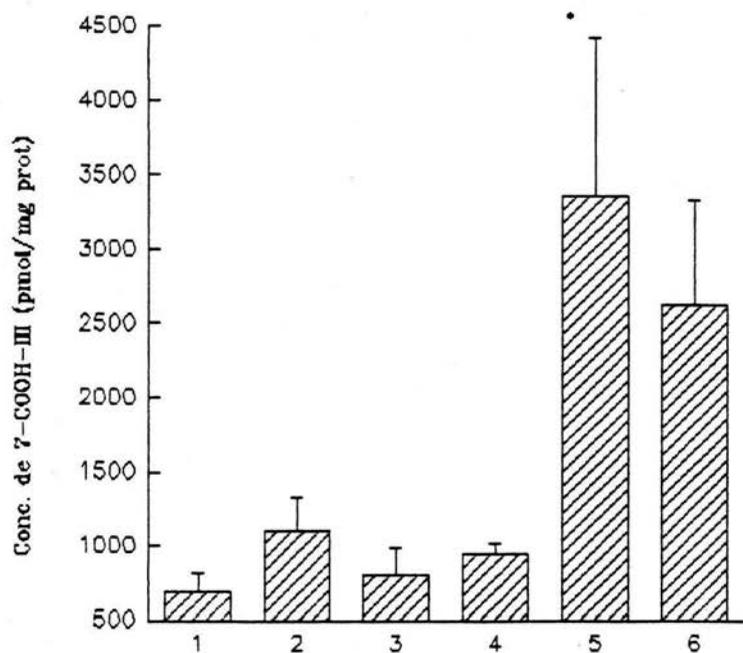


Fig. 14 Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre el contenido renal de Heptacarboxiporfirina, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm s.e (n=5). * significativamente diferentes respecto al control $p \leq 0.05$. 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles, 5: 75 μ moles 6: 90 μ moles.

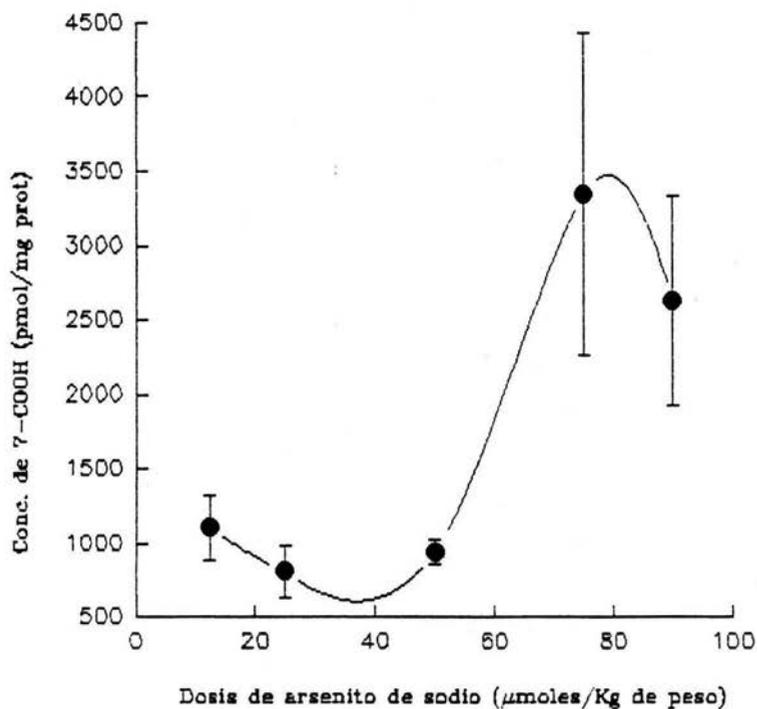


Fig. 15 Curva dosis-respuesta de heptacarboxiporfirina renal de ratas tratadas con arsenito de sodio, observándose que conforme aumenta la dosis aumenta la concentración de 7-COOH determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la concentración media. (n=5).

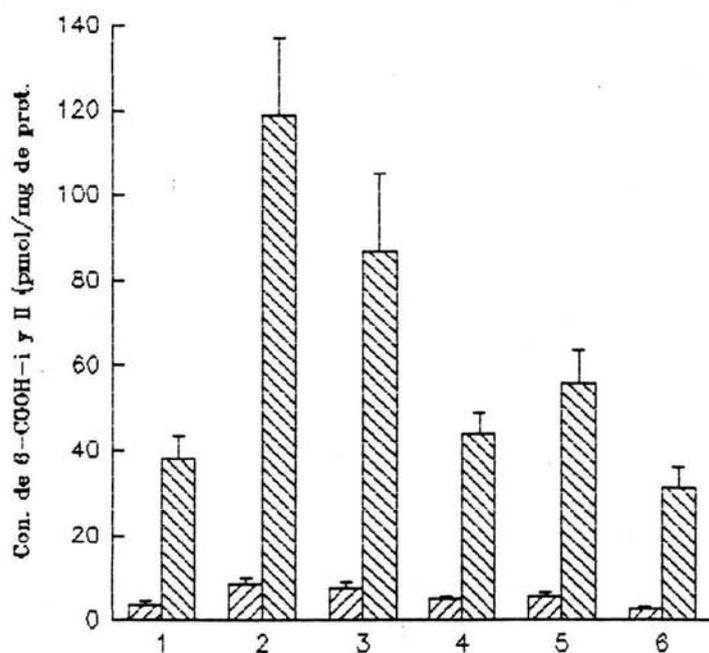


Fig. 16 Efecto de la administración de arsenito de sodio sobre el contenido renal de Hexacarboxiporfirina I y III, determinadas por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.s. ($n=5$)  6-COOH-I  6-COOH-III
 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles
 5: 75 μ moles y 6: 90 μ moles

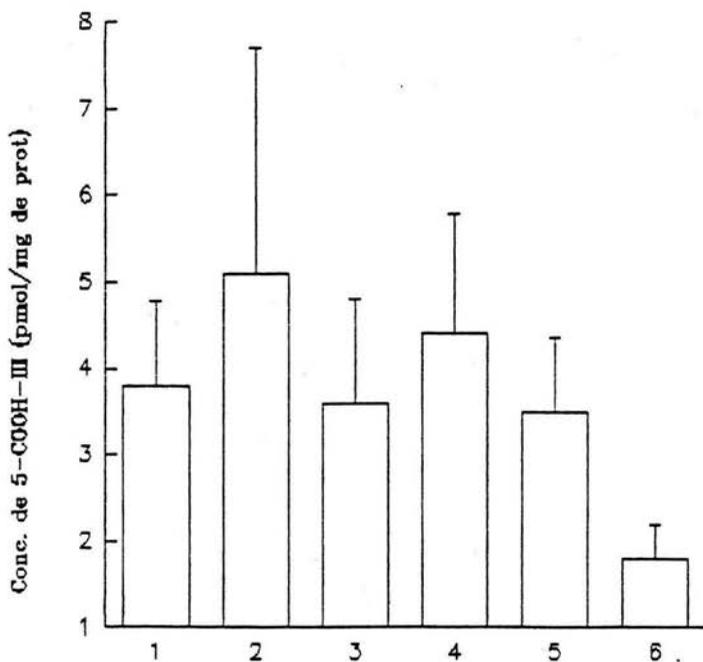


Fig. 17. Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre el contenido renal de Pentacarboxiporfirina III, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e. (n=5)
 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles
 5: 75 μ moles 6: 90 μ moles.

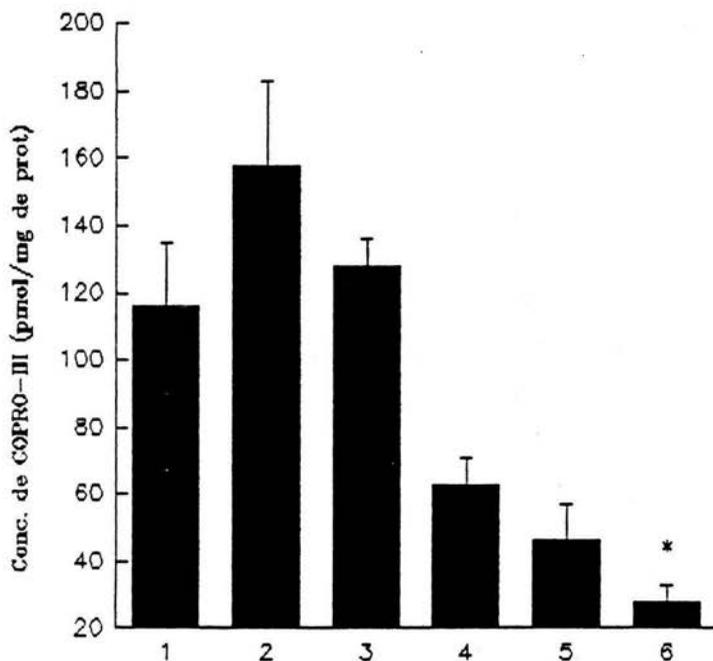


Fig. 18 Efecto de la administración de arsenito de sodio sobre el contenido renal de Coproporfirina III, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como la media \pm e.e (n=5). * significativamente diferentes respecto al control de acuerdo al análisis de varianza $p \leq 0.05$.
 1: Control, 2: 12.5 μ moles, 3: 25 μ moles, 4: 50 μ moles, 5: 75 μ moles, 6: 90 μ moles.

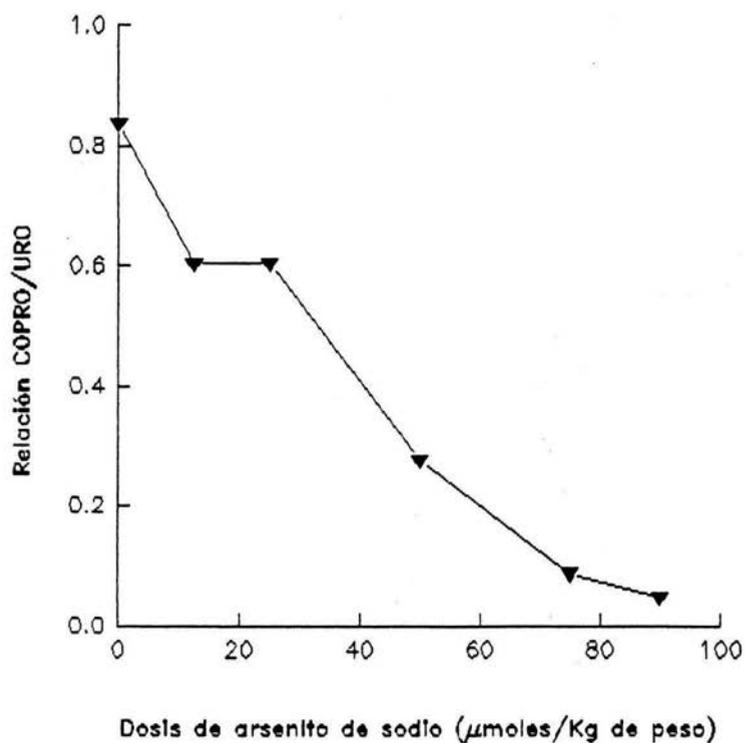


Fig. 20 Curva dosis-respuesta de la relación COPRO/URO renal, observándose que conforme aumenta la dosis de arsenito de sodio disminuye la relación COPRO/URO. (n=5 para cada punto).

Tabla 7.- Efecto de la administración de As (III) en la relación COPRO/URO en porfirinas renales.

Grupo	Relación COPRO/URO	Número de veces abajo del control
Control	0.8382	
12.5 μ moles	0.6032	1.4
25.0 μ moles	0.6034	1.4
50.0 μ moles	0.2778	3.0
75.0 μ moles	0.087	9.6
90.0 μ moles	0.047	18.0

En esta tabla se presenta la relación media de COPRO/URO de porfirinas renales, mostrándose el número de veces que disminuye en los grupos tratados respecto al grupo control.
(n=5 para cada dosis).

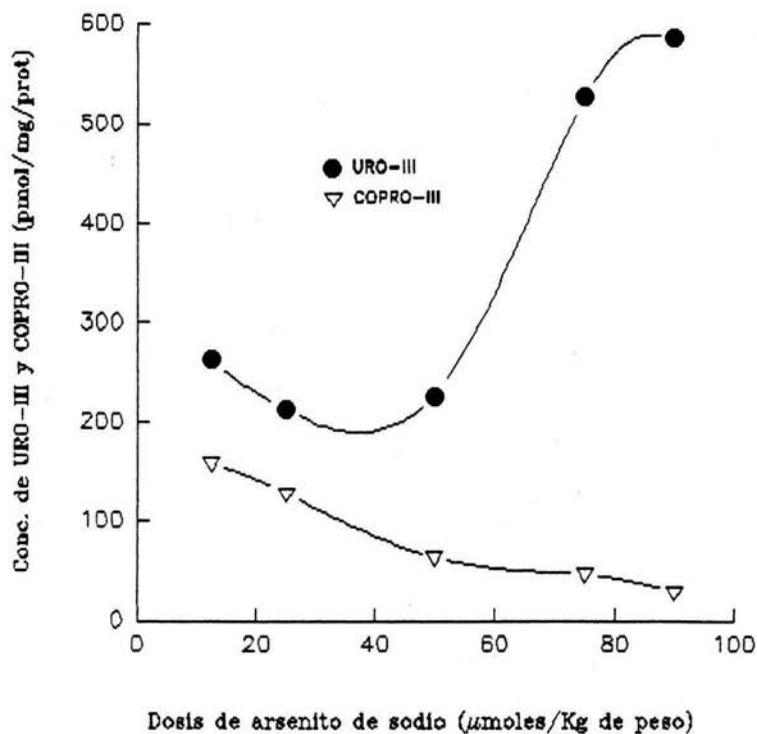


Fig. 21. Efecto de la administración del arsenito de sodio sobre el contenido renal de uroporfirina III y coproporfirina III en ratas tratadas con arsenito de sodio. Los resultados se expresan como concentración media ($n=5$)

Tabla 8. Excreción urinaria de As total en ratas intoxicadas con diferentes concentraciones de As (III). Media \pm desviación estándar.

Conc.de AsIII μ moles/Kg de peso	n	Conc. de AsT μ g/100g/día	% de Excreción
0	5	2.22 \pm 0.76	
12.5	5	19.0 \pm 4.2	11.84
25.0	5	44.0 \pm 5.5	13.43
50.0	5	77.0 \pm 30.0	11.84
75.0	5	139.0 \pm 37.0	13.97
90.0	5	208.0 \pm 74.0	17.76

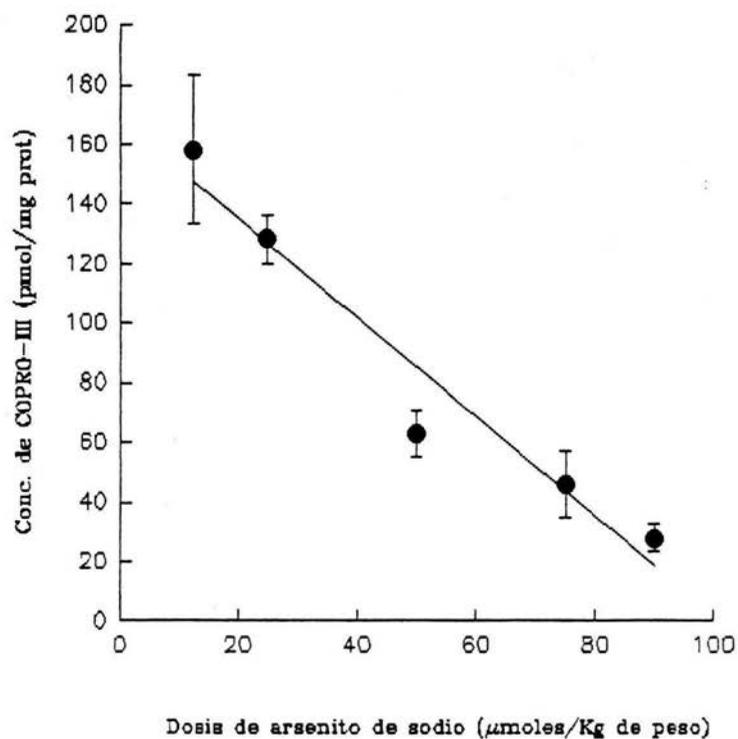


Fig. 19 Curva dosis-respuesta de COPRO-III renal de ratas tratadas con arsenito de sodio, observándose que conforme aumenta la dosis disminuye la concentración de COPRO-III, determinada por HPLC. Los resultados se expresan como concentración media ($n=5$).

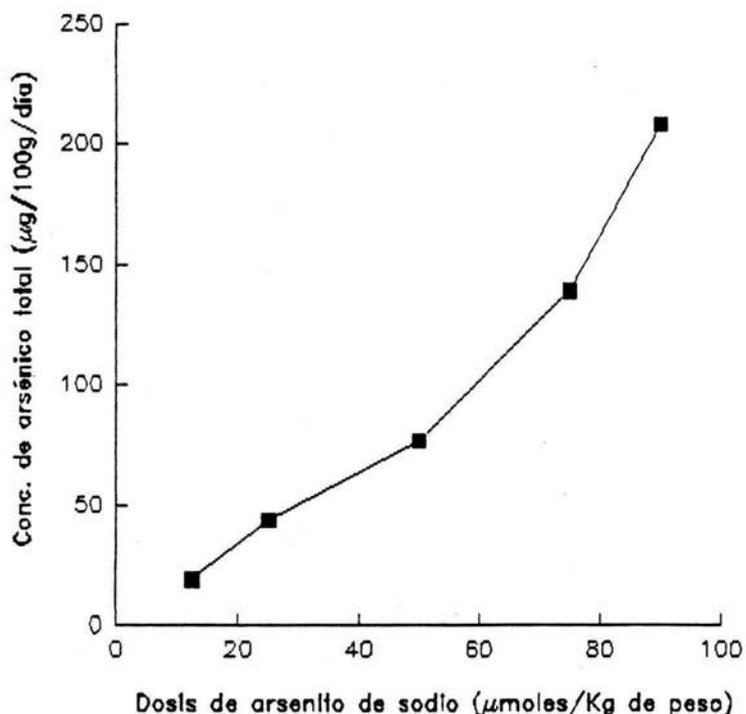


Fig. 22 Relación del arsenito de sodio sobre la excreción urinaria de arsénico total, observándose que conforme aumenta la dosis aumenta la concentración de AsT urinario de las ratas tratadas con arsenito de sodio. Los resultados se expresan como concentración media. ($n=5$, $y=2.28x - 18$, $r=0.98$, $p \geq 0.05$)

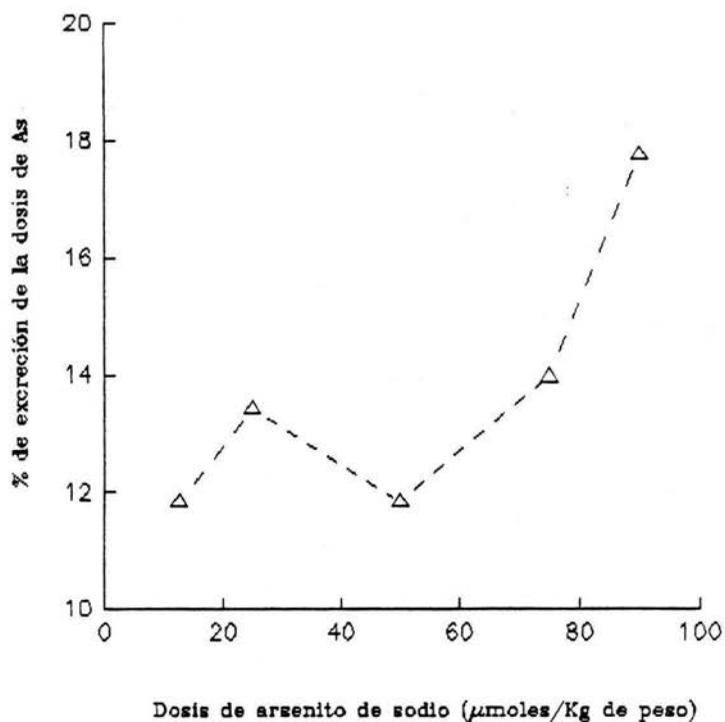


Fig. 23 Porcentaje de excreción de arsénico urinario con respecto a la dosis administrada de arsenito de sodio. Los cálculos se hicieron de acuerdo al volumen urinario y al peso de la rata

IV.- DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Estudios generales de toxicidad aguda.

La DL-50 para As (III) administrado subcutáneamente a ratas fué de 36 mg/Kg de peso, este valor es ligeramente menor que la DL-50 oral reportada en la misma especie que es de 41 mg/kg (NIOSH, 1977). Es posible que esta diferencia sea debido a que el As (III) administrado parenteralmente logra una biodisponibilidad mayor a cuando es administrado por vía oral (McKinney, 1992). Sin embargo, no es posible comparar la DL-50 subcutánea obtenida en este trabajo con otros valores publicados pues no hay información disponible.

4.1 Efecto del As (III) sobre la excreción de porfirinas urinarias.

Muchos metales pueden tener efectos porfirinogénicos (Marks, 1984). En este trabajo demostramos que el As (III) administrado en un esquema agudo es un agente porfirinogénico, pues se observaron severas alteraciones en el patrón y contenido urinario de porfirinas de las ratas tratadas.

Las alteraciones más evidentes causadas por la administración de As (III) fueron los efectos observados sobre la excreción de porfirinas totales en orina, esto queda de manifiesto en la observación del aumento de todas las porfirinas urinarias. Sin embargo, solamente la concentración urinaria de COPRO-III fué la que resultó ser estadísticamente diferente con respecto al control. Este perfil de porfirinas urinaria puede ser explicado por diversas alternativas no necesariamente excluyentes:

a) Una inducción de la hemo oxigenasa, la cual es la enzima a cargo de degradar al hemo. Así, un incremento en la actividad de esta enzima tendría como consecuencia una disminución en las pozas celulares de hemo, estimulando mediante un mecanismo de retroalimentación negativa la síntesis de los precursores de porfirinas, en consecuencia un aumento en el contenido tisular de porfirinas y finalmente un incremento en su excreción urinaria (Rimington, 1987).

Existen varias evidencias en donde se ha observado que la hemo oxigenasa puede ser inducida por diversos metales. El grupo de Kappas (Maines y Kappas en 1976; Drummond y Kappas, 1981) ha reportado que la administración subcutánea e individual de antimonio, cobalto, níquel, fierro, cadmio, cobre, litio, zinc, plomo y mercurio, fueron capaces de inducir a la hemo oxigenasa, provocando una disminución del hemo microsomal hepático, un aumento en la actividad de la ALA-S y como consecuencia, un incremento en la síntesis de porfirinas.

Sardana y col., (1981), reportaron que la administración subcutánea de arsenito y arsenato de sodio (25-100 $\mu\text{mol/Kg}$) provocó una inducción de la hemo oxigenasa hepática, observándose una mayor inducción en las ratas tratadas con As (III). En este mismo sentido, Cebrian y col., (1988), observaron incrementos significativos en la actividad de la ALA-S en ratas tratadas crónicamente con As (III) en agua de bebida. Esta observación coincidió con disminuciones importantes en la saturación de la triptofano pirrolasa, manifestando una disminución en las pozas

celulares hepáticas de hemo libre. La disminución en las pozas celulares de hemo libre como respuesta al tratamiento con arsenito fue explicado como consecuencia de una inducción de la hemo oxigenasa. Esto fue corroborado posteriormente por los mismos autores (Albores y col., 1989), al observar incrementos en la actividad de la hemo oxigenasa y ALA-S posterior a la administración aguda de arsenito de sodio (75 μ moles/kg de peso).

Con todo lo anterior se puede proponer que el incremento en la excreción urinaria de porfirinas puede ser debido a un incremento en la síntesis de porfirinas. El incremento en la síntesis de porfirinas es explicado por una inducción de la ALA-S a consecuencia de una disminución de las pozas celulares de hemo libre hepático (Cebrián y col., 1988), a su vez causada un incremento de la degradación del hemo por el efecto del As de inducir la actividad de la hemo oxigenasa (Albores y col., 1989).

b) Inhibición de la COPRO-OX. El reflejo de una inhibición de esta enzima sería un incremento notable en la excreción urinaria de coproporfirina III, el cual fue el principal hallazgo cualitativo de este trabajo. La inhibición de la COPRO-OX ya ha sido reportada por Woods y Southern (1989), quienes observaron la inhibición de esta enzima en hígado de ratas tratadas subcrónicamente con arsénico en agua de bebida.

c) Otra explicación para la coproporfirinuria III consiste en que el tratamiento agudo con As haya inhibido a la ferroquelatasa y que por rebosamiento se estuviera acumulando PROTO, y que este aumento en PROTO trajera como consecuencia un incremento en la

acumulación de COPRO III.

Con respecto a pentacarboxiporfirina-III se observa que existió un aumento significativo en la dosis de 90 μ moles As/Kg de peso, esto puede ser debido a que haya una disminución en la eficiencia de la última descarboxilación del uroporfirinógeno por la URO-D. Es importante remarcar que el incremento en la pentacarboxiporfirina-III aparece como una alteración en el perfil urinario de porfirinas observada en los animales tratados con As en este trabajo. Esta observación se debe a la capacidad y resolución del método analítico empleado.

No se observó ninguna alteración respecto a la excreción urinaria de URO-I y III. Estos resultados difieren de los reportados por Woods y col., (1977, 1978). Esta discrepancia puede explicarse por la diferencia en el esquema de tratamiento utilizada, ya que en este trabajo el tratamiento se realizó en forma aguda, mientras que en los trabajos de Woods y col., los esquemas de exposición fueron de tipo crónico.

4.3 Efecto del As (III) sobre el contenido de porfirinas renales

El arsenito de sodio resultó ser un agente porfirinogénico en el riñón ya que su contenido de porfirinas se alteró. En primer lugar, se observó un aumento en la concentración renal de URO-III, siendo estadísticamente significativo en los animales tratados con 75 y 90 μ moles As/Kg. Estos animales también presentaron un aumento en el contenido renal de heptacarboxiporfirina-III. Por otra parte, la concentración tisular

renal de coproporfirina III disminuyó progresivamente, en forma dosis-dependiente, logrando un decremento significativamente mayor en los animales tratados con 90 μ moles As/Kg. Estas alteraciones en la concentración renal de porfirinas pueden ser explicadas por una inhibición de la uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D) renal en las ratas tratadas con As. La URO-D es la enzima que cataliza la descarboxilación de URO-III a COPRO-III, formando las 7, 6 y 5 carboxiporfirinas como productos intermediarios. La inhibición de la URO-D provocaría una acumulación del sustrato (URO III) y una menor formación del producto (COPRO III) y en consecuencia una disminución en la relación COPRO/URO en tejido renal. La asociación causal entre la inhibición de la URO-D y la disminución de la relación de coproporfirinas/uroporfirinas tisulares ha sido propuesta previamente por Doss (1979). Este autor, reportó que la inhibición de la URO-D es la que causa la porfiria hepática crónica, resultando primero una acumulación de uro y heptacarboxiporfirinas hepáticas, y en consecuencia una inversión en la relación COPRO/URO, lo cual posteriormente reflejaría en la excreción urinaria de uro y heptacarboxiporfirinas. Existen diversas evidencias en los cuales la actividad de la URO-D es capaz de ser inhibida por sustancias químicas. Por ejemplo Francis y Smith (1987) sugieren que la URO-D también es inhibida en hígado de ratones tratados con hidrocarburos aromáticos.

Por otra parte el grupo de Woods (Woods y col., 1981 y Woods y col., 1984) observaron los efectos de varios metales traza sobre la actividad de la URO-D hepática "in vitro", observando que

tanto el As (III) como el arsenato inhiben significativamente esta enzima y ellos sugieren que esta inhibición puede ser debida a la formación del mercaptido del metal con los grupos sulfihidrilos de la URO-D. García-Vargas y col. (1994), observaron una disminución en la actividad de URO-D renal y hepática en ratones expuestos subcrónicamente a arsenito y arsenato de sodio subcrónicamente *in vivo*. En este trabajo la inhibición de la URO-D renal fué significativamente mayor que la hepática. Además este efecto fué mas acentuado en los ratones tratados con arsenito en comparación a los tratados con arsenato. Finalmente García-Vargas y col (1994a), observaron una inversión en la relación COPRO/URO en poblaciones humanas expuestas crónicamente a arsénico en el agua de bebida. Estas alteraciones fueron interpretadas como un resultado de la inhibición "*in vivo*" de la URO-D en los individuos expuestos a arsénico. Así la acumulación de URO-III observada en este trabajo sugiere una inhibición de la URO-D, lo cual es apoyado por el hecho de que la acumulación fué dosis-dependiente.

4.4 Excreción de arsénico total en orina.

Respecto a la concentración de arsénico total en orina, se pudo observar que se presentaron diferencias de todos los grupos tratados con respecto al control. La excreción urinaria de arsénico total presento una conducta tipo dosis-respuesta, observandose que conforme aumentaba la dosis de As (III) aumentaba la concentración de arsénico total en orina.

Por otra parte en cuanto al porcentaje de excreción urinaria de arsénico en 24 horas, se pudo observar que todos los valores obtenidos en los grupos tratados con As (III) entran en el rango reportado por Odanaka y col. 1980 el cual se encuentra entre un 10 y 17 %.

V.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- * El As (III) de sodio actúa como un agente porfirinogénico, en ratas en un esquema de intoxicación aguda.

- * La administración de As (III) causa un aumento de porfirinas totales urinarias, sobresaliendo el aumento en la excreción urinaria de COPRO-III. Estas alteraciones pueden ser explicadas por:
 - i) Inducción de la hemo oxigenasa, causando degradación intracelular de hemo y en consecuencia una disminución en las pozas celulares de hemo libre. Se estimula a la ALA-S para aumentar la síntesis de porfirinas y reajustar las pozas celulares de hemo libre.
 - ii) Inhibición de la COPRO-OX trayendo como consecuencia un aumento en la excreción de su sustrato COPRO-III
 - iii) Inhibición de la ferroquelatasa trayendo como consecuencia un aumento de PROTO y por rebosamiento se este acumulando COPRO-III

- * El As (III) causó un aumento de URO-III renal y una disminución de COPRO-III probablemente debido a una inhibición de URO-D renal. Estos cambios en el contenido de porfirinas renales fué dependiente de la dosis.

VI. - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1.- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1992). Toxicological Profile for Arsenic. U.S. Public Health Service.

2.- Albores, A., Cebrian, M.E., Bach, P.H., Connelly, J.C., Hinton, R.H and Bridges, J.W. (1989). Sodium arsenite induced alterations in bilirubin excretion and heme metabolism. *J. Biochem. Toxicol.* **4(2)**:73-78.

3.-Bonsnes, R.W and Tausky, H.H. (1945). On the colorimetric determination of creatinine. By the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* **158**:581.

4.- Bradford, M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.

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

6.- Cebrian, M.E.; Albores, A., Aguilar, M. and Blakely, E. (1983). Chronic Arsenic poisoning in the North of Mexico. *Human Toxicol.* **2**:121-133.

7.- Cebrian, M.E. (1986). Some hepatic and extrahepatic effects of arsenic and selenium on heme metabolism. University of Surrey, Guilford. pp. 1-20.

8.- Cebrian, M.E., Albores, A., Connelly, J.C., and Bridges, J.W. (1988). Assessment of arsenic effects on cytosolic heme status using tryptophan pyrrolase as an index. *J. Biochem. Toxicol.* **3**:77-86.

- 9.- Clarkson, T.W, Friberg,L., Nordberg,G. and Sager,P. (1988). Biological Monitoring of Toxic Metals. NIOSH Plenum Press Mew York. pp. 303-321.
- 10.- Cox, D.H. (1980). Arsine evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J. Analyt. Toxicol.* **4**:207-211.
- 11.- Crecelius, E.A. (1974). The geochemistry of arsenic and antimony in Puget Sound and Lake Washington. University of Washington.
- 12.- Crecelius, E.A. (1977). Arsenite and arsenate levels in wine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **18**:227-230
- 13.- Chilvers, D.C. and Peterson, P.J. (1987). Global cycling of arsenic. In: Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the environment. (eds). John Wiley and Sons Ltd, Ney York, pp. 279-301.
- 14.- De Matteis, F. and Prior, B. (1962). Experimental hepatic porphyria caused by feeding 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine. *Biochem. J.* **83**:1-8.
- 15.- De Matteis, F., Harvey, C., Reed, C and Hempenius, R. (1988). Increased oxidation of uroporphyrinogen by an inducible liver microsomal system. *Biochem.J.* **250**:161-169.
- 16.- Dobbs, A.J., Phil,D. and Grant, C. (1976). Report on the burning of wood treated whit wood preservatives containing copper, chromium and arsenic. Aylesbury, Buckninhm shire, UK, Building Research Establishment.
- 17.- Done, A.K. and Peart, A.J. (1971). Acute toxicities of arsenical herbicides. *Clin. Toxicol.* **4**:343-355.

18.- Doss, M. (1979). Chronic hepatic porphyrias in humans (endogenic factors). Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

19.- Drummond, G.S. and Kappas, A. (1981). Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasitocidal agents. *J. Exp. Med.* **153**:245-256.

20.- Durán, D.A., Cisneros, C.A., Fernandez, A.M., Gersenowies, R.J., Meraz, M.S y Vargas, V.A. (1985). Manual de Técnicas Estadísticas. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. pp.140.

21.- Franke, K.W. and Moxon, A.L. (1936). A comparison of the minimum fatal doses of selenium, tellurium, arsenic and vanadium. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **58**:454-459

22.- Friberg, L., Nordberg, G., and Vouk, V.B. (1979). Handbook on the toxicology of metals. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp 293-313.

23.- Fries, G.F. and Marrow, G.S. (1975) Hexachlorobenzene retention and excretion by dairy cows. *J. Dairy Sci.* **59**(3):475-480.

24.- Fuhrhop, J.H. and Smith, K.M. (1975). Laboratory methods in porphyrin and metalloporphyrin research. Elsevier Scientific, Netherlands, Amsterdam. pp.243.

25.- Galvao, L y Corey, G. (1987). Arsénico. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Serie 1.

26.- García-Vargas, G., Gracia-Rangel, A., Aguilar-Romo, M., García-Salcedo, J., Del Razo, L.M., Ostrosky-Wegman, P., Cortinas de Nava C. and Cebrian, M.E. (1991). A pilot study on the urinary

excretion of porphyrins in human populations chronically exposed to arsenic in Mexico. *Human Exp. Toxicol* 10:189-193.

27.- García-Vargas, G.G., Cebrian, M.E., Albores, A., Lim, C.K and De Matteis, F. (1994). Time dependent porphyric response in mice subchronically exposed to arsenic. *Hum. Exp. Toxicol.* Vol. 13. En prensa.

28.- García-Vargas, G.G., Del Razo, L.M., Cebrian, M.E., Albores, A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Gonsebatt, M., Lim, C.K. and De Matteis, F. (1994a). Altered urinary porphyrin excretion in a human population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum. Exp. Toxicol.* Vol. 13. En prensa.

29.- Goldstein, J.A., Hickman, P. and Jue, D.L. (1974). Experimental hepatic porphyria induced by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 27:437-448.

30.- González, S.G. (1977). Acute arsenic poisoning in dairy cattle in the Lagoon Region. *Memorias del I Simposio Internacional de Laboratorios Veterinarios de Diagnósticos, México, Vol. III.* pp. 551-560.

31.- Gordus, A.A. (1991). *Química Analítica.* McGraw Hill, México, pp.255.

32.- Gregus, Z. and Klaassen, C.D. (1980). Disposition of metals in rats: A comparative study of fecal, urinary and biliary excretion of eighteen metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85:24-38.

33.- Harrison, J.W., Packman, E.W. and Abbott, D.D. (1958). Acute oral toxicity and chemical and physical properties of arsenic trioxides. *Arch. Ind. Health.* 17:118-123.

34.- How, J.K. (1989). Separation of zinc-protoporphyrin and porphyrin methyl esters by high performance liquid chromatography. *J.Liquid Chrom.* **12**:2611-2619.

35.- Johnson, D.L and Braman, R.S. (1975). Alkyl-and inorganic arsenic in air samples. *Chemosphere.* **6**:333-338.

36.- Klaassen, C.D. (1974). Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **29**:447-457.

37.- Lauwerys, R., Buchet, J.P. and Roels, H. (1979). The determination of trace levels of arsenic in human biological Materials. *Arch. Toxicol.* **41**:239-247.

38.- Lehman, P.A. (1980). Dosis letal o efectiva media: Un cálculo manual fácil y rápido. *Arch. Farmacol. Toxicol.* **VI(2)**:161-178.

39.- Letey, J., Robert, C., Penberth, M. and Vasek, C. (1986). An agricultural dilemma: drainage water and toxics disposal in San Joaquin Valley. Division of Agricultural and Natural Resources, University of California, Publication 3319.

40.- Li, F. (1987). Studies of haem biosynthesis and metabolism by high-performance liquid chromatography. Harrow, Middlesex U.K.

41.- Lunde, G. (1977). Occurrence and transformation of arsenic in the marine environment. *Environ. Health Perspect.* **19**:47-52.

42.- Maines, D.M. and Kappas, A. (1976). Studies the mechanism of induction of heme oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem. J.* **154**:125-131.

43.- Marafante, E. and Vahter, M. (1987). Solubility, retention and metabolism of intratracheally and orally administered inorganic

compounds. *Environ. Res.* **42**:72-82.

44.- Marks, G.S. (1984). Exposure to toxic agents: the heme biosynthesis pathway and hemoproteins as indicator. *CRT. Crit. Rev. Toxicol.* **15**:151-179.

45.- Martindale, W. (1977). *The Extra Pharmacopea*. 27th edition. The Pharmaceutical Press, London.

46.- Martínez, G., Cebrian, M., Chamorro, G. y Jauge, P. (1983). Urinary uroporphyrin as an indicator of arsenic exposure in rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**:171-174.

47.- Mckinney, J.D. (1992). Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans. *Environ. Geochem. Health.* **14**:43-48.

48.- Minerals Yearbook. (1990). Government Printing Office, Washington.

49.- Miyuki, H., Akiyo, T., Akira, H. and Noburu, I. (1990). Effects of glutathione depletion on the acute nephrotoxic potential of arsenite and on arsenic metabolism in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**:469-481.

50.- Molina, G., Garza-Chapa, R., González, D y Ramírez, M. (1977). Porfirias. *Gaceta Med. Méx.* **113**(4):191-195.

51.- Morrison, J.L. (1969). Distribution of arsenic from poultry litter in broiler chickens, soils, and crops. *J. Agric. Food. Chem.* **17**:1288-1290.

52.- Mukerji, S.K., Pimstone, N.R and Burns, M. (1984). Dual mechanism of inhibition of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase activity by ferrous iron: Its potential role in the genesis of

porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 87:1248-1254.

53.- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (1977) Registry of toxic effects of chemical substances. Vol. II. Cincinnati, Ohio.

54.- Nelson, H.A., Crane, M.R. and Tomson, K. (1971). Inorganic arsenic poisoning in pastured feeder lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158:1943-1945.

55.- Odanaka, Y., Matano, O. and Goto, S. (1980). Biomethylation of inorganic arsenic by the rat and some laboratory animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24:452-459.

56.- Rideout, J.M., Wright, D.J and Lim, C.K. (1983). High performance liquid chromatography of uroporphyrin isomers. *J. Liquid Chrom.* 6(2):383-394.

57.- Rimington, C. (1987). Haem Biosynthesis and Porphyrins: 50 years in Retrospect. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27:473-486. (1987).

58.- San Martin de Viale, L.C., Nacht, S and Grinstein, M. (1970). Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. A study of the porphyrins excreted by urine. *Clin. Chim. Act.* 28:13-23.

59.- Sardana, M.K., Drummond, G.S., Sassa, S. and Kappas, A. (1981). The potent heme oxygenase inducing action of arsenic and parasiticidal arsenicals. *Pharmacology.* 23:247-253.

60.- Schreiber, W.E., Vidmantos, A.R. and Labbé, R.F. (1983). Liquid-Chromatographic profiles of urinary porphyrins. *Clin. Chem.* 29(3):527-530

61.- Schwartze, E. (1922). The so-called habituation to "arsenic": Variation in the toxicity of arsenous oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 20:181-203.

62.- Sinclair, P.R., Bement, W.J., Bonkovsky, H.L., Lambrecht, R.W., Frezza, J.E., Sinclair, J.F., Urquhart, A.J and Elder, G.H. (1986). Uroporphyrin accumulation produced by halogenated biphenyls in chick-embryo hepatocytes. *Biochem. J.* 237:63-71.

63.- Snedecor, G.W y Cochran, W.G. (1977) *Métodos Estadísticos*. C.E.C.S.A, México. 4a. impresión. pp.701.

64.- Steel, R.G y Torrie, J.H. (1988). *Bioestadística*. Principios y procedimientos. McGrawHill, México. 2a. ed. pp.622.

65.- Straka, J.G., Rank, J.M., and Bloomer, J.R. (1990). Porphyria and porphyrin metabolism. *Annu. Rev. Med.* 41:457-469.

66.- Takashi, M., Hiroyuki, I., Tatsuyuki, O., Ginji, E., Shun'ichi, H. and Shoji, F. (1993). Renal lesions induced in F344/DuCrj rats by 4-weeks oral administration of dimethylarsinic acid. *Toxicol. Let.* 66:53-61.

67.- Tamaki, S. and Frankerberger, W.T. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental biochemistry of arsenic*. Vol. 124 New York. pp. 79-110

68.- Tomokuni, K. and Ichiba, M. (1990). Interaction between nickel and lead in relation to porphyrin metabolism in mice. *Indust. Health.* 28:145-149.

69.- Vahter, M. and Lind, B. (1986). Concentrations of arsenic in urine of the general population in Sweden. *Sci. Total Environ.* 54:1-12.

70.- Vahter, M and Norin (1980). Metabolism of As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ. Res.* **21**:446-457.

71.- Vallee, B.L., Ulmer, D.D. and Wacker, W.C. (1960). Arsenic toxicology and biochemistry. *Arch. Ind. Health.* **21**:132-151.

72.- Wakao, N., Koyatsu, H., Komai, Y., Shimo Kawara, H., Sakurai, Y. and Shiota, H. (1988). Microbial oxidation of arsenate and occurrence of arsenite-oxidizing bacteria in acid mine water from a sulfur-pyrite mine. *J. Geomicrobiol.* **6**:11-24.

73.- Woods, J., Bowers, M. and Davis, H. (1991). Urinary porphyrin profiles as biomarkers of trace metal exposure and toxicity: Studies on urinary porphyrin excretion patterns in rats during prolonged exposure to methyl mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**:464-476.

74.- Woods, J.S., Eaton, D.L. and Lukens, C. (1984). Studies on porphyrin metabolism in the kidney. *Mol. Pharmacol.* **26**:336-341.

75.- Woods, J.S. and Fowler, B. (1977). Effects of chronic arsenic exposure on hematopoietic function in adult mammalian liver. *Environ. Health Perspect.* **19**:209-213.

76.- Woods, J.S. and Fowler, B. (1978). Altered regulation of mammalian hepatic heme biosynthesis and urinary porphyrin excretion during prolonged exposure to sodium arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43**:361-371.

77.- Woods, J.S., Kardish, R. and Fowler, B. (1981). Studies on the action of porphyrinogenic trace metals on the activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res.*

Comm. 103(1):264-271.

78.- Woods, J.S. and Southern, M. (1989). Studies on the ethiology of trace metal-induced porphyria. Effects of porphyrinogenic metals on coproporphyrinogen oxidase in rat liver and kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97:183-190.

79.- Woolson, E.A. and Kearney, P.C. (1973). Persistence and reaction of (¹⁴C) cacodylic acid in soils. *Environ. Sci. Technol.* 7:47-50.

80.- World Health Organization (WHO). (1981). Arsenic. *Environ. Health Crit.* 18. Genova.

81.- World Health Organization (WHO). (1992). Revision of the guidelines for drinking-water quality. Report of the final task group meeting Geneva, Switzerland, 21-25 september, 1992.

82.- Wright, D.J., Rideout, J.M. and Lim, C.K. (1983). High-performance liquid chromatography of coproporphyrins isomers. *Biochem. J.* 209:553-555.