



17 300627
24
UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Determinación de los Parámetros Hematológicos
en la Intoxicación Aguda con Arsénico Inorgánico**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
PRESENTA
AURORA LARA VARGAS

Director de Tesis: **DRA. ARACELI SANCHEZ DE CORRAL**

México, D. F., 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

"DETERMINACION DE LOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS EN LA

INTOXICACION AGUDA CON ARSENICO INORGANICO"

VOTO APROBATORIO U.L.S.A



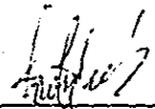
DRA. ARACELI SANCHEZ DE CORRAL



Q. M. TERESA ESTRADA DE GOMEZ MURIEL



Q. JOSE LUIS GONZALEZ HERRERA



Q.F.B. MARTHA MUSTRE DE LEON

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCION	3
1. ARSENICO	
1.1 Generalidades	3
1.2 Aspectos químicos	3
1.3 Producción minera	5
1.4 Obtención	6
1.5 Distribución en el ambiente	
1.5.1 Suelo	7
1.5.2 Aire	8
1.5.3 Agua	8
1.5.4 Alimentos y otros	9
1.6 Usos	10
1.7 Toxicocinética	
1.7.1 Absorción	
1.7.1.1 Absorción por el tracto respiratorio	11
1.7.1.2 Absorción gastrointestinal	11
1.7.1.3 Absorción por piel	12
1.7.2 Distribución y acumulación	12
1.7.3 Biotransformación	13
1.7.4 Eliminación	14
1.8 Efectos tóxicos	
a) intoxicación aguda	15
b) intoxicación crónica	16

1.9 Mecanismos de toxicidad	20
1.10 Criterios de selección del tejido considerado en este estudio	22
 2. S A N G R E	
 2.1 Generalidades	23
2.2 Funciones	23
2.3 Composición	
2.3.1 Plasma	24
2.3.2 Leucocitos	25
2.3.3 Plaquetas	25
2.3.4 Eritrocitos o glóbulos rojos	26
2.3.4.1 Hemoglobina	27
2.3.4.2 Glutación reducido (GSH)	28
2.3.4.3 Membrana o estroma	29
2.4 Eritropoyesis	30
2.5 Metabolismo en los eritrocitos	31
2.6 Defectos enzimáticos en los eritrocitos	37
2.6.2 Anemia	38
2.7 Alteraciones hematológicas en caso de daño	41
 II OBJETIVO	 42

III DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Esquema de trabajo	43
3.1.1 Estudio agudo	43
3.1.2 Estudio crónico	44
3.2 Métodos y reactivos	
3.2.1 Contenido de glutatión reducido	44
3.2.2 Determinación de fragilidad osmótica	46
3.2.3 Determinación de parámetros hematológicos	48
3.2.4 Determinación de osmolaridad del plasma.....	51
3.2.5 Determinación de sodio y potasio del plasma ..	51
3.2.6 Tratamiento estadístico	53

IV RESULTADOS

4.1 Administración aguda	55
a) Células sanguíneas	
b) Fragilidad osmótica de los eritrocitos	
c) Niveles de glutatión reducido en sangre	
d) Osmolaridad en plasma	
e) Niveles de sodio y potasio en plasma	
4.2 Administración crónica	75
a) Células sanguíneas	
b) Fragilidad osmótica de los eritrocitos	

- c) Niveles de glutatión reducido en sangre
- d) Osmolalidad en plasma
- e) Niveles de sodio y potasio en plasma

V	DISCUSION	95
VI	CONCLUSIONES	107
	APENDICE I	110
VII	BIBLIOGRAFIA	112

R E S U M E N

Desde el punto de vista toxicológico, el arsénico es un metaloide muy importante. La toxicidad de los compuestos de arsénico inorgánico depende de su estado de oxidación, siendo el As (III) el más tóxico.

Se tienen antecedentes de que la exposición a arsénico afecta entre otras cosas a la producción de glóbulos rojos y leucocitos, así como su tiempo de sobrevivencia; los principales cambios que se han encontrado sugieren la presencia de diferentes tipos de anemia (megaloblástica, hemolítica).

El objetivo de este trabajo es evaluar los cambios que se producen en poblaciones celulares en la sangre de ratas durante la intoxicación aguda y crónica con arsénico inorgánico trivalente y los posibles efectos en la membrana de los eritrocitos.

En este trabajo se utilizaron dos grupos de ratas intoxicadas por vía oral con sonda gástrica con arsenito de sodio (III); al primer grupo se le administró 1.2 mg/kg/día durante 8 semanas. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas por punción cardíaca y a las muestras de sangre obtenidas se les determinó conteo total de eritrocitos y leucocitos, volumen celular medio, hemoglobina, hematocrito, distribución del tamaño de eritrocitos y leucocitos; se calculó el contenido medio de la hemoglobina y la concentración corpuscular media de hemoglobina. Las muestras de sangre fueron sometidas también a pruebas de

desafío osmótico para evaluar su fragilidad y se les determinó el glutatión reducido presente. Por otro lado al plasma que se obtuvo por centrifugación se le hicieron pruebas de osmolalidad y de niveles de sodio y de potasio presentes en él.

En el estudio agudo se encontró un aumento inicial en el número de eritrocitos, hemoglobina y cantidad media de hemoglobina, y una disminución en el volumen celular medio, número y distribución de leucocitos, 50 % de hemólisis, glutatión reducido y niveles de sodio y de potasio. Mientras que en el estudio crónico se observó una disminución en el número de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina; valores menores que el control en la concentración corpuscular media de hemoglobina, número y distribución de leucocitos, glutatión reducido y osmolalidad en el plasma.

Los resultados obtenidos en ambos estudios sugieren la presencia de anemia hemolítica producida por los cambios que se generan en el eritrocito al estar en contacto con el arsénico.

3 INTRODUCCION

1. ARSENICO

1.1 Generalidades

El uso del arsénico tiene una gran tradición histórica, se sabe que antes de Cristo se usaba como agente terapéutico; aproximadamente 300 años D.C., los chinos lo utilizaban para combatir las plagas de sus cultivos y todavía se utiliza como poderoso veneno por lo que es común asociarlo con homicidios y suicidios.

Se cree que Napoleón fué intoxicado con arsénico durante su destierro en la isla de Santa Elena. Esta creencia se basa en los síntomas que presentó al morir y en los altos niveles de arsénico encontrados en muestras de su cabello ⁵³.

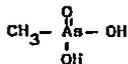
1.2 Aspectos químicos

El arsénico es el vigésimo elemento más abundante en la tierra. Tiene propiedades metaloides, su peso atómico es 74.9; su número atómico es 33 ; su punto de ebullición es de 190°C. Se encuentra ubicado en el grupo VA de la tabla periódica. El arsénico aparece en la naturaleza en los estados de oxidación -3, +3 y +5 principalmente; es raro encontrarlo como un elemento libre ⁵⁶. Con los estados de oxidación +3 y +5 puede formar muchos compuestos inorgánicos y orgánicos como el pentóxido de arsénico (As_2O_5), trióxido de arsénico (As_2O_3), ácido arsénico (H_3AsO_4), ácido arsenioso (H_3AsO_3 o $HAsO_2$), ácido arsánico, ácido dimetilarsínico. En el estado reducido -3, se encuentra principalmente formando arsina que es un gas soluble en cloroformo, benceno y agua.

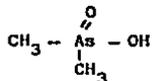
Los compuestos de arsénico inorgánico trivalente más comunes son trióxido de arsénico (que se obtiene principalmente como subproducto de la refinación de plomo, cobre, cinc y oro), arsenito de sodio y tricloruro de arsénico. Los compuestos pentavalentes de arsénico inorgánico más importantes son pentóxido de arsénico, ácido ortoarsénico y arseniatos. Los compuestos orgánicos también existen en formas trivalentes y pentavalentes. Las formas pentavalentes más comunes son ácido arsánico, ácido metilarsónico y ácido dimetilarsínico (ácido cacodílico).

El ácido arsénico metilado se deriva del ácido arsénico $\text{AsO}(\text{OH})_3$ por reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con grupos metilo para formar:

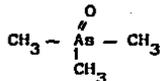
Acido metilarsónico



Acido dimetilarsínico



Oxido de trimetilarsina



1.3 Producción minera

Desde el punto de vista toxicológico los metales más importantes que se producen en México son: plomo, arsénico, antimonio, cadmio, selenio y mercurio. La producción mundial anual de arsénico es aproximadamente de 35,000 Ton.

TABLA I

PRODUCCION MUNDIAL DE ARSENICO (TON/AÑO)⁽³⁾

	1982	1983
Namibia	1895	2000
Francia	5200	5000
México	3590	3452
Perú	2200	2200
Suecia	4000	4000
U.R.S.S.	8000	8000
Otros países	900	900

México es uno de los primeros cinco productores mundiales de arsénico. Los valores de su producción nacional se muestran en la tabla II.

TABLA II

PRODUCCION DE ARSENICO EN MEXICO 3,17

AÑO	TON/AÑO
1976	4165
1977	4350
1978	4730
1979	4950
1980	5250
1981	4936
1982	3590
1983	3542
1986	5374
1987	4816

Estados Unidos consume cerca de la mitad de la producción mundial y produce para su consumo interno cerca de la mitad de lo que consume 64 .

1.4 Obtención

El arsénico se obtiene por la refinación de metales, generalmente en forma de polvos por procesos de sublimación, principalmente como producto secundario de la refinación de plomo, cinc y cobre. El óxido de arsénico (III) (As_2O_3), es el producto principal que se obtiene por este proceso industrial.

Existe en la naturaleza como sulfuro. El mineral más común que contiene cantidades importantes de arsénico y que se utiliza para su obtención es la arsenopirita ³³. En los minerales se encuentra formando arseniuros de cobre, níquel, cinc, hierro, plomo, plata, oro, así como óxidos y sulfuros.

1.5 Distribución en el ambiente

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza. Su contenido en la corteza terrestre es generalmente menor de 2 mg/kg, algunos minerales como piritita pueden contener hasta un 5% de arsénico ³³. El arsénico se encuentra en el ambiente en forma de compuestos inorgánicos y orgánicos, en su estado de oxidación trivalente o pentavalente ³³.

1.5.1. Suelo

El rango de concentración natural de arsénico en el suelo va de 0.1 a 42 ppm. Se ha encontrado en rocas ígneas y piedra arsenisca en concentraciones de 118 ppm y 1.0 ppm respectivamente ⁵⁶. El arsénico como elemento lábil, está sujeto a muchos procesos en el suelo. Bajo ciertas condiciones puede ser oxidado, reducido, volatilizado y adsorbido ⁹³. Poca cantidad de arsénico está presente en forma de compuestos solubles y es probablemente la forma disponible para que las plantas puedan absorberlo ⁶⁴.

El grado de incorporación de arsénico por las plantas está relacionado aparentemente con la concentración de arsénico soluble en el suelo, la composición química del suelo y la especie de las plantas ³³. El arsénico puede reducirse y metilarse en el suelo, pero este proceso es lento. De 10 ppm aplicadas, sólo 1 a 2 % es volatilizado como dimetilarsina $(CH_3)_2AsH$ en 160 días ⁶⁴.

Los plaguicidas arsenicales son la fuente de mayor contaminación del suelo además de los procesos ambientales naturales y de los subproductos resultantes de las operaciones mineras ³⁴.

1.5.2 Aire

Las principales fuentes de arsénico en el aire son la refinación de metales no ferrosos, la combustión de carbón, operaciones de fundición y el uso de compuestos arsenicales como plaguicidas.

La combustión del carbón produce aproximadamente 6.5×10^8 g As/año en el aire urbano. Las plantas generadoras de energía eléctrica que utilizan la combustión de carbón, pueden ocasionar una grave contaminación por arsénico, encontrándose entre 6 y 51 % del arsénico total emitido como arsénico inorgánico trivalente y el resto como pentavalente ²⁹.

1.5.3 Agua

Se ha encontrado arsénico en diferentes aguas naturales, incluyendo agua de mar, manantiales, ríos y lagos. La concentración que se ha determinado en aguas dulces está en el rango de 0.002 a 0.068 mg/l, mientras que en agua de mar el rango es de 0.002 a 0.004 mg/l 31,70 .

El arsénico en el agua puede provenir tanto de fuentes naturales como por actividades humanas. Tanto el arsénico, cadmio y selenio, son componentes importantes de los combustibles fósiles y pueden causar problemas biológicos en el ambiente acuático cercano a las plantas donde se utiliza este tipo de combustible. El arsénico es metilado por hongos y bacterias tanto en agua como en los sedimentos. Las formas metiladas se encuentran en concentraciones menores

que las formas inorgánicas ¹⁵.

La concentración normal de arsénico total en agua de bebida tiene gran variación en las diferentes partes del mundo. En diversas regiones tales como Nueva Escocia en Canadá ⁸⁸, Antofagasta en Chile ¹² y la Comarca Lagunera en México ^{1,18}, el nivel de arsénico sobrepasa los valores máximos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (menos de 0.05 mg/l), habiéndose observado casos de intoxicaciones crónicas por arsénico.

1.5.4. Alimentos y otras

En los alimentos, los niveles de arsénico generalmente se encuentran por debajo de 1 mg/kg con excepción de los alimentos marinos, en donde se han encontrado niveles superiores ⁸⁰.

La mayoría del arsénico que se encuentra en los organismos marinos está en forma de organocompuestos solubles tanto en grasa como en agua, ya que las formas liposolubles pueden ser convertidas en hidrosolubles por tratamiento con ácido.

La capacidad de los organismos a bioacumular arsénico es bien conocida ⁷⁹. La acumulación está afectada por varios factores tales como la temperatura y salinidad del medio y además el tamaño del organismo ⁸⁰.

El vino que se elabora con uvas que fueron rociadas con insecticidas arsenicales puede contener niveles elevados de arsénico. Se han observado niveles mayores de 0.5 mg/l; la mayor parte del arsénico está presente en su forma inorgánica trivalente ²¹.

También se han observado niveles altos de arsénico en algunas aguas minerales embotelladas, mientras que los encontrados en las cervezas no son de significación ¹¹.

Se encontró arsénico en el tabaco procedente del uso de arseniato de plomo como insecticida en este tipo de cultivos. En la actuali-

dad, los niveles de arsénico han disminuido ya que se ha restringido el uso de esta sustancia: del 10 al 20 % del contenido total de arsénico en cigarrillos, se volatiliza al momento de fumarlos, permaneciendo el resto en la colilla del cigarro ⁴³.

1.6 Usos del arsénico

a) En medicina. Desde el año 400 D.C. se han utilizado ampliamente compuestos de arsénico inorgánico en humanos como agente terapéutico, para el tratamiento de leucemia, psoriasis, asma crónica, anemia perniciosa, daños parasitarios, neumonía y como tónico (solución de Fowler) ³³. Existen evidencias de su uso en el tratamiento de cáncer en la piel, aunque actualmente en éste aspecto su empleo es muy restringido ³⁹.

Los compuestos de arsénico orgánico se utilizaron para el tratamiento de la sífilis y trepanomatosis. Actualmente se prescriben en algunas partes como fármaco antiparasitario para humanos.

En veterinaria, el ácido arsenílico es usado como aditivo alimenticio principalmente en aves de corral ¹⁹.

b) En agricultura y silvicultura. Muchos de los compuestos inorgánicos de arsénico se utilizan como herbicidas en el cultivo del algodón; el arseniato de calcio se usa como insecticida para el control del gorgojo del algodón y del gusano de las hojas de algodonnero ⁹³. Los arseniatos de plomo y de calcio son insecticidas empleados para combatir las plagas en el árbol de "goma".

c) Otros. El arseniato de sodio y de cinc son utilizados como preservativos de madera ⁶⁴. También se utiliza en la industria del vidrio, en la metalurgia especialmente en aleaciones de plomo y últimamente se ha incrementado su empleo en la industria electrónica ⁸⁹.

1.7 Toxicocinetica

La comprensión de la toxicocinética de los compuestos de arsénico es difícil, ya que ésta varía en función de la forma química del compuesto de arsénico estudiada y la especie animal probada.

1.7.1 Absorción

Las principales vías para la introducción de compuestos arsenicales en el organismo son: vía respiratoria, muy importante en exposición ocupacional; vía oral, fundamentalmente a través de los alimentos, agua y medicamentos que contienen arsénico y de menor importancia la absorción a través de la piel ^{27,85}.

1.7.1.1 Absorción por el tracto respiratorio

La exposición a arsénico inorgánico a través de la inhalación ocurre ocupacionalmente o al fumar cigarrillos, aunque también puede ser inhalado en forma de aerogol.

Después de la inhalación sigue la absorción que puede tener lugar directamente en el tracto respiratorio o en el tracto gastrointestinal como consecuencia del aclaramiento mucociliar. La retención, deposición y absorción por el tracto respiratorio depende de la solubilidad del material inhalado y del tamaño de la partícula del material ³³.

1.7.1.2 Absorción gastrointestinal

La absorción del arsénico inorgánico por el tracto gastrointestinal se produce después de la ingestión de medicina, alimento o agua que

lo contenga o como resultado de la inhalación de éste y subsecuente aclaramiento mucociliar. La absorción gastrointestinal dependerá de factores tales como la solubilidad de los compuestos de arsénico.

Algunos estudios indican que el arsénico presente en alimentos marinos y en agua, es fácilmente absorbido (70 a 90 %) por el tracto gastrointestinal, y esta absorción depende del tamaño de las partículas y del pH del jugo gástrico ²⁷.

En un estudio se observó una absorción cercana a 80 % en un individuo expuesto a arsénico al cual se mantuvo con dieta controlada. La concentración de As (V) en orina, estuvo aumentada durante las primeras horas después de la ingestión y la concentración de As (III) en orina fue cercana a los niveles normales de 1 a 2 ppb después de 20 horas de la ingestión ²².

1.7.1.3. Absorción por piel

Realmente existen pocos estudios acerca de la absorción a través de piel; sin embargo, se ha indicado que al tratar a ratas con diferentes concentraciones de arseniato de sodio, éste es absorbido por la piel, además de absorberse por el tracto respiratorio, luego del contacto prolongado con este compuesto ²⁷.

1.7.2 Distribución y acumulación

Una vez absorbidos los compuestos arsenicales, independientemente de su forma, son transportados por la sangre a otras partes del organismo. Aunque no se ha definido un órgano blanco en la intoxicación con arsénico se conoce que éste se acumula fundamentalmente en hígado, pulmón, riñón y bazo ⁷³. Las concentraciones en músculo y huesos si bien son bajas, dada la gran cantidad de tejido involucrado pueden ser sitios importantes de acumulación.

En las ratas, el arsénico inorgánico se acumula en la sangre, especialmente en los eritrocitos; esta acumulación podría deberse al número de grupos sulfhidrilo libres presentes en la hemoglobina y a su posición ⁶³.

El arsénico se acumula también en pelo y uñas. Los niveles de arsénico en estas muestras biológicas se utilizan como índice de exposición a este tóxico, cuando se ha estado expuesto por un período prolongado.

En algunos órganos, el nivel de arsénico cae rápidamente con el tiempo, mientras que en otros como piel, cerebro y esqueleto, los niveles de arsénico disminuyen lentamente ¹⁶.

1.7.3 *Biotransformación*

La biotransformación del arsénico inorgánico se produce tanto en animales como en humanos. Hay muchos mecanismos que pueden alterar la composición química o estado físico de los compuestos arsenicales. Estos mecanismos incluyen oxidación, reducción y metilación biológica.

La biometilación del arsénico sucede aparentemente como un proceso normal ¹⁶. El arsénico sufre una gran variedad de reacciones en sistemas acuosos heterogéneos incluyendo acomplejamiento y precipitación. El pH es un factor clave en todas estas reacciones ⁴⁵.

La oxidación "in vivo" del arsénico inorgánico trivalente a pentavalente es bien conocida ^{9,22,29}. Recientemente se ha demostrado la reducción "in vivo" de arsénico pentavalente a trivalente en ratones, ratas y conejos ^{26,28}.

El arsénico inorgánico es metilado "in vivo" en animales ¹⁰ y en seres humanos ⁹⁵, encontrándose al ácido dimetilarsínico como la especie principal, mientras que el ácido monometilarsónico está presente en concentraciones más bajas.

No se ha observado la metilación "in vivo" de compuestos arsenicales inorgánicos en sangre y orina humana y de perros⁸¹.

Los compuestos arsenicales tanto orgánicos como inorgánicos pueden ser oxidados o reducidos por microorganismos. Las bacterias y el fitoplancton marino pueden reducir el arseniato a arsenito y se sabe que la oxidación de arsenito a arseniato es catalizada por bacterias.

La oxidación y reducción de los compuestos arsenicales se produce tanto por reacciones químicas como bióticas.

1.7.4. *Eliminación*

La principal vía de eliminación del arsénico en humanos es la orina, eliminándose por este medio aproximadamente 70 % de la dosis administrada⁵⁷. Sólo una muy baja proporción de la dosis se excreta por heces; también puede ser eliminado en menores cantidades a través de cabello, piel y uñas.

La excreción urinaria de arsénico en humanos expuestos a As (III) o As (V) es principalmente en forma de ácidos metilarsonico o dimetilarsonico. La mayor parte es eliminado durante las primeras horas (48 horas)⁹⁴.

La concentración de arsénico en orina, se ha utilizado como índice de exposición; sin embargo, se deberán considerar algunos factores como la dieta y el período transcurrido entre la exposición y la toma de las muestras. Se ha indicado que después de la ingestión de compuestos organoarsenicales que se encuentran en la carne de cangrejo, estos pueden ser excretados sin degradación metabólica.

1.8 Efectos tóxicos

El arsénico produce diferentes efectos tóxicos dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración a la que se encuentre.

La dosis mínima letal del trióxido de arsénico para seres humanos es de 70 a 180 mg.

La toxicidad de los compuestos de arsénico inorgánico varía de acuerdo a su estado de oxidación, encontrándose que el As (III) es más tóxico que el As (V) ²⁹.

As (III)	NaAsO_2	via de administración: intraperitoneal e en rata. LD_{50} 2.5 mg/kg ⁶⁵
As (V)	Na_2HAsO_4	via de administración: intraperitoneal - en rata LD_{50} 8.0 mg/kg ⁶⁵

Se ha observado que luego de la administración intraperitoneal de compuestos de arsénico a ratas hembras en diferentes días de gestación, se producen efectos teratogénicos al administrar arsenito de sodio, mientras que con arsénico pentavalente, aún en dosis mayores, no se observaron estos efectos ⁸⁷.

1) Intoxicación aguda. Los animales normalmente sobreviven dos o tres días después de la intoxicación y presentan signos de diarrea, a menudo con deposiciones sanguinolentas; temblores, cólicos violentos, debilidad, paso tambaleante, pulso rápido, deshidratación, fiebre, anorexia, contracción muscular, edema facial y cambios en el funcionamiento del corazón ⁷⁶, presentándose éstos síntomas también en seres humanos ²⁹.

b) Intoxicación crónica. Este tipo de intoxicación se presenta en personas expuestas por largo tiempo a arsénico por inhalación, ingestión de alimentos y agua contaminada con arsénico y se manifiesta por lesiones en la piel y mucosas, presentandose ocasionalmente a nemia moderada y leucopenia, así como alteraciones en los sistemas nervioso y cardiovascular.

El arsénico produce diferentes efectos en cada uno de los órganos involucrados y estos efectos varían de acuerdo al tipo de exposición.

En las tablas III y IV se resumen los efectos provocados por el arsénico inorgánico en diferentes órganos y sistemas.

TABLA III

INTOXICACION AGUDA Y SUBAGUDA CON ARSENICO INORGANICO

<u>Organo o Sistema</u>	<u>Efecto</u>	<u>Referencia</u>
Sist. Respiratorio	irritación ulceración de mucosas edema de pulmón perforación del septum nasal	29
Sist. Cardiovascular	daños vasculares peri- féricos electrocardiogramas anor- males	40 29 42
Sist. Gastrointestinal	vómitos diarrea cólicos sangre en heces	27
Sist. Hematopoyetico	anemia leucopenia	48 90
Sist. Nervioso	neuropatía periférica degeneración tipo Walle- riana.	40

TABLA IV

INTOXICACION CRONICA CON ARSENICO INORGANICO

<u>Organo o Sistema</u>	<u>Efectos</u>	<u>Referencia</u>
Sist. Cardiovascular	desordenes vasculares ("Black foot disease")	29
	aumento en incidencia de infarto al miocardio	84
Sist. Respiratorio	irritación de mucosas traqueobronquitis	29
	insuficiencia respiratoria tumores cáncer	52,68
Sist. Hematopoyético	daños en médula ósea cambios megaloblásticos granulocitopenia pancitopenia	90,82
Sist. Nervioso	neuropatías periféricas acrocirosis	47
Piel	hipo o hiperpigmentos	1
	hiperqueratosis palmar y plantar tumores cáncer	68,52,4
Hígado	hipertensión portal alteración de actividad enzi- mática en hepatocitos.	59

<u>Organo o Sistema</u>	<u>Efecto</u>	<u>Referencia</u>
Sistema Reprodutor	aumento en el número de abortos espontáneos. malformaciones en recién nacidos de madres expuestas	23,61
Otros efectos	aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas.	66,67

1.9 Mecanismos de toxicidad

Como se ha mencionada, la toxicidad del arsénico III es mayor que la del arsénico V. Los compuestos de arsénico inorgánico trivalente son fundamentalmente reactivos con los grupos sulfhidrilo (-SH) 85, inhibiendo un número importante de sistemas enzimáticos dependiente de estos grupos, entre ellos ureasa, glucosa oxidasa, fumarasa, piruvato deshidrogenasa, xantina oxidasa, etc ^{52,77}.

La toxicidad provocada por el arsénico pentavalente, se debe a la capacidad de competir con grupos fosfato ocasionando inhibición en la producción de ATP por el desacople de la fosforilación oxidativa; además a su capacidad de reducirse a arsénico trivalente.

En la figura 1, se muestra un ejemplo de la competencia de arseniato por grupos fosfato en la reacción de gliceraldehído deshidrogenasa.

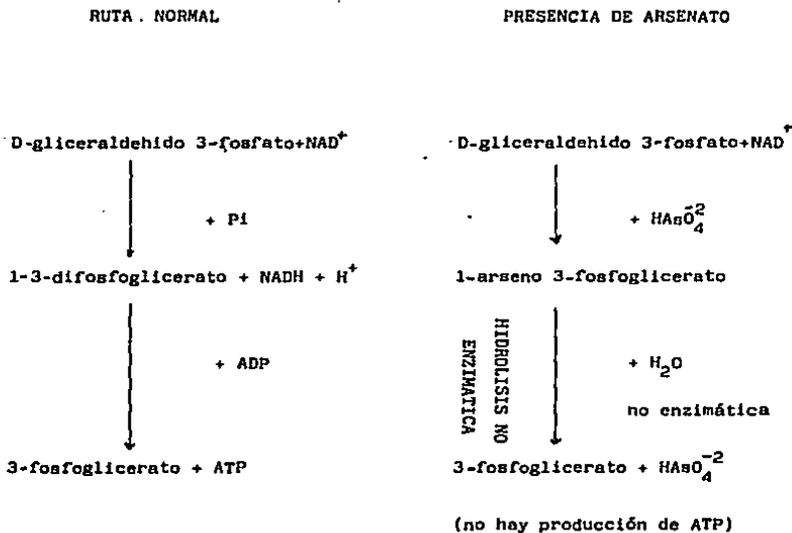


Fig. 1 Unión de arsenato a gliceraldehido 3-fosfato, inhibiendo la producción de ATP (37)

1.10 Criterios de selección del tejido considerado en este estudio

Existen órganos y sistemas que debido al lugar donde se encuentran ubicados y las funciones que realizan en el organismo, pueden ser el blanco de la acción tóxica de un compuesto. Se entiende como órgano blanco aquel sobre el cual una sustancia ejerce su efecto.

Se tienen varios antecedentes de la acción tóxica del arsénico sobre varios órganos tales como hígado, riñón y pulmón, sin embargo, son pocos y aislados los antecedentes sobre los efectos observados directamente en sangre; en estos estudios se habla de la presencia de leucopenia, trombocitopenia así como de anemia megaloblástica y anemia hemolítica ^{82,90} aunque no se ha podido precisar la causa de la producción de la anemia.

Considerando la alta sensibilidad de los elementos sanguíneos a la exposición de agentes tóxicos que pueden interferir en su desarrollo celular, además de que la sangre misma sirve de transporte de estos agentes, se seleccionó a la sangre como tejido de estudio ya que presenta la posibilidad de reflejar los efectos adversos del arsénico. Es bien conocida la gran afinidad que presenta el arsénico trivalente por los grupos tiol, y en la sangre están presentes estos grupos sulfhidrilo formando parte de la hemoglobina, en las enzimas y en las proteínas de las membranas de los eritrocitos. Por otra parte al considerar que la principal fuente de energía en la sangre es el ATP y que su síntesis puede ser inhibida por la afinidad que tiene el arsénico pentavalente por los grupos fosfato, llegando a substituirlos en el metabolismo energético, es de esperarse el poder apreciar algún cambio significativo.

2. SANGRE

2.1 Generalidades

La sangre es un tejido que circula dentro de los vasos sanguíneos; su principal función es llevar las sustancias nutritivas y el oxígeno a todas las células que forman los tejidos, y retirar de ellas los productos de eliminación; frecuentemente está involucrada en reacciones adversas provocadas por sustancias químicas.

La proliferación de los elementos sanguíneos es una de las principales razones de su alta sensibilidad a agentes tóxicos, que pueden interferir con su desarrollo celular. La densidad de la sangre fluctúa entre 1.054 y 1.060 mientras que su viscosidad es aproximadamente 4.5 veces mayor que la del agua⁴¹.

2.2 Funciones

La sangre transporta oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos y lleva CO_2 desde los tejidos a los pulmones; transporta además los materiales alimenticios absorbidos, las hormonas y metabolitos; interviene en el mantenimiento del equilibrio ácido-base del organismo, en el balance hídrico y en la regulación de la temperatura corporal. Además la sangre lleva para su eliminación los desechos metabólicos a riñones, pulmones, piel o intestino y constituye uno de los mecanismos de defensa del organismo contra la infección por medio de los leucocitos y de los anticuerpos circulantes.

2.3 Composición

La sangre está formada principalmente por un líquido de composición variable, el plasma, que contiene eritrocitos, leucocitos y plaquetas, fibrinógeno, además de hormonas, proteínas, enzimas etc. Noemalmente el volumen celular constituye alrededor de 45 % del volumen total de la sangre ⁶².

2.3.1 Plasma

El plasma es la parte fluida de la sangre, transporta muchos tipos de sustancias de una parte del cuerpo a otra. Algunas de las sustancias transportadas están en solución, otras están unidas a una o varias proteínas del plasma. El plasma es una mezcla compleja de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, sales, hormonas, enzimas, anticuerpos y gases disueltos. Sus principales constituyentes son agua (90 a 92 %) y proteínas (7 a 8 %) ²⁵. Constantemente toma y lleva sustancias que pasan a través de los capilares, por lo que cualquier cambio en su composición inicia respuestas de uno o más órganos del cuerpo para restaurar el equilibrio normal. El plasma está en equilibrio dinámico con el fluido intersticial que baña a las células y con el fluido intracelular.

Tanto las proteínas del plasma, como la hemoglobina de los eritrocitos son importantes amortiguadores ácido base para mantener el pH de las células del cuerpo en rangos estrechos.

La concentración de glucosa en el plasma es cercana a 0.1% y es acarreada por la sangre, luego de su absorción en el intestino, hígado y ocasionalmente en todas las células del cuerpo donde es metabolizada, para proporcionar la energía necesaria para el organismo ⁵.

2.3.2 *Leucocitos o glóbulos blancos*

En la sangre se presentan cinco clases diferentes de glóbulos blancos (linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) sin considerar las formas jóvenes o inmaduras. Los leucocitos tienen núcleo, pueden moverse alrededor y aún deslizarse a través de las paredes de los vasos sanguíneos. Son mucho menos numerosos que los eritrocitos, son cerca de 7 000 por milímetro cúbico. Los distintos leucocitos utilizan la corriente sanguínea sólo para su transporte y ejercen su función en los tejidos, después de abandonar la sangre.

Los monocitos y linfocitos se producen en el tejido linfóide como el bazo, timo y nodos linfáticos. Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos son producidos en la médula ósea y huesos planos, paralelamente con los eritrocitos.

Cuando la médula es estimulada los leucocitos migran hacia las zonas de infección, esto provoca que se acelere su proliferación y liberación. Las diferentes clases de leucocitos tienen una función bien definida, por ejemplo los granulocitos y los monocitos son la principal fuente de pirógenos que producen una respuesta febril en la mayoría de las infecciones, mientras los basófilos intervienen en reacciones alérgicas y los eosinófilos pueden fagocitar complejos antígeno anticuerpo y algunos microorganismos, aunque son menos eficaces en matar bacterias que los neutrófilos que son quienes las fagocitan provocando su muerte por la unión de los gránulos de los neutrófilos y monocitos con la vacuola fagocitada. Este mecanismo se utiliza como una de las defensas principales del organismo contra agentes extraños.

2.3.3 *Plaquetas*

Las plaquetas son fragmentos pequeños de células redondas u ovales (de 2 a 3 μ) presentes en la sangre circulante. Estas células se encuentran en circulación por un periodo de 5 días y después son atrapadas por las células del sistema reticuloendotelial. La sangre normal contiene de 150 000 a 300 000 plaquetas/mm .

La mayoría de las plaquetas son producidas por los megacariocitos de la médula ósea. La mayor parte de estos megacariocitos circulantes quedan atrapados en los pulmones, donde siguen liberando un número

importante de plaquetas.

Las plaquetas son metabólicamente activas y necesitan un aporte constante de ATP; su principal fuente de energía es la glucosa. Contiene todas las enzimas de la vía glucolítica y también grandes cantidades de glucógeno.

Las plaquetas desempeñan un papel muy importante mecánica y químicamente en la homeostasia y en la reconstrucción de vasos⁹¹.

2.3.4 Eritrocitos o glóbulos rojos

Normalmente los eritrocitos son producidos por la médula ósea y liberados a la circulación. La vida media de los eritrocitos varía según la especie, en el hombre es de aproximadamente 120 días, mientras que en ratón es de aproximadamente 40 días y en conejo y rata alrededor de 64 días⁷⁵.

Los eritrocitos tienen forma bicóncava, son discos homogéneos que miden de 6 a 8 μ de diámetro y tienen un volumen promedio de 87 μ^3 en seres humanos. El eritrocito es altamente deformable y se adapta fácilmente a cambios físicos para permitir su paso a través de capilares de 2 a 3 μ m de diámetro, manteniendo su área superficial. La célula madura no contiene mitocondria, núcleo o ribosomas⁷¹.

Algunos de los constituyentes más importantes de los eritrocitos son la hemoglobina, el glutatión reducido y la membrana comunmente conocida como estroma. En la sangre humana el número de eritrocitos por milímetro cúbico de sangre es de 5 400 000 aproximadamente. Su principal función es transportar la hemoglobina a través de la circulación, de modo que el transporte de oxígeno hacia los tejidos y de dióxido de carbono de los tejidos a los pulmones sea óptimo. Para facilitar el intercambio gaseoso, el eritrocito viaja a través de capilares delgados y permite con esto un intercambio rápido.

La sangre de seres humanos adultos contienen aproximadamente 15 g Hb/100 ml.

El nivel de glucógeno en eritrocitos es bajo y los niveles de glucosa en la célula se mantienen principalmente por transporte activo de la glucosa del plasma. La glucosa en los eritrocitos, a través de un proceso metabólico activo, mantiene el medio reducido para que el hierro se conserve en su forma divalente.

Los niveles de sodio, potasio, calcio y magnesio, se mantienen constantes por las bombas $\text{Na}^+ \text{K}^+$ y $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$. Estos niveles varían en el eritrocito con la dieta y el estado general del individuo.

Otro factor importante es la edad de las células, ya que los eritrocitos jóvenes, tienen mayores concentraciones de enzimas que las células viejas y éstas se vuelven más concentradas y tienen mayor peso específico que las células jóvenes, de modo que al centrifugar, las células maduras quedarán en el fondo.

Al finalizar su período de vida, las células rojas son removidas de la circulación por el bazo, que fagocita a los eritrocitos retirándolos de la circulación lo que permite la introducción de células nuevas.

2.3.4.1 Hemoglobina

La hemoglobina, componente principal de los glóbulos rojos (90% del peso seco), es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de oxígeno y de CO_2 . Totalmente saturada, la hemoglobina contiene alrededor de 1.34 ml de oxígeno por gramo. La masa de los eritrocitos de un adulto contiene unos 600 g de hemoglobina capaz de transportar 800 ml de oxígeno⁵⁰.

Una molécula de hemoglobina consta de dos pares de cadenas de polipéptidos (globina) y cuatro grupos prostéticos hemo, cada uno con un átomo de hierro en estado ferroso. El grupo hemo se cambia de forma reversible con una molécula de oxígeno o de dióxido de carbono.

La hemoglobina reducida es hemoglobina con hierro no asociado al oxígeno. Cuando cada grupo hemo se asocia con una molécula de oxígeno, la hemoglobina se transforma en oxihemoglobina. Tanto en la hemoglobina reducida como en la oxihemoglobina, el hierro permanece en estado ferroso. Cuando el hierro se oxida al estado férrico, se forma metahemoglobina y la molécula pierde su capacidad para transportar oxígeno o dióxido de carbono.

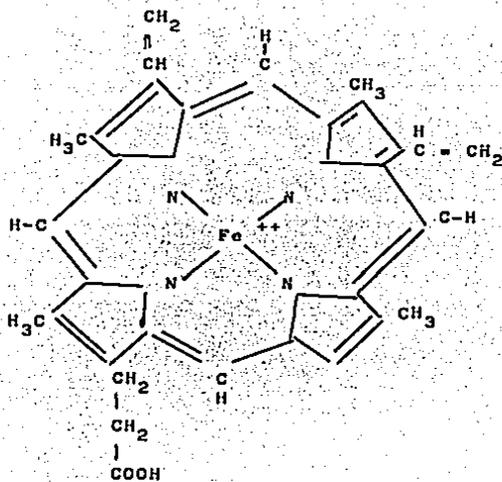
El catabolismo de la hemoglobina es realizado por las células reticuloendoteliales, transformándola en pigmentos biliares, hierro y globina.

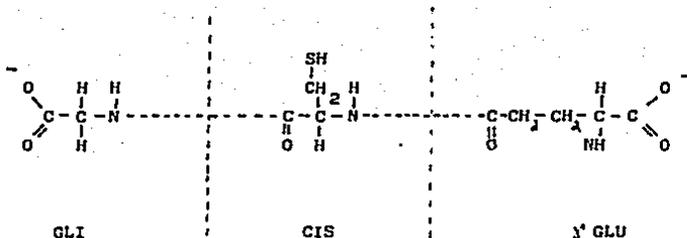
2.3.4.2 *Glutación reducido (GSH)*

La integridad de la membrana plasmática depende del contenido de glutatión reducido (GSH) presente en los eritrocitos.

En los eritrocitos se encuentra la forma reducida de glutatión, aunque es normal una pequeña cantidad de glutatión oxidado (GSSG).

El glutatión es un tripéptido (γ -glutamil-1-cisteinglicina) endógeno presente en levaduras, plantas y tejidos animales; interviene en la protección contra la oxidación de los componentes de las membranas, enzimas y proteínas celulares, forma parte del transporte de aminoácidos y participa en el metabolismo de ciertos compuestos endógenos; en general es un agente activo en la reparación de daños oxidativos 2, 35 .





Molécula de glutatión reducido (GSH)

Los glóbulos rojos con un nivel deprimido de GSH son más sensibles a la acción hemolítica de los agentes químicos⁷⁸.

2.3.4.3 Membrana o estrona

A pesar de que los componentes de la membrana varían según la especie y aún en la misma especie, se conoce que aproximadamente contiene 40-60 % de proteínas y 10-12 % de lípidos. La fracción lipídica incluye 60 % de fosfolípidos, 30 % de colesterol libre y 10 % de colesterol y grasas neutras.

Además de las cinasas de proteínas, la membrana contiene diferentes enzimas, entre ellas la deshidrogenasa de 3-fosfato de gliceraldehído, aldolasa, cinasa de 3-fosfoglicerato, cinasa de adenilato, ATPasa y colinesterasa⁵⁰.

Dos características importantes de la membrana del glóbulo rojo son su permeabilidad y su capacidad de deformación. Es importante que la membrana conserve su elasticidad porque al disminuir su ca-

pacidad de deformación provocaría secuestros y destrucción de eritrocitos por el sistema reticuloendotelial.

La membrana del eritrocito ejerce un papel importante como modificador de los componentes que deben entrar y salir del glóbulo rojo; éste controla su volumen por medio de la permeabilidad de su membrana y el trabajo de la bomba de cationes. Dentro de la célula sanguínea existen algunas moléculas entre ellas el glutatión reducido y la hemoglobina, que no pueden atravesar la membrana, lo que produciría un gradiente osmótico ligeramente positivo, pero para evitar un volumen excesivo en la célula que pueda causar su lisis, el eritrocito se protege por el transporte activo de sus aniones y una relativa impermeabilidad de sus cationes.

2.4 *Eritropoyesis*

La destrucción diaria de aproximadamente 2×10^{11} eritrocitos debe compensarse por la liberación del mismo número de glóbulos rojos por la médula ósea. Hay evidencias de que la producción de eritrocitos está bajo control hormonal, por medio de la hormona eritropoyetina. Se ha comprobado que el lugar principal, aunque no el único de producción de eritropoyetina que aumenta el número de precursores de células rojas inmaduras es la médula ósea, la cual cambia su aspecto físico; la grasa es reemplazada por células eritroides y la forma amarilla "inactiva" de la médula, se vuelve roja "activa". En condiciones de máxima estimulación la médula ósea es capaz de incrementar su producción de células rojas de seis a ocho veces⁹².

La eritropoyesis en un embrión de un mes, se realiza principalmente en el hígado, el bazo y por un período limitado, en el timo. El hígado es el sitio principal para la eritropoyesis del tercero al

sexto mes (fase hepática) y continúa su función hasta la primera semana de vida post natal.

El órgano primordial de origen de los eritrocitos es la médula ósea que diferencia y provee los precursores de eritrocitos circulantes, plaquetas y granulocitos neutrófilos.

El precursor rojo que se reconoce más tempranamente es el pronormoblasto. En esta fase, el desarrollo de la célula empieza con la síntesis de globina y concentración de hierro. Hay un núcleo, mitocondria y ribosomas presentes inicialmente en los precursores del eritrocito y se mantienen a través de muchas divisiones mitóticas. Se piensa que un pronormoblasto puede dar de 8-16 células rojas maduras en un periodo de 4-6 días.

En seres humanos adultos normales los eritrocitos sólo se producen en la médula ósea, aunque en ciertas circunstancias, la eritropoyesis se lleva a cabo en el hígado y bazo, que son sitios donde normalmente se produce la eritropoyesis fetal.

Algunos minerales como hierro, cobre y cobalto, son necesarios para la eritropoyesis normal; algunas vitaminas B, especialmente B₁₂, ácido fólico, piridoxina, ácido ascórbico, ácido pantoténico y riboflavina, así como el ácido nicotínico y la vitamina E, también intervienen en la eritropoyesis.

2.5 Metabolismo en los eritrocitos

Para que se realice de manera eficaz el metabolismo en los eritrocitos, son de gran importancia la membrana celular, el sistema fosfatopentosa glutatión, la glucólisis por la vía Embden Meyerhof y la hemoglobina; cuando hay cambios en cualquiera de estos factores, se originan trastornos tanto en la función como en la supervivencia de los eritrocitos.

El eritrocito es una célula metabólicamente activa que cuando es madura pierde sus mitocondrias; utiliza glucosa para llenar sus requerimientos de energía, cerca del 90 % de la glucosa que utiliza, pasa a lactato por la vía anaeróbica de Embden Meyerhof, el resto se metaboliza por la vía pentosa-fosfato. Como no tiene mitocondria, solo se obtienen 2 moles de ATP por mol de glucosa metabolizada.

La energía proveniente de la hidrólisis de ATP se utiliza principalmente para el transporte activo de Na^+ y K^+ , además de que interviene en la conservación de la permeabilidad y en la capacidad que tiene la membrana del eritrocito para deformarse.

El metabolismo de la glucosa en el eritrocito por vía glucolítica produce 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), que es esencial para el funcionamiento normal de la hemoglobina.

La ruta pentosa-fosfato es de gran importancia para el eritrocito, ya que por medio de ésta es que se genera el NADPH, el cual es esencial para mantener los valores normales de GSH quien constituye la principal defensa del eritrocito contra lesiones oxidantes⁵⁸. En la figura número 2 se muestra un esquema de la función de glutatión frente a sustancias oxidantes.

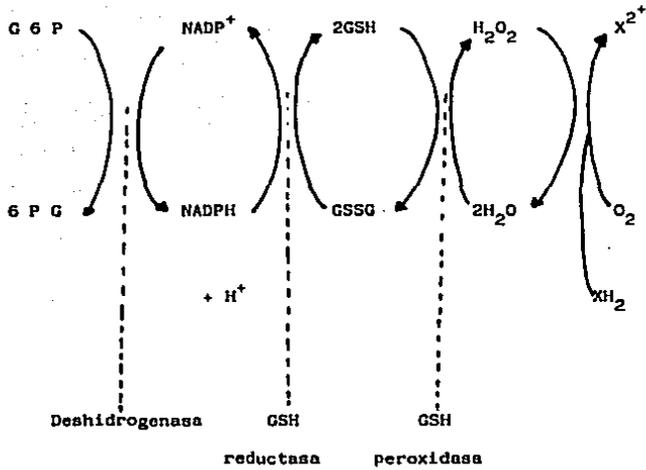
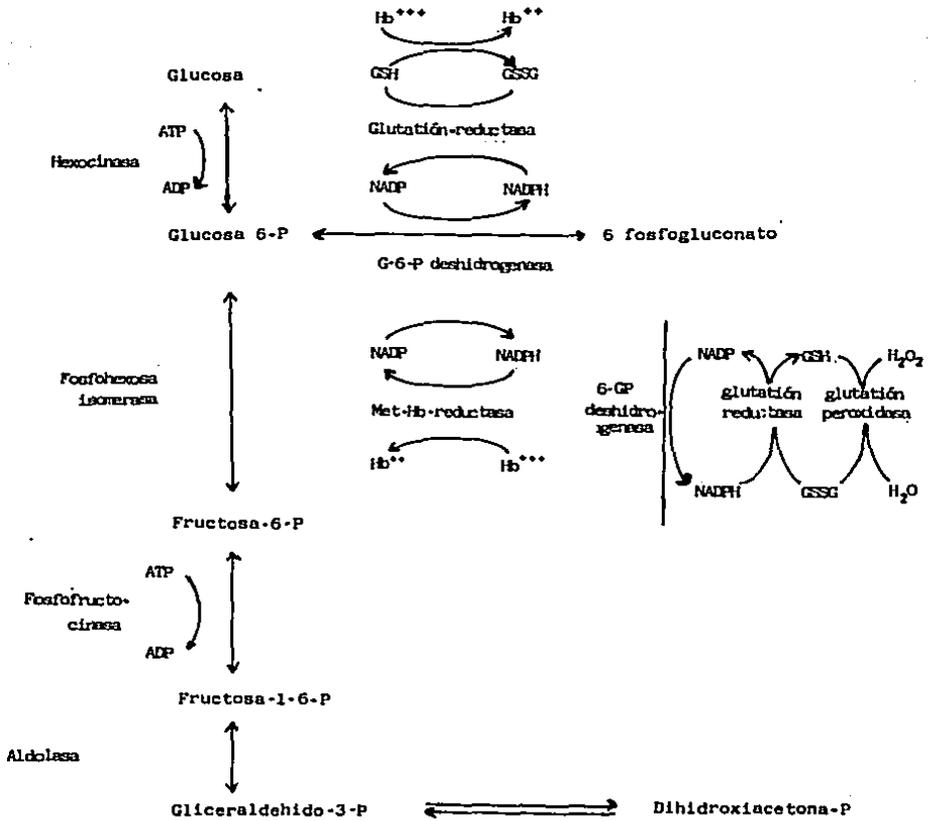
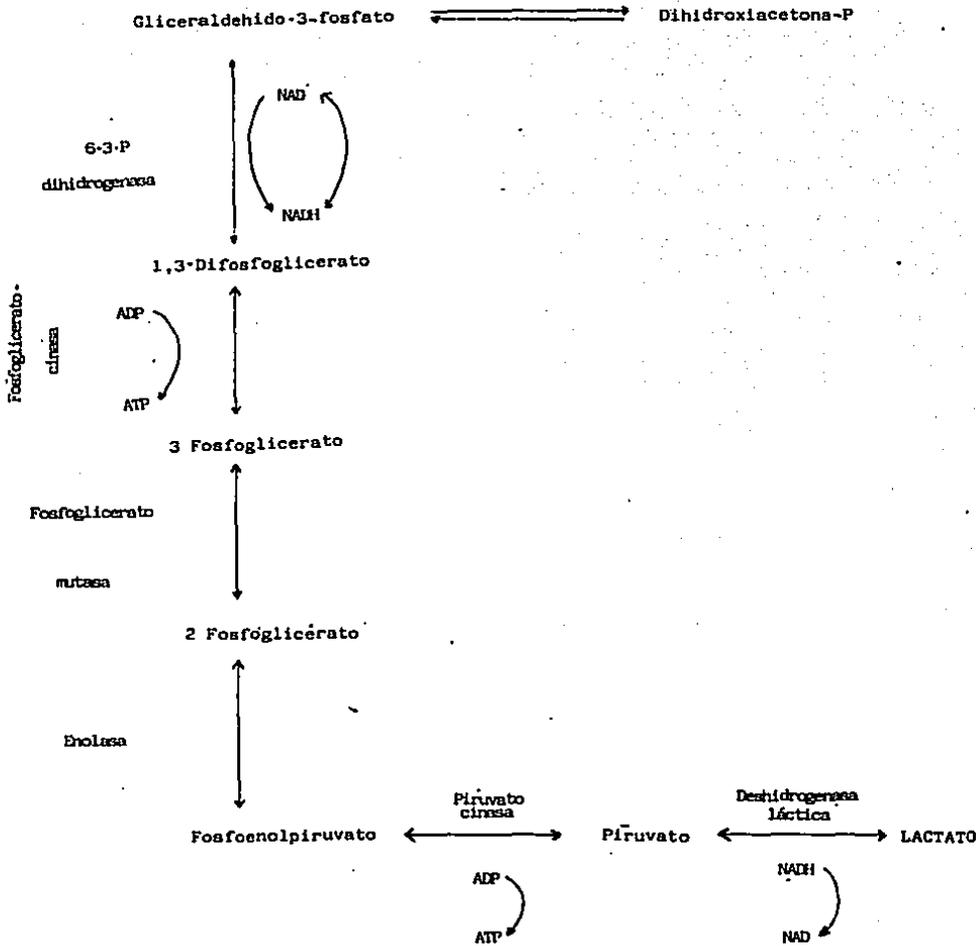


Fig. 2 Reacción del glutati6n frente a sustancias oxidantes⁷⁴

Tanto la enzima glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa, son importantes para la reducción de H_2O_2 ⁷⁴. La glutatión peroxidasa debe disponer de un aporte continuo de GSH, que ha sido convertido a GSSG por oxidación. Cuando hay una acumulación de H_2O_2 se produce oxidación de la hemoglobina, de manera irreversible y se precipita formando los cuerpos de Heinz, que son cuerpos rígidos, que impiden la deformación natural de la membrana provocando lisis²⁰. Además se producen cambios en la estructura de la membrana, lo que puede desencadenar una serie de reacciones produciendo la peroxidación de los lípidos.

Fig. 3





2.6 Defectos enzimáticos en los eritrocitos

Cada una de las enzimas que intervienen en el metabolismo en los eritrocitos es esencial para su buen funcionamiento. Se han encontrado defectos genéticos en el metabolismo en los eritrocitos que son responsables de por lo menos catorce formas de anemia hemolítica. Algunos de los defectos enzimáticos demostrados se relacionan con la deficiencia en algunas enzimas tales como glucosa 6 fosfato-dehidrogenasa, 6 fosfogluconato-dehidrogenasa, glutatión-reductasa, glutatión-sintetasa, glutatión-peroxidasa, glutamil-cisteína-sintetasa, piruvato-quinasa. Los eritrocitos con deficiencia de glucosa 6 fosfato dehidrogenasa (6 GPD) son más susceptibles a hemólisis durante las infecciones, en el período neonatal, bajo condiciones de stress y principalmente bajo la administración de fármacos como primaquina y sulfamidas ⁶. El mecanismo por el cual el déficit de G-6-PD permite la hemólisis inducida por fármacos no se conoce con precisión, pero se relaciona de manera indirecta con la incapacidad de mantener niveles adecuados de GSH en el eritrocito cuando se expone a agentes oxidantes, probablemente por deficiencias en la producción de NADPH. Las deficiencias de glutatión reductasa, glutatión sintetasa y glutatión peroxidasa producen síntomas que van desde aumento en la formación de metahemoglobinemia, peroxidación lipídica, formación de cuerpos de Heinz y anemia hemolítica. La deficiencia de piruvato cinasa (PK) se caracteriza por la presencia de anemia crónica hemolítica y noesferocítica. La hemólisis se atribuye a la incapacidad del eritrocito escaso en PK para mantener niveles normales de ATP, lo cual provoca cambios físicos en la membrana.

La determinación de la fragilidad osmótica se ha utilizado para evaluar los daños producidos por los agentes químicos en la membrana plasmática de los eritrocitos. La membrana dañada permite el libre intercambio de electrolitos, lo que produce un hinchamiento en la

célula por la entrada de mayor cantidad de agua y esto provoca que la membrana se agriete y se libere el contenido del eritrocito. Hay grandes variaciones en la susceptibilidad a la hemólisis en los eritrocitos ya que la fragilidad osmótica está en función de la edad celular, es decir, las más jóvenes o menos densas son más resistentes que las más viejas o muy densas. Los cambios en la fragilidad osmótica podrían indicar cambios en la resistencia de la membrana.

Los individuos que están expuestos a agentes que causan hemólisis, presentan un incremento en las poblaciones de eritrocitos jóvenes, en el tamaño celular medio y en la fragilidad osmótica.

Generalmente se encuentra una fragilidad osmótica elevada en la esferocitosis hereditaria y en las anemias hemolíticas idiopáticas y sintomáticas adquiridas. Por el contrario, una fragilidad osmótica disminuida, denota un aplanamiento excesivo de los hematíes como en la presencia de ictericia, en anemia sideropénica, talasemia o anemia de células falciformes ²⁵.

2.6.1 Anemia

La presencia de anemia es un síntoma que consiste en una reducción de los niveles de hemoglobina circulante, de tal forma que no es adecuada la oxigenación de los tejidos periféricos. La anemia puede desarrollarse si existe pérdida de sangre, producción deficiente de eritrocitos o si la destrucción de los eritrocitos es excesiva. En el hombre, también puede presentarse anemia como resultado de la deficiencia de hierro.

La anemia según su mecanismo de producción se puede clasificar de la siguiente manera:

- a) Eritropoyesis disminuida. Las causas pueden ser deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico (anemia megaloblástica) por absorción defectuosa o por insuficiencia de la médula ósea (anemia aplástica).
- b) Pérdida de sangre. Provocada por traumatismos o enfermedad como lesión del tubo digestivo o trastornos ginecológicos.
- c) Hemólisis aumentada. Esta es una causa frecuente de anemia que se debe básicamente a trastornos hemolíticos hereditarios tales como defectos de la membrana del eritrocito, deficiencias del sistema enzimático vía fosfato de pentosa glutatión, deficiencia de enzimas glucolíticas y hemoglobinopatías, así como trastornos hemolíticos adquiridos, producidos por infecciones, agentes químicos, agentes físicos y trastornos mediados por anticuerpos.

Para clasificar el tipo de anemia de acuerdo a las características de los eritrocitos, es necesario determinar el número de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre, la concentración de hemoglobina y el volumen corpuscular medio. Con estos datos es posible calcular el hematocrito, el contenido corpuscular medio de hemoglobina (CMH) y la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH). En la tabla V se muestra la clasificación de anemia en seres humanos.

Es importante clasificar el tipo de anemia presente, ya que nos permitirá conocer más acerca de la patología; por ejemplo la anemia asociada con la enfermedad renal crónica, casi siempre es de tipo normocrómico o normocítico y rara vez será macrocítico.

TABLA V

CLASIFICACION DE ANEMIA EN SERES
HUMANOS 25

TIPO	VCM (fl)	CCMH (%)
Macrofítica	94	30
Normofítica	80 - 94	30
Microfítica simple	80	30
Microfítica hipocrómica	80	30

VCM = Volumen celular medio

CCMH = Concentración corpuscular media de hemoglobina

2.7 Alteraciones hematológicas en caso de daño

Se sabe que cuando la sangre está en contacto con diferentes compuestos químicos se pueden presentar alteraciones en algunos de sus componentes; algunos de los cambios más representativos se producen con el uso de medicamentos, el contacto con contaminantes del ambiente ó con aditivos de los alimentos y en el alcoholismo ⁵⁰, por ejemplo se ha informado la presencia de anemia y porfirinuria en la intoxicación por plomo, la presencia de anemia aplásica después de la exposición a benceno o en personas sujetas a irradiación.

La exposición de los seres humanos a arsénico produce alteraciones hematológicas que se manifiestan por la presencia de anemia, leucopenia y trombocitopenia ^{48,90}

Weathoff y col ⁹⁰ y Feussner y col ³² comunicaron que el tipo de anemia encontrada en la exposición a arsénico es megaloblástica ya que esta substancia inhibe la formación de ácido fólico que es un constituyente que se obtiene de la dieta, necesario para la maduración normal de los eritrocitos. Sin embargo, en el estudio de Kyle y col ⁴⁸ realizado en seis personas expuestas a arsénico en diferentes concentraciones, se informa la presencia de anemia moderada en todos los pacientes, con incremento en el número de reticulocitos y rápida desaparición de Cr ⁵¹ en eritrocitos marcados. Los autores sugieren que la causa de la anemia se debe parcialmente a un incremento de hemólisis provocada por el arsénico.

II OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es evaluar los cambios que se producen en las poblaciones celulares en la sangre de ratas durante la intoxicación con arsénico inorgánico trivalente y los posibles efectos en la membrana de los eritrocitos.

III DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Esquema de trabajo

Este trabajo se dividió en dos etapas que consistieron en un estudio agudo donde se administró una dosis alta única de arsénico trivalente y en un estudio crónico con la administración durante ocho semanas de una dosis relativamente baja de arsénico.

3.1.1 Estudio agudo

Se utilizaron ratas Wistar macho (200-250 g), que se mantuvieron en jaulas en grupos de seis ratas, con libre acceso a agua corriente y alimento de laboratorio (nutricubos de Purina). Después de un período de adaptación de cinco días, se les administró por sonda gástrica una dosis única de 32.5 mg As/Kg como arsenito de sodio (n=90).

Las ratas fueron sacrificadas por punción cardíaca bajo anestesia con éter, después de 1,2,4,8,12,16,24,36,48,72,96,120,168,264 y 336 horas de la administración. Para cada período se sacrificaron seis animales.

A la sangre obtenida se le adicionó EDTA sódico como anticoagulante (1mg/ml sangre).

3.1.2 Estudio cadáverico

Se emplearon ratas Wistar macho con peso inicial de aproximadamente 120 g y se mantuvieron en jaulas en grupos de seis ratas, con libre acceso a agua corriente y alimento de laboratorio (nutricubos de Purina). Luego de un período de adaptación, se les administró por sonda gástrica una dosis diaria de 1.2 mg As/Kg como arsenito de sodio durante 8 semanas. Se realizó un seguimiento de peso a cada rata a lo largo de todo el estudio (n=48).

Cada semana se sacrificó a un grupo de seis ratas por punción cardíaca. La sangre obtenida se recolectó en viales que contenían EDTA sódico para impedir la coagulación.

3.2 Métodos y reactivos

En cada uno de los estudios se procedió a realizar las siguientes determinaciones:

3.2.1 Contenido de glutatión

El contenido de glutatión se realizó de acuerdo al método establecido por Beutler y col ^B, basado en el desarrollo de color formado al agregar 5,5'dithiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) a compuestos sulfhidrilo. El método se realiza de la siguiente manera:

Reactivos:

Solución precipitante
de proteínas

1.67 g de ácido metafos-
fórico glacial + 0.2567
g de EDTA sódico + 30 g
de NaCl en 100 ml de agua
destilada. Se conserva -
a 4° C y tiene una dura-
ción de 15 días.

Solución de fosfato ácido
de sodio (0.3M)

57.72 g de Na_2HPO_4 en
500 ml de agua destilada.

Solución de 5,5'ditiobis
2 nitrobenzoico (DTNB)

20 mg de DTNB aforados a
50 ml con una solución de
citrato de sodio al 1%.

Procedimiento:

En un tubo de ensayo se agregaron 3 ml de solución precipitante y se le adicionaron 300 ul de sangre total, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos, después de los cuales la mezcla se filtró en un papel filtro Whatman No. 2. A 2 ml del filtrado se le agregaron 2 ml de la solución de fosfato.

Se preparó un blanco con 2 ml de la solución precipitante de proteínas y 2 ml de la solución de fosfato.

A las muestras listas para leer se les adicionó 0.5 ml de la solución de DTNB y se formó un compuesto colorido estable por poco tiempo (de 5 a 15 minutos), que se determinó en un espectrofotómetro de absorción lineal Coleman Junior II A modelo 6²⁰_A (Perkin Elmer) ajustado con el blanco a una longitud de onda de 412 nm.

Los cálculos se hicieron de acuerdo a la fórmula:

$$\text{mg \% sangre} = F \times \frac{D.O.}{C_1} \times \frac{A + S}{S} \times \frac{N + H + D}{N} \times PM \times 100$$

En donde:

- F = Factor obtenido al calibrar el colorímetro con un espectrofotómetro.
- D.O = Densidad óptica de la muestra
- C₁ = Coeficiente de extinción molar de GSH
- A = ml de solución precipitante de proteínas
- S = ml de muestra de sangre
- N = ml del filtrado
- H = ml de solución de Na₂HPO₄
- D = ml de DTNB
- PM = peso molecular de GSH

3.2.2 Determinación de fragilidad osmótica

La determinación de la fragilidad de la membrana de los eritrocitos se realizó según el método de Beutler y col⁷, en el que se someten las células sanguíneas a un desafío osmótico, provocando ruptura parcial o total de su membrana y midiendo la cantidad de hemoglobina

liberada por el color presente en la muestra.

Reactivos:

Solución base para hemólisis	45 g NaCl + 17.2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 1.07 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada.
Solución amortiguadora salino fosfato	100 ml de solución base para hemólisis en 1000 ml de H_2O .
Soluciones con diferente concentración de NaCl	A partir de la sol. salino fosfato se prepararon soluciones con diferentes porcentajes de NaCl.

Procedimiento:

Se preparó una serie de tubos; en cada uno se agregaron 5 ml de cada concentración de solución salino fosfato, que va de 0.62 a 0.30% de NaCl y al tubo control se le adicionó 5 ml de agua destilada. A cada uno de los tubos se agregaron 20 μl de sangre, se mezclaron suavemente y se dejaron reposar 30 minutos. Después del tiempo de reposo, se les centrifugó a 2 000 rpm durante 5 minutos. Se midió la absorbancia de cada muestra a 540 nm, considerando la hemólisis de la muestra en agua como el 100% y utilizando agua destilada como blanco. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción lineal Coleman Junior IIA modelo 6 A²⁰ (Perkin Elmer). El porcentaje de hemólisis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula :

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia del tubo con agua}} \times 100$$

Los resultados pueden graficarse en forma directa, formando la gráfica acumulativa y así obtener la concentración de NaCl a la que se produce el 50 % de hemólisis.

3.2.3 *Determinación de parámetros hematológicos*

Para evaluar los cambios en sangre, se realizaron determinaciones por medios electrónicos utilizando un Coulter Counter modelo ZB I, de Coulter Electronics (USA); esta determinación se basa en las diferencias en la conductividad eléctrica entre las partículas y el diluyente. Se utilizó un tubo con orificio de 100 μ l y la toma de la muestra fué de 500 μ l.

Soluciones:

Solución de Isotón II CC	Coulter Electronics
Solución de Isoterge CC	"
Solución de Hemoterge CC	"
Solución Zap-oglobin II	"

Condiciones instrumentales para la determinación de leucocitos y errocitos:

Amplificación %

Apertura de corriente	1
Ventana inferior	10
Ventana superior	110
Muestra	500 μ l

Procedimiento:

I) Determinación de eritrocitos.— Se utilizó Isotón II como medio de dilución. Se hizo una dilución 1:50 000 con un dilutor Coulter dilutter II de la sangre que luego se mezcló de manera suave y se procedió a hacer las lecturas de eritrocitos.

II) Determinación de leucocitos.— La muestra de sangre se mezcló suavemente antes del muestreo y se diluyó con Isotón II 1:500 mediante el Coulter dilutter II. Una vez realizada la dilución se agregaron 3 gotas de zap-oglobina II que es el agente estromalizante y se procedió a leer la cantidad de leucocitos.

III) Distribución de partículas.— La distribución de partículas se llevó a cabo utilizando el canalizador Coulter que es un analizador del tamaño de las partículas mediante sus pulsos eléctricos.

Condiciones:

	Eritrocitos	Leucocitos
Base de canal	10	12
Ancho de ventana	30	25
Rango	4K	400

IV) Determinación de hemoglobina.— Para la determinación de hemoglobina, se utilizó la solución lisada que se ocupó para el conteo de leucocitos utilizando un Coulter Hemoglobinometer. El tiempo mínimo requerido para que el reactivo forme un pigmento estable es de dos minutos.

Con ésta metodología se determinó: .

Recuento de eritrocitos	millones / μ l
Recuento de leucocitos	miles / μ l
Determinación de hemoglobina	g / 100 ml
Hematocrito	(%)
Volumen corpuscular medio	(fl)

Por medio de los valores anteriores se pudo calcular:

a) Cantidad media de hemoglobina (CMH).— Es el contenido en peso de hemoglobina en un eritrocito medio individual, expresado en picogramos (pg).

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{No. de eritrocitos}}$$

b) Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH).— Es la concentración media de hemoglobina por 100 ml de eritrocitos.

$$\text{CCMH} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematocrito}}$$

3.2.4 *Determinación de osmolalidad del plasma*

La determinación de osmolalidad se realizó por un método que se basa en el descenso del punto de congelación de la muestra.

Soluciones:

Solución calibradora de 100 mOsm

Procedimiento:

Se utilizó un osmómetro de precisión Osmette modelo 3007, calibrado a 100 mOsm., se tomó una muestra de 200 μ l de plasma para determinar la osmolalidad. Los resultados se expresan en mOsm/Kg H₂O.

3.2.5 *Determinación de sodio y potasio del plasma*

Se cuantificaron las concentraciones de los iones Na⁺ y K⁺ en el plasma por medio de un flamómetro marca Coleman modelo 51 (Perkin-Elmer).

Soluciones:

Estandar de K⁺ 1 meq/l

0.008 g K₂HPO₄ en 100 ml de agua destilada.

Estandar de K^+ 9 meq/l	0.078 g K_2HPO_4 en 100 ml de agua destilada
Estandar de Na^+ 110 meq/l	0.643 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.
Estandar de Na^+ 40 meq/l	0.234 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.

Procedimiento:

Se hace una dilución de la muestra del plasma 1:2 con agua destilada. El volumen total requerido es de 500 μ l. Las muestras se colocan en viales adecuados. El flamómetro se calibró previamente con las soluciones estandar, para lo que se utilizó un rango inferior y uno superior; una vez calibrado el aparato, se procedió a hacer la lectura de las muestras.

3.2.6 Tratamiento estadístico

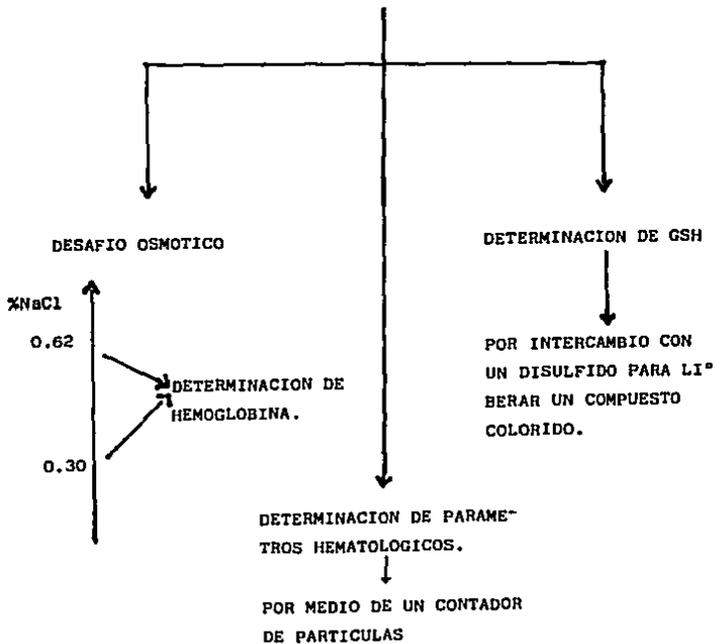
Tanto para el estudio agudo como para el crónico los grupos utilizados estuvieron formados por seis ratas cada uno; para cada grupo se realizó el promedio de los seis valores obtenidos y la media \pm error tipo de la media (ETM) (desviación estandar) para las diferentes determinaciones efectuadas, los resultados obtenidos se compararon con un grupo control. Para demostrar estadísticamente las diferencias que existen entre los grupos de ratas intoxicadas y el grupo control, se utilizó la prueba de t de Student, tomando como valores significativos, aquellos que tenían una p menor de 0.05 ($p < 0.05$)²⁴.

ESQUEMA DE TRABAJO



BAJO ANESTESIA CON ETHER

SANGRE CON EDTA



IV RESULTADOS

ADMINISTRACION AGUDA.

Células sanguíneas.

Las ratas expuestas en forma aguda a 32.5 mg As/kg presentaron un aumento en el número de glóbulos rojos en las primeras dos horas posteriores a la intoxicación; a las doce horas de la administración disminuyó el valor de manera significativa ($p < 0.05$), para luego alcanzar valores similares al control en el resto del período de observación (figura 1), mientras que los valores del volumen corpuscular medio de los eritrocitos (VCM) presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$), observada alrededor de las 72 horas posteriores a la intoxicación y un valor cercano al control a los 6 días de que fueron administrados los animales (figura 2).

En las primeras 4 horas luego de la intoxicación, se observó una elevación del 10% en el valor del hematocrito disminuyendo después a valores similares al control (figura 3); este valor se obtuvo directamente del Coulter Counter que lo calcula a partir del volumen celular medio y está relacionado con los valores que se obtuvieron en el número de glóbulos rojos, que también tienen similitud con el valor de la hemoglobina en donde se obtuvo un incremento de 15.7 g/100 ml que corresponde al control, a 17.5 g/100 ml en la segunda hora posterior a la intoxicación. En el resto del período de observación se presentó una tendencia a disminuir obteniéndose el valor mas bajo seis días después de administrar el arsénico a los animales (figura 4).

FIGURA 1

NUMERO DE ERITROCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ * $p < 0.05$

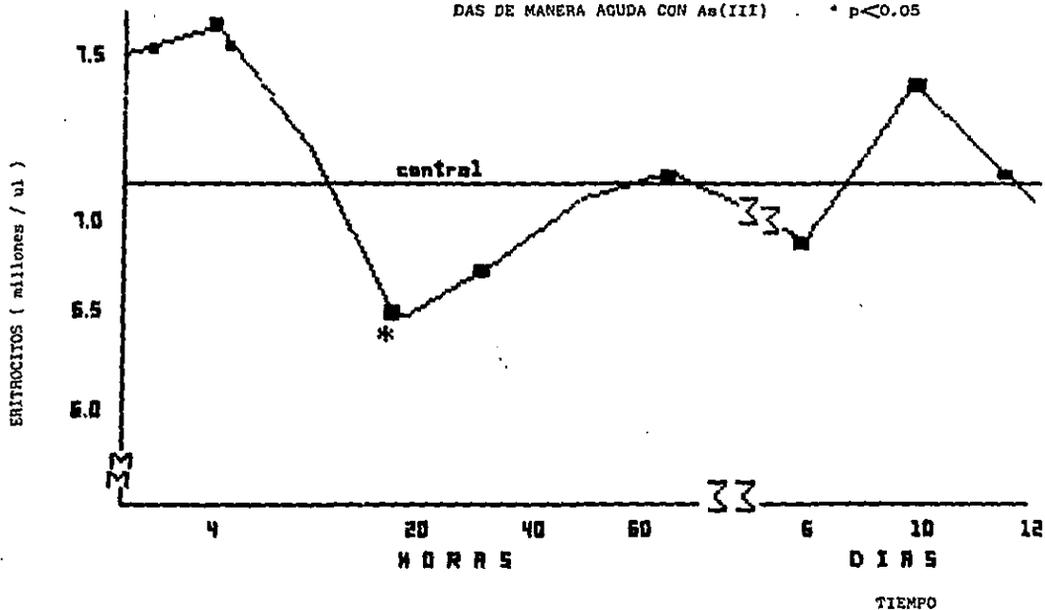


FIGURA 2

VALORES DEL VOLUMEN CELULAR MEDIO EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO • $p < 0.05$

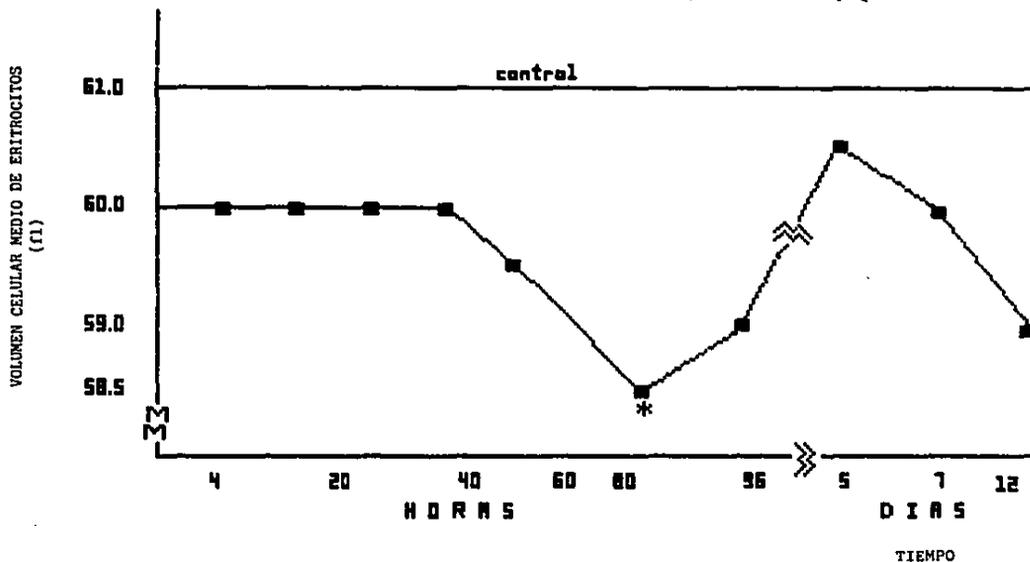


FIGURA 3

HEMATOCRITO EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA
CON AB (III) INORGANICO.

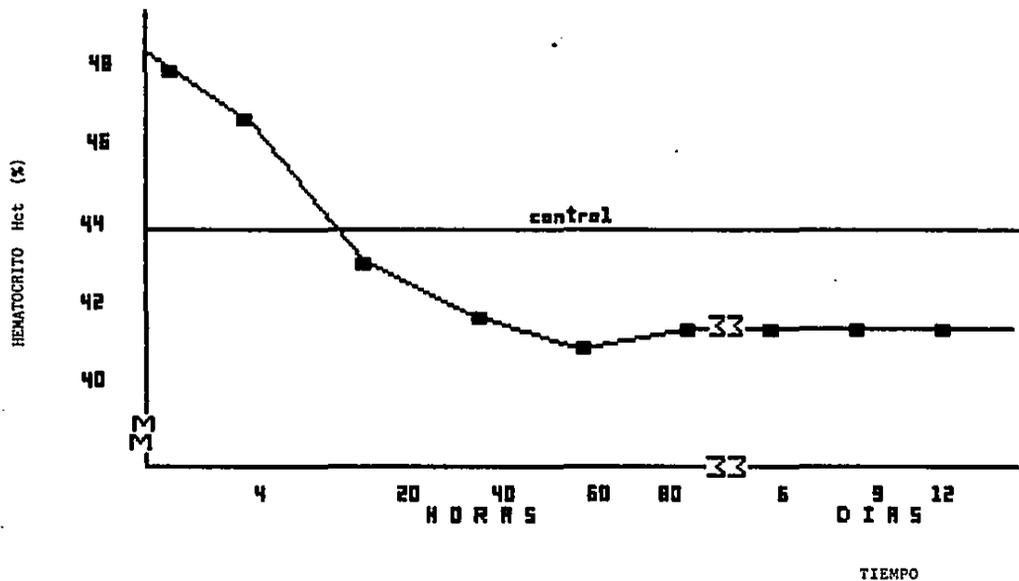
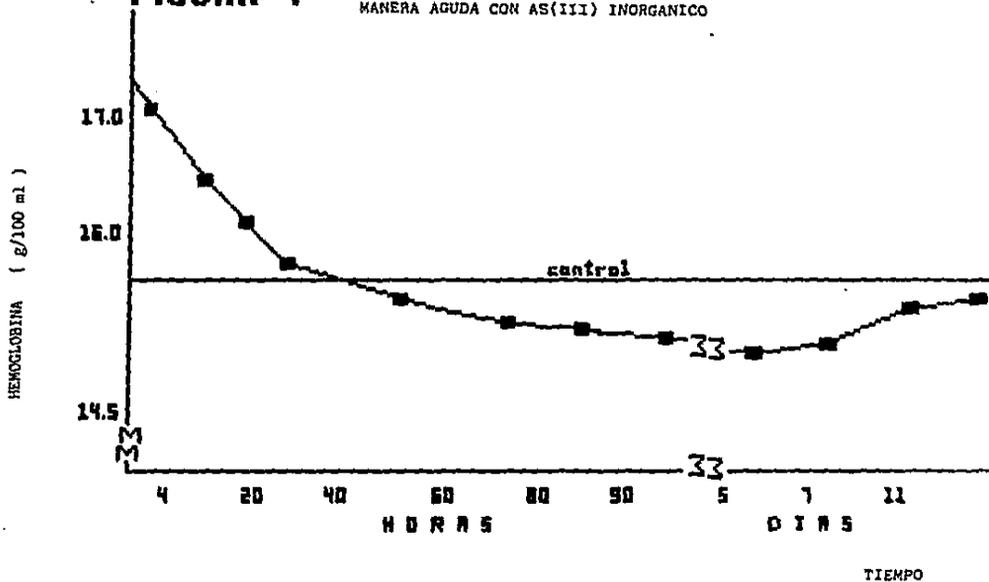


FIGURA 4

NIVELES DE HEMOGLOBINA EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON AS(III) INORGANICO



La cantidad media de hemoglobina (CMH) obtenida al considerar la concentración de hemoglobina y el número de eritrocitos presentes en la muestra presenta una disminución significativa de los valores ($p < 0.05$); el valor más bajo se obtuvo 12 días después de la intoxicación (figura 5).

La concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) obtenida al relacionar la hemoglobina con el hematocrito mostraron una tendencia general a disminuir, excepto a las 48 y 72 horas de intoxicación en que se presentó un aumento aproximadamente del 4% con respecto al control. La disminución que se presentó los últimos 7 días del período de observación fué estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (figura 6).

Las curvas de distribución que muestran el tamaño de los eritrocitos presentaron un desplazamiento hacia menores volúmenes en todo el período de observación, los datos de volumen menor y el valor de la amplitud de la curva al 50% más bajo se obtuvieron a los 14 días de haber sido administrados los animales (figura 7).

Con respecto a las células blancas, observamos la presencia de una disminución en las primeras semanas de la administración en el número de leucocitos presentes en las muestras con tendencia a aumentar estos valores hasta alcanzar $8.8 \times 10^3 / \mu l$ al final del período de observación, mientras que el valor del volumen celular medio de los leucocitos fué siempre más alto que los valores control; el valor más elevado se presentó a las 96 horas de intoxicación y representa un incremento del 11.4% con respecto al control (Tabla I).

En los valores obtenidos de las curvas de distribución de los leucocitos, observamos un ligero desplazamiento hacia un mayor volumen celular en la curva que representa el promedio de ratas sacrificadas

FIGURA 5

CONTENIDO MEDIO DE HEMOGLOBINA EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON As(III) INORGANICO * $p < 0.005$

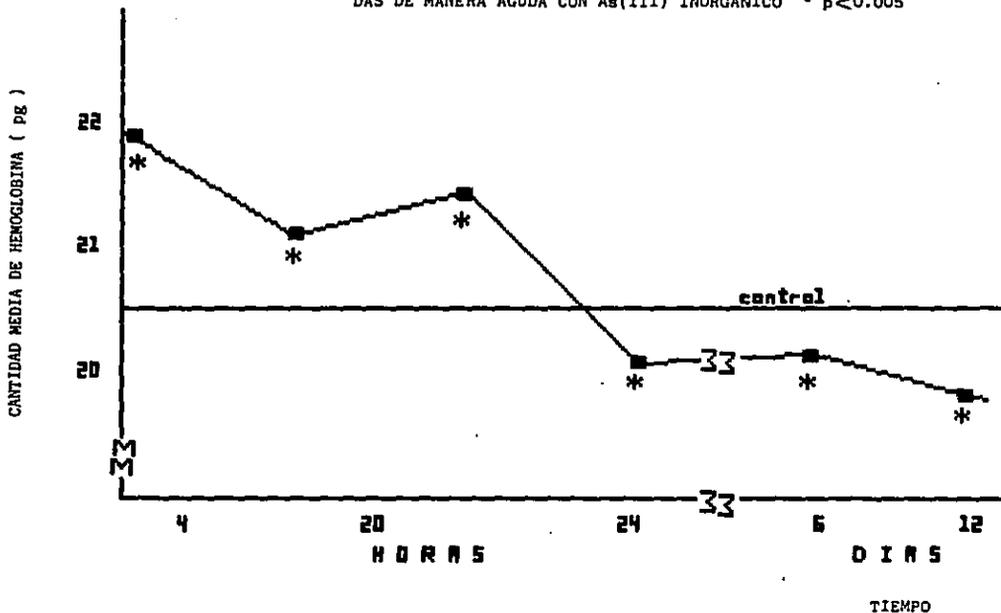


FIGURA 6

CONCENTRACION CORPUSCULAR MEDIA DE HEMOGLOBINA DE RATAS IN
TOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO * $p < 0.05$

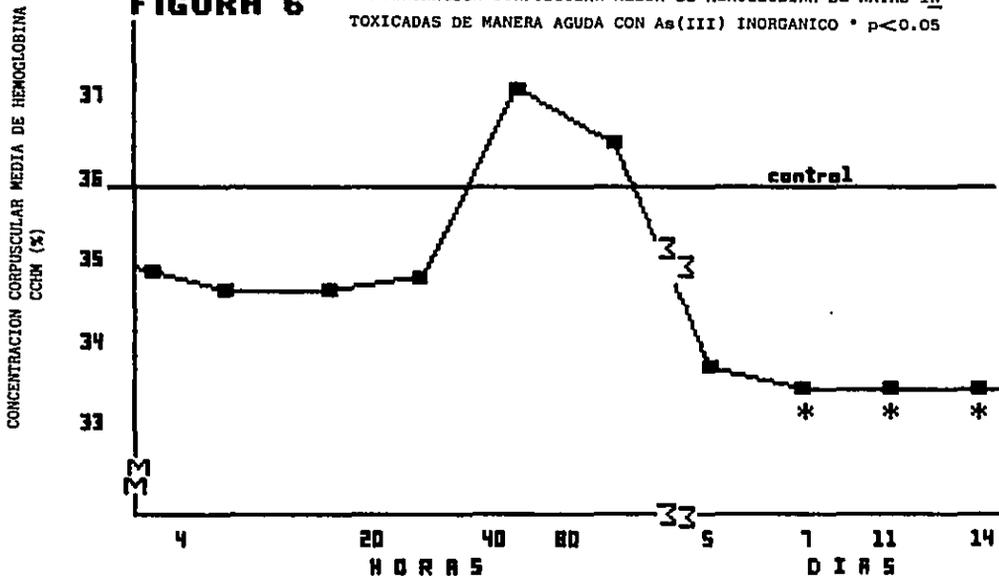


FIGURA 7

DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LOS ERITROCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO

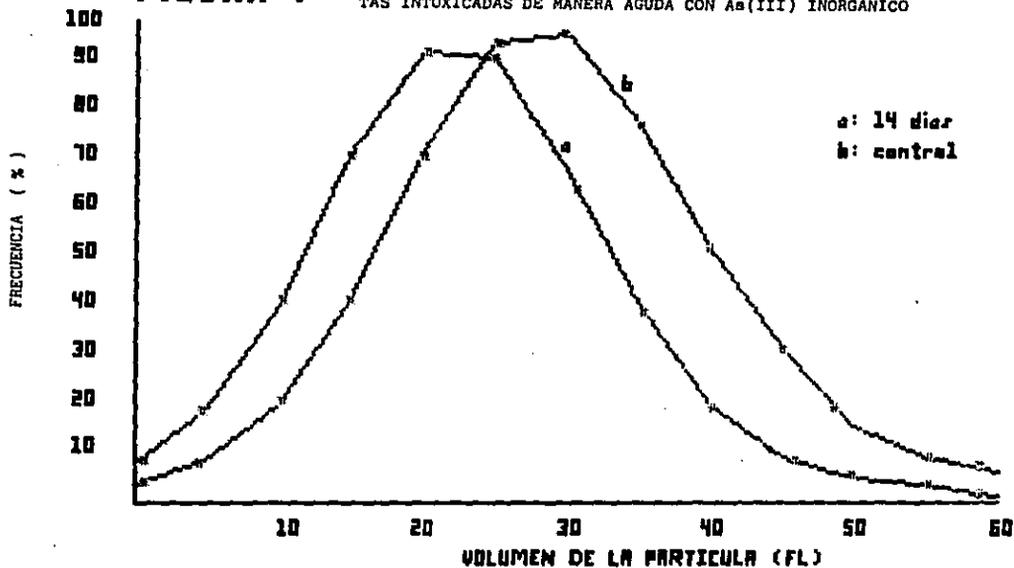


TABLA I

NUMERO DE LEUCOCITOS Y VOLUMEN CELULAR MEDIO EN RATAS
INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON ARSENITO DE SODIO.

TIEMPO horas / días	LEUCOCITOS $\times 10^3$	VCM (fl)	n
1	6.05 ⁺ 1.08	75 + 2.22	6
2	5.31 + 1.07	74 + 3.84	6
4	5.92 + 0.55	74 + 4.41	5
8	8.40 + 1.15	76 + 3.01	6
12	6.55 + 1.16	72 + 3.76	5
16	6.83 + 0.39	76 + 4.08	4
24	7.65 + 1.77	73 + 6.01	6
36	6.90 + 1.08	74 + 5.49	6
48	7.52 + 1.36	74 + 6.83	6
72	8.56 + 2.35	74 + 6.93	5
96	8.88 + 1.43	78 + 6.12	6
5 días	8.74 + 2.41	70 + 5.61	6
7 "	8.15 + 1.40	72 + 6.18	6
11 "	8.25 + 2.01	73 + 4.75	6
14 "	6.70 + 1.19	72 + 5.98	5
CONTROL	7.05 + 2.19	71 + 5.74	6

n = Número de ratas sacrificadas en cada período.

luego de 2 horas de la intoxicación, éste valor es similar al valor control, sin embargo la curva que representa 14 días de intoxicación muestra un desplazamiento hacia menor volumen celular (figura 8).

Fragilidad osmótica de los eritrocitos.

En la determinación de fragilidad osmótica, los datos expresados como 50% de hemólisis se mantuvieron por debajo del valor control, y presentan una tendencia constante a disminuir (figura 9).

Al evaluar el grado relativo de hemólisis representado por la pendiente en la parte recta de la gráfica integral, se observó un aumento significativo de este valor dos horas después de la intoxicación y posteriormente los valores disminuyeron hasta ser próximos al valor control (figura 10).

Las curvas de fragilidad osmótica de cada grupo de ratas sacrificadas a diferentes tiempos se mostraron desplazadas hacia una menor fragilidad de los eritrocitos y este desplazamiento es más evidente mientras más tiempo dure la exposición, con excepción de la curva que representa 5 días de intoxicación que presentó el mayor desplazamiento (figura 11).

Niveles de glutatión reducido en sangre.

La concentración de glutatión reducido, se vió drásticamente disminuida en las primeras 8 horas luego de la intoxicación manteniéndose por debajo del valor control en el resto del período de observación (figura 12).

FIGURA 8

DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LOS LEUCOCITOS EN SANGRE DE RATAS
INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO

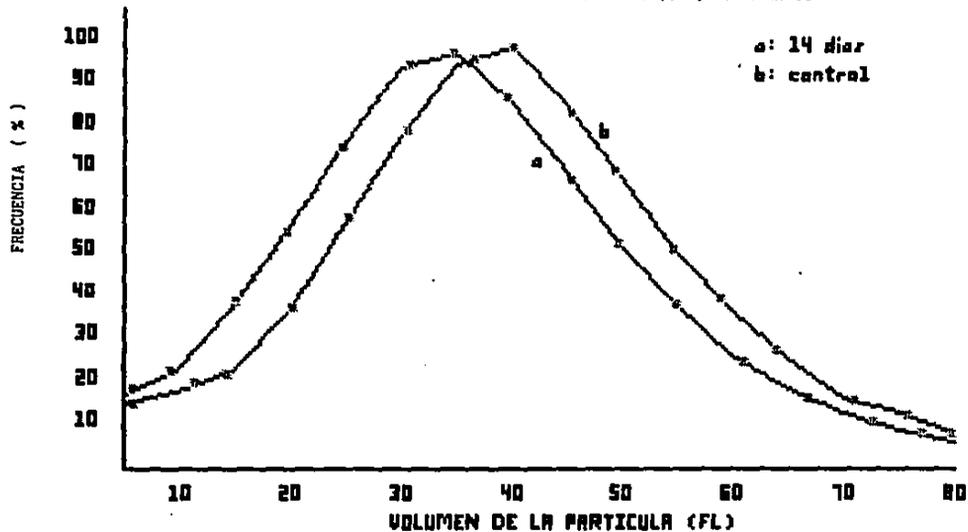


FIGURA 9

DETERMINACION DEL 50 % DE HEMOLISIS PRODUCIDA POR ACCION DEL ARSENICO (III) ADMINISTRADO DE MANERA AGUDA : * $p < 0.05$

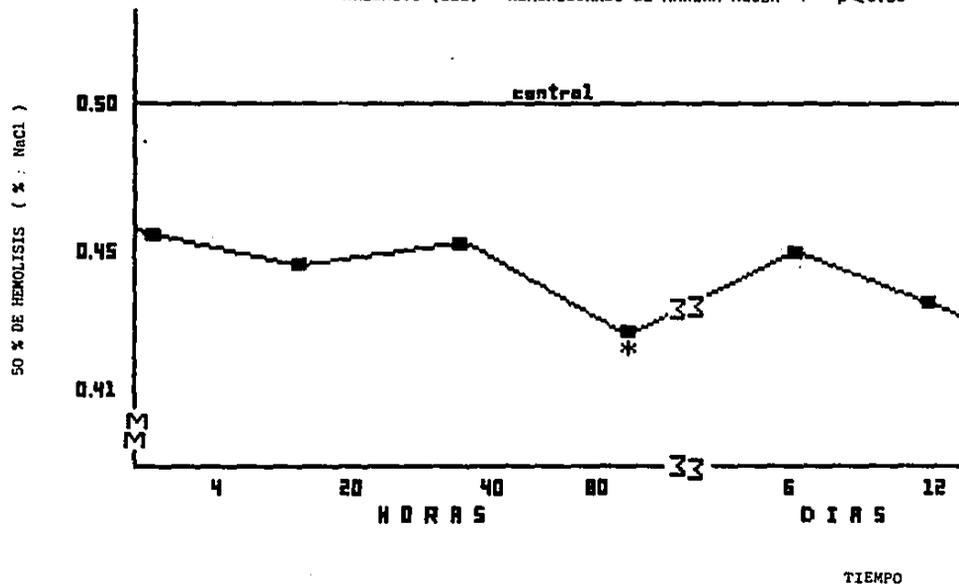
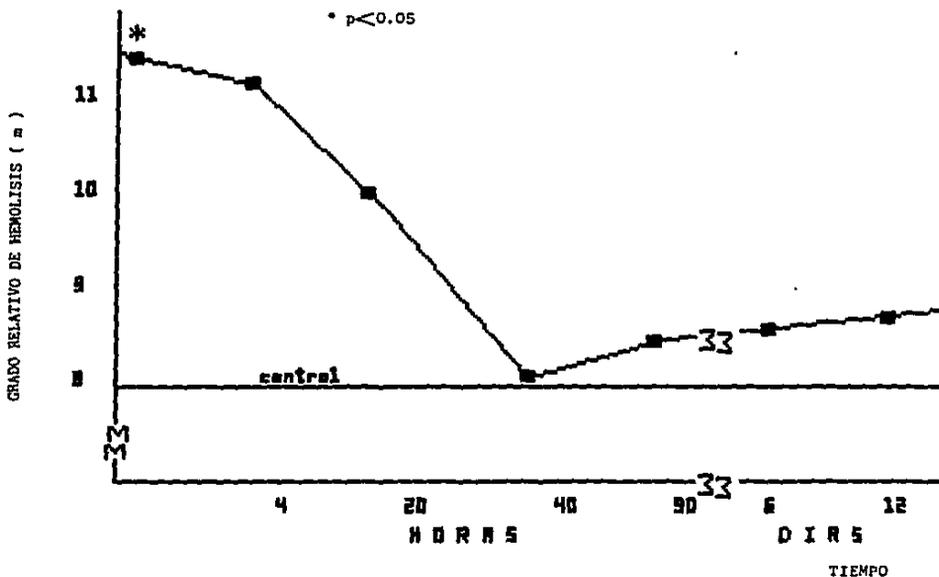


FIGURA 10

GRADO RELATIVO DE HEMOLISIS DETERMINADO CON LA PENDIENTE DE LA GRAFICA ACUMULATIVA EN LA INTOXICACION AGUDA CON $As(III)$

* $p < 0.05$



FRAGILIDAD OSMOTICA EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS DE MANE_
 RA AGUDA CON As(III) (expresadas en diferentes periodos
 de la administración)

FIGURA 11

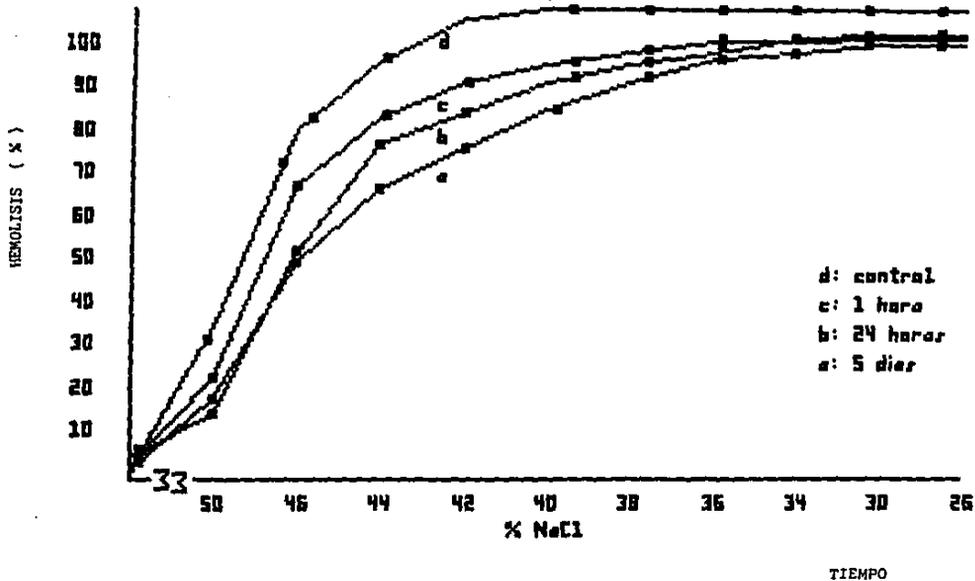
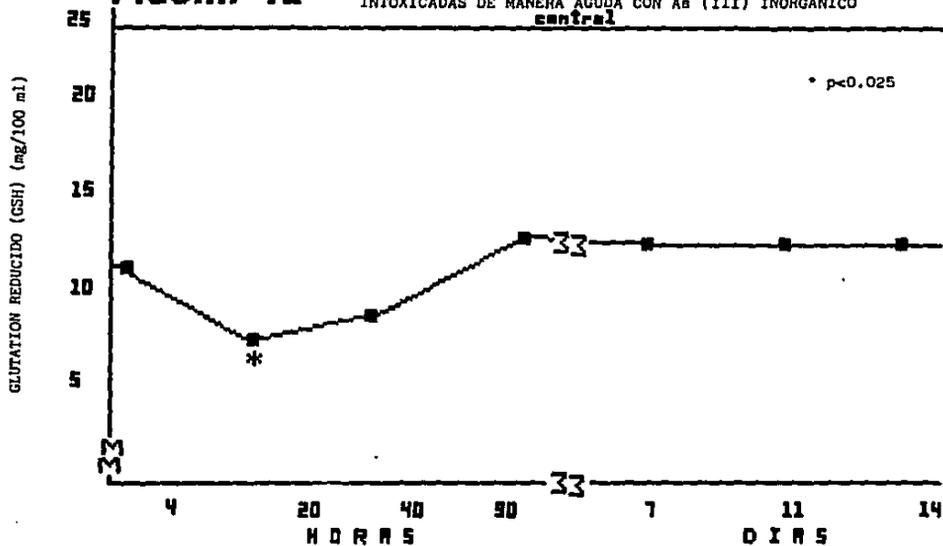


FIGURA 12

CONCENTRACION DE GLUTATION REDUCIDO EN SANGRE DE RATAS
INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO



Osmolalidad en plasma.

Respecto a los niveles de osmolalidad en el plasma se observó el máximo incremento (320 mOsm/kg H₂O) después de 2 horas de la intoxicación; posteriormente se presentó una disminución paulatina que se hizo significativa ($p < 0.025$) durante el período de 6 a 12 días posteriores a la intoxicación (figura 13).

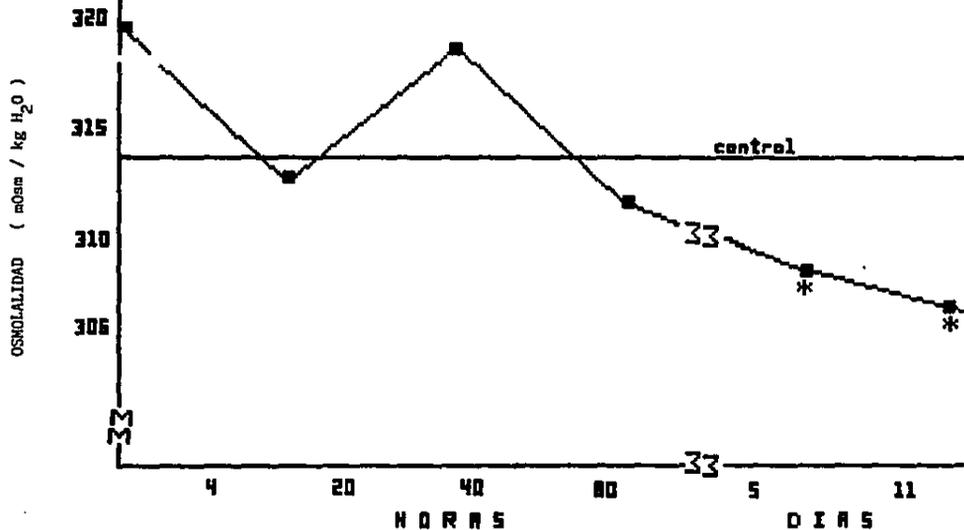
Niveles de sodio y potasio en plasma.

Los valores de sodio en el plasma, fueron siempre menores que el control; alcanzando la menor concentración a los 7 días posteriores a la intoxicación con un nivel de significancia de $p < 0.001$ (figura 14).

Para el ión potasio, se obtuvieron valores menores (10-30%) que el control en todo el período de observación, con una ligera tendencia a recuperarse en los últimos días de la intoxicación (figura 15).

FIGURA 13

OSMOLALIDAD EN PLASMA DE RATAS INTOXICADAS DE MANERA AGUDA CON $As(III)$ INORGANICO. * $p < 0.025$



VALORES DEL ION SODIO EN EL PLASMA DE RATAS INTOXICADAS
CON DOSIS UNICA DE ARSENITO DE SODIO * $p < 0.001$

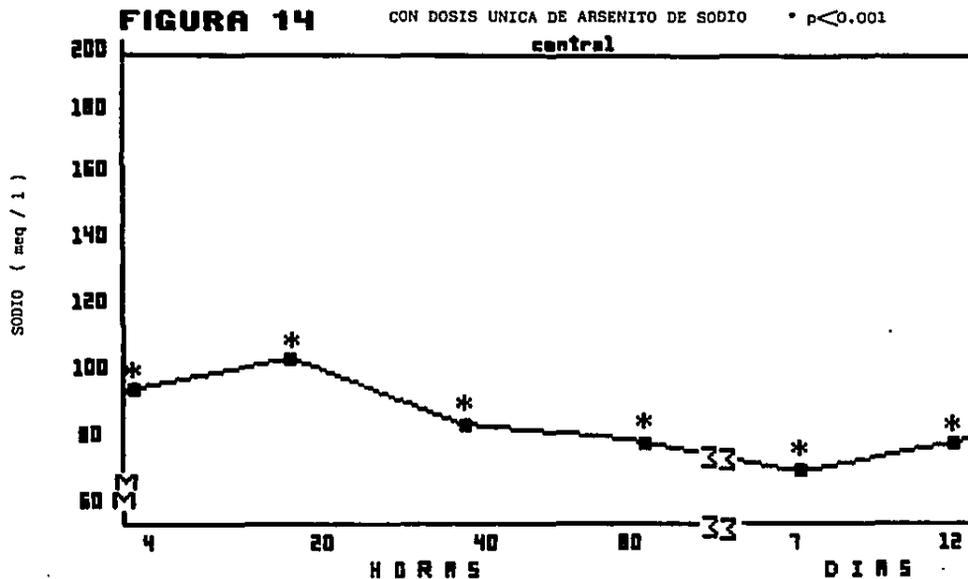
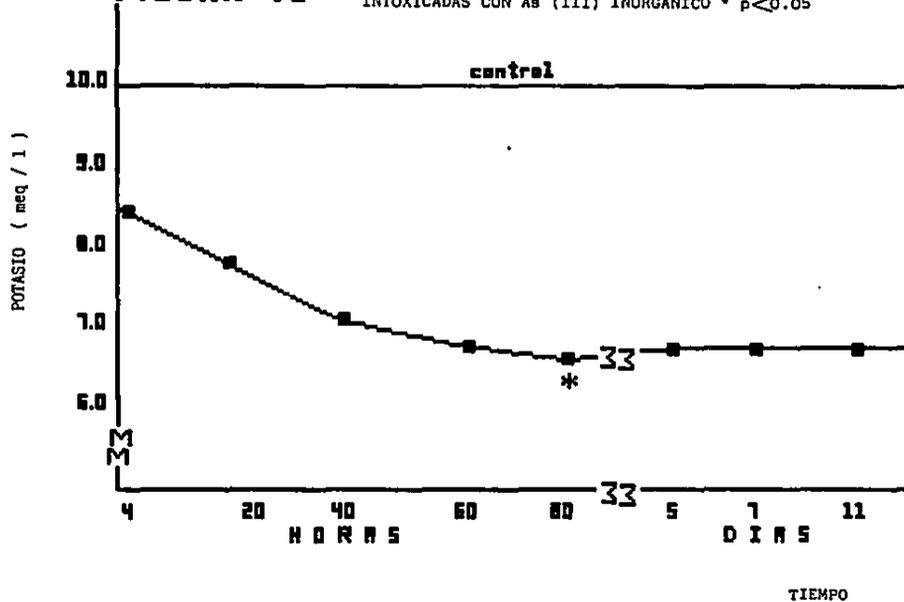


FIGURA 16

CONCENTRACIONES DE POTASIO EN EL PLASMA DE RATAS
INTOXICADAS CON As (III) INORGANICO * $p < 0.05$



*ADMINISTRACION CRONICA.**Células sanguíneas.*

Las ratas administradas con una dosis diaria de 1.2 mg As/kg presentaron inicialmente una disminución significativa ($p < 0.001$) en el número de eritrocitos con una tendencia a aumentar estos valores hasta llegar a un valor máximo de $8.64 \times 10^6/\mu l$ en la última semana del periodo de observación (figura 16), mientras que los valores del volumen corpuscular medio (VCM) de los eritrocitos presentaron un aumento alcanzando un valor máximo (69 fl) en la segunda semana de administración y posteriormente hubo una tendencia a disminuir para igualar los valores de los datos control (figura 17).

El valor de hematocrito presentó una disminución inicial y luego de 4 semanas de intoxicación, rebasó el valor control siendo el aumento significativo en la última semana de intoxicación ($p < 0.001$) (figura 18), éstos datos coinciden con los resultados obtenidos en el número de glóbulos rojos, que están relacionados con la cantidad de hemoglobina presente en la célula sanguínea, en donde se presentó una disminución inicial de este valor con tendencia a aumentar alcanzando el valor máximo en la octava semana de la intoxicación ($p < 0.05$) (figura 19).

Respecto a la cantidad media de hemoglobina (CHM), se observó un incremento significativo de este valor ($p < 0.0025$) en la tercera semana de la administración y posteriormente una tendencia significativa a disminuir ($p < 0.001$). Como se mencionó anteriormente este dato se obtiene al relacionar la cantidad de hemoglobina con el número de

NUMERO DE ERITROCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON As (III) INORGANICO *p<0.001

FIGURA 16

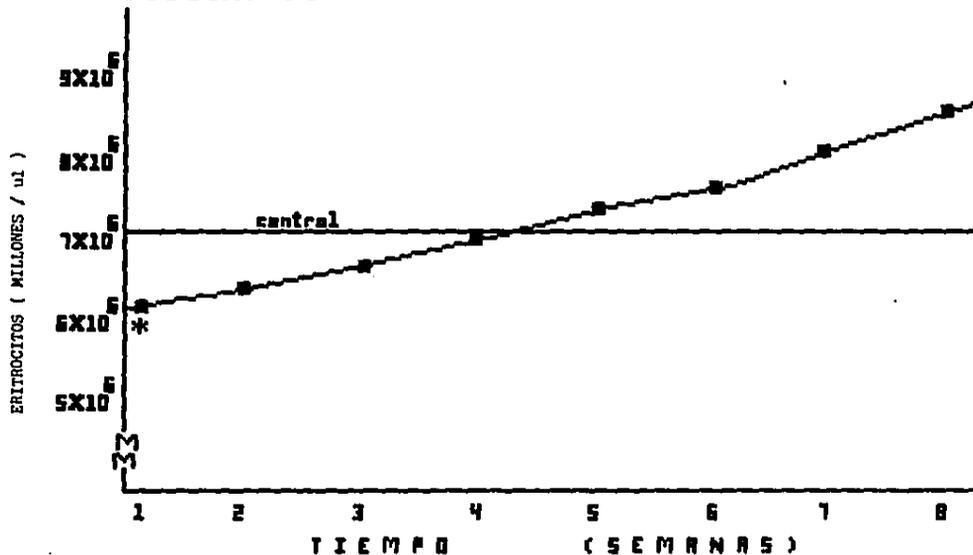


FIGURA 17

VALORES DEL VOLUMEN CELULAR MEDIO DE LOS ERITROCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON As (III) INORGANICO * $p < 0.05$

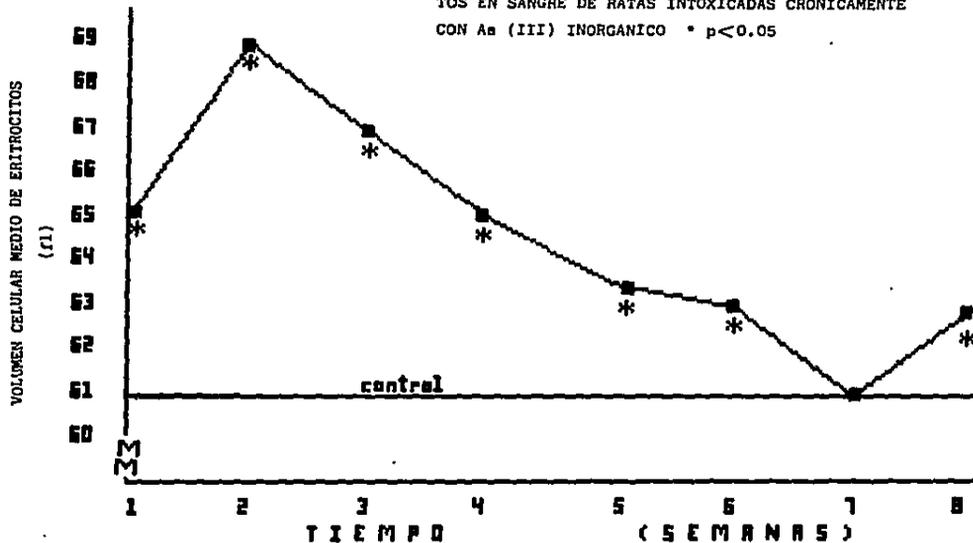


FIGURA 18

VALORES DEL HEMATOCRITO DE SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON $As(III)$ INORGANICO

* $p < 0.001$

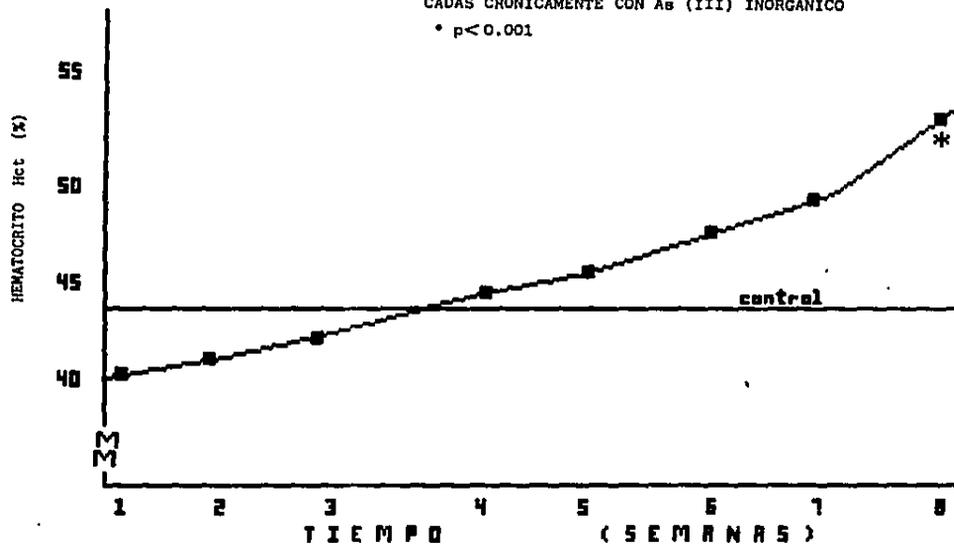
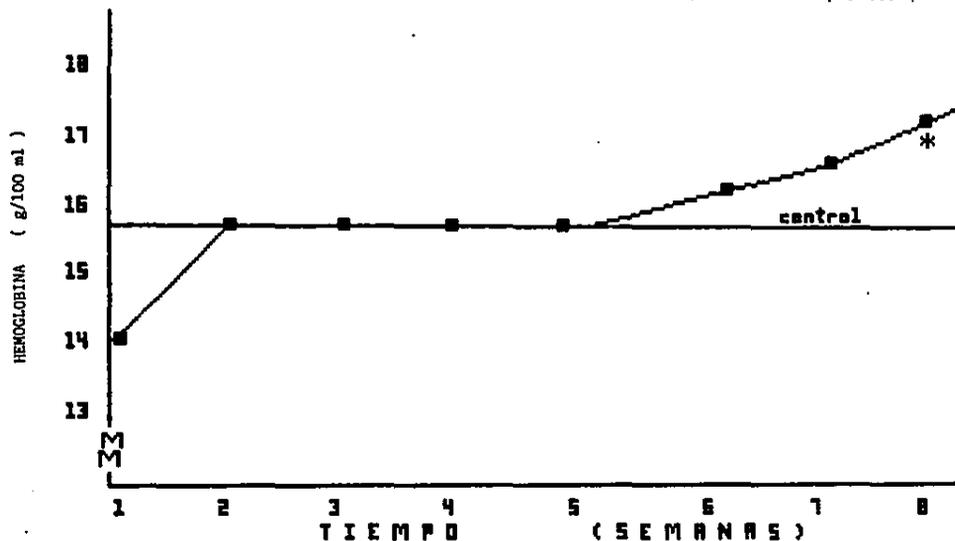


FIGURA 19

NIVELES DE HEMOGLOBINA EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON $As(III)$ INORGANICO * $p < 0.05$



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

eritrocitos (figura 20), mientras que los valores de CCMH, estuvieron todos por debajo del control y fueron estadísticamente significativos las semanas 1, 2 y 8 (figura 21).

Durante la primera semana de intoxicación se observó un desplazamiento hacia volúmenes mayores de la curva que representa la distribución del tamaño de los eritrocitos. Al final del período de observación, el desplazamiento de la curva fué hacia volúmenes menores. Los valores de amplitud de la curva fueron menores que el valor control en ambos casos (figura 22).

En el número de leucocitos se observó una tendencia a aumentar para llegar a un valor máximo en la octava semana de intoxicación ($9.05 \times 10^3 / \mu l$) (Tabla II), mientras que en el volumen celular medio de los leucocitos se presentó el valor máximo en la segunda semana de la intoxicación, con el resto de datos cercanos al valor control (Tabla II).

Las gráficas de distribución del tamaño de los leucocitos mostraron un desplazamiento hacia volúmenes menores en las células durante las 4 primeras semanas de intoxicación; posteriormente el desplazamiento se dirigió a volúmenes mayores. Los valores del rango en el volumen de los leucocitos, fueron siempre ligeramente más elevados que los valores control (figura 23).

Fragilidad osmótica de los eritrocitos.

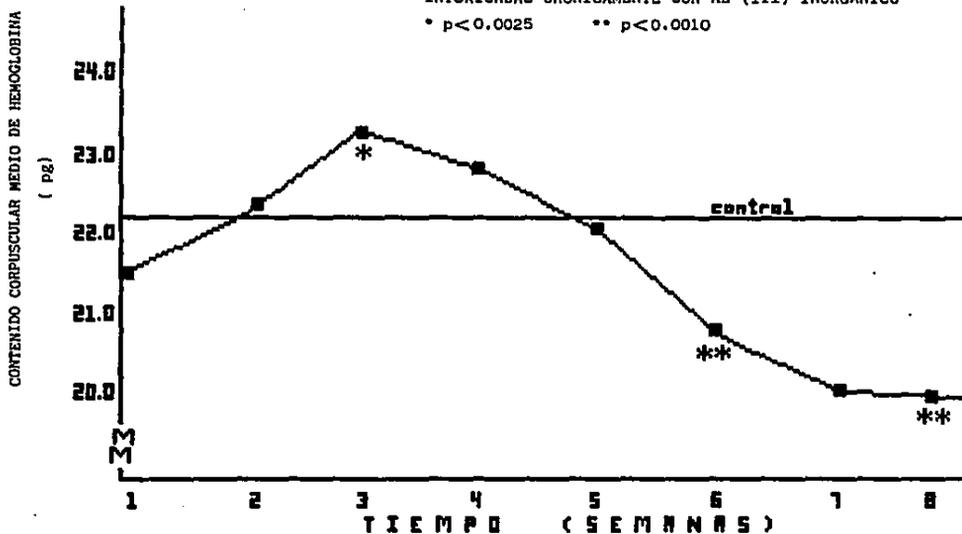
Los datos expresados como 50 % de hemólisis, fueron más altos que el valor control con una tendencia constante a aumentar con una significancia de $p < 0.05$ (figura 24).

FIGURA 20

CONTENIDO MEDIO DE HEMOGLOBINA EN SANGRE DE RATAS
INTOXICADAS CRONICAMENTE CON $As(III)$ INORGANICO

* $p < 0.0025$

** $p < 0.0010$



CONCENTRACION CORPUSCULAR MEDIA DE HEMOGLOBINA

FIGURA 21

CONCENTRACION CORPUSCULAR MEDIA DE HEMOGLOBINA EN
SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON A_2
(III) INORGANICO * $p < 0.025$

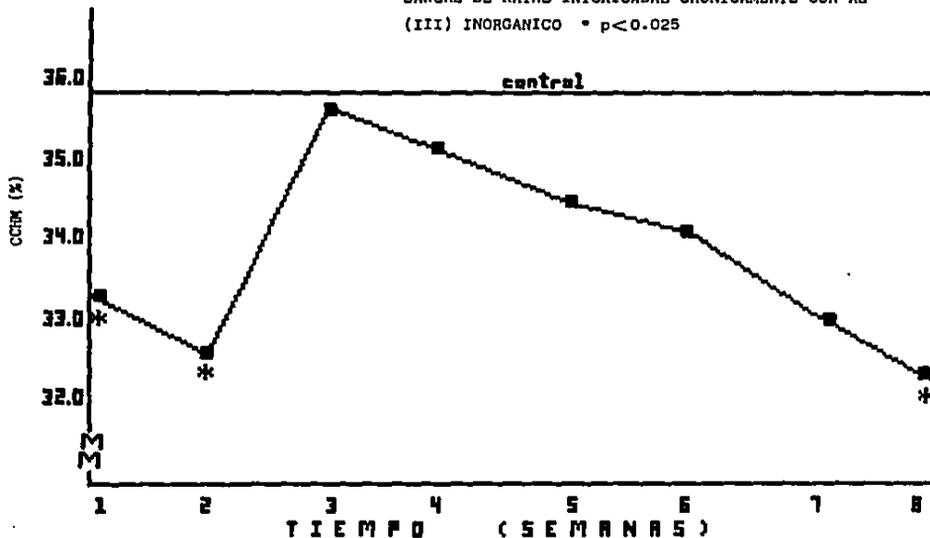


FIGURA 22

DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LOS ERITROCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON As (III)

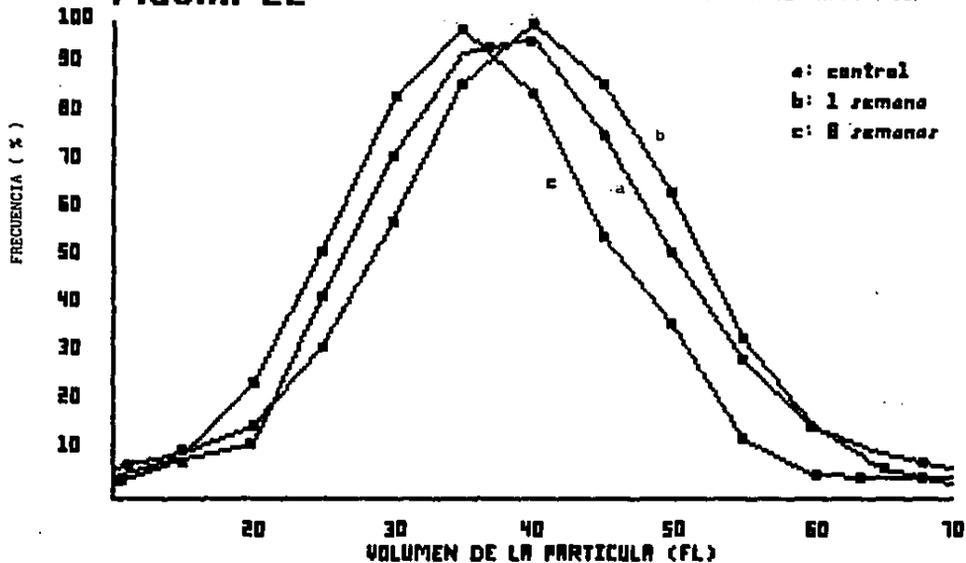


TABLA II

NUMERO DE LEUCOCITOS Y VOLUMEN CELULAR MEDIO DE LOS
LEUCOCITOS DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON AR
SENITO DE SODIO.

TIEMPO (semanas)	LEUCOCITOS $\times 10^3 / l$	VCM (fl)	n
1	6.72 \pm 1.41	72 \pm 3.2	6
2	7.44 \pm 0.94	75 \pm 4.59	6
3	8.73 \pm 1.32	71 \pm 5.65	6
4	7.87 \pm 0.75	70 \pm 2.31	6
5	5.96 \pm 2.01	74 \pm 4.4	6
6	7.87 \pm 1.72	70 \pm 5.15	6
7	7.08 \pm 1.0	68 \pm 2.09	5
8	9.04 \pm 2.38	71 \pm 2.58	6
Control	7.05 \pm 2.19	71 \pm 5.74	6

$p < 0.05$

n = Número de ratas sacrificadas en cada período.

FIGURA 23

DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LOS LEUCOCITOS EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON $As(III)$

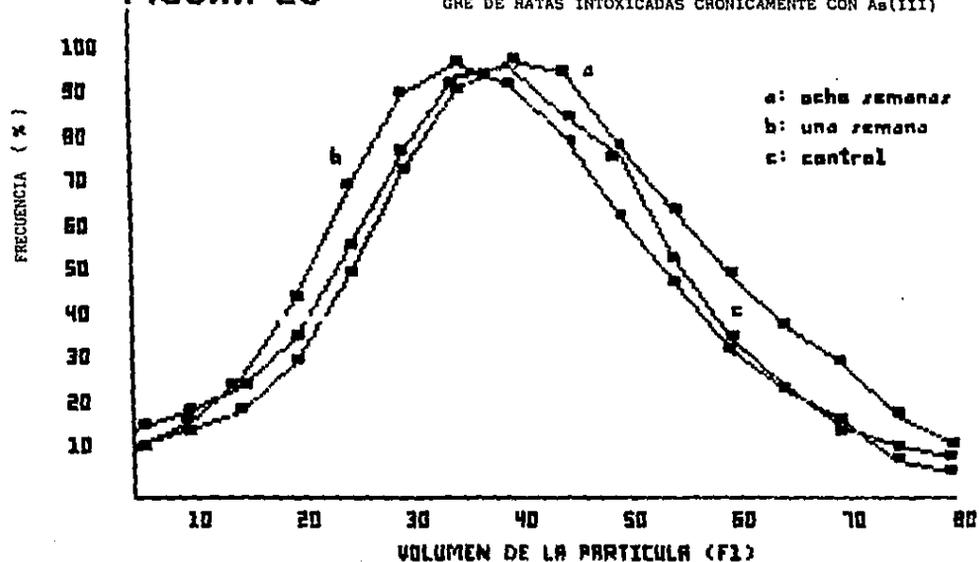
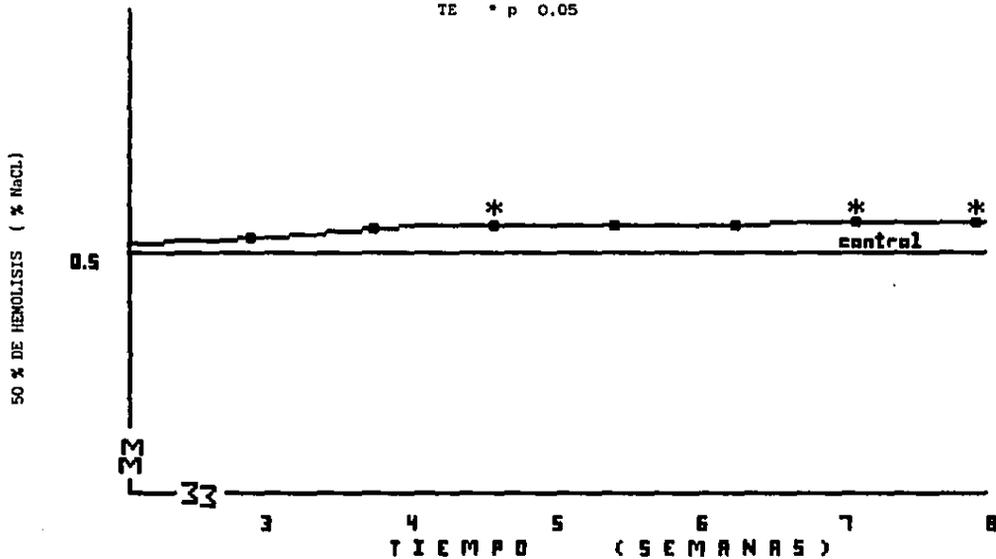


FIGURA 24

DETERMINACION DEL 50 % DE HEMOLISIS PRODUCIDA POR
ACCION DEL ARSENICO (III) ADMINISTRADO CRONICAMENTE
* p 0.05



Los datos del grado relativo de hemólisis (que se obtuvieron de la gráfica integral) mostraron valores mayores que el control, presentándose el valor mas alto en la quinta semana de intoxicación ($p < 0.05$) y posteriormente una tendencia a disminuir para igualar a los datos control (figura 25).

En las curvas de fragilidad osmótica se observó un desplazamiento hacia valores de mayor fragilidad osmótica en los eritrocitos (figura 26).

Niveles de glutatión reducido en sangre.

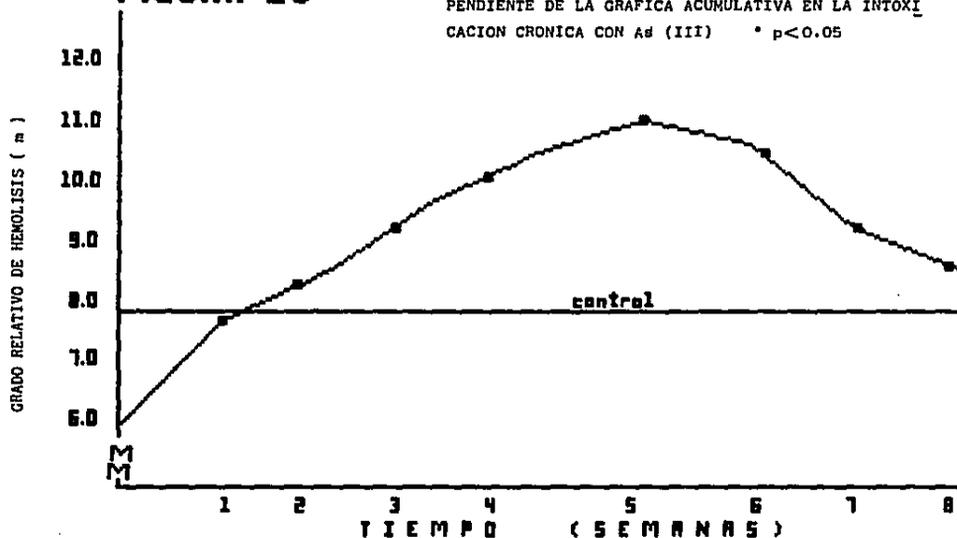
Los niveles del glutatión reducido fueron siempre mas bajos que el control observandose una disminución drástica del nivel de GSH en sangre durante la primera semana posterior a la intoxicación con tendencia a alcanzar valores control ($p < 0.001$).

Osmolalidad en plasma.

Los resultados que se obtuvieron respecto a la osmolalidad del plasma mostraron una disminución significativa las tres primeras semanas de la intoxicación ($p < 0.025$); en las semanas siguientes hubo una tendencia a aumentar hasta igualar los datos control (figura 28).

FIGURA 25

GRADO RELATIVO DE HEMOLISIS DETERMINADO CON LA
PENDIENTE DE LA GRAFICA ACUMULATIVA EN LA INTOXI-
CACION CRONICA CON Ad (III) * p<0.05



FRAGILIDAD OSMOTICA EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRO-
NICAMENTE CON $Aa(III)$. (expresadas en diferentes perio-
dos de la administración).

FIGURA 26

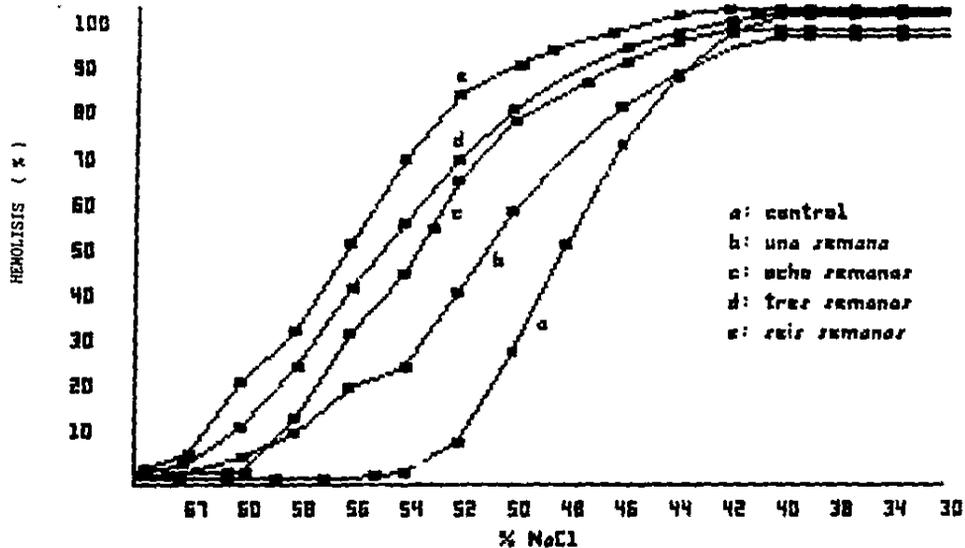


FIGURA 27

CONCENTRACION DE GLUTATION REDUCIDO EN SANGRE DE RATAS INTOXICADAS CRONICAMENTE CON As_2O_3 (III)

* $p < 0.001$

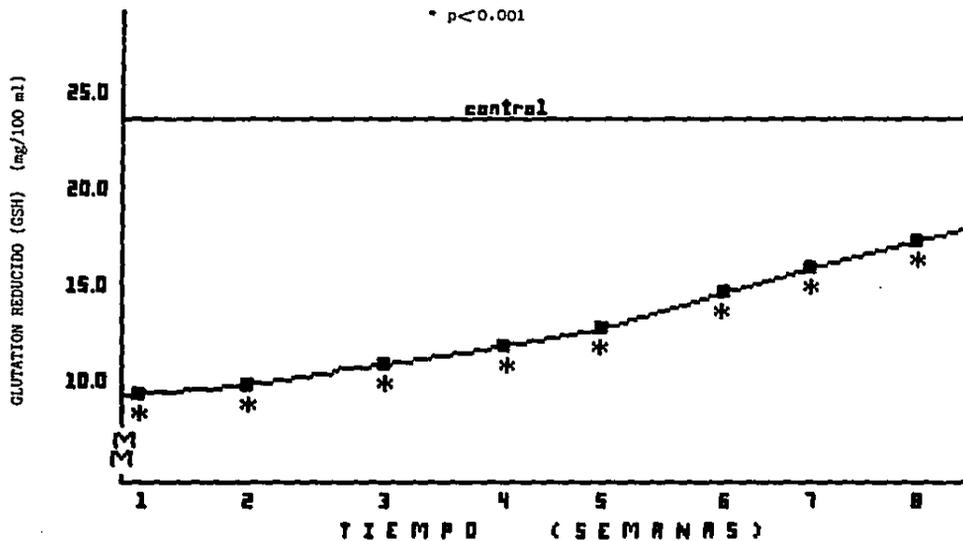
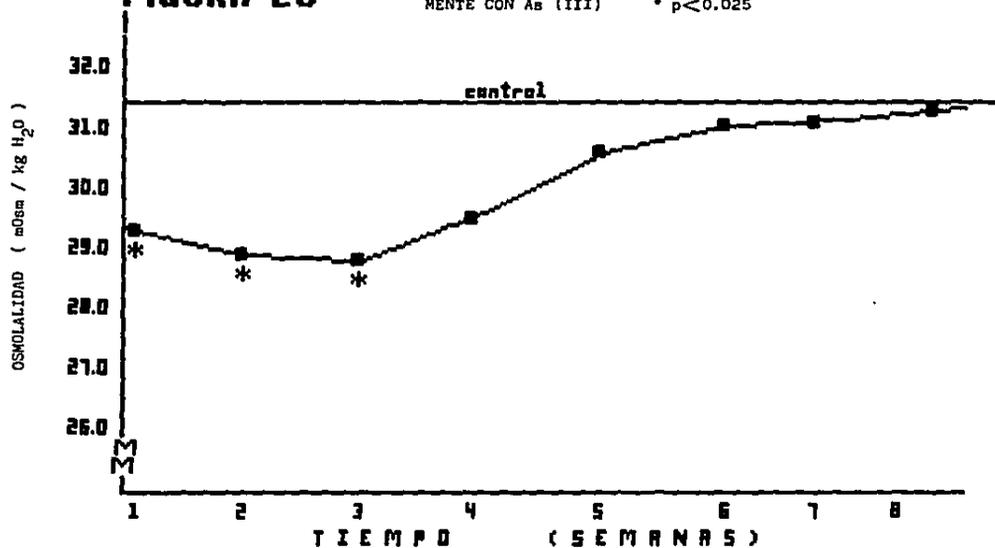


FIGURA 28

OSMOLALIDAD EN PLASMA DE RATAS INTOXICADAS CRONICA
MENTE CON A_B (III) * p<0.025



Niveles de sodio y de potasio en plasma.

La primera semana de intoxicación se observó un aumento significativo ($p < 0.025$) en los niveles de sodio plasmático, disminuyendo después en las siguientes semanas ($p < 0.001$) para finalizar con una tendencia a recuperar sus valores control (figura 29), mientras que el nivel del ión potasio aumentó hasta alcanzar el valor máximo durante la quinta semana de la intoxicación ($p < 0.05$), disminuyendo posteriormente hasta valores menores al control (figura 30).

FIGURA 29

CONCENTRACIONES DE SODIO EN PLASMA DE RATAS INTOXI
CADAS CRONICAMENTE CON As (III) * $p < 0.025$

** $p < 0.001$

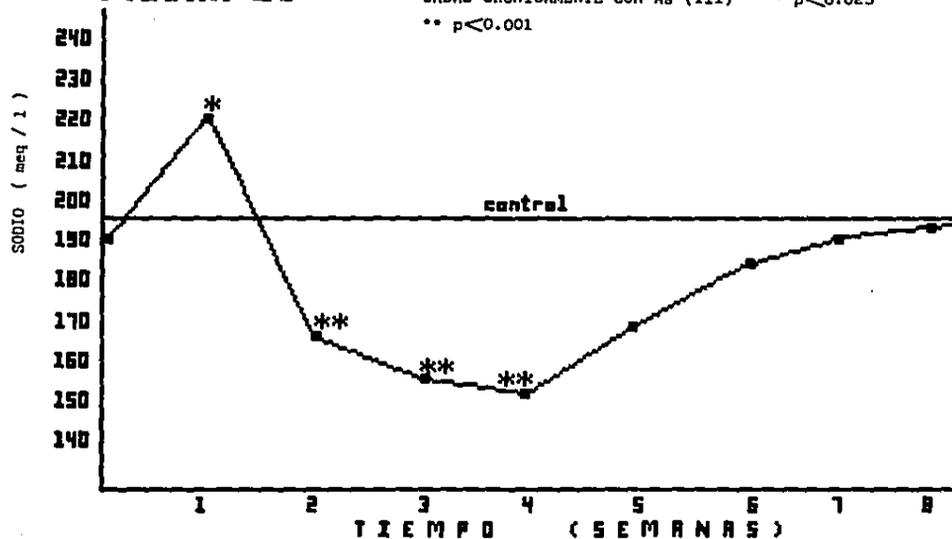
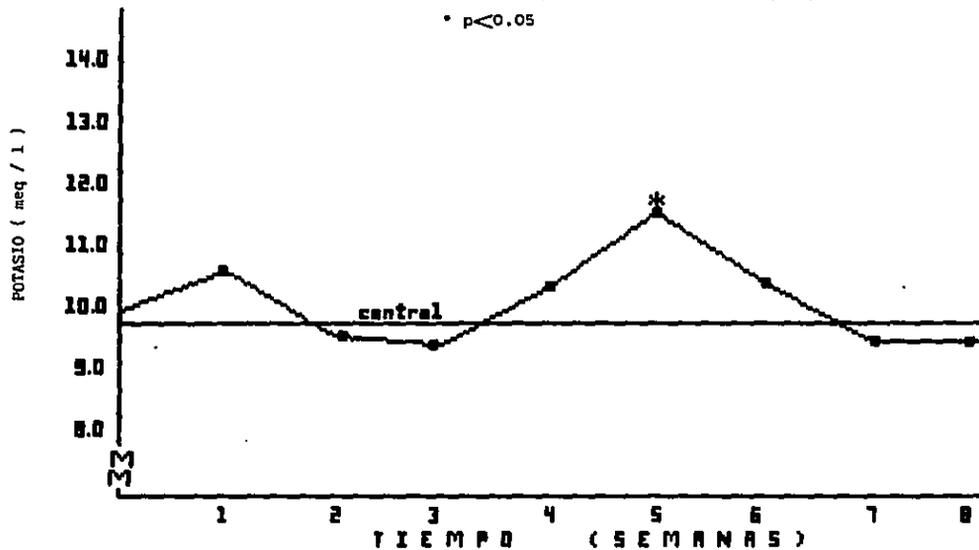


FIGURA 30

CONCENTRACION DE POTASIO EN EL PLASMA DE RATAS
INTOXICADAS CRONICAMENTE CON As (III)

* $p < 0.05$



V D I S C U S I O N

El uso de los metales, sales metálicas o sus compuestos orgánicos producen un incremento en el riesgo a presentar efectos tóxicos en poblaciones humanas; con el apogeo de la edad industrial, se ha presentado una alta frecuencia en las enfermedades especialmente en las de tipo ocupacional.

En México, es importante el estudio de los efectos producidos por el arsénico ya que ocupacionalmente existe exposición a este elemento en una parte importante del país por su alta producción y la difusión del uso de compuestos arsenicales en la industria electrónica⁸⁹, además del problema de exposición a arsénico a través del agua de bebida en la región conocida como Comarca Lagunera, ubicada en los estados de Durango y Coahuila.

Estimaciones recientes sobre la magnitud de este problema indican que en términos de población expuesta en el área rural de esta región existe un número importante de personas (400 000) expuestas a niveles superiores al límite máximo permisible de arsénico en agua de bebida (0.05 mg/l). Los efectos en la salud que se atribuyen al arsénico más comúnmente observados en dicha zona son queratosis palmo plantar, hipo e hiper Cromias y la enfermedad denominada "black foot disease".

Se observó que la mayoría de las personas afectadas por el arsénico en esta región pertenecen al grupo productivo y conforme aumenta la edad, incrementa la proporción de individuos afectados con signos

de hiperqueratosis palmo plantar y discromías.¹

Se sabe que el arsénico se acumula fácilmente en sangre y siendo ésta el medio de transporte y contacto del exterior con el interior del organismo, además de ser una muestra biológica fácil de obtener fue blanco de evaluaciones de los parámetros hematológicos que nos permitieran conocer los efectos producidos en el organismo debido a la exposición a arsénico.

Este trabajo se dividió en dos etapas: un estudio agudo administrando una dosis única de 32.5 mg/kg y un estudio crónico con una dosis de 1.2 mg As/kg diariamente durante 8 semanas. Estas dos partes del trabajo se hicieron con el fin de conocer las posibles diferencias y similitudes en los dos tipos de intoxicación, ya que se tienen antecedentes de diferentes efectos producidos por el arsénico dependiendo del tiempo y tipos de exposición, además de otros factores tales como la dieta, forma en que el tóxico entra al organismo y el estado de oxidación del elemento químico.

Existe poca información sobre los efectos que produce el arsénico en el tejido sanguíneo y las opiniones son variadas. Terada y col.⁸² indican que el arsénico produce anemia hipoplástica; mientras que Kyle y col.⁴⁸ reportan que se produce anemia de tipo hemolítica y megaloblástica. Al parecer en los pocos reportes encontrados al respecto los resultados coinciden en la presencia de anemia.

En este estudio al administrar 32.5 mg As/kg a ratas, no se presentó ninguna muerte en los 90 animales intoxicados observándose una cantidad anormal de líquido tanto en el estómago como en el intestino en los animales sacrificados durante las primeras horas posteriores a la intoxicación; al sacrificar a los animales al final del período de observación no se detectó esta alteración. También se observó un incremento inicial en el número de eritrocitos (figura 1), en el valor de hematocrito (figura 3) y en la cantidad de hemoglobina (figura 4) y posteriormente una disminución de estos valores. Por otra parte, se observó una disminución permanente en el volumen celular medio de los eritrocitos (figura 2).

Estas observaciones nos permiten relacionar los valores obtenidos al inicio del estudio con el estado de los animales, es decir, el estado anormal de intestino y estómago pudo deberse a la transvación de líquido a estos órganos por efecto del arsénico. El aumento tanto en el número de eritrocitos como en la cantidad de hemoglobina y el hematocrito pudo haberse producido por medio de dos mecanismos diferentes: una alteración en la médula ósea que provocara la producción de mayor cantidad de eritrocitos como consecuencia de un mayor requerimiento del organismo, o bien por hemoconcentración que a su vez puede ser producida ya sea por transvación de líquidos o por diuresis.

Estudios realizados anteriormente en el laboratorio ²⁶ indican la presencia de diuresis a partir del cuarto día de la administración aguda de arsénico con aumento en la excreción de sodio, por lo tanto la hemoconcentración observada en nuestros resultados podría ser producida tanto por la transvación de líquidos como por la diuresis, y consideramos poco probable que se deba a algún efecto provocado en la médula ósea ya que el tiempo que el arsénico estuvo en el organismo fué muy corto para provocarle una alteración. Isaacs,⁴⁴ (1928) indica que en la intoxicación aguda con arsénico no hay cambios en el número de reticulocitos dentro de las primeras 24 horas de intoxicación.

Al existir esta hemoconcentración se deben esperar valores muy altos de los parámetros hematológicos determinados, sin embargo si bien los datos observados son por arriba del control, no corresponden a la hemoconcentración producida, lo que sugiere la presencia de anemia.

Al analizar los valores calculados tanto del contenido de hemoglobina en el eritrocito individual (CCMH) (figura 6), como la concentración media de hemoglobina (CMH) (figura 5), se observó una disminución importante de estos valores que nos sugieren la presencia de anemia de tipo hemolítica.

Anteriormente el arsénico se utilizó en el tratamiento de leucemia porque produce una disminución en el número de leucocitos

(tabla I) a números aproximadamente normales ³⁶. Nuestros resultados muestran que el arsénico produce una disminución inicial en el número de leucocitos, probablemente debido a la acción directa sobre éstas células ya que son el principal medio de defensa del organismo y probablemente el aumento posterior se debe a la propia recuperación del organismo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Morse y col (1980) ⁶⁰ en estudios realizados en ratones. En este estudio solamente se realizó el recuento de leucocitos totales, no se hizo distinción entre los cinco tipos de células blancas normales (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), lo que probablemente nos hubiera dado mayor información.

La prueba de fragilidad osmótica se realizó con el propósito de obtener alguna evidencia del cambio en la forma del eritrocito normal, además es de utilidad para caracterizar la edad celular de la sangre. En general, las pruebas cuantitativas para eritrocitos, se utilizan para hacer algunos diagnósticos como el de anemia hemolítica producida por el uso de ciertos fármacos. En el laboratorio, se utilizó el método más común para evaluar lisis, en el que se obtiene una curva sigmoidea que es típica de una distribución continua de la población. A partir de esta curva se obtuvieron dos gráficas que son la de 50 % de hemólisis y la gráfica del grado relativo de hemólisis; cada una proporciona información sobre la población celular.

Levander y col (1977) sugieren el empleo del término "grado relativo de hemólisis" al valor de la pendiente obtenida en la parte media de las curvas de fragilidad osmótica, indicando un valor menor de la pendiente en aquellas donde la fragilidad osmótica está disminuida.

Las curvas típicas de fragilidad osmótica (figura 11) y de concentración de cloruro de sodio que produce el 50 % de hemólisis (figura 9) obtenidas con nuestros resultados indican una disminución de la fragilidad osmótica de los eritrocitos expuestos a arsénico en forma aguda. Sin embargo el valor de grado relativo de hemólisis (figura 10) siempre estuvo por arriba del valor control, siendo significativamente superior al inicio de la intoxicación, esto probablemente se debe a que el tipo de curvas de fragilidad osmótica obtenida en animales expuestos son un poco aplanadas lo que hace difícil la medición de la pendiente en la parte media de la curva.

Por otra parte, si tenemos presente la diuresis producida por el arsénico, es de suponer que exista pérdida de plasma, el eritrocito pierde su forma de disco bicóncavo con lo que se vuelve más rígido y al mismo tiempo más frágil. Así encontramos también una disminución de los niveles de sodio (figura 14), potasio (figura 15) volumen celular medio (figura 2), del eritrocito expuesto a arsénico, lo que ocasiona que entre más agua al eritrocito provocando su hemólisis.

El arsénico también produce alteración tanto en el manejo de agua como de los electrolitos y puede provocar cierta alteración en el funcionamiento del riñón³⁰. En este estudio se observó una disminución en el ion sodio que sugiere que también existe una pérdida de agua extracelular para poder mantener normales los niveles osmóticos, lo que podría explicar la hemoconcentración observada en exposiciones agudas a arsénico. Estos resultados están de acuerdo con la diuresis y el incremento en la excreción de sodio en orina reportado previamente³⁰. El sodio en el plasma también se encuentra disminuido cuando hay una producción mayor de aldosterona como en el caso de shock y se produce una disminución en el volumen del líquido extracelular³⁰. El potasio es el principal catión que se encuentra en el interior de la célula, por lo que al haber una mayor pérdida de líquido se produce también una disminución de este catión.

Bosman y Johnson¹⁴ (1975) al estudiar la distribución del volumen del eritrocito en sujetos sanos y enfermos, encontraron que en pacientes con anemia microcítica las gráficas de distribución se encuentran desplazadas hacia valores menores de VCM, al compararla con una distribución de eritrocitos controles.

En nuestro estudio encontramos en los eritrocitos expuestos a arsénico un desplazamiento similar al de los pacientes con anemia microcítica (figura 7).

Las curvas de fragilidad osmótica obtenidas en la exposición aguda a arsénico (figura 11), son similares a las que se obtienen cuando existe esferocitosis. El mismo tipo de curvas se obtienen en la exposición aguda a plomo⁵⁴ y los autores sugieren que el eritrocito cambia su forma haciéndose menos susceptible a la presión osmótica.

Al evaluar los niveles de glutatión reducido en las muestras de sangre (figura 12), encontramos valores menores a los controles durante todo el período de observación y esta disminución fue significativa 12 horas después de la administración del arsénico. Estas observaciones sugieren que ya que el arsénico III tiene afinidad por los grupos SH, probablemente esté interactuando directamente con el grupo SH de la molécula de glutatión reducido o bien interaccionando con los sistemas enzimáticos dependientes de grupos tioles encargados de regular la homeóstasis celular, lo que provocaría la disminución de los niveles de glutatión reducido. Al producirse la oxidación del glutatión reducido es posible que se formen cuerpos de Heinz que son estructuras rígidas de hemoglobina desnaturalizada, que altera la membrana celular y hace que disminuya la capacidad que tiene el eritrocito de deformarse por lo que el bazo busca remover rápidamente a estas células y esto puede ser una causa importante de hemólisis. La disminución que se produce en los niveles de glutatión reducido, hace que el eritrocito sea un buen blanco de agentes oxidantes provocando su destrucción, y explicaría la mayor fragilidad osmótica observada en este estudio.

En el estudio crónico encontramos que al administrar diariamente 1.2 mg As/kg a los animales, los valores del número de eritrocitos (figura 16), hematocrito (figura 18) y concentración media de hemoglobina (figura 19), permanecieron por debajo del valor control durante las primeras semanas, observándose una recuperación de los valores después de la quinta semana de intoxicación que es cuando se ha observado la presencia de diuresis en animales expuestos a arsénico en forma crónica ³⁰, aunque esta recuperación también puede deberse al desarrollo de cierta tolerancia del animal hacia el arsénico.

Los individuos que están afectados por agentes que causan hemólisis presentan mayores poblaciones de eritrocitos jóvenes y sus células se reportan con un tamaño celular medio incrementado.

Al analizar la gráfica de distribución de los eritrocitos (figura 22) se observa un desplazamiento hacia un mayor volumen de partícula con respecto al valor control, lo que indica que probablemente el arsénico actúa sobre la médula ósea activando la producción de eritrocitos, ya que el volumen celular medio de un eritrocito maduro es de 7 micras aproximadamente, mientras que los reticulocitos son mayores y más viscosos que los hematíes maduros. Sin embargo, existe una gran discrepancia sobre la eritropoyesis en presencia de arsénico: Isaacs (1928) y Morse y col (1980), indican una disminución en la producción de reticulocitos, mientras que Limarzi (1943) y Kyle (1965) indican un aumento. En el laboratorio se realizaron algunos estudios

para cuantificar el número de reticulocitos, que sugieren un aumento en su número. Estos resultados no se presentan en este trabajo porque no fueron suficientes los datos para realizar el estudio estadístico.

En este estudio se observó un incremento en el número de leucocitos mientras que el volumen celular medio permaneció con valores cercanos al control (Tabla II). El aumento en los leucocitos pudo ser originado como defensa del organismo contra el agente extraño y liberados tanto del bazo como de la médula ósea que son sus principales lugares de almacenamiento. La gráfica de distribución de leucocitos (figura 23) indica que existe un desplazamiento hacia un volumen de partícula más pequeño que el control. De acuerdo con England y col estos cambios pueden deberse a que el elemento químico probablemente ejerce un daño en la médula ósea.

Hay varios factores que pueden influir en la deformabilidad y por lo tanto en la fragilidad de los eritrocitos y son su contenido celular, las propiedades físicas de la membrana celular que están influenciadas por el estado metabólico del eritrocito y la forma de la célula. Los eritrocitos que han perdido su forma bicóncava y se vuelven de forma esférica (esferocitos) no pueden deformarse para pasar a través de los angostos vasos sanguíneos, lo que probablemente ayuda a su ruptura.

Al analizar las gráficas de 50 % de hemólisis (figura 24) y de fragilidad osmótica (figura 26), encontramos un aumento de la fragilidad osmótica, en este caso también el valor de grado relativo de hemólisis es mayor que el valor control (figura 25), pero no es significativa su diferencia. El tipo de curvas obtenidas sugieren la presencia de anomalías como la talasemia que se caracteriza por la producción alterada de una de las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina, produciendo anemia hemolítica, con gran cantidad de células en diátesis

Existen evidencias de cambios de forma en la superficie de la membrana de los eritrocitos provocados por metales pesados (Pb, Hg, Zn, Cu), que se ha relacionado con un bloqueo de grupos sulfhidrílicos en la estructura de la membrana. Sin embargo, cada metal interactúa de diferente manera con la membrana del eritrocito causando diferentes cambios en la fragilidad osmótica.

También encontramos una disminución en el nivel de sodio (figura 29) y potasio (figura 30) presente en el plasma con aumento de su valor en la quinta semana de intoxicación.

Al evaluar los niveles de glutatión reducido en las ratas intoxicadas con 1.2 mg As/kg (figura 27), encontramos disminuida su concentración a lo largo del período de observación siendo significativa ($p < 0.001$) en todos los casos. Estas observaciones sugieren

que al igual que en el estudio agudo, la gran afinidad del arsénico trivalente por grupos tioles produce una disminución de los niveles de glutatión reducido originando como consecuencia la hemólisis de los eritrocitos.

Es conveniente mencionar que aunque nuestros resultados sugieren la presencia de anemia hemolítica en animales expuestos a arsénico, no descartamos la presencia de anemia megaloblástica sugerida por varios autores^{48,90}. La presencia de este tipo de anemia se debe básicamente a deficiencia de vitamina B₁₂ o de ácido fólico y existen reportes⁸³ de que el arsénico inhibe la conversión enzimática de ácido fólico en sus derivados biológicamente activos.

VII CONCLUSIONES

- 1) El arsénico provoca cambios en la forma del eritrocito manifestandose en el estudio agudo con una disminución de su fragilidad osmótica y en el estudio crónico con un aumento de ésta.

- 2) La disminución que el arsénico produce en los niveles de glutatión reducido sugiere la interacción del arsénico con grupos sulfhidrilo. Como la presencia de glutatión reducido está directamente relacionada con la integridad de la membrana del glóbulo rojo, puede ser una causa importante de que exista hemólisis.

- 3) Existe anemia en los animales expuestos a arsénico y es mas evidente en la intoxicación aguda. En ambos estudios la presencia de anemia no es tan clara debido a la hemoconcentración provocada por el efecto diurético del arsénico.
- 4) En general se observa que el arsénico provoca daños similares en el eritrocito expuesto en forma aguda o crónica, siendo su diferencia en tiempo y magnitud del daño.

El cambio más importante para efecto de este estudio es la modificación que sufre la membrana del eritrocito, señalada tanto por las variaciones en los niveles de glutación reducido como en la fragilidad osmótica, en donde se ha visto una clara afección que puede producir la ruptura parcial o total de su membrana lo que da como resultado que esca-

pe fácilmente su contenido.

El arsénico produce anemia tanto en la in toxicación aguda como en la crónica; en base a los resultados se puede clasificar como anemia de tipo hemolítica. Debe consi derarse que la presencia de anemia es un síntoma y no un diagnóstico, la gravedad de esta depende de su causa fundamental más que de su intensidad, y aunque no se pueda corregir lo que la produce, sigue siendo esencial un diagnóstico exacto para que el tratamiento sea adecuado.

A P E N D I C E I

ABREVIATURA	NOMBRE
As	arsénico
Ton	tonelada
ppm	partes por millón
mg/kg	miligramo por kilogramo
g	gramo
mg/l	miligramo por litro
-SH	grupos sulfhidrilo
NaAsO ₂	arsenito de sodio
Na ₂ HAsO ₄	arseniato de sodio
Pi	fosforo inorgánico
HAsO ₄ ⁻²	arseniato
u	micras
Hb	hemoglobina
CO ₂	bioxido de carbono
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GPD	glucosa fosfato dihidro genasa
PK	piruvato cinasa
CMH	cantidad media de hemo globina

ABREVIATURA	NOMBRE
CCMH	concentración corpuscul lar media de hemoglobi na
VCM	volumen celular medio
Cr	chromo
ETM	error tipo media
mOsm/kg	miliosmols por kilogra mo
fl	femtolitros
Hct	hematocrito
rpm	revoluciones por minu to
nm	nanómetros
LD ₅₀	dosis letal presente en el 50 % de la población

BIBLIOGRAFIA

- 1) Albores A., Cebrián M., Tellez I. y Valdés B. Estudio comparativo de hidroarsenicismo crónico en dos comunidades rurales de la región lagunera de México. Bol of Sanit Panam 86 (3) : 196 203 (1979).
- 2) Allen W.D. and Jand H.J.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II Role of thiols in oxidant drug action. J. Clin. Invest. 40 : 454 459 (1961).
- 3) Anuario Estadístico de la Minería Mexicana. 1983 . Ed. Consejo de Recursos Minerales, México D.F. (1984).
- 4) Astolfi E., Maccagno H., Fernández J.C.G. Vaccaro R. and Stimola R. Review. : Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. Biol. Trace Elem. Res. 3 : 133.143 (1981).
- 5) Baver J.D., : Clinical laboratory methods. Ninth Ed. The C.V. Mosby Company. (1982).
- 6) Beutler E. Glucose 6 phosphate dehydrogenasa deficiency in : Stanbury J.B. Wyngaarden J.B. Fredickson D.S., Golsten J.L. and Brown M.S. (eds) : The metabolic basis of inherited diseases (ed 4th) New York, Mc Graw Hill, 1629 1953 (1983).
- 7) Beutler E. : Erythrocyte enzyme assays in : Hematology. Beutler E., Williams J. 3th Ed. Mc Graw Hill, New York. (1967).
- 8) Beutler E., Duron O. and Kelly B.M. : Improved methods for the determination of blood glutathione. J. Lab. and Clin. Med. 61 (5) 882 888 (1963).

- 9) Bencko J., Bones B. and Cikrt M. : Biotransformation of As (III) to As (V) and arsenic tolerance. Arch. Toxicol. 36 : 156 162 (1976).
- 10) Bertolero F., Marafante E., Rade J.E., Pietra R. and Sabbioni E. : Biotransformation and intracellular binding of arsenic in tissues of rabbits after intraperitoneal administration of As labelled arsenite. Toxicol. 20 : 35 44 (1981).
- 11) Binns F., Ensor R.J. and Macpherson A.L. : Metal content of United Kingdom and overseas lager beers. J. Sci. Food Agric. 29 : 71 74 (1978).
- 12) Borgoño J.M. and Greiber B. : Estudio epidemiológico del arsenicismo en la ciudad de Antofagasta. Rev. Med. de Chile 99 : 702 707 (1970).
- 13) Borgoño J.M., Vincent P., Venturino H. and Infante A. : Arsenic in drinking water of the city of Antofagasta : Epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant. Environ. Health Perspect. 19 : 103 105 (1977).
- 14) Bosman D. and Johnson R.K. : Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects. Blood 46 : 369 379 (1975).

- 15) Braman R.S. and Foreback C.C. : Methylated forms of arsenic in environment. Science. 182 : 1247 1254 (1973).
- 16) Brinckman F.E., Parris G.E., Blair W.R., Jewett K.L., Iverson W.P. and Bellama J.M. : Questions concerning environmental mobility of arsenic needs for a chemical data base and means for speciation of trace organoarsenicals. Environ. Health Perspect. 19 : 11 24 (1977).
- 17) Camimex. Revista de la Cámara Minera de México. Vol VI Num. 5 (1988).
- 18) Castellano Alvarado L., Viniegra G., Esalava García R. y Alvarez Acevedo J. : El arsenicismo en la Comarca Lagunera. Estudio epidemiológico de arsenicismo en las colonias Miguel Alemán y Eduardo Guerra de Torreón Coah., Salud Publica 6 (3) : 375 386 (1964).
- 19) Caleswick B., Wase A. and Overby C.R. : Availability during human consumption of the arsenic in tissues of chicks fed arsenilic acid. Toxicol. Appl. Pharmacol. 9 : 27 30 (1966).
- 20) Christie N.T. and Costa M. : In vitro assessment of the toxicity of metal compounds IV. Disposition of metals in cells: Interactions with membrane, glutathione, metallothionein and DNA Biol. Trace Element Res. 6 : 139 158 (1984).

- 21) Crecelius E.A. : Arsenite and arsenate levels in wine. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18 : 227 230 (1977).
- 22) Crecelius E.A. : Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. Environ. Health Perspect. 19 : 147 150 (1977).
- 23) Crossen P. E. : Arsenic and SCE in human lymphocytes. Mutation Res. 119 : 415 419 (1983).
- 24) Daniel Wayne W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. (1982).
- 25) Davidsohn I. y Nelson D.A. : Sangre : Diagnostico clínico por el laboratorio. Todd Sanford. Salvat Editores. S.A. (1978).
- 26) Del Razo L.M., Ramírez A. y Jauge P. : Metabolismo de compuestos de arsénico inorgánico III y V en ratas intoxicadas crónicamente. VIII Congreso Nacional de Farmacología., Monterrey N.L. México. (1984).
- 27) Dulkiewicz. T. : Experimental studies on arsenic absorption routes in rats. Environ. Health. Persp. 19 : 173 177 (1977).

- 28) England J.M. and Down M.C. : Red cell volume distribution curves and the measurement of anisocytosis. The Lancet : 701 703 (1974).
- 29) Environmental Health Criteria 18. Arsenic. World Health Organization. Geneva. (1981).
- 30) Espinoza Melendez R. : Equilibrio hídrico y de electrolitos en ratas intoxicadas con arsénico inorgánico. Tesis Licenciatura. Cuautitlán., México (1986).
- 31) Ferguson J.F. and Gavis J.A. : A review of the arsenic cycle in natural waters. Water Res. 6 : 1259 1274 (1972).
- 32) Feussner J.R., Shelburne J.D., Bredehoeft S. and Cohen H.J. : Arsenic induced bone marrow toxicity : Ultrastructural and electron probe analysis. Blood. 53 (5) : 820 827 (1979).
- 33) Fowler B.A., Ishinishi N., Tsuchiya K. and Vather M., : Arsenic handbook on the toxicology of metals. Ed. by L. Friberg. Elsevier/ North Holland. Biomedical Press. (1979).
- 34) Fowler B.A. : International Conference on Environmental Arsenic and overview. Environ. Health. Perspect. 19 : 239 242 (1977).

- 35) Fujii S., Dale G.E. and Beutler E. : Glutathione : Dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood*. 65 (5) : 1096-1101 (1984).
- 36) Goodman Louis M.A. y Gilman Alfred. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Unión tipográfica. Ed. Hispano Americana (1984).
- 37) Gossel T.A. and Bricker J.D. : Metals in : Principles of Clinical Toxicology. Raven Press. New York. 157-161 (1984).
- 38) Hahn R., Wendel A. and Flohé L. : The fate of extracellular glutathione in the rat. *Biochem. et Biophys. Acta*. 539 : 324-327 (1978).
- 39) Hammond P.B. and Beliles R.P. : Metals In : J'Doull, Klaasen C.D. and Amdur M. *Toxicology*. Macmillan Publishing C. New York. (1980).
- 40) Hanna K. and Mc Hugo P. : Studies on the capillary and cardiovascular actions of intravenous sodium arsenate and arsenite. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 2 : 674-682 (1960).

- 41) Harper H.A. : Sangre, linfa y liquido cefaloraquideo en : Manual de química fisiológica. Harpre. H. 7a Ed. Editorial El Manual Moderno (1980).
- 42) Hindsmarsh J.T., Mc. Letchie O.R., Meffernan P.M., Hayne O.A., Ellenberger H.A., Mc. Curdy R.R. and Thieboux A.J. : Electromyographic abnormalities in chronic environmental arsenicalism. J. Anal. Toxicol. 1 : 270 276 (1977).
- 43) Holland R.M. and Acevedo A.R. : Current status of arsenic in american cigarettes. Cancer 19 : 1248 1250 (1966).
- 44) Isaacs R. and Arbor A. : The effect of arsenic on the mutation of red blood cells. Folia Hematol. 37 : 389 404 (1928).
- 45) Jeline K.C.F., Cornelussen P.E. : Levels of arsenic in the United States food supply. Environ. Health Perspect. 19 : 83 87 (1977).
- 46) Knowles F.C. and Benson A.A. : The biochemistry of arsenic. Elsevier Publishers B.V. Amsterdam 178 180 (1983).

- 47) Kreiss K., Feldman R., Landrigan P., Boyd M., Cox D. : Neurologic evaluation of a population exposed to arsenic in Alaskan well water. Arch. Environ. Health. 38 (2) : 116 121 (1983).
- 48) Kyle E.A. and Poase G.L. : Hematologic aspects of arsenic intoxication. N. England. J. Med. 273 : 18 23 (1965).
- 49) Langston W.J. : Availability of arsenic to estuarine and marine organisms : a field and laboratory evaluation. Marine Biology. 80 : 143 154 (1984).
- 51) Lenwood W., Hall J. and Dennis T.B. : Effects of power plant coal pile and coal waste runoff and leachate on aquatic biota; an overview with research recommendations C.R.C. Critical reviews in Toxicology. Vol 10 ISSVEV 287 301 (1982).
- 50) Leavell B.S. and Thorup O.A. : Eritropoyesis y metabolismo de la hemoglobina en : Hematologia Clínica. Leavell & Thorup. 4a Ed. Nueva Editorial Interamericana (1978).
- 52) Leonard A. and Lauwerys R.R. : Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. Mutation Re. 75 : 49 67 (1980).
- 53) Leslie, A.C.D. and Smith H. : Napoleon Bonaparte's exposure to arsenic during 1816. Arch. Toxicol. 41 : 163 167 (1978).

- 54) Levander O.A., Ferretti R.J. and Morris V.G. : Osmotic and peroxidative fragilities of erythrocytes from vitamin E deficient lead poisoned rats. *J. Nutr.* 107 : 373 377 (1977).
- 55) Limarzi L.R. : The effect of arsenic (Fowler's solution) on erythropoiesis. *Am. J. of Med. Sci.* 206 : 339 347 (1943).
- 56) Lommo V., Faust D., Belton T. and Tucker R. : Assessment of the chemical and biological significance of arsenical compounds in a heavily contaminated watershed. Part I. The fate and speciation of arsenical compounds in aquatic environments. *J. Environ. Sci. Health* 18 (3) : 335 387 (1983).
- 57) Marafante E., Rade J. and Sabbioni E.: Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite in the rabbit. *Clin. Toxicol.* 18 : 1335 1342 (1981).
- 58) Meister A. : Glutathione in the liver: Biology and Pathology. Edited by Arias I., Popper H., Schanchter D and Shafritz D.A. Raven Press, New York. (1982).
- 59) Mohelska H., Benckow S. and Hyncka V. : Ultrastructural changes in hepatocytes of mice exposed to arsenic in drinking water. *Exp. Pathol.* 18 : 275 281 (1980).

- 60) Morse B. Conlan M., Giuliani. and Nussbaum M. : Mechanism of arsenic induced inhibition of erythropoiesis in mice. Am. J. of Hematol. : 8 : 273 280 (1980).
- 61) Nakamura, K. and Wayato, Y. : Comparative studies of chromosomal aberrations induced by trivalent and pentavalent arsenic. Mut. Res. 88 : 73 80 (1981).
- 62) Natelson S., and Natelson E. : Principles of applied clinical chemistry. Vol. 2 : The erythrocyte : chemical composition and metabolism. Plenum Press., New York. (1983).
- 63) Neis J.M., Van Gemert P.J.L., Roelofs H.M. and Henderson P.T. Disappearance of free SH groups in hemoglobin of man, rat and rabbit after exposure to alkylating agents in vitro. Toxicol. 319 327 (1984).
- 64) Nelson K.W. : Industrial contributions of arsenic to the environ Environ. Health. Perspect. 19 : 31 34 (1977).
- 65) Niesh. : Registry of toxic effects of chemical substances. National Institutes of chemical substances. Ed. Lewis. R., and Tatken R. (1978).
- 66) Nordenson, I. and Beckman L. : Occupational and environmental risks in and around a smelter in north Sweden VII. Reanalysis

and follow up of chromosomas aberrations in workers exposed to arsenic. Hereditas 96 : 175 181 (1982).

- 67) Nordenson I., Beckman G., Beckman L. and Norström S. : Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic Hereditas 88 : 41 50 (1978).
- 68) Pershagen Göran. : The carcinogenicity of arsenic. Environ. Health. Perspec. 40 : 93 100 (1981).
- 69) Pinto S.S., Varner M.O., Nelson K.W., Labbe A.L. and White L.D. Arsenic trioxide absorption and excretion in industry. J. Occupational Medicine 18 : 167 169 (1976).
- 70) Portman J.E. and Riley J.P. : Determination of arsenic in sea water, marine plants, silicate and carbonate sediments. Anal. Chem. Acta. 31 : 509 513 (1964).
- 71) Franckerd T.A.J. : The red cell. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications L.T.D., Oxford. (1961).
- 72) Riggs A.F. and Wolback R.A. : Sulfhydryl groups and the structure of the hemoglobin. J. Gen. Physiol. 39 (4) : 585 602 (1956).

- 73) Sahli B.P. : Arsenic concentrations in cattle liver, kidney and milk. *Vet. Hum. Toxicol.* 24 (3) : 173 175 (1982).
- 74) Salkie M.L. and Simpson E. : The erythrocyte glutathione reductasa activity (E.C. 1.6.4.2) of healthy blood donors. *J. Clin. Path.* 23 : 708 710 (1970).
- 75) Schalm O.W., Jain N.C. and Carroll E.J. : The erythrocytes: their production, function and destruction in : *Veterinary hematology* 3th Ed. Lea & Feuiger. Philadelphia. (1975).
- 76) Selby L.A. : Epidemiology and toxicology of araccnic poisoning in domestic animals. *Environ. Health. Perspect.* 19 : 183 189 (1977).
- 77) Sierra Santoyo A. : Estudio comparativo de la inhibición "in vitro" de la xantina oxidasa por compuestos de arsénico inorgánico. Tesis Licenciatura (1986).
- 78) Silversten Tore. : Copper induced GSH depletion and methahemoglobin formation in vitro in erythrocytes of some domestic animals and man. A comparative study. *Acta Pharmacol et Toxicol.* 46 : 121 126 (1980).

- 79) Sorensen E.M.B., Henry R.E. and Mitchell R.R. : Arsenic accumulation, tissue distribution and cytotoxicity in teleosts following indirect aqueous exposures. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21 162 166 (1979).
- 80) Spehar R.L., Fiandt J.T., Anderson R.L. and De Foe D.L. : Comparative toxicity of arsenic compounds and their accumulations in invertebrates and fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9 53 63 (1980).
- 81) Tam G.K., Charbonneau S.M., Lacroix G. and Bryce F. : In vitro methylation of As in urine, plasma and red blood cells of human and dog. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22 : 69 71 (1979).
- 82) Terada H., Sasagawa T., Saito H., Shirata H. and Sekiya T. : Chronic arsenical poisoning and hematopoietic organs. Acta. Med. et Biol. 9 (4) : 279 292 (1962).
- 83) Tongeren Van J.H.M. and Kunst A. : Folic acid deficiency in chronic arsenic poisoning. The Lancet. 10 : 784 789 (1965).
- 84) Tseng W.P. : Effects and dose response relationships of skin cancer and black foot disease with arsenic. Environ. Health. Perspect. 19 : 109 119 (1977).

- 85) Vather M. and Norin H. : Metabolism of ⁷⁴As labelled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. Environ. Res. 21 : 446 457 (1980).
- 86) Vather M. and Envall J. : In vitro reduction of arsenate in mice and rabbits. Environ. Res. 32 : 14 24 (1983).
- 87) Vather M. and Gustafsson B. : Biotransformation of inorganic arsenic in germfree and conventional mice. Spurenelement Symposium, Arsen, Karl Marx. Univ. Leipzig U. Friedr. Schiller. Univ. Jena, 3/1980.
- 88) Wagermann R., Snow N.B., Rosenberg D.M. and Lutz A. : Arsenic in sediments, water and aquatic biota from lakes in the vicinity of Yellowknife, Northwest Territories, Canada. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 7 : 169 172 (1978).
- 89) Webb D.R., Sipes I.G. and Carter D.T. : "In vitro" solubility and "in vivo" toxicity of gallium arsenide. Toxicol. Applied Pharmacol. 76 : 96 104 (1984).
- 90) Westhoff D.P., Samahara R.J. and Barnes A.J. : Arsenic intoxication as a cause of megaloblastic anemia. Blood. 45 (2) : 241 246 (1975).

- 91) White J.G. : Morphology of platelets in hematology In : Williams, Beutler, Erster, Rundles. 2nd. Ed. Mc. Graw Hill. Book Company. (1977).
- 92) Wintrobe M.M. and Lee G.R. : Hematologic alterations In: Harrison' principles of internal medicine. Edited by Wintrobe, Adams, Bennett, Braunwald, Isselbacher and Petersdore. Sixth Ed. Mc. Graw Hill Book Company (1970).
- 93) Woolson, E.A. : Fate of arsenicals in different environmental substrates. Environ. Health. Perspect. 19 : 73 81 (1977).
- 94) Yamamura, Y. and Yamauchi, M. : Arsenic metabolites in hair, blood and urine in workers exposed to arsenic trioxide. Ind. Health. 18 : 203 210 (1980).
- 95) Yamauchi, H. and Yamamura, Y. : Dynamic change of inorganic arsenic and methylarsenic compounds in human urine after oral intake as arsenic trioxide. Ind. Health. 17 : 79 83 (1979).