

25
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



V N A M

"ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE
S-ADENOSIL-L-METIONINA EN RATAS INTOXICADAS
EN FORMA AGUDA CON ARSENICO INORGANICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N

FRANCISCO VICENTE GARCIA CARRANZA

ANGEL MEJIA ALVAREZ

ASESORES DE TESIS: Q.F.I. LUZ MARIA DEL RAZO JIMENEZ

Q.F.I. LETICIA ZUÑIGA RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

PAGINA

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS.

I. INTRODUCCION.

1. ARSENICO

1.1 CARACTERISTICAS Y USOS	1
1.2 DISTRIBUCION EN EL AMBIENTE	2
1.2.1. SUELO	3
1.2.2 AIRE	3
1.2.3 AGUA	4
1.2.4 ALIMENTOS	4
1.3 METABOLISMO	
1.3.1 ABSORCION	5
1.3.2 DISTRIBUCION Y ACUMULACION	6
1.3.3 BIOTRANSFORMACION	8
1.3.4 EXCRECION	10
1.4 EFECTOS TOXICOS	
1.4.1 INTOXICACION AGUDA	12
1.4.2 INTOXICACION CRONICA	14
1.5 MECANISMO DE TOXICIDAD	
1.5.1 ARSENICO TRIVALENTE	16
1.5.2 ARSENICO PENTAVALENTE	17
1.6 IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO	19
1.7. S-ADENOSIL-L-METTONINA	
1.7.1 GENERALIDADES	22

	PAGINA
1.7.2. IMPORTANCIA METABOLICA	23
1.7.3. FARMACOCINETICA	27
1.8. GLUTATION	
1.8.1. GENERALIDADES	28
1.8.2. IMPORTANCIA METABOLICA	29
OBJETIVOS	32
II. MATERIALES Y METODOS.	
2.1 MATERIALES Y EQUIPO	
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	33
2.1.2. MATERIAL QUÍMICO	33
2.1.3. EQUIPO	35
2.2 METODOS	
2.2.1. TRATAMIENTOS	37
2.2.2. DETERMINACION DE ESPECIES DE ARSENICO EN ORINA Y DE ARSENICO TOTAL EN HIGADO Y ORINA	39
2.2.3. DETERMINACION DE SULFATO INORGANICO EN ORINA	44
2.2.4. DETERMINACION DE GLUTATION HEPATICO	46
2.2.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA Y S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA	49
2.3.5. ANALISIS ESTADISTICO	52

III. RESULTADOS.

3.1. EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO Y DE ARSENICO TOTAL	53
3.2. DETERMINACION DE ARSENICO TOTAL EN HIGADO DE RATA	67
3.3. DETERMINACION DE SULFATO INORGANICO EN ORINA	70
3.4. DETERMINACION DE GLUTATION REDUCIDO EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA	73
3.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA Y S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA	75
IV. DISCUSION	79
V. CONCLUSIONES	85
VI. REFERENCIAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

- AsI.- Arsénico inorgánico.
- AsT.- Arsénico total (AsI+MMA+DMA).
- ATP.- Adenosil trifosfato.
- ATSDR.- Agency for Toxic Substance and Disease Registry
- CINVESTAV.- Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional.
- D.O. .- Densidad óptica
- DMA.- Acido dimetilarsínico.
- EPA.- Environmental Protection Agency
- GSH.- Glutación reducido.
- GSSG.- Glutación oxidado.
- IM.- Vía de administración intramuscular.
- LC₅₀.- Concentración letal 50.
- LD₅₀.- Dosis letal 50.
- MMA.- Acido monometilarsónico.
- NIST.- National Institute Standards of Technology.
- OMS.- Organización Mundial de la Salud.
- PDS.- 2,2'-ditiodipiridina.
- ppb.- Partes por billón.
- SAH.- S-adenosil-L-homocisteína.
- SAME.- S-adenosil-L-metionina.
- SC.- Vía de administración subcutanea

RESUMEN

La biometilación del arsénico inorgánico (AsI) es considerado un mecanismo de desintoxicación en el hombre y algunos mamíferos, debido a la formación de los metabolitos: ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsínico (DMA), que son menos tóxicos y son excretados en orina más rápidamente que el AsI.

Se ha demostrado "in vitro" que el proceso de metilación requiere S-adenosil-L-metionina (SAME) como el compuesto donador de grupos metilo, necesitándose además la presencia de glutatión reducido (GSH). El objetivo del presente trabajo fué evaluar si la administración de SAME, a ratas intoxicadas con AsI favorece la formación de especies metiladas de arsénico.

Se utilizaron ratas Wistar macho distribuidas en 4 grupos: 2 grupos expuestos: ARSENICO-SAME y ARSENICO, donde se administró SAME a dosis de 10 mg/kg vía I.M. dos veces al día durante diez días, y As³⁺ a dosis única de 11.7 mg/kg peso, 2 grupos control: CONTROL-SAME y CONTROL. Al término del tratamiento, se recolectó orina de 24, 48 y 72 horas, en donde se determinó la concentración de las especies de arsénico, arsénico total (AsT) y sulfato inorgánico. Las ratas se sacrificaron por desnucación, se extrajo el hígado y se determinó el nivel de glutatión hepático, arsénico total y la concentración de SAME y SAH.

La administración de As redujo pronunciadamente (80 %) la concentración de glutatión hepático durante todo el período del estudio y la excreción urinaria de sulfato inorgánico en el intervalo de 48-72 horas posteriores a la intoxicación.

No se modificaron los niveles de SAME y SAH hepático en los 4 grupos experimentales.

La administración de SAME produjo los siguientes cambios en la intoxicación arsenical, que solo se observaron en el intervalo de 48-72 horas.

- 1) Incremento significativo en la excreción urinaria de DMA y AST ($p= 0.001$ y 0.04 , respectivamente).
- 2) Aumento significativo ($p= 0.006$) en la concentración de glutatión hepático.
- 3) Disminución de la excreción de sulfato inorgánico ($p= 0.03$).
- 4) Incremento en el nivel de AST en hígado ($p= 0.004$).

La administración de SAME puede favorecer la metilación del arsénico inorgánico al incrementar la síntesis de GSH hepático a través de la vía de transulfuración, más que por su participación directa como donador de grupos metilo.

En este estudio, no se observó una clara utilización de SAME en la biometilación del arsénico, debido probablemente a la disminución de los niveles de glutatión hepático, por lo que se sugiere la administración de SAME junto con GSH, que podría favorecer la metilación de compuestos arsenicales.

I N T R O D U C C I O N

1. ARSENICO

1.1 CARACTERISTICAS Y USOS

El arsénico es un metaloide que posee características tanto metálicas, como no metálicas. Se encuentra en el grupo V-A de la tabla periódica, su peso atómico es de 74.92 y posee valencias -3, +3, +5.

Los compuestos de arsénico han sido utilizados en medicina desde hace aproximadamente 2000-3000 años, teniendo aplicaciones terapéuticas hasta nuestros días, aunque han sido desechados en muchos países. A ganado también la reputación de ser un veneno poderoso y durante los siglos XV a XVIII fué el principal ingrediente en muchas mezclas homicidas de los venenos más famosos.

En la decada de los años setentas la distribución de su uso fué de la siguiente manera:

- a) Manufactura de agroquímicos: 82 %
- b) Manufactura de cerámica, vidriería y cristalería: 8 %
- c) Aleaciones con cobre y plomo, y productos farmacéuticos: 10 %

Se han utilizado como insecticidas las sales de arsenito de plomo, acetoarsenito de cobre, arsenito de sodio, arseniato de calcio y compuestos orgánicos. Como herbicidas y defoliantes los compuestos orgánicos a base de ácido metilarsónico y ácido dimetilarsínico. El arseniato de cobre, de sodio y de zinc son usados como conservadores de la madera, proporcionándole resistencia al ataque de insectos y hongos (Squibb S. y Fowler B., 1983).

Algunos compuestos fenilarsenicales, tales como el ácido arsánico son usados como aditivos de alimentos balanceados para animales, así como también para combatir ciertas enfermedades de las aves (Squibb S. y Fowler B., 1983).

Los cristales de arseniuro de galio son empleados en la industria electrónica y de computadoras, para la fabricación de fibras ópticas (Kogelnik H., 1985), microcircuitos y diodos emisores de luz (Robinson A., 1985).

Los compuestos de arsénico han sido utilizados en la medicina para el tratamiento de sífilis, disenteria amebiana y tripanosomiasis. El uso de compuestos organoarsenicales para el tratamiento de enfermedades venereas se ha substituido por el uso de antibióticos, pero algunos compuestos arsenicales aún son usados para tratar algunas enfermedades parasitarias severas (Eisler, 1988).

1.2 DISTRIBUCION EN EL AMBIENTE

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en compuestos orgánicos e inorgánicos, forma parte de minerales, yacimientos de carbón, suelos, aguas, aire, plantas y animales, se encuentra también en fuentes geotérmicas y volcanes (Foa V. y Maroni M., 1987).

1.2.1. SUELO

La Agencia de Protección Ambiental en U.S.A. (EPA, 1982) señala que la mayor parte del arsénico que es liberado por las actividades humanas (cerca del 80 %) se deposita en el suelo. La presencia de arsénico en el suelo se debe a la aplicación de insecticidas, a la descarga de residuos sólidos de combustibles fosiles y al uso de procesos industriales.

1.2.2. AIRE

El arsénico presente en el aire proviene principalmente de industrias procesadoras de minerales. así como de los yacimientos de donde se extrae carbón mineral. En el aire existen cantidades de arsénico que fluctuan en un rango de concentraciones que va de nanogramos a decimas de $\mu\text{g}/\text{m}^3$, en áreas urbanas, y de 1 a 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en áreas cercanas a fundidoras (Vahter M. y col., 1986). El límite máximo permisible en U.S.A., para la exposición ocupacional al arsénico inorgánico es de 10 μg de As/m^3 (U.S. Occupational Safety and Health Administration, 1983), en la mayoría de estos casos la especie predominante es As (III) .

Walsh P. y col. (1979) señalan que cerca de 17 millones de libras de arsénico por año pueden ser liberadas hacia el aire por fenómenos naturales, incluyendo erupciones volcánicas e incendios forestales.

1.2.3. AGUA

El arsénico se encuentra distribuido en aguas subterráneas y superficiales, detectándose concentraciones en ríos y lagos de alrededor de 10 $\mu\text{g/L}$ (ppb). La concentración media en aguas superficiales se encuentra en el orden de 3 ppb, en agua de lluvia se han detectado 0.2-0.5 ppb, en agua de mar existen niveles de 2 ppb. En agua de bebida, la concentración máxima permitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 50 ppb (WHO, 1984); sin embargo, actualmente existe la propuesta de disminuir este límite hasta 10 ppb (WHO, 1992). La Agency for Toxic Substance and Disease Registry de U.S.A. (ATSDR, 1992) reporta que en varias regiones del mundo, incluyendo a México, se han encontrado niveles de arsénico en agua muy superiores a los recomendados para el consumo humano.

En el agua se presentan compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos (Braman R. y Foreback C., 1973), encontrándose en mayor proporción los compuestos inorgánicos y predominando los arseniatos, los organoarsenicales se han detectado en agua superficial y subterránea, en concentraciones muy bajas, del orden de 0.01-7.4 ppb (ATSDR, 1992).

1.2.4. ALIMENTOS

La concentración de arsénico en alimentos, en general es menor a 1 mg/kg de peso húmedo; sin embargo, en organismos marinos, dependiendo de las diferentes especies, puede estar en el rango

de 1-100 mg/kg (ATSDR, 1992), siendo los peces marinos comestibles, el salmón y la almeja los que presentan los niveles más altos (Arbouine M. y Wilson H., 1992; Mürer J. y col., 1992).

Las especies de arsénico encontradas en estos animales marinos son los compuestos orgánicos arsenobetaina y arsenocolina, los cuales son considerados no tóxicos (Vahter M., 1983; Yamahuchi H. y col., 1986).

El vino y agua mineral pueden contener arsénico en varios cientos de $\mu\text{g/L}$, probablemente como resultado del uso de insecticidas que contienen arsénico (ATSDR, 1992).

1.3. METABOLISMO DEL ARSENICO

1.3.1. ABSORCION

La absorción de arsénico se presenta por la ingestión directa de agua, bebidas, alimentos o medicamentos que lo contengan, por la inhalación de aire que contenga partículas de arsénico tales como arsenato de calcio, arsenato de plomo o arseniuro de galio y a través de la piel.

La absorción por tracto gastrointestinal depende de diversas propiedades físicas y químicas de los compuestos arsenicales, tales como su solubilidad en agua, tamaño de partícula, solubilidad en el medio biológico, estado de oxidación, etc; (Foa V. y Maroni M., 1987). En seres humanos y algunos animales de experimentación, se estima que la absorción de arseniatos y arsenitos por tracto

gastrointestinal es de al menos 95 % (Bettley F. y O'Shea J., 1975; Vather M. y Norin H., 1980).

La absorción por vía respiratoria involucra dos procesos: el depósito de las partículas en la superficie del pulmón y la absorción de arsénico del material depositado. Las partículas de cerca de $0.05 \mu\text{m}$ son depositados en la mucosa y tracto respiratorio, pudiendo ser transportadas por secreciones mucociliares, se ha estimado que en seres humanos se absorbe del 30-34 % del arsénico inhalado (ATSDR, 1992).

No se han descrito estudios cuantitativos de la absorción de compuestos arsenicales inorgánicos en humanos, después de la exposición a través de la piel; en ratas, el nivel de absorción dérmica ha sido estimado en $1-33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$ (Dutkiewicz T., 1977); en este estudio se sugiere que la exposición dérmica lleva inicialmente a la unión del arsénico a la piel y puede ser lentamente incorporado hacia la sangre, aún después de finalizar la exposición.

1.3.2. DISTRIBUCION Y ACUMULACION

La distribución en tejidos, retención y toxicidad de los compuestos de arsénico depende de la biotransformación que sufren en vivo.

Una vez absorbidos por pulmón o tracto gastrointestinal pasan a sangre y como consecuencia del eficiente intercambio de valencia pueden existir en forma trivalente o pentavalente, distribuyéndose

en la pared estomacal e intestinal, epidídimo, tiroides, esqueleto, piel, uñas, riñón, hígado y pulmón. Debido a que el arsénico (III) tiene afinidad a grupos sulfhidrilo de las proteínas intracelulares, los arsenitos se retienen en los tejidos durante más tiempo que los arseniatos, acumulándose en pelo y uñas (Deak S. y col., 1976; Marafante E. y Bertolero J., 1982). En algunos órganos como cerebro, piel y hueso los niveles de arsénico disminuyen lentamente. El arseniato muestra una tendencia a depositarse en el tejido esquelético, presumiblemente porque es un análogo del fosfato (Lindgren A. y col., 1982).

Se ha encontrado que en la fracción citosólica de las células se retiene la mayor cantidad de arsénico, seguido por las fracciones nuclear, lisosomal, microsomal y mitocondrial (Marafante E. y col., 1985).

El tiempo de la permanencia de arsénico inorgánico en el organismo humano es de 40-60 hr después de la exposición oral. En el hamster y el ratón, la eliminación de arsénico inorgánico es más rápida, removiéndose el 90 % en dos días. En humanos y animales, los organoarsenicales son removidos durante las primeras 24 horas (ATSDR, 1992).

La distribución de arsénico en la rata es diferente a la de otras especies animales, el arsénico se une en gran cantidad a la hemoglobina de los eritrocitos y muy poco a otros tejidos, aumentando la vida media de este elemento en comparación con otras especies (Odanaka Y. y col., 1980; Rowland I. y Davies M., 1982).

1.3.3. BIOTRANSFORMACION

Varios reportes muestran que los humanos y la mayoría de los animales metilan el arsénico inorgánico, considerándose este proceso un mecanismo de desintoxicación (Lakso J. y People S., 1975; Yamauchi H. y Yamaura Y., 1985).

Se ha estudiado la capacidad de biotransformación del arsénico en diferentes tejidos: cerebro, pulmón, intestino, riñón, hígado y eritrocitos, encontrándose que la fracción citosólica del hígado es el principal sitio donde se realiza la metilación. La capacidad de metilación en hígado es mayor que la del pulmón y esta a su vez que la del riñón (Georis B. y col., 1990).

Esta demostrada la oxidación "in vivo" del As (III) a As (V) y la reducción de As (V) a As (III). La única especie de arsénico que puede ser metilada es el As (III) (Vahter M. y Envall J., 1983).

El mecanismo de metilación de arsénico se lleva a cabo en dos pasos: en la primera metilación se forma ácido monometilarsónico (MMA) y en la segunda metilación se origina ácido dimetilarsínico (DMA) (fig 1). Después de 24 horas de la exposición a arsénico inorgánico, estos compuestos son excretados en la orina en la siguiente proporción:

10-20 % arsénico inorgánico (sin metilar)

10-15 % MMA

60-80 % DMA

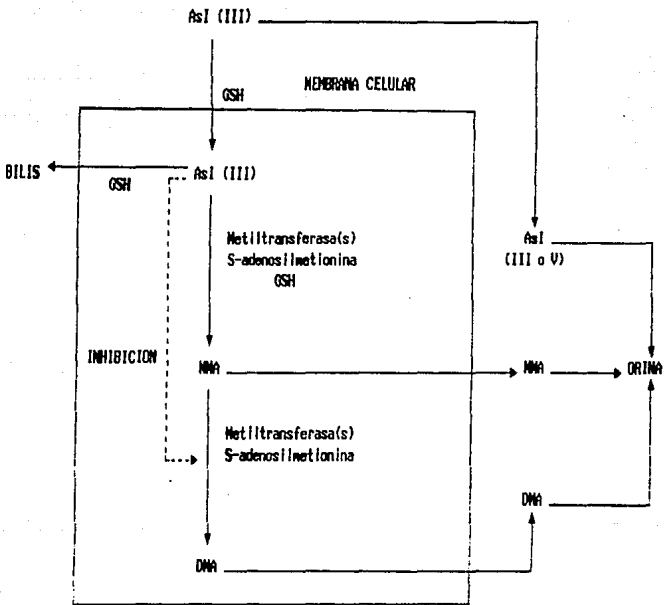


Figura 1. Biotransformación del arsénico inorgánico trivalente [AsI(III)]

(Offergelt J. y col, 1992).

Hasta el momento no existen evidencias de la existencia de una tercera metilación para formar compuestos trimetilados, así como tampoco de la existencia del proceso de demetilación de compuestos organoarsenicales (Buchet J. y col., 1981).

En estudios in vitro, se ha observado que para llevar a cabo la metilación del arsénico se requiere de la presencia de glutatión reducido (GSH), S-adenosil-L-metionina (SAME), vitamina B₁₂ (actuando como cofactor) y un pH óptimo de 7.5-8.0 (Buchet J. y Lauwerys R., 1985). Se cree que en este proceso están participando dos diferentes metiltransferasas (Buchet J. y Lauwerys R., 1988).

Al estudiar el proceso de metilación en rebanadas de tejido de ratas se han observado los siguientes resultados: 1) Se requiere SAME como donador de grupos metilo, 2) El GSH facilita la entrada de As (III) a los hepatocitos, 3) Se requiere de la presencia de GSH para que se realice la primera metilación pero no así para la realización de la segunda metilación; sin embargo, parece que la presencia de GSH estimula la excreción de DMA en las células del hígado (Georis B. y col., 1990).

1.3.4. EXCRECION

La excreción de los metabolitos de arsénico es principalmente por vía urinaria y en pequeñas cantidades en heces y bilis (Klaassen D., 1974; Odanaka Y. y col., 1980).

También se ha informado que en seres humanos la velocidad de excreción es mayor para los compuestos organoarsenicales que para

el arsénico inorgánico (Buchet J. y col., 1981; Vahter M. y col., 1984).

En seres humanos la excreción urinaria de arsénico es cerca de 30-60 % de la dosis inhalada (Holland R. y col., 1959; Vahter M. y col., 1986) y de 45-85 % de la dosis ingerida por vía oral. La excreción urinaria se realiza de 1-3 días después de la intoxicación en ambas vías de intoxicación (Creceilius E., 1977; Tam G. y col., 1979; Buchet J. y col., 1981). El MMA y DMA ingeridos son excretados principalmente en la orina (75-85 %) dentro del primer día de exposición (Buchet J. y col., 1981; Marafante E. y col., 1987).

El arsénico es excretado a través de la bilis en diferente proporción dependiendo de su estado de valencia, siendo el As (III) más rápidamente removido que el As (V). En ratas, la proporción de excreción por vía biliar después de 24 horas, es de 10 y 7 % de la dosis total, para As (III) y As (V) respectivamente (Cikrt M. y Bencko B., 1974). La excreción de arsénico por vía biliar depende de la especie animal, siendo 40 veces más rápida en conejos comparada con ratas y 800 veces más rápida en perros (Klassen C., 1974), no existen datos de excreción biliar en humanos.

En animales de experimentación no existe evidencia, de que el arsénico sea excretado en el aire expirado (ATSDR, 1992). También se ha considerado a el pelo y las uñas como rutas de excreción de arsénico, pero su contribución es menor a la de otras vías de excreción.

1.4. EFECTOS TOXICOS

El arsénico produce diferentes efectos tóxicos dependiendo del tipo de compuesto, del tiempo de exposición y de la concentración a la que se encuentre. El As (III) es más tóxico que el As (V), y en general los compuestos organoarsenicales presentan menor toxicidad que los inorgánicos.

A continuación se presentan los valores de la dosis letal 50 (LD₅₀) obtenido en rata intoxicada por vía oral de las diferentes especies de arsénico:

LD₅₀ con As (III), 10 mg/kg peso (Schoroeder H. y Balassa J., 1966).

LD₅₀ con As (V), 100 mg/kg peso (Schoroeder H. y Balassa J., 1966).

LD₅₀ con MMA, 400 mg/kg peso (Fairchild E. y col., 1977)

LD₅₀ con DMA, 1000 mg/kg peso (Fairchild E. y col., 1977).

1.4.1. INTOXICACION AGUDA

La intoxicación aguda puede ser el resultado de un uso inapropiado de compuestos químicos, ingestión inadvertida o materiales contaminados.

El nivel menor en el que se observan efectos adversos (LOAEL), es el nivel de exposición más bajo que causa un daño serio en la salud. El valor LOAEL reportado para la exposición aguda a arsénico inorgánico por vía oral en humanos es de 1 mg As/kg/día, cuando la exposición aguda es por vía inhalatoria los efectos tóxicos

aparecen a concentraciones por debajo de 0.1-1 mg de As/m³ (ATSDR, 1992).

Se ha estimado que la dosis 1-3 mg/kg de arsénico inorgánico puede producir la muerte (Vallee B. y col., 1960). No hay datos reportados de muertes en humanos después de la intoxicación oral a arsenicales orgánicos.

Un hecho a destacar es el de que las diferentes especies de los animales son menos sensibles que la humana, por ejemplo, la LD₅₀ para arseniato y arsenito en ratas y ratones se encuentra en el rango de 15 a 110 mg As/kg y para humanos la dosis de 1-3 mg/kg causa la muerte (ATSDR, 1992).

Los efectos observados después de una intoxicación aguda son disturbios gastrointestinales, como vómito, diarreas y lesiones, contracción muscular, edema facial, anormalidades cardíacas y shock como resultado de una deshidratación seguida de un colapso sistémico (Joliffe D. y Budd A., 1991); los efectos subagudos principalmente son problemas respiratorios, disturbios gastrointestinales y en el sistema hematopoyético con anemia y leucopenia. Estos efectos son dependientes de las dosis, ruta de absorción, tamaño de partícula y solubilidad del compuesto en el medio biológico.

1.4.2. INTOXICACION CRONICA

La intoxicación crónica se presenta principalmente por ingestión de agua, medicamentos y a través del aire.

Para exposiciones subcrónicas, el rango LOAEL en humanos para la vía oral es de 0.05 a 0.5 mg As/kg/día, mientras el rango LOAEL para exposiciones crónicas es de 0.01 a 0.1 mg de As/kg/día (ATSDR, 1992).

En humanos, la exposición crónica y subcrónica al arsénico ha sido asociada con cirrosis hepática, síndrome de hipertensión portal con cirrosis, cáncer del hígado. Estos efectos son observados después de una exposición crónica a dosis de 0.02-0.1 mg de As/kg/día (ATSDR, 1992).

La inhalación de partículas de arsénico, produce irritación de las membranas mucosas de la nariz y la garganta. También se han reportado efectos en el tracto respiratorio que incluyen perforación del septum nasal, laringitis, faringitis y cáncer pulmonar (Pershagen G. y col., 1984).

La presencia de anemia y leucopenia son efectos comunes observados en la intoxicación por arsénico en humanos, y ha sido reportada su presencia después de intoxicaciones orales agudas, intermedias y crónicas. Estos efectos pueden ser debidos a un efecto citotóxico o hemolítico en las células sanguíneas y a la supresión de la eritropoyesis (Lerman B. y col., 1980). Los efectos hematológicos han sido detectados en humanos expuestos crónicamente a niveles de 0.07 mg de As/kg/día o menos (ATSDR, 1992)

La exposición al arsénico inorgánico durante varios años a dosis de 0.01-0.1 mg As/kg/día, vía agua contaminada provoca lesiones en la piel tales como hiperqueratosis, verrugas y melanosís, desencadenando lesiones cancerosas o precancerosas. Shannon R. y Strayer D. (1989) reportan que la hiperqueratosis verrucosa simétrica de palmas y plantas es ocasionada por incremento en la mitosis celular. El grado de incidencia de cáncer en piel depende de la duración y magnitud de la exposición (Cebrián M. y col., 1983).

Existen diversos estudios epidemiológicos que reportan una asociación entre la exposición a arsénico inorgánico y aumento en el riesgo de efectos adversos al producto en la etapa de la gestación tales como malformaciones congénitas, disminución del peso y aborto espontáneo (Nordstrom S. y col., 1978a, 1978b, 1979a, 1979b; Aschengrau A. y col., 1989).

Como resultado de estudios en seres humanos se ha descrito que el arsénico inorgánico es capaz de producir alteraciones en cromosomas tales como aberraciones e intercambio de cromátidas hermanas. Nordenson I. y col. (1978 y 1979), han observado una incidencia elevada de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos, en la exposición al arsénico por vía respiratoria y por vía oral.

1.5. MECANISMO DE TOXICIDAD

1.5.1. ARSENICO TRIVALENTE

Los estudios acerca del mecanismo de toxicidad del As^{3+} han establecido que sus efectos citotóxicos son debidos a la inhibición de enzimas que contienen grupos sulfhídrico.

Muchas son las enzimas que son susceptibles a la desactivación del As^{3+} y en algunos de estos casos pueden ser restauradas por la adición de un exceso de compuestos monotioles tales como el glutatión, debido a que la unión del arsénico con la enzima es a través de un solo grupo sulfhídrico. Las enzimas que caen dentro de esta categoría incluyen las monoaminooxidasas, transaminasas y ácido d-amino oxidasas (Squibb S. y Fowler B., 1983).

Algunas enzimas no pueden ser protegidas por la adición de grupos monotioles, debido a la formación de un anillo de 6 miembros con As^{3+} y dos grupos sulfhídrico contiguos, formando una estructura muy estable en donde no se rompen fácilmente los enlaces monotioles, uno de los sistemas enzimáticos más importantes que se encuentran dentro de este grupo es el complejo piruvato deshidrogenasa (Gorby M., 1988) (fig 2).

El complejo piruvato deshidrogenasa, es necesario para la descarboxilación oxidativa de piruvato a Acetil CoA, este sistema enzimático comprende varias enzimas y cofactores. Bajo la presencia de arsénico trivalente se impide la oxidación de piruvato, necesario para la actividad enzimática (Gorby M., 1988), una vez inhibido este paso, trae como resultado la inhibición del

metabolismo de piruvato y del ciclo del ácido cítrico (Franz-Xaver R. y col., 1989), contribuyendo a su vez al bloqueo de la gluconeogénesis y provocando disminución del metabolismo de carbohidratos, y de la síntesis de NADH y ATP.

Otros de los principales blancos del As^{3+} son las enzimas tiolasa (encargada de la formación de acetil CoA vía lipólisis) y glutatión reductasa, que origina la disminución de GSH (Aposhian H. y Aposhian M., 1989). Esta disminución se encuentra asociada a la presencia de cáncer en los individuos.

Además, la presencia de As^{3+} se ha asociado con situaciones estresantes que producen aumento en la concentración de adrenalina y glucogenólisis, produciendo de esta manera hiperglicemia (fig 2) (Aposhian H. y Aposhian M., 1989).

Chien-Jen (1992), ha sugerido que la presencia de arsénico en humanos puede inducir la presencia de diabetes mellitus.

1.5.2 ARSENICO PENTAVALENTE

A pesar de que la mayor atención ha sido dirigida al mecanismo de toxicidad de los compuestos de arsénico trivalente, debido a su alta reactividad con grupos sulfhídrido libres y la conversión "in vivo" de arsenicales pentavalentes a la forma trivalente, las reacciones potenciales del arseniato dentro de los tejidos no deben ser descartadas.

El ion arseniato es isostérico e isoelectrónico con el fosfato y un considerable número de estudios "in vitro" han demostrado que

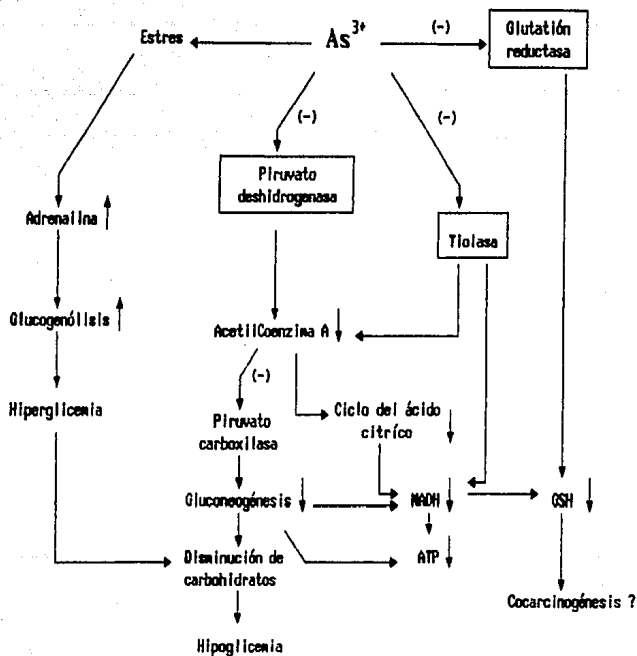


Figura 2. Inhibición enzimática producida por arsénico trivalente (Aposhian H. y Aposhian M., 1989).

el arseniato puede substituir al fosfato en las reacciones enzimáticamente catalizadas (Squibb S. y Fowler B., 1983).

El arseniato puede actuar como un desacoplador de la fosforilación oxidativa. El mecanismo por el cual se lleva acabo este proceso es a través de una substitución competitiva del arseniato por el fosfato con la formación subsecuente de un éster de arseniato inestable que es rápidamente hidrolizado. La hidrólisis instantanea de los esteres arsenicales ha sido denominada "arsenolisis" (Gorby M., 1988).

1.6. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL ARSENICO

Se conoce como hidroarsenicismo crónico a la ingestión crónica de arsénico a través del agua de bebida, siendo un problema de salud que ha sido referido en varias partes del mundo como en Argentina (Astolfi E., 1971), Chile (Borgoño J. y col., 1977; Zaldivar R. y Guillier A., 1977), Taiwan (Tseng W. y col., 1968), además de algunas regiones del norte de América como Alaska, Canada y EUA (Goldsmith J., 1972; Gratham S. y Jones J., 1977; Harrington J. y col., 1978).

En México se ha descrito la presencia de hidroarsenicismo en los estados de Puebla (Gonzales C. y col., 1972), Chihuahua (Vidal-Lozano A. y Abbud-Ochoa A., 1979), Hidalgo (periódico Excelsior, 1992) y algunos lugares de los estados de Coahuila y Durango (Albores A. y col., 1979; Cebrián M. y col., 1983). En un trabajo reciente Del Razo L. y col. (1990), reportaron en esta área

concentraciones de arsénico total en agua en el rango de 8-624 $\mu\text{g/L}$.

En este tipo de regiones los minerales son ricos en arsénico, por lo que durante el proceso de extracción de los metales, se producen altos niveles de este compuesto en la atmósfera y el agua.

Además México es un país con una larga tradición minera que ocupa un lugar primordial en la producción de varios metales, está ubicado dentro de los primeros cinco productores mundiales de arsénico, la producción anual de trióxido de arsénico es de 8500 toneladas.

En la ciudad de San Luis Potosí, existe un complejo de fundidoras formado por una fundidora de cobre y una refinería electrolítica de zinc, en donde se ha reportado la presencia de arsénico como un subproducto del proceso y en áreas urbanas cercanas a la fundidora se han presentado personas con problemas de arsenicismo crónico (Díaz-Barriga F. y col., 1993).

Por otra parte, en México se ha difundido el uso de los insecticidas arsenicales. Las intoxicaciones arsenicales con productos insecticidas son frecuentes y ocasionadas por la imprudencia en su manejo y el abuso de los insecticidas en plantas o frutos.

Los arsenicales más empleados en la lucha contra las plagas de insectos son:

Metarsenito de sodio	AsO_2Na
Arseniato sódico	AsO_4HNa_2
Arseniato tetracálcico	$As_2O_5Ca_4$
Arseniato de plomo	$(AsO_4)_2Pb_2H_2$
Arseniato tricálcico	$(As_2O_5)_2Ca_3$

(Aguilar B., 1961).

1.7. S-ADENOSIL-L-METIONINA

1.7.1. GENERALIDADES

La S-adenosil-L-metionina (SAME) es una molécula descubierta en 1950 por Cantoni G. (1952), en condiciones fisiológicas se encuentra presente en los mamíferos y esta distribuida en los tejidos corporales incluyendo el hígado (Eloranta T., 1977; Placidi S. y col., 1977). La SAME tiene un peso molecular de 399.4.

Se sintetiza en hígado a partir de metionina y ATP, por la S-adenosil-L-metionina sintetasa (también llamada SAME sintetasa o metionina-adenosil transferasa) (EC 2.5.1.6). (fig 3).

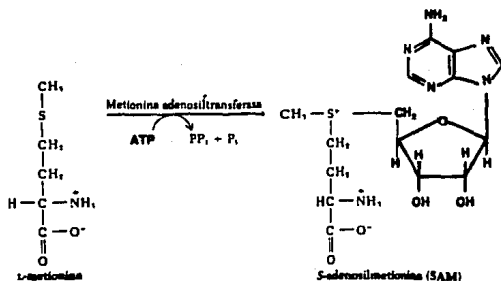


Figura 3. Síntesis de S-adenosil-L-metionina (Neuhaus O. y Orten M., 1984).

1.7.2. IMPORTANCIA METABOLICA

La importancia metabólica de la SAME estriba en que además de jugar un papel notable en la síntesis y catabolismo de catecolaminas (Friedof A. y col., 1972), es el intermediario activo en más de 40 reacciones de transmetilación. De estas reacciones destacan la metilación de compuestos de bajo peso molecular (Shapiro S. y Schlenk F., 1965) y de macromoléculas como la miosina, ácidos nucleicos, RNA y proteínas nucleares (Golds M. y col., 1963; Hoffman L., 1980). La SAME es una coenzima que juega un papel clave en las reacciones de metilación, provocando que los grupos metilos de metionina estén disponibles para las reacciones de transmetilación.

Las tres principales vías metabólicas en las cuales participa SAME son las siguientes (Giulidori P. y col., 1984) (figura 4):

1.- Transmetilación, para la síntesis de varias proteínas y lípidos, entre ellos fosfolípidos para membranas celulares.

Las reacciones de transmetilación son facilitadas por enzimas particulares, las metiltransferasas, que transfieren el grupo metilo de un compuesto donador a un compuesto aceptor.

2.- Transulfuración, para formar glutatión y compuestos sulfatados vía homocisteína y cisteína (fig 5), aumentando la capacidad desintoxicante del sistema metabólico (Kaye G. y Blake J., 1990). Es conocido que la presencia intracelular de glutatión reducido (GSH), tiene un papel muy importante en la desintoxicación de células (Baillie A. y Slatter G., 1991).

3.- Aminopropilación, para la síntesis de poliaminas. La SAME asume el papel de donador del grupo aminopropílico.

Las poliaminas son factores que intervienen en la síntesis de proteínas al estabilizar las estructuras de los ribosomas de algunos virus y de muchos organismos, además mantienen la estructura normal de la cromatina. La disminución de las poliaminas puede causar aberraciones en los cromosomas, alteración en la morfología nuclear y pérdida de microfilamentos y microtúbulos (Anthony E.P., 1986).

El producto de la transmetilación es S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que posteriormente forma homocisteína y adenosina, la homocisteína puede ser revertida a metionina por la transferencia de un grupo metilo proveniente del N-5-metil tetrahidrofolato. Esta reacción es catalizada por la homocisteína metil transferasa, una enzima que contiene vitamina B₁₂ (Neuhaus O. y Orten M., 1984).

SAH actúa como un inhibidor competitivo con respecto a su sustrato, se ha propuesto que SAH actúa como un compuesto biorregulador, y que la relación SAME/SAH es de crítica importancia en la regulación de la metilación biológica (Hoffman D. y col., 1979; Hoffman L., 1980).

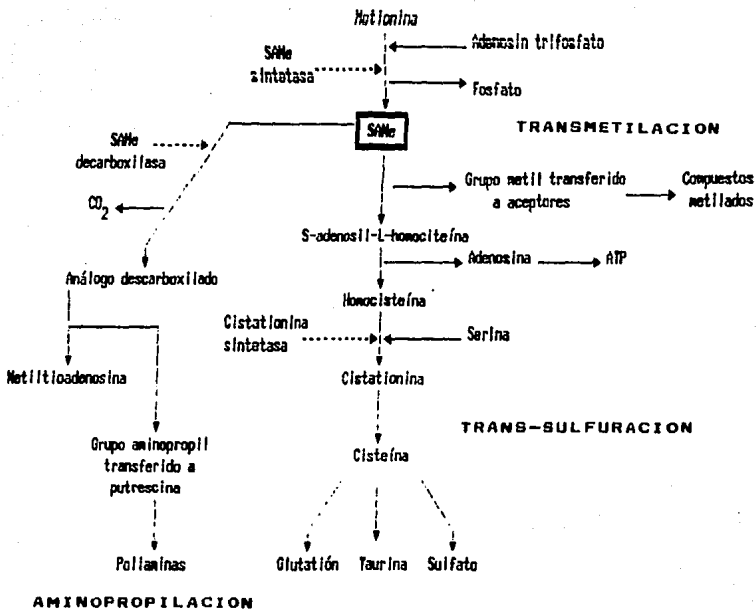


Figura 4. Principales vías metabólicas de la S-adenosil-L-metionina

(Glulidori P. y col., 1984).

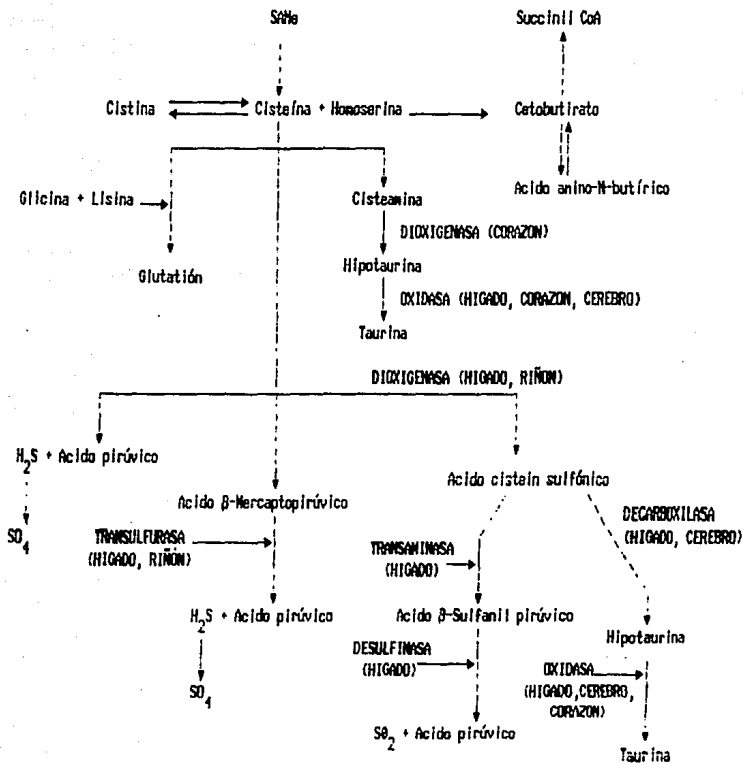


Figura 5. Vía de transulfuración (Glulidori P. y col., 1984)

1.7.3. FARMACOCINETICA

Cuando SAME es administrada por vía oral, el nivel plásmatico alcanza valores máximos 30 a 60 minutos después de la administración y decae gradualmente a los niveles basales en 8 horas. La biodisponibilidad por vía oral es baja, aproximadamente el 1 % de la dosis administrada (Stramentinoli G. y col., 1979a); cuando SAME es administrada por vía intramuscular o intravenosa, la biodisponibilidad es de 80 al 90 %. La absorción por vía intramuscular es completa después de 2 horas de la administración (Stramentinoli G. y Catto E., 1976)

La SAME exógena es distribuida hacia los diferentes tejidos incluyendo el hígado, riñón, intestino, bazo, adrenales, etc (Placidi G. y col., 1977).

La SAME en el hígado es rápidamente metabolizada y el grupo metilo es incorporado a pozas estables en el plasma, proteínas y fosfolípidos (Stramentinoli G., 1987).

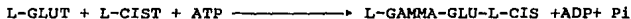
Se ha observado que S-adenosil-L-metionina tiene un uso potencial como agente terapéutico para una gran variedad de efectos tóxicos, tales como la presencia de colestasis asociadas a enfermedades hepáticas y embarazos (Almasio P. y col., 1990; Bonferraro T. y col., 1990), a toxicidad producida con paracetamol (Stramentinoli G. y col., 1979b), en la intoxicación ocasionada por plomo (Paredes S. y col., 1985), en cirrosis hepática producida por CCl₄ (Corrales F. y col., 1992), en el síndrome de Gilbert (Gentile S. y col., 1987) y en el daño hepático producido por el alcohol (Lieber C. y col., 1990).

1.8. GLUTATION

1.8.1. GENERALIDADES

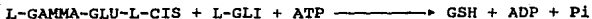
El glutatión es una biomolécula de tres aminoácidos, cuya síntesis se lleva a cabo en dos reacciones, requiriendo en cada reacción una molécula de ATP, la primer reacción involucra la participación de gama glutamil cisteína sintetasa y se lleva a cabo entre L-glutamato y L-cisteína (Meister A. y col., 1976).

Mg ²⁺



La segunda reacción es catalizada por la glutatión sintetasa, con la adición de glicina a gamma-glutamyl-cisteína, dando origen a la formación de glutatión reducido:

Mg ²⁺

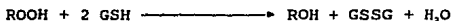


1.8.2. IMPORTANCIA METABOLICA

El GSH es un importante tiol que se encuentra dentro de las células, un 90% de GSH se encuentra en el citosol y el 10% se encuentra a nivel mitocondrial (Meister A. y Anderson M., 1983), A continuación se describen sus principales funciones:

1.- El GSH actúa como protector de grupos sulfhídrico en células, regulando el estado de oxidación de los tioles, esta es considerada una de las más importantes funciones fisiológicas de GSH (Kosower E. y Kosower N., 1978). Se ha descrito la disminución de proteínas con grupos sulfhídrico después de la disminución de GSH, tales proteínas tiólicas son esenciales para la actividad membranal, actividad enzimática y sistemas de transporte de calcio en mitocondrias y en microsomas (Bellomo G. y col., 1983; Comporti M. y col., 1991).

2.- Hidroperoxidación de lípidos. La enzima GSH peroxidasa inhibe la iniciación de lipoperoxidación catalizando la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido. La función crítica de GSH peroxidasa es inhibir los procesos de peroxidación de lípidos en la membranas biológicas (Christophersen B., 1968).



Se ha reportado que GSH a través de la enzima GSH-peroxidasa proporciona protección contra la lipoperoxidación inducida por agentes oxidantes tales como, aniones superóxido O_2^- . La actividad de GSH peroxidasa, y GSSG-reductasa es inducible después de una exposición subletal a ozono (O_3) y esto puede implicar cierto desarrollo de tolerancia a ozono, actuando como protector del tejido pulmonar contra agentes oxidativos (Chow C., 1976).

3.- Papel de GSH en el metabolismo de xenobióticos. El glutati6n es un protector de estructuras biol6gicas y funcionales, el papel m1s ampliamente conocido del GSH es la conjugaci6n con compuestos extraños o sus metabolitos, esta reacci6n no s6lo facilita la excreci6n de los xenobi6ticos, tambi6n sirve para interceptar compuestos electrofílicos altamente reactivos antes de que se unan covalentemente a tejidos nucleofílicos que pueden llevar a secuelas t6xicas y/o mutag6nicas (Meister A. y Anderson M., 1983).

Se ha indicado la disminuci6n de los niveles de GSH en diferentes situaciones como: condiciones estresantes oxidativas y químicas, en el caso de enfermedades como SIDA, marasmo, s6ndrome Parkinson (Ruffmann R. y Wendel A., 1991).

También se ha descrito que durante la intoxicación por arsenicales el nivel de glutatión hepático disminuye, aumentando la excreción biliar de GSH. Para explicar estos hallazgos, se ha sugerido que una pequeña parte del arsénico ingerido es excretado del hígado a través de un mecanismo dependiente de GSH, este mecanismo puede proteger al hígado de la toxicidad del metal, (Anundi I. y col., 1982; Díaz-Barriga F. y col., 1990; Gyurasics A. y col., 1991). Además el arsénico tiene la capacidad de inhibir a la enzima glutatión reductasa, inhibiendo la reducción de glutatión oxidado (Aposhian H. y Aposhian M., 1989).

El proceso de desintoxicación del arsénico se lleva a cabo por un mecanismo de metilación, donde el compuesto donador de grupos metilo es la SAME. Debido a ello, se esperaba que la administración de SAME a ratas intoxicadas con arsénico inorgánico favoreciera la formación de especies metiladas de arsénico.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si la administración de S-adenosil-L-metionina (SAME) disminuye la toxicidad de arsénico, favoreciendo la metilación de las especies de arsénico, en ratas intoxicadas en forma aguda.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1) Determinar el patrón de excreción urinaria de las especies de arsénico y la cantidad de arsénico total, en ratas tratadas y no tratadas con S-adenosil-L-metionina, después de la intoxicación aguda con arsénico.

2) Evaluar la relación S-adenosil-L-metionina/S-adenosil-L-homocisteina en hígado como indicador de metilación.

3) Determinar el contenido de glutatión reducido, así como la presencia de arsénico total en hígado, como indicador de daño y carga corporal respectivamente.

4) Estudiar el valor de la excreción urinaria del sulfato inorgánico, como posible indicador de la alteración en la vía de transulfuración de SAME.

MATERIALES Y METODOS

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES Y EQUIPO

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Como animal de experimentación se utilizaron ratas Wistar macho de aproximadamente 2 meses de edad (200-250 g), proporcionadas por el bioterio del CINVESTAV, las cuales tuvieron libre acceso al alimento (PurinaLab Rodent-Diet) y agua de bebida.

2.1.2. MATERIAL QUÍMICO

Determinación de especies de arsénico en orina y arsénico total en hígado y orina.

- a) Solución patrón de 1000 mg/L de arsénito de sodio (Sigma).
- b) Solución patrón de 1000 mg/L de ácido cacodílico ó DMA (Sigma)
- c) Solución patrón de 1000 mg/L de ácido metilarsónico (Vineland).
- d) Acido sulfúrico concentrado (J.T. Baker).
- e) Acido perclórico concentrado (J.T. Baker).
- f) Acido nítrico concentrado (J.T. Baker).
- g) Acido clorhídrico al 5 % (J.T. Baker) en agua desionizada.
- h) Acido clorhídrico 0.5 N en agua desionizada.
- i) Acido clorhídrico 1.0 N en agua desionizada.
- j) Hidróxido de amonio al 5 %. (J.T. Baker) en agua desionizada.
- k) Hidróxido de amonio al 20 %. (J.T. Baker) en agua desionizada.
- l) Yoduro de potasio al 20 % (Sigma) en agua desionizada.
- n) Tabletas de borohidruro de sódio (Alfa División, Ventron Co.)

Determinación de sulfato inorgánico en orina.

- a) Solución de Na_2SO_4 , 20 mM (J.T. Baker) en agua desionizada.
- b) Solución de Na_2SO_4 , 50 mM (J.T. Baker) en agua desionizada.
- c) Solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 0.97 % (J.T. Baker) y polietilenglicol 6000 al 15 % (J.T. Baker) en agua desionizada (reactivo Ba-PEG).
- d) HCl 0.5 N en agua desionizada.

Determinación de glutatión hepático.

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (J.T. Baker), conservada a 4°C.
- b) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, NaCl al 0.9 % y sacarosa al 4.28 % en agua desionizada y conservada a 4° C (solución para perfundir).
- c) Solución de 2,2'-ditiopiridina (PDS) al 0.23 % (Sigma), disuelta en HCl al 10 % y aforada con solución amortiguadora de fosfatos.
- d) Solución de NaCl 0.15 M (J.T. Baker) en agua desionizada.
- e) Solución de ácido sulfosalicílico al 10 % (Sigma) en agua desionizada.
- f) Solución de glutatión al 0.04 % (Sigma) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2.

Determinación de la concentración de S-adenosil-L-metionina y S-adenosil-L-homocisteína en hígado de rata.

- a) Acido perclórico 0.4 M en agua desionizada.

- b) Solución de EDTA al 0.1 % (J.T. Baker) y de metabisulfito de sodio al 0.1 % (J.T. Baker) en ácido perclórico 0.4 M.
- c) Fase móvil. Solución de ácido hepanosulfónico 6 mM (Sigma) y de fosfato de amonio dibásico 40 mM (J.T. Baker) en metanol al 6 % (grado HPLC, Mallinckrodt) y pH de 4.2.
- d) Metanol al 20 % en agua desionizada.
- e) Preparación de estándares.
 - i. Solución stock de SAME 443 ng/ml en agua desionizada.
 - ii. Solución stock de SAH 384 ng/ml en agua desionizada.
 - iii. SAME 6.60 ng/ μ l, a partir de la sol. stock de SAME y aforada con HClO, 0.4 N.
 - iv. SAH 1.90 ng/ μ l, a partir de la sol. stock de SAH y aforada con HClO, 0.4 N.
 - v. Solución de SAME 6.60 ng/ml y SAH 1.90 ng/ml, a partir de las sol. stock de SAME y SAH, aforada con HClO, 0.4 N.

2.1.3. EQUIPO

- Baño de temperatura controlada W.H. Curtin & Co.
- Potenciometro. Marca Beckman, modelo Selection 2000
- Centrifuga. Marca Beckman, modelo J2-21.
- Espectrofotómetro. Marca Spectronic, modelo 20D.
- Jaulas metabólicas. marca Nalgene
- Espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian modelo AA-475, equipado con generador de hidruros. marca Varian, modelo 65. Lámpara de cátodo hueco de arsénico y lámpara de deuterio marca Varian, registrador Varian modelo 9176.

- Espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer modelo AA-3100, equipado con automuestreador Perkin Elmer modelo AS90, y equipo de inyección automatizada de flujo Perkin Elmer modelo FIAS 200. Lámpara de descarga sin electrodo de arsénico marca Perkin Elmer. Computadora Acer 286 equipada con utilería que proporciona área bajo la curva y concentración de la muestra. Impresora Star NX1001.
- Cromatografo de líquidos de alta resolución Varian modelo 8500 equipado con un inyector Rheodyne 7125 con una espiral de carga de 20 μ l, precolumna empacada de octadecil (C₁₈) Bio-Rad, columna modelo Phase SepSpheris (sílica esférica 5 μ m químicamente enlazada con grupos octadecilo), se empleo un detector de luz ultravioleta marca Bio-Rad modelo 1740, con filtro de 254 nm y un registrador marca Varian modelo 9176.

2.2. METODOS

2.2.1. TRATAMIENTO

Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos que se denominaron: CONTROL, CONTROL-SAME, ARSENICO y ARSENICO-SAME, que recibieron el siguiente tratamiento:

1.- GRUPO CONTROL. Se les administró agua inyectable por vía intramuscular (IM) durante 10 días, 2 veces al día (n= 9). Se subdividieron en grupos de 3 animales para recolectar su orina.

2.- GRUPO CONTROL-SAME. Se les administró 10 mg de SAME/ kg peso, durante 10 días por vía IM, 2 veces al día (n= 9). Se subdividieron en grupos de 3 animales para recolectar su orina.

La SAME fue donada por Laboratorios Promeco S.A de C.V.

3.- GRUPO ARSENICO. Se les administró agua inyectable vía IM durante 10 días, 2 veces al día. El día 7 se les administró 11.7 mg de Arsénito de sodio (NaAsO_2)/ kg peso / vía subcutanea (SC) y se continuo la administración de agua inyectable (n= 18). Se subdividieron en grupos de 6 animales para recolectar su orina.

4.- GRUPO ARSENICO-SAM. Se les administró 10 mg de SAME/ kg peso / 10 días / vía IM, 2 veces al día. El día 7 se les administró 11.7 mg de NaAsO_2 / kg peso / SC y se continuo la administración de SAME (n = 18). Se subdividieron en grupos de 6 animales para recolectar su orina.

En el día 7 de tratamiento, las ratas se introdujeron en jaulas metabólicas, se recolectó su orina cada 24 horas y se sacrificaron los animales por desnucación a las 24, 48 y 72 h posteriores a la introducción en las jaulas (3 y 6 animales en cada ocasión para los grupos control y expuestos a arsénico respectivamente), para realizar las siguientes determinaciones:

- 1.- Determinación de especies de arsénico: arsénico inorgánico (AsI), ácido monometil arsónico (MMA) y ácido dimetil arsínico (DMA) en orina y arsénico total en orina e hígado.
- 2.- Determinación de sulfato inorgánico en orina.
- 3.- Determinación de glutatión reducido en homogenado de hígado.
- 4.- Determinación de la cantidad de SAME y SAH en hígado.

2.2.2. DETERMINACION DE ESPECIES DE ARSENICO EN ORINA Y ARSENICO TOTAL EN HIGADO Y ORINA [Tam G. y col., (1978); Cox D.,(1980)].

La separación de las especies de arsénico se realizó por cromatografía de intercambio iónico. La determinación de arsénico se basa en su capacidad para generar hidruros (arsina) al reaccionar con borohidruro de sodio en medio ácido.

PROCEDIMIENTO

i) Separación de especies de arsénico en orina.

Se colocó, por duplicado, una alícuota de orina (0.5 ml para animales expuestos a arsénico y 2 ml para animales control), en la parte superior de la columna empacada con resina de intercambio catiónico. Las especies de arsénico fueron eluidas y colectadas de la siguiente manera:

Al agregar: 10 ml de HCl 0.5 N, se colecto Así.

15 ml de H₂O, se colecto MMA.

20 ml de NH₄OH al 5 % , se desecho.

25 ml de NH₄OH al 20% , se colecto DMA.

Todas las fracciones fueron concentradas a 1 ml, por evaporación a 100° C. Las fracciones de MMA y Así, se llevaron a un volumen final de 5 ml con agua desionizada.

La fracción DMA y la muestra de orina para determinar AsT se digirieron de acuerdo al método establecido por Cox D. (1980).

Para determinar la precisión y exactitud del sistema de separación se preparó una mezcla de AsI, MMA y DMA que contenía 200 ng de cada una de las especies, esta mezcla se eluyó por duplicado al mismo tiempo que las muestras problema.

ii) Digestión ácida de Cox para la fracción DMA de orina y AsT en orina e hígado.

La técnica se fundamenta en la ruptura de los enlaces carbono-arsénico presentes en la muestra, bajo condiciones ácidas y altas temperaturas, para obtener finalmente arsénico inorgánico.

PROCEDIMIENTO

A la fracción evaporada DMA y a la muestra de orina para determinar arsénico total, se adicionaron 5 ml de HNO₃ conc. y 1 ml de ácido perclorico conc., se taparon con vidrio de reloj y calentaron a 100° C/1 hr. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se adicionó 2.5 ml de HNO₃ concentrado, colocando nuevamente en la placa de calentamiento y aumentando gradualmente la temperatura hasta alcanzar 200°C, permaneciendo a esta temperatura durante 40 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se adicionó 2 ml de H₂SO₄ concentrado, calentando a 250°C hasta la desaparición de la coloración amarilla. Se aforó a 10 ml con HCl al 10 %.

Para determinar la precisión y exactitud de la determinación de AsT en orina se digirió por duplicado una muestra obtenida del National Institute Standards of Technology (NIST). Esta muestra se digirió al mismo tiempo que las muestras problema.

Para la determinación de arsénico total en hígado, se usó 1 gramo del lóbulo derecho del hígado perfundido de animales expuestos a arsénico y 2 gramos de hígado en el caso de animales controles. El tejido se homogenizó y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua desionizada. En un vaso de precipitados, se colocó una alícuota del homogenado (1 ml para animales expuestos a arsénico y 2 ml para animales controles) y se adicionaron 5 ml de HNO₃ y 1 ml de HClO₄, manteniendo esta mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente (digestión en frío), se cubrió la mezcla con un vidrio de reloj y se calentó durante 90 min a 100°C., para después continuar con la digestión ácida descrita anteriormente.

Para determinar la precisión y exactitud de la determinación de AsT en hígado se utilizó por duplicado muestras de hígado a las que se les adicionó de una mezcla de AsI, MMA y DMA (1:2:4) que contenía 368 ng de AsT. Estas muestras se digirieron al mismo tiempo que las muestras problema.

iii) Determinación de arsénico.

Condiciones de operación del equipo de absorción atómica Varian AA 475:

Corriente de la lámpara de arsénico : 7.0 mA.

Longitud de onda: 193.7 nm.

Ancho de la banda: 1 nm.

Corrección de fondo: lámpara de deuterio activada en todas las determinaciones.

Amplificación del registrador: 20

Velocidad de la carta: 2.5 cm/min.

Condiciones de operación del equipo de absorción atómica Perkin Elmer AA 3100:

Corriente de la lámpara de arsénico: 8 mA.

Longitud de onda: 193.7 nm

Ancho de la banda: 0.7 nm

Con el propósito de reducir el As (V) a As (III), a una alícuota de las muestras procesadas (5 ml) se les adicionó 1 ml de KI al 20 % y 1 ml de HCl al 50 %, 30 minutos antes de la lectura. Al adicionar la muestra en la cámara de generación de hidruros, se agregó 4 ml de HCl al 50 % y una tableta de NaBH₄.

Todas las fracciones de arsénico presentes en orina fueron analizadas en el equipo de espectrofotometría de absorción atómica, utilizando una lámpara de cátodo hueco de arsénico (Varian) y

corrector de fondo (lámpara de deuterio), registrándose la lectura en un registrador Varian modelo 9176.

Para conocer las concentraciones de cada una de las especies de arsénico, se determinó el área bajo la curva y se interpoló en la gráfica de calibración de la especie de arsénico correspondiente (AsI, MMA, DMA). La gráfica de calibración se preparó en el intervalo de 8-160 $\mu\text{g}/\text{l}$ de la especie de arsénico correspondiente. Los resultados obtenidos se expresaron en μg de As/24 hrs/100 g de peso corporal.

La concentración de arsénico total en orina e hígado se determinó en un equipo de absorción atómica Perkin Elmer 3100.

La concentración de arsénico en la muestra se obtuvo al interpolar la densidad óptica en una gráfica de calibración.

La gráfica de calibración de arsénico total se preparó en el intervalo de 4.2-126 $\mu\text{g}/\text{l}$, utilizando como estándares AsI, MMA y DMA (con una relación 1:2:4).

2.2.3. DETERMINACION DE SULFATO INORGANICO EN ORINA (Lundquist P. y col., 1980).

El método estuvo basado en la determinación turbidimétrica del sulfato formado como sulfato de bario, en la presencia de una pequeña cantidad de sulfato de bario preformado y usando polietilenglicol como agente estabilizante. Se determinó directamente el sulfato inorgánico.

PROCEDIMIENTO

Se colocó, por duplicado, 0.1 ml de orina en un tubo de ensaye y se adicionó:

2.9 ml de agua

1.0 ml de HCl 0.5 N.

1.0 ml de sol. Ba-PEG.

Se mezclo con vortex.

Se determinó la densidad óptica (D.O.) a 600 nm contra un blanco de reactivos, en el intervalo de 5-30 minutos después de haber hecho la mezcla.

Para determinar la precisión y exactitud del método empleado, se colocó por duplicado una muestra de orina a la que se le adicionó 357 μg de SO_4^{2-} y se sometió al mismo procedimiento empleado para las muestras.

La concentración de sulfato inorgánico se determinó al interpolar la D.O. de la muestra problema en la gráfica de calibración.

Se realizó la gráfica de calibración en un intervalo de 10-570 $\mu\text{g SO}_4^{2-}/\text{ml}$.

2.2.4. DETERMINACION DE GLUTATION HEPATICO (Grassetti D. y Murray J., 1967).

Esta determinación se llevó a cabo al hacer reaccionar 2,2'-ditiodipiridina con los grupos tioles presentes en la muestra, dando origen a la correspondiente 2-tiopiridona, que es el compuesto responsable de la absorción en el espectro ultravioleta.

PROCEDIMIENTO

Se sacrificaron a las ratas por desnucación y se les perfundió el hígado con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (todo el procedimiento se realizó a 4°C ó en cuarto frío).

Se pesaron aproximadamente 2 gramos del lóbulo principal y se homogenizaron con 10 ml de solución de fosfatos pH 7.2. Se adicionó ácido sulfosalicílico al 10 %; en un volumen igual al del homogenado. El homogenado se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm, decantando el sobrenadante y determinando el volumen.

Se tomó, por triplicado, una alícuota de 0.075 ml del sobrenadante, se transfirió a los tubos de ensaye, se adicionó 0.3 ml de PDS y 2.625 ml de sol. de PO, y se agitó en un vortex, determinandose la densidad óptica a 343 nm.

La lectura se realizó dentro de los 5 minutos después de haber hecho la mezcla. La concentración de glutatión en las muestras problema se obtuvo al interpolar la D.O. de la muestra en la gráfica de calibración.

Para determinar la precisión y exactitud del método empleado, se colocó por duplicado en un tubo de ensaye el volumen necesario para obtener 20 μg de GSH/ml y se sometió al mismo procedimiento empleado que las muestras.

CURVA PATRON DE GLUTATION

Parte 1. Adicionar en tubos de ensaye:

tubo	sol. patron de glutatión ml	sol. de PO, ml
1	0.375	2.625
2	0.750	2.250
3	1.500	1.500
4	2.250	0.750
5	3.000	0.000

Agitar los tubos.

Parte 2. De las diluciones hechas en la parte 1, adicionar el volumen indicado:

Tubo	Vol. Glut. ml	PDS ml	sol. PO, pH 7.2 ml	Conc.Glut. $\mu\text{g/ml}$
bco	-	0.3	2.7	-
1	0.3	0.3	2.4	5
2	0.3	0.3	2.4	10
3	0.3	0.3	2.4	20
4	0.3	0.3	2.4	30
5	0.3	0.3	2.4	40

2.2.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L- METIONINA Y S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA (Guattari B., 1991).

Estos compuestos fueron determinados en extracto de homogenado de hígado, separados por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa y detectados en el espectrofotómetro de luz ultravioleta.

PROCEDIMIENTO

I. Método de extracción.

Se sacrificaron las ratas por desnucación y se perfundió el hígado con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2. De el lóbulo izquierdo se peso aproximadamente 2 gramos, el tejido se homogenizó en aproximadamente 5 ml de la solución EDTA-metabisulfito. Se centrifugó el homogenizado a 12 000 rpm/20 min/4°C. El sobrenadante se separó y filtró en una membrana de 0.4 μ m, posteriormente se incubó a 40°C/90 minutos. Las muestras se guardaron a -60°C hasta el análisis.

II. Separación de SAME y SAH por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

A) Acondicionamiento de la columna

Se llevó a cabo al inicio y final de cada sesión de trabajo, haciendo pasar a través de la columna de cromatografía las siguientes soluciones:

a. Al inicio de la sesión.

Metanol al 20 %, flujo de 20 ml/hr, durante 15 minutos.

flujo de 40 ml/hr, durante 10 minutos.

flujo de 60 ml/hr, durante 5 minutos.

flujo de 80 ml/hr, durante 5 minutos.

Fase móvil, flujo de 20 ml/hr, durante 15 minutos.

flujo de 40 ml/hr, durante 10 minutos.

flujo de 60 ml/hr, durante 5 minutos.

flujo de 80 ml/hr, durante 5 minutos.

b. Al final de cada sesión.

Fase móvil, flujo 80 ml/hr, 5 minutos.

flujo 60 ml/hr, 5 minutos.

flujo 40 ml/hr, 10 minutos.

flujo 20 ml/hr, 15 minutos.

Metanol al 20 %, flujo 80 ml/hr, 5 minutos.

flujo 60 ml/hr, 5 minutos.

flujo 40 ml/hr, 10 minutos.

flujo 20 ml/hr, 15 minutos.

B) Determinación del tiempo de retención de SAME y SAH.

i) El flujo de la fase móvil fue establecido en 80 ml/hr, se inyectó 3 veces el estándar de SAME 6.60 ng/ μ l.

ii) Se inyectó 3 veces el estándar de SAH 1.90 ng/ μ l.

iii) Se inyectó 3 veces la mezcla de estándares SAME/SAH.

iv) Se determinó el tiempo de retención de los compuestos.

C) Inyección de muestras.

A partir de las soluciones stock de SAME y SAH, se preparó la gráfica de calibración en un intervalo de 1.0-20.0 ng/ μ l para SAME y 0.7-6.0 ng/ μ l para SAH.

Después del acondicionamiento de la columna se inyectó la mezcla de estándares SAME/SAH, posteriormente se inyectaron las muestras problemas. Todas las muestras fueron inyectadas por duplicado.

Para determinar la precisión y exactitud del método empleado, se inyectó una mezcla de estándares SAME/SAH de 6.60 y 1.90 ng/ μ l, respectivamente.

Se calculó el área bajo la curva de los respectivos compuestos. Determinando la concentración de SAME y SAH al interpolar en una gráfica de calibración el área obtenida con las muestras problema.

2.2.6. TRATAMIENTO ESTADISTICO

En las diferentes determinaciones efectuadas, se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar de cada grupo, y se compararon los resultados de los diferentes grupos experimentales utilizando la t de Student como prueba de diferencia de medias, tomando como valor significativo aquellos que presentaron $p < 0.05$.

RESULTADOS

III. RESULTADOS

Durante la realización de este proyecto se murieron 2 ratas (2/18) correspondientes al grupo ARSENICO, 24 horas después de la administración del arsenito de sodio, 2 ratas del grupo ARSENICO-SAME, una a las 24 (1/18) y la otra (1/6) a las 72 horas posteriores a la intoxicación.

3.1. EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO Y ARSENICO TOTAL.

Los resultados de la excreción urinaria de especies de arsénico total expresados en $\mu\text{g As}/24$ horas se muestran en la tabla 1a para los grupos controles y 1b para los grupos expuestos a arsénico. Con el propósito de normalizar los resultados obtenidos se consideró la cantidad de arsénico administrado a las ratas en función de su peso corporal, expresando los resultados en $\mu\text{g As}/24$ horas/100 g peso para los grupos controles en la tabla 2a y para los grupos expuestos a arsénico en la tabla 2b y figura 1.

En los grupos CONTROL y CONTROL-SAME, aún cuando no se les administró arsénico como parte del tratamiento, las ratas ingieren alimento que contiene arsénico orgánico, que trae como consecuencia la excreción urinaria de arsénico.

No se observó diferencia significativa entre los grupos CONTROL Y CONTROL-SAME en la excreción urinaria de las especies de arsénico y en la de arsénico total. Como se esperaba, la excreción urinaria de especies de arsénico y de arsénico total en los grupos tratados con arsénico fué significativamente mayor ($p < 0.05$)

que en los grupos controles.

La mayor cantidad de arsénico fué excretada en la orina durante el intervalo de 0-24 horas posteriores a la intoxicación; no se observó diferencia en la excreción urinaria de las especies de arsénico y de arsénico total entre los grupos ARSENICO y ARSENICO-SAME durante las primeras 0-48 horas posteriores a la intoxicación.

Sin embargo, en el grupo ARSENICO-SAME la excreción de DMA y de arsénico total fué significativamente mayor ($p = 0.001$ y 0.04 , respectivamente) que en el grupo ARSENICO, en el intervalo de 48-72 horas posteriores a la intoxicación con arsénico.

Para comparar la excreción urinaria de las especies de arsénico expresada como porcentaje de la dosis administrada en los dos grupos intoxicados con arsénico, se realizó la tabla 3 y la figura 2. La cantidad de arsénico excretada a través de la orina durante los tres días de análisis fué 12.3 y 10.9 % de la dosis administrada en el grupo ARSENICO y ARSENICO-SAME, respectivamente. En este caso el grupo ARSENICO-SAME también presentó, en el intervalo de 48-72 horas, aumento significativo ($p < 0.05$) en la excreción de especies metiladas y de arsénico total en comparación al grupo ARSENICO.

En la tabla 4 y figuras 3a, b y c se muestra la proporción relativa entre los grupos ARSENICO y ARSENICO-SAME de las especies de arsénico urinario medida a 24, 48 y 72 horas posteriores a la administración de arsénico, no se observó diferencia significativa.

Al transcurrir el tiempo de intoxicación con arsénico, en ambos grupos expuestos la proporción de DMA aumento, en tanto que la proporción de AsI y MMA disminuyó, este patrón esta de acuerdo a reportes previos (Odanaka Y. y col., 1980).

La precisión y exactitud para la determinación de las especies de arsénico en orina fue de 13.64 % y 98.55 % para AsI, 18.6 % y 116% para MMA, 16.43 % y 109% para DMA, respectivamente. Para la determinación de arsénico total en orina la precisión fue de 12.87 % y la exactitud de 92.07 %.

TABLA 1a. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO EN RATAS CONTROL.

GRUPO CONTROL	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	0.295 ± 0.307 9	0.503 ± 0.399 9	0.366 ± 0.309 9	0.869 ± 0.339 9	1.164 ± 0.347 9
24-48 HORAS n	0.098 ± 0.017 6	0.692 ± 0.006 6	1.594 ± 1.156 6	2.200 ± 0.991 6	2.385 ± 1.040 6
48-72 HORAS n	0.005 ± 0.007 3	0.005 ± 0.007 3	0.062 ± 0.267 3	0.947 ± 0.264 3	1.032 ± 0.262 3

GRUPO CONTROL-SAMe	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	0.210 ± 0.196 9	0.696 ± 0.642 9	0.258 ± 0.332 9	0.954 ± 0.715 9	1.160 ± 0.789 9
24-48 HORAS n	0.080 ± 0.012 6	1.192 ± 0.170 6	0.276 ± 0.259 6	1.460 ± 0.312 6	1.540 ± 0.301 6
48-72 HORAS n	0.003 ± 0.007 3	0.441 ± 0.271 3	0.090 ± 0.503 3	1.330 ± 0.827 3	1.420 ± 0.826 3

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg de As/24 hrs.

TABLA 16. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

GRUPO ARSENICO	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	69.00 ± 38.35 15	48.43 ± 15.56 15	35.43 ± 24.52 15	87.87 ± 25.32 15	146.21 ± 36.02 15
24-48 HORAS n	4.13 ± 1.00 10	4.61 ± 2.10 10	19.33 ± 13.60 10	23.94 ± 14.17 10	28.33 ± 14.76 10
48-72 HORAS n	0.27 ± 0.26 5	0.09 ± 0.04 5	3.40 ± 1.00 5	3.49 ± 1.00 5	3.77 ± 1.49 5

GRUPO ARSENICO-S/M	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	59.02 ± 29.02 13	53.05 ± 12.97 13	28.95 ± 10.28 13	84.03 ± 18.02 13	142.18 ± 21.89 13
24-48 HORAS n	3.82 ± 1.84 9	3.87 ± 1.44 9	17.77 ± 3.87 9	21.46 ± 4.69 9	25.37 ± 6.60 9
48-72 HORAS n	0.70 ± 0.25 5	1.09 ± 1.32 5	11.57 ± 1.94 ^{**} 5	12.66 ± 3.20 ^{**} 5	13.36 ± 3.60 ^{**} 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg de As/24 hrs.

^{**}, p < 0.05. AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO.

TABLA 2a. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO EN RATAS CONTROL.

GRUPO CONTROL	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	0.121 ± 0.130 9	0.215 ± 0.198 9	0.240 ± 0.237 9	0.390 ± 0.175 9	0.579 ± 0.252 9
24-48 HORAS n	0.045 ± 0.007 6	0.319 ± 0.407 6	0.743 ± 0.567 6	1.062 ± 0.446 6	1.100 ± 0.494 6
48-72 HORAS n	0.041 ± 0.001 3	0.041 ± 0.001 3	0.425 ± 0.173 3	0.467 ± 0.141 3	0.585 ± 0.170 3

GRUPO CONTROL-SAMe	AsI	MMA	DMA	MMA+DMA	AsT
0-24 HORAS n	0.093 ± 0.025 9	0.275 ± 0.312 9	0.118 ± 0.164 9	0.431 ± 0.323 9	0.524 ± 0.300 9
24-48 HORAS n	0.037 ± 0.006 6	0.563 ± 0.122 6	0.127 ± 0.132 6	0.691 ± 0.152 6	0.760 ± 0.145 6
48-72 HORAS n	0.040 ± 0.002 3	0.103 ± 0.109 3	0.436 ± 0.342 3	0.654 ± 0.404 3	0.583 ± 0.414 3

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg de As/24 hrs/100 g peso.

TABLA 2b. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

GRUPO ARSENICO	AsI	NNA	DNA	NNA+DNA	AsT
0-24 HORAS n	29.82 ± 16.37 16	21.28 ± 7.55 16	15.43 ± 10.87 16	36.75 ± 11.40 16	66.55 ± 15.25 16
24-48 HORAS n	1.84 ± 0.82 10	2.09 ± 1.03 10	8.23 ± 6.90 10	10.88 ± 6.84 10	12.75 ± 7.13 10
48-72 HORAS n	0.12 ± 0.12 5	0.04 ± 0.02 5	1.54 ± 0.44 5	1.55 ± 0.44 5	1.67 ± 0.54 5

GRUPO ARSENICO-SAMA	AsI	NNA	DNA	NNA+DNA	AsT
0-24 HORAS n	24.94 ± 11.27 13	21.12 ± 5.36 13	12.01 ± 5.12 13	33.97 ± 8.04 13	58.36 ± 12.18 13
24-48 HORAS n	1.50 ± 0.69 9	1.53 ± 0.57 9	7.00 ± 1.34 9	8.53 ± 1.54 9	10.32 ± 2.31 9
48-72 HORAS n	0.27 ± 0.10 5	0.42 ± 0.58 5	4.48 ± 0.87 [*] 5	4.94 ± 1.34 [*] 5	5.10 ± 1.44 [*] 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg de As/24 hrs/100 g peso.

^{*}, p < 0.05. AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO.

A) GRUPO ARSENICO SAME

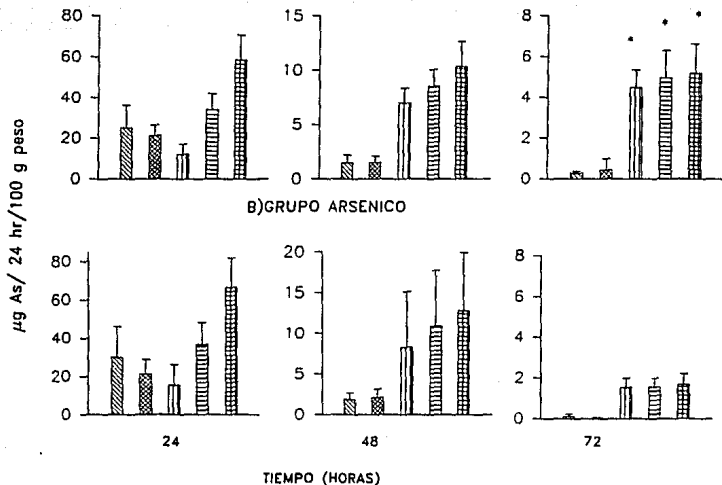


Figura 1 . Excreción urinaria de especies de arsénico y de arsénico total en orina de ratas intoxicadas con arsénico inorgánico.

AsI, MMA, DMA, MMA + DMA, AsT.

* $p < 0.05$ (MEDIA \pm SD)

TABLA 3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE EL PORCENTAJE DE EXCRECION URINARIA DE ESPECIES DE ARSENICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

GRUPO ARSENICO	AsI	NNA	DNA	NNA+DNA	AsT
0-24 HORAS n	4.42 ± 2.34 15	3.16 ± 1.00 15	2.29 ± 1.56 15	5.44 ± 1.59 15	9.06 ± 2.16 15
24-48 HORAS n	0.27 ± 0.12 10	0.31 ± 0.12 10	1.30 ± 0.97 10	1.61 ± 1.01 10	1.00 ± 1.00 10
48-72 HORAS n	0.02 ± 0.02 5	0.01 ± 0.01 5	0.22 ± 0.07 5	0.23 ± 0.07 5	0.25 ± 0.08 5

GRUPO ARSENICO-SAME	AsI	NNA	DNA	NNA+DNA	AsT
0-24 HORAS n	3.54 ± 1.60 13	3.25 ± 0.75 13	1.78 ± 0.73 13	5.03 ± 1.19 13	8.58 ± 1.75 13
24-48 HORAS n	1.22 ± 0.97 9	0.22 ± 0.00 9	1.03 ± 0.18 9	1.26 ± 0.22 9	1.48 ± 0.30 9
48-72 HORAS n	0.04 ± 0.01 5	0.06 ± 0.00 5	0.67 ± 0.12 [*] 5	0.73 ± 0.20 [*] 5	0.77 ± 0.20 [*] 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LA DOSIS ADMINISTRADA.

^{*}, p < 0.05, AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO.

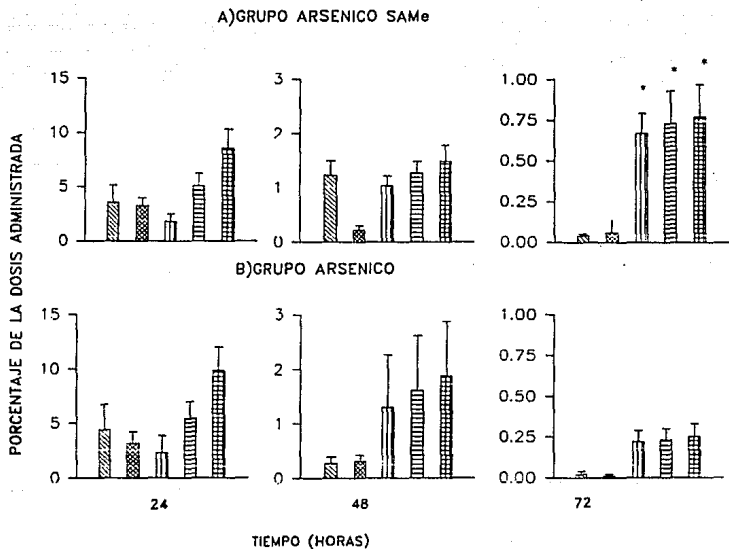


Figura 2 . Excreción urinaria de especies de arsénico y de arsénico total en orina de ratas intoxicadas con arsénico Inorgánico.

AsI, MMA, DMA, MMA + DMA, AsT,

* $p < 0.05$ (MEDIA \pm SD)

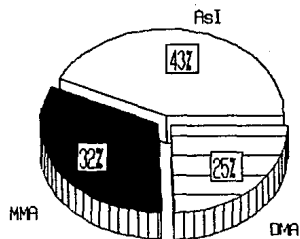
TABLA 4. DISTRIBUCION RELATIVA DE LAS ESPECIES DE ARSENICO EXCRETADAS EN ORINA.

GRUPO ARSENICO	AsI	MMA	DMA
0-24 HORAS n	43.09 ± 19.21 15	32.37 ± 13.14 15	24.58 ± 17.30 15
24-48 HORAS n	17.24 ± 9.90 10	18.69 ± 12.26 10	64.05 ± 19.85 10
48-72 HORAS n	5.97 ± 4.69 5	2.77 ± 1.29 5	91.26 ± 3.40 5

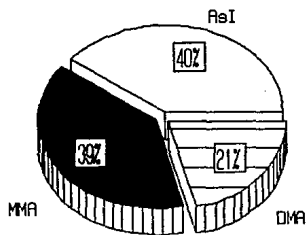
GRUPO ARSENICO-SAME	AsI	MMA	DMA
0-24 HORAS n	38.52 ± 15.20 13	37.64 ± 9.85 13	20.60 ± 6.80 13
24-48 HORAS n	14.15 ± 3.65 9	14.83 ± 4.14 9	68.57 ± 7.87 9
48-72 HORAS n	5.53 ± 2.59 5	6.34 ± 8.51 5	87.51 ± 7.42 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCIENTO.

FIG 8A. DISTRIBUCION RELATIVA DE ESPECIES DE As EN ORINA

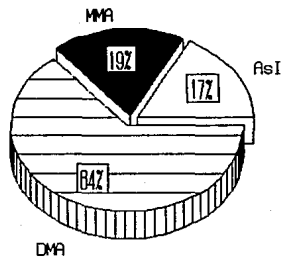


GRUPO ARSENICO 0-24 HORAS

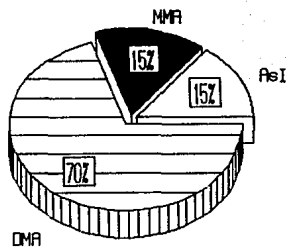


GRUPO ARSENICO-SAM 0-24 HORAS

FIG 3B. DISTRIBUCION RELATIVA DE ESPECIES DE As EN ORINA

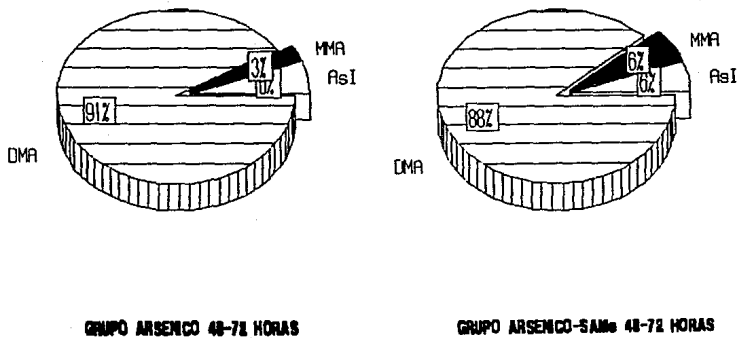


GRUPO ARSENICO 24-48 HORAS



GRUPO ARSENICO-24-48 HORAS

FIG 3C. DISTRIBUCION RELATIVA DE ESPECIES DE As EN ORINA



3.2. DETERMINACION DE ARSENICO TOTAL EN HIGADO DE RATA.

Sabiendo que el hígado es el principal órgano en donde se realiza el proceso de metilación de arsénico inorgánico, además de que en este órgano se deposita una gran cantidad del arsénico absorbido, se decidió determinar el contenido de arsénico total en hígado de rata. Los resultados de la concentración de arsénico total en hígado de rata se muestra en la tabla 5 y figura 4.

El nivel de arsénico en las muestras de hígado de las ratas de los grupos intoxicados con arsénico fué notablemente superior ($p < 0.01$) al de los grupos controles.

La concentración de arsénico total en las muestras de hígado de las ratas del grupo ARSENICO-SAMe fué mayor que el grupo ARSENICO; sin embargo, solo a las 72 horas esta diferencia fué estadísticamente significativa ($p = 0.004$).

La precisión para la determinación de arsénico total en hígado de rata fué de 8.61 % y la exactitud de 105.16 %.

TABLA No 5. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE 5-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA PRESENCIA DE ARSENICO TOTAL EN HIGADO DE RATA.

	24 h	48 h	72 h
CONTROL	0.075 ± 0.04	0.087 ± 0.063	0.143 ± 0.088
n	3	3	3
CONTROL-SAMe	0.031 ± 0.006	0.037 ± 0.015	0.094 ± 0.051
n	3	3	3
As	2.40 ± 1.10 [*]	1.76 ± 0.33 [*]	0.95 ± 0.31 [*]
n	4	5	5
As-SAMe	3.38 ± 1.17 [*]	2.68 ± 1.02 [*]	1.68 ± 0.21 ^{*,**}
n	4	6	5

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg de As/g de hígado.

^{*}, p < 0.05, AL COMPARAR CON EL GRUPO CONTROL.

^{**}, p < 0.05, AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO.

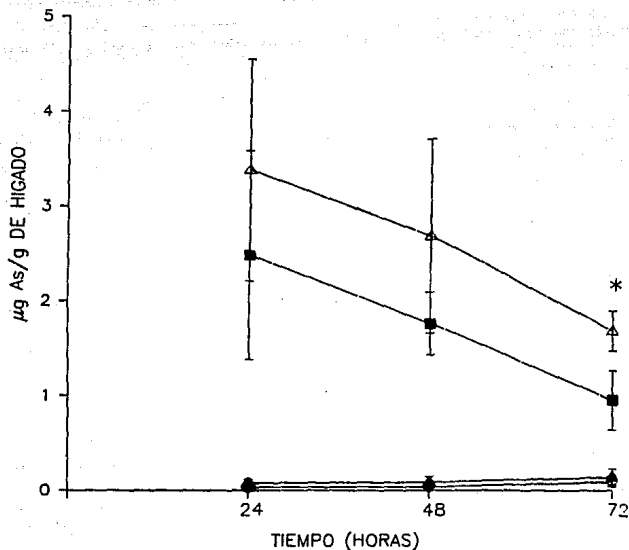


FIGURA No. 4. DETERMINACION DE ARSENICO TOTAL EN HIGADO DE RATA.

■ GRUPO ARSENICO, ▲ GRUPO ARSENICO-SAMe.

◇ GRUPO CONTROL, ◊ GRUPO CONTROL-SAMe.

* $p < 0.05$, AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO

(MEDIA \pm SD).

3.3. DETERMINACION DE SULFATO INORGANICO EN ORINA.

Los resultados de la concentración de sulfato inorgánico en orina expresados en $\mu\text{g}/24$ horas se muestran en la tabla 6 y expresados en $\mu\text{g}/24$ horas/100 g de peso en la tabla 7.

Se observó que al transcurrir el tiempo de tratamiento en todos los grupos experimentales, incluyendo los controles, existió la tendencia a incrementar la excreción de sulfato inorgánico; sin embargo, esta tendencia fué menor en los dos grupos intoxicados con arsénico.

No existen diferencias significativas al comparar la excreción de sulfatos en los grupos CONTROL y CONTROL-SAME.

La administración de arsénico redujo significativamente la excreción urinaria de sulfato inorgánico, a las 24-48 horas ($p= 0.002$) y a las 48-72 horas ($p= 0.03$).

La precisión para la determinación de sulfato inorgánico en orina fué de 8.12 % y la exactitud de 107.64 %.

TABLA No 6. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA EN LA EXCRECION URINARIA DE SULFATO INORGANICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

	0-24 h	24-48 h	48-72 h
CONTROL n	40.42 ± 32.94 9	79.96 ± 27.56 6	138.86 ± 29.41 3
CONTROL-SAMe n	54.78 ± 32.16 9	57.81 ± 32.78 6	111.78 ± 17.09 3
As n	50.89 ± 92.00 16	45.31 ± 14.34 [*] 12	81.89 ± 31.00 [*] 6
As-SAMe n	33.10 ± 13.78 17	56.26 ± 24.58 11	59.83 ± 29.08 [*] 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN µg/24 hrs.

^{*}, p < 0.05, AL COMPARAR CON EL GRUPO CONTROL.

TABLA No 7. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE 5-ADENOSIL-L-METIONINA EN LA EXCRECION URINARIA DE SULFATO INORGANICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

	0-24 h	24-48 h	48-72 h
CONTROL n	22.11 ± 16.40 9	37.72 ± 14.01 6	67.20 ± 9.66 3
CONTROL-SaMe n	25.00 ± 16.46 9	27.22 ± 16.84 6	55.45 ± 11.13 3
As n	12.10 ± 6.44 16	20.33 ± 7.93 [*] 12	35.81 ± 13.27 [*] 6
As-SaMe n	13.31 ± 5.52 17	22.09 ± 0.69 11	23.81 ± 13.27 [*] 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN $\mu\text{g}/24 \text{ hrs}/100 \text{ g peso}$.

^{*}, $p < 0.05$. AL COMPARAR CON EL GRUPO CONTROL.

3.4. DETERMINACION DE GLUTATION REDUCIDO EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

Los resultados de la concentración de glutatión reducido en hígado de rata se muestran en la tabla 8.

No existio diferencia significativa entre la concentración de glutatión hepático presente en las ratas del grupo CONTROL y las del grupo CONTROL-SAME.

Después de la intoxicación con arsénico, la concentración de glutatión hepático en los grupos ARSENICO y ARSENICO-SAME fué significativamente menor ($p < 0.03$) que la de los grupos controles. También se observó que a las 48 y 72 horas posteriores a la intoxicación con arsénico, el nivel de glutatión en el grupo ARSENICO-SAME aumento significativamente ($p = 0.006$) con respecto al grupo ARSENICO, y a los grupos controles a las 72 horas (aunque esta diferencia no fué significativa).

Se observó la disminución de concentración de glutatión hepático en función del tiempo en todos los grupos experimentales, aun en los CONTROL.

La precisión para la determinación de glutatión hepático fué de 9.68 % y la exactitud de 107.45 %.

TABLA No 9. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA EN EL CONTENIDO DE GLUTATACION HEPATICO EN RATAS EXPUESTAS A ARSENICO INORGANICO.

	24 h	48 h	72 h
CONTROL n	5.47 ± 1.68 3	0.87 ± 0.22 3	0.29 ± 0.10 3
CONTROL-SAMe n	1.74 ± 0.18 3	0.88 ± 0.12 3	0.37 ± 0.20 3
As n	1.18 ± 1.12* 4	0.16 ± 0.12* 6	0.037 ± 0.01* 6
As-SAMe n	0.87 ± 0.53** 5	0.41 ± 0.26** 6	0.60 ± 0.34** 5

RESULTADOS EXPRESADOS EN $\mu\text{mol/g}$ de hígado.

*, $p < 0.05$, AL COMPARAR CON EL GRUPO CONTROL.

**, $p < 0.05$, AL COMPARAR CON EL GRUPO ARSENICO.

3.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA Y S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA.

Los tiempos de retención obtenidos en las condiciones experimentales fueron:

SAH = 19 minutos, 00 segundos.

SAMe= 20 minutos, 52 segundos.

Los resultados de concentración hepática de SAMe y SAH expresados en nmol/ g hígado se muestran en la tabla 9 y expresados en nmol/ hígado en la tabla 10.

En la tabla 9 y 10, se observa que no existió diferencia significativa al comparar la concentración de SAMe entre los grupos controles. Sin embargo, a las 24 horas posteriores a la intoxicación con arsénico, los grupos ARSENICO y ARSENICO-SAMe presentaron menor concentración de SAMe hepático que los grupos controles (tabla 9 y 10). Cuando se compararon los resultados expresados en nmol/ hígado, la concentración de SAMe en el grupo CONTROL a las 24 horas fué mayor ($p = 0.01$) que el grupo ARSENICO.

En la tabla 9 y 10 se observa que no existió diferencia significativa al comparar la concentración de SAH hepático en los grupos controles y espuestos a arsénico.

A las 24 horas posteriores a la intoxicación con arsénico, la relación SAMe/SAH en los grupos ARSENICO y ARSENICO-SAMe fué menor a la de los grupos controles; no obstante, esta diferencia no fué estadísticamente significativa.

La precisión para la determinación de SAH fué de 7.70 % y la exactitud de 99.99 %; en tanto que para SAME la precisión fué de 6.26 % y la exactitud de 97.78 %.

TABLA No 9. CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-METIONINA Y S-ADENOSIL
L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA.

24 h	SAMe	SAH	SAMe/SAH	n
CONTROL	51.85 ± 11.21	17.14 ± 2.03	3.02	3
CONTROL-SAMe	53.03 ± 8.53	16.32 ± 0.56	3.24	3
ARSENICO	37.20 ± 11.66	14.06 ± 4.79	2.64	6
ARSENICO-SAMe	40.90 ± 11.40	10.62 ± 5.39	2.19	4

48 h	SAMe	SAH	SAMe/SAH	n
CONTROL	32.30 ± 5.30	16.40 ± 1.34	1.97	3
CONTROL-SAMe	30.60 ± 2.07	15.62 ± 0.54	1.95	3
ARSENICO	32.50 ± 6.78	16.66 ± 2.69	1.95	5
ARSENICO-SAMe	32.33 ± 6.63	15.49 ± 4.51	2.08	6

72 h	SAMe	SAH	SAMe/SAH	n
CONTROL	43.37 ± 11.92	16.49 ± 2.07	2.63	3
CONTROL-SAMe	52.00 ± 12.10	12.51 ± 3.79	4.22	3
ARSENICO	41.03 ± 6.71	15.20 ± 3.46	2.73	6
ARSENICO-SAMe	42.03 ± 8.66	15.55 ± 4.52	2.75	6

RESULTADOS EXPRESADOS EN nmol/ g de hígado.

TABLA No 10. CONCENTRACION DE S-ADENOSIL-L-METIONINA Y S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA EN HIGADO DE RATA.

24 h	SAm	SAH	SAm/SAH	n
CONTROL	749.60 ± 153.60	251.46 ± 45.84	3.02	3
CONTROL-SAm	670.91 ± 104.60	211.00 ± 10.39	3.24	3
ARSENICO	497.09 ± 106.03 [*]	196.91 ± 41.40	2.51	6
ARSENICO-SAm	447.57 ± 211.37	211.37 ± 04.90	2.19	4

48 h	SAm	SAH	SAm/SAH	n
CONTROL	304.94 ± 113.72	192.19 ± 40.77	1.97	3
CONTROL-SAm	350.04 ± 32.67	178.40 ± 1.96	1.95	3
ARSENICO	407.09 ± 134.71	203.71 ± 35.19	1.95	5
ARSENICO-SAm	436.70 ± 103.12	208.44 ± 58.76	2.08	6

72 h	SAm	SAH	SAm/SAH	n
CONTROL	504.17 ± 136.33	193.33 ± 19.75	2.63	3
CONTROL-SAm	739.24 ± 171.40	174.95 ± 30.99	4.22	3
ARSENICO	400.19 ± 130.07	173.91 ± 53.05	2.73	6
ARSENICO-SAm	436.70 ± 103.12	222.00 ± 08.00	2.75	6

RESULTADOS EXPRESADOS EN nmol/hígado.

^{*}, p < 0.05. AL COMPARAR CON EL GRUPO CONTROL.

D I S C U S I O N

IV. DISCUSION

El hombre y algunos mamíferos llevan a cabo la desintoxicación del arsénico a través del mecanismo de metilación donde el compuesto donador de grupos metilo es la S-adenosil-L-metionina, necesitándose en este proceso la presencia de GSH (Buchet J. y Lauwerys R., 1985).

La dosis de arsénico administrada fue seleccionada en base a un estudio paralelo realizado en el CINVESTAV, en donde no se observó letalidad a la dosis de 11.7 mg NaAsO₂/kg de peso; sin embargo, durante la realización de este estudio se murieron 2 ratas (2/18) en el grupo ARSENICO, 24 horas después de la administración del tóxico y 2 ratas en el grupo ARSENICO-SAME, 1 a las 24 (1/18) y la otra (1/6) a las 72 horas posteriores a la intoxicación.

El objetivo de la administración de SAME antes y después de la intoxicación con NaAsO₂, fué aumentar la poza de SAME hepático e incrementar de manera indirecta la concentración de GSH intracelular, proporcionando grupos de cisteína como producto de la vía de transulfuración de SAME.

Las muestras de orina y de hígado pertenecientes a los grupos CONTROL y CONTROL-SAME, presentaron pequeñas cantidades de arsénico, debido a que el alimento que ingirieron las ratas contiene arsénico orgánico (NAS, 1977); sin embargo, la concentración que presentaron las muestras de los animales expuestos a arsénico fue significativamente mayor ($p < 0.05$).

En los grupos expuestos a arsénico se observó que la mayor parte de la excreción urinaria de especies de arsénico y de arsénico total se llevó a cabo durante las primeras 24 horas posteriores a la intoxicación, lo cual está de acuerdo a reportes previos (ATSDR, 1992). Además, el total excretado durante el tiempo de análisis fue de 12.3 % de la dosis administrada para el grupo ARSENICO y de 10.9 % para el grupo ARSENICO-SAME, estos resultados estan de acuerdo a estudio previos en donde se reporta que la excreción urinaria en ratas durante los primeros 4 días de exposición es de 10-17 % de la dosis de arsénico administrada (Odanaka Y. y col., 1980; Buchet J. y Lauwerys R., 1987). El arsénico que no se excreta en el periodo de 0-48 horas se distribuye en diferentes tejidos del organismo, tales como hígado, riñón, pulmón, etc. y en una importante proporción en eritrocitos (Odanaka Y. y col., 1980; Rowland I. y Davies M., 1982; Klaasen D., 1990; ATSDR., 1992), excretandose lentamente durante un periodo más largo.

La administración de SAME a las ratas intoxicadas con arsénico aumentó (3 veces) la excreción de DMA y AST en las muestras de orina recolectadas entre las 48 y 72 horas, después del tratamiento; sin embargo, la excreción urinaria de especies metiladas de arsénico y de arsénico total no se modificó en el intervalo de 0-48 horas, que corresponde al tiempo de mayor excreción de compuestos de arsénico (Tam G. y col., 1979; Buchet J. y col., 1981).

Al comparar la proporción relativa de las 3 especies determinadas, no se observó diferencia entre los 2 grupos intoxicados con arsénico en ningún intervalo de tiempo.

La administración de SAME a las ratas control no modificó la excreción ni la proporción relativa de las especies de arsénico con respecto al grupo CONTROL, porque el arsénico presente en la dieta es principalmente trimetilado y se encuentra en pequeñas cantidades.

El aumento observado en la excreción urinaria de AsT en el grupo ARSENICO-SAME ocurre al mismo tiempo que el incremento de 42 y 162 % del nivel de GSH hepático, con respecto al grupo CONTROL y ARSENICO, respectivamente; simultáneamente, los niveles de excreción urinaria de sulfato inorgánico en el grupo ARSENICO-SAME son menores a la de los grupos CONTROL y ARSENICO.

La disminución de GSH hepático en los grupos expuestos a arsénico ha sido documentada (Anundi I. y col., 1982; Diaz-Barriga F. y col., 1990; Gyurasics A. y col., 1991); las principales causas atribuidas a esta disminución son: a) inhibición enzimática del metabolismo de carbohidratos que disminuye la síntesis de ATP necesario para la síntesis de GSH, b) la inhibición de la reducción del glutatión oxidado, que origina disminución en el contenido de glutatión reducido, y c) la excreción biliar de un complejo As-GSH (Anundi I. y col., 1982; Aposhian H. y Aposhian M., 1989; Gyurasics A. y col., 1991).

Se ha observado que cuando el nivel de GSH es bajo, existe

disminución de la metilación de arsénico (Hirata M. y col., 1990). Los efectos reguladores adjudicados al GSH son: reducción de las especies de As (V), facilitación de la entrada de As (III) hacia las células, estimulación de la reacción de la primera metilación e incremento de la excreción de DMA de la célula (Buchet J. y Lauwerys R., 1988; Georis B. y col., 1990). Estudios más recientes indican que el GSH después de la reducción de As (V) forma un complejo As-SG que puede ser el sustrato para las enzimas metilantes (Scott N. y col., 1993).

Estos estudios sugieren que la mayor excreción de DMA y AsT en el grupo ARSENICO-SAME en el intervalo de 48-72 horas es ocasionado por la recuperación de los niveles de GSH ocurrido al mismo tiempo de la disminución de la excreción urinaria de sulfato inorgánico, lo que indica que existe menor catabolismo de cisteína, que es utilizada para favorecer la síntesis de GSH. Los resultados anteriores indican que la administración de SAME puede favorecer la síntesis de GSH intracélular a través de la vía de transulfuración.

La disminución de los niveles hepáticos de GSH y el aumento de la excreción urinaria de sulfato inorgánico observada en función del tiempo, aun en los grupos controles, es probablemente causada por la situación de estrés al que fueron sometidos los animales durante el tiempo de experimentación (aislamiento, manipulación, administración de xenobióticos, etc). Este comportamiento se ha observado anteriormente y se ha relacionado

con la liberación de adrenalina, la cual induce la salida de GSH del hígado (Sies H. y Graf P., 1985; Lu C. y col., 1990).

El nivel hepático de AST es mayor en las ratas correspondientes al grupo ARSENICO-SAME al compararlo con el grupo ARSENICO, se observa que la administración de SAME provocó la acumulación de arsénico en este órgano.

Una posible explicación a este comportamiento es suponer que la administración de SAME si aumenta la metilación de arsénico en el hígado, siendo entonces DMA la especie predominante en este órgano, tal como se ha observado en estudios anteriores (Odanaka Y. y col., 1980; Rowland I. y Davies M., 1982). Si este fuera el caso, como el nivel de GSH es bajo no se facilita la salida de DMA del hepatocito y en consecuencia no se aumenta la excreción de este compuesto en la orina. Desafortunadamente, en este estudio no se pudo realizar la separación de las especies de arsénico presentes en el hígado, lo que pudiera ayudar a explicar este comportamiento.

Se esperaba que la administración exógena de SAME aumentara su concentración en el hígado; sin embargo, no se observó aumento de los niveles de SAME en los grupos CONTROL-SAME y ARSENICO-SAME. Tampoco se observó cambio en los niveles del producto de la reacción de transmetilación (SAH), en ninguno de los grupos experimentales. Este comportamiento es posiblemente ocasionado por: 1) la distribución de SAME en otros tejidos tales glandulas suprarrenales, riñón, intestino, bazo, etc. (Placidi G. y col., 1977), 2) el rápido metabolismo que sufre SAME y SAH en el hígado

(Stramentinoli G., 1987), y 3) la utilización de SAME en otras vías metabólicas (Giulidori P. y col., 1984), ocasiona que en el momento del sacrificio de la rata, la concentración de SAME hepático haya regresado a valores similares a los del grupo CONTROL.

En general, la concentración de SAME en los 4 grupos experimentales fue menor a las 48 horas, esta disminución es más evidente cuando se expresa la concentración en nmol/hígado.

A este respecto se puede mencionar que los factores como estrés, ciclo circadiano, dieta, entre otros pueden modificar los niveles intracelulares de SAME (Bartosek I. y col., 1978; Chagoya de Sanchez V. y col., 1991)

No se observó una diferencia significativa en la relación SAME/SAH, entre los 4 grupos experimentales en ningún intervalo de tiempo, por lo que consideramos que bajo estas condiciones experimentales este parámetro no puede ser utilizado como un indicador de metilación de arsénico.

Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de GSH no favorecen la utilización de SAME en la metilación de arsénico, por lo que creemos que la administración de SAME junto con GSH ó un precursor como N-acetil cisteína que incrementa el GSH intracelular podría favorecer la metilación de los compuestos arsenicales.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1) La administración de SAME no aumentó la excreción urinaria de especies metiladas de arsénico y de arsénico total, durante el intervalo de 0-48 horas posterior a la intoxicación con arsénico, que es el tiempo en el cual se excreta la mayor parte del arsénico.

2) La administración de SAME produjo los siguientes cambios en la intoxicación arsenical que solo se observaron en el intervalo de 48-72 horas: a) incremento en la excreción urinaria de DMA y arsénico total, b) aumento en la concentración de GSH hepático, c) disminución de la excreción de sulfato inorgánico en orina, y d) incremento del nivel de AsT en hígado.

3) Los resultados indican que la administración de SAME puede favorecer la metilación de arsénico incrementando la síntesis de GSH intracélular a través de la vía de transulfuración, más que por su participación directa como donador de grupos metilo.

4) Bajo las condiciones experimentales de este proyecto, la relación del contenido SAME/SAH en hígado, no es un indicador que ayude a evaluar la metilación de los compuestos de arsénico.

5) Se necesita realizar más estudios en esta área para conocer si la determinación de la excreción de sulfato inorgánico en orina, puede ser utilizado como indicador de la exposición a arsénico.

REFERENCIAS

VI. REFERENCIAS

- 1.- Aguilar L.(1961). Química de los insecticidas, Capitulo VII. 2a. Edición. Madrid, España.
- 2.- Albores A., Cebrián M.E., Tellez I., y Valdez B.(1979). Estudio comparativo del hidroarsenicismo crónico en dos comunidades rurales de la región Lagunera de México. *Bol. of Sanit. Panam.*, 86:196-205.
- 3.- Almasio P., Bortolini M., Pagliaro L. y Coltorti M.(1990). Role of adenosyl-L-methionine in the treatment of intrahepatic cholestasis. *Drugs*, 40:111-123.
- 4.- Anundi I., Högberg J. y Vahter M.(1982). GSH release in bile as influenced by arsenite. *FEBS Lett.*, 145:285-288.
- 5.- Anthony E.P.(1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, 234: 249-262.
- 6.- Aposhian H. V. y Aposhian M.M.(1989). Newer developments in arsenic toxicity. *J. of Amer. College of Toxicol.*, 8:1297-1305.
- 7.- Arbouine M.W., y Wilson H.K.(1992). Effect of seafood consumption on the assessment of occupational exposure to arsenic by urinary arsenic speciation measurements. *J. Trace Elem. Electrol. Health Dis.*, 6:153-160.

8.- Aschengrau A., Zierler S. y Cohen A.(1989). Quality of community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Arch. Environ. Health*, 44:283-290.

9.- Astolfi E.(1971). Estudios de arsenicismo en agua de consumo. *La Prensa Médica Argentina*, 58:1342-1343.

10.- ATSDR. (1992). Agency for Toxic Substance and Disease Registry, Health Assessment Guidance Manual. U.S. Public Health Service, Atlanta Ga.

11.- Baillie A.T. y Slatter G.J.(1991). Glutathione: A vehicle for the transport of chemically reactive metabolites in vivo. *Acc. Chem. Res.*, 24:264-270.

12.- Bartosek I., Guitani A., Villa P., Stramentinoli G., Gualano M. y Pezzoli C.(1978). S-adenosyl-L-methionine: hepatic levels in rats during various stress situations. *Biochem. Pharmacol.*, 27:2649-2650.

13.- Bellomo G., Miabelli F., Richelmi P. y Orrenius S.(1983). Critical role of sulphhydryl group in ATP-dependent Ca^{2+} sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. *FEBS Lett.*, 163:136-139.

14.- Bettley F.R. y O'Shea J.A.(1975). The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 92:563-568.

15.- Bonferraro T., Chieffi O., Quinti R., Tedesco R. y Le Grazie C.(1990). S-adenosyl-L-methionine (SAME)-induced amelioration of intrahepatic cholestasis of pregnancy: results of an open study. *Drug Invest.*, 2:125-128.

16.- Borgoño J.M., Vincent P., Venturino M. e Infante A.(1977). Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: Epidemiological of clinical study before an after the installation of a treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, 19:103-105.

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

18.- Buchet J.P., Lauwerys R. y Roels H.(1981). Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsenate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48:71-79.

19.- Buchet J.P. y Lauwerys R.(1985). Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.*, 57:125-129.

20.- Buchet J.P. y Lauwerys R.(1987). Study of factors influencing the in vivo methylation of the inorganic arsenic in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 91:65-74.

21.- Buchet J.P. y Lauwerys R.(1988). Role of thiols in the in vitro methylation of inorganic arsenic by rats liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 37:3149-3153.

22.- Cantoni G.L.(1952). The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methyonine and Adenosiltriphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74:2942-2943.

23.- Cebrián M.E., Albores A., Aguilar M. y Enrique B.(1983). Chronic arsenic poisoning in the north of México. *Human Toxicol.*, 2:121-133.

24.- Chagoya de Sanchez V., Hernández-Muñoz R., Sanchez L., Vidrio S., Yañez L. y Suárez J.(1991). Twenty four hours changes of S-adenosyl methionine, S-adenosyl homocysteine, adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver: possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int. J. Biochem.*, 234:1439-1443.

25.- Chien-Jen C., Mei-Shwu L., Mei-Ping H., Shwu-Yuan C. Meei-Maan W., Shen-Nan L., Ta-Jen W. y Tong-Yuan T. (1992). Dose-reponse relationship between ingested inorganic arsenic and diabetes Mellitus. 4th Abstract from Fourth Annual Meeting of the International Society for Enviromental Epidemiology (ISEE). Cuernavaca, Morelos, México.

26.- Christophersen B.O. (1968). Formation of monohydroxy polienoic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 164:35.

27.- Chow C.K. (1976). Biochemical response in lungs of ozone-tolerance, rats. *Nature*, 260:721.

28.- Cikrt M. y Bencko B. (1974). Fate of arsenic after parenteral administration to rats, with particular reference to excretion via bile. *J. Hyg. Microbiol. Immunol.*, 18:129-136.

29.- Comporti M., Maellaro E., Del Bello B. y Casini F.A. (1991). Glutation depletions its effects on other antioxidant system and hepatoceular damage. *Xenobiotica*, 21:1067-1076.

30.- Corrales F., Gimenez A., Alvarez L., Caballeria J., Pajares M., Andrew H., Parés A., Mato M. y Rodés J.(1992). S-adenosyl methionine treatment prevent carbon tetrachloride-induced S-adenosyl methionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *Hepatology*, 16:1022-1027.

31.- Cox D.H.(1980). Arsine evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J. Analyt. Toxicol.*, 4:207-211.

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

33.- Deak S.T., Csaky K.G. y Wadeell W.J.(1976). Localization and histochemical correlation of ⁷⁵As by whole-body autoradiography in mice. *J. Toxicol. Environ Health*, 1:981-984.

34.- Del Razo L.M., Arellano M.A. y Cebrián M.E.(1990). The oxidation state of arsenic in well water from a chronic arsenicism area of Northern Mexico. *Environ. Poll.*, 64:143-153.

35.- Diaz-Barriga F., Llamas E., Mejía J.J., Carrizales L., Santoyo M.E., Vega-Vega L. y Yañez L.(1990). Arsenic-cadmium interactions in rats. *Toxicology*, 64:191-203.

36.- Diaz-Barriga F., Medellin P., Santos M.A., Batres L., Mejia J.J., Yañes L., Carrizales L., Vera M.E., Hernandez M.G., Del Razo L.M. y Cebrián M.(1993). Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelters complex in San Luis Potosi, Mexico. *Environ. Res., en prensa.*

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

38.- Eisler (1988). Arsenic hazards to fish wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Laurel M.D. U.S. Fish and Wildlife Service. Patuxent Wildlife Research Center.

39.- Eloranta T. H.(1977). Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. *Biochem. J.*, 166:521-529.

40.- E.P.A.(1982). An exposure and risk assessment for arsenic. Washington D.C. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standars.

41.- Excelsior (Mayo 18 de 1992). Contaminados con arsénico, dos pozos en Zimapan: Lugo Verduzco. página 3, sección A.

42.- Fairchild E.J., Lewis R.J. y Tathe R.L.(1977). Registry of toxic effects of chemicals substances. U.S. Department of Health Education and Wellfase. National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati. OH.

43.- Foa V. y Maroni M.(1987). Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals. Commission of the European Communities.

44.- Franz-Xaver R., Szinicz L., Kreppel H. y Forth W.(1989). Effect on mitochondrial metabolims in livers of guinea pigs after a single or repeated injection of As_2O_3 . *Arch. Toxicol.*, 63:419-422.

45.- Friedof A.J., Schmeitzer J.W. y Muller J.(1972).The enzymatic formation of 3,4-di-o-methylate dopamine metabolites by mammalian tissues. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 3:293.

46.- Giulidori P., Galli-Kienle M., Catto E. y Stramentinoli G. (1984). Transmethylation, transsulphuration and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine in vivo. *J. Biol. Chem.*, 259:4205-4211.

47.- Gentile S., Persico M., Orlando C. y Coltorti M.(1987). Effect of high dose S-adenosyl methionine (SAME) on nicotinic acid induced hyperbilirubinaemia in Gilbert's Syndrome. *J. of Hepatol.*, 5 (suppl):S29.

- 48.- Georis B., Cardenas A., Buchet J.P. y Lauwerys R.(1990). Inorganic arsenic methylation by rats tissue slices. *Toxicology*, 63:73-84.
- 49.- Golds M., Hurnitz J. y Anders M.(1963). The enzymatic methylation of ribonucleic and dioxiribonucleic acid (RNA and DNA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11:107.
- 50.- Goldsmith J.R., Deane M. y Thom J.(1972). Evaluation of health implications of arsenic in well waters. *Water Res.*, 6:1113:1136.
- 51.- Gonzales C.A., Arreortúa H.H. y Guzman B. J.(1972). Arsenicismo crónico en una comunidad rural y subdesarrollada. *Rev. Inv. Salud Pública*, 32:82-88.
- 52.- Gorby M.S.(1988). Arsenic Poisoning. (Clinical Conference). *West J. Med.*, 149:308-315.
- 53.- Grantham S.A. y Jones J.F.(1977). Arsenic contamination of waters of wells in Nova Scotia. *JAWWA*, 69:653-657.
- 54.- Grassetti D.R. y Murray J.F.(1967). Determination of Sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-Dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 119:41-49.

55.- Guattari B.(1991). High performance liquid chromatographic determination with ultraviolet detection, of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in rat tissues and simultaneously of normetanephrine and metanephrine for phenylethanolamine-N-metyltransferase or catechol-O-methyltransferase activities. *J. Chromatogr.*, 567:254-260.

56.- Gyurasics A., Varga F. y Gregus Z.(1991). Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochem. Pharmacol.*, 4:465-468.

57.- Harrington J.M., Middaugh J.P. y Morse D.L.(1978). A survey of a populations exposed to high concentrations of arsenic in well water in Fairbanks, Alaska. *Am. J. Epidemiol.*, 108:377-385.

58.- Hirata M., Takana A., Hisanaga A. e Ishinishi N.(1990). Effects of glutathione depletion on the acute nephrotoxic potential of arsenite and or arsenic metabolism in hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106:469-481.

59.- Hoffman D. R., Cornatzer W.E. y Duerre J.A.(1979). Relationship between tissue levels the S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylatation reactions. *Can. J. Biochem.*, 57:56-65.

- 60.- Hoffman L.J.(1980). The rate transmethylation in mouse liver as measured by trapping S-Adenosilhomocysteine. *Arch. Biochem Biophys.*, 205:132-153.
- 61.- Holland R.H., McCall M.S. y Lanz H.C.(1959). A study of inhaled arsenic-74 in man. *Cancer Res.*, 19:1154-1156.
- 62.- Joliffe D. M. y Budd A.J.(1991). Masive acute arsenic poisoning. *Anaesthesia*, 46:288-290.
- 63.- Kaye G.L. y Blake J.C.(1990). Metabolims of exogenous S-Adenosyl-L-methionine in patients whit liver disease. *Drugs*, 40: 124-128.
- 64.- Klaasen D.C.(1974). Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29:447-457.
- 65.- Kogelnik H.(1985). High-speed lightwave transmission in optical fibers. *Science*, 228:1043-1048.
- 66.- Kosower E. M. y Kosower N.(1978). The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, 54:109.
- 67.- Lakso J. U. y People S.A.(1975). Methylation of inorganic arsenic by mammals. *Agric. Food Chem.*, 23:674-676.

68.- Lerman B.B., Ali N. y Green D.(1980). Megaloblastic, dyserythropoietic anemia following arsenic ingestion. *Ann. Clin. Lab. Science.*, 10:515-517.

69.- Lieber C.S., Casini A., DeCarli L.M., Kim C. y Lowe N. (1990). Adenosyl-L-methionine (SAME) attenuates alcohol induced liver injury in the baboon. *Hepatology*, 11:165-172.

70.- Lindgren A., Vather M. y Dencker L.(1982). Autoradiographic studies on the distribution of arsenic in mice and hamster administered ⁷⁵As-arsenite or arsenate. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 51:253-255.

71.- Lu C.S, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J., Ookhtens M., Salas-Prato M. y Kaplowitz N.(1990). Hormonal regulation of glutathione efflux. *J. Biol. Chem.*, 265:16088-16095.

72.- Lundquist P., Johannes M. Sörbo B. y Öhman S. (1980). Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem.*, 26:1178-1181.

73.- Marafante E. y Bertolero J.(1982). Intracellular interaction and biotransformation of arsenite in rats and rabbits. *Sci. of Tot. Environ.*, 24:25-39.

74.- Marafante E., Vahter M. y Envall J.(1985). The role of the methylation in the detoxification of arsenate in the rabbit. *Chem. Biol. Inter.*, 56:225-238.

75.- Marafante E., Vahter M. y Norin H.(1987). Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *J. Appl. Toxicol.*, 7:111-117.

76.- Meister A. y Anderson M.(1983). Glutathione. *Annal. Rev. Biochem.*, 52:711-756.

77.- Meister A.(1976). Metabolic pathways, Vol. VII: Metabolism of sulfur compounds. Academic Press, New York.

78.- Mürer J.l., Abildtrup A., Poulsen O.M. y Christensen J. M. (1992). Effect of seafood consumptions on the urinary level of total hydrire-generating arsenic compounds. Inestability of arsenobetaine and arsenocholine. *Analyst*, 117:677-680.

79.- NAS.(1977). Medical and Biological Effects of Enviromental Pollutans: Arsenic. National Academic of Sciences. Washington D.C.

80.- Neuhaus W.O. y Orten M.J.(1984). Metabolismo de aminoácidos en: Bioquímica Humana. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 10° Edición.

81.- Norderson I., Beckman G. y Beckman L.(1978). Occupational and enviromental risks in and around a smelter in Northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas*, 88:47-50.

82.- Norderson I., Salmonsson E.B. y Brun E.(1979). Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic. *Hum. Genet.*, 48:1-6.

83.- Nordstrom S., Beckman L. y Norderson I.(1978a). Occupational and enviromental risks in and around a smelters in Northern Sweden. I. Variations in birthweigth. *Hereditas*, 88:43-46.

84.- Nordstrom S., Beckman L. y Norderson I.(1978b). Occupational and enviromental risks in and around a smelters in Northern Sweden. III. Frecuencies of spontaneous abortions. *Hereditas*, 88:51-54.

85.- Nordstrom S., Beckman L. y Norderson I.(1979a). Occupational and enviromental risks in and around a smelters in Northern Sweden. V. Spontaneous abortions among female employees and decrease birth weight in their offspring. *Hereditas*, 90:291-296.

86.- Nordstrom S., Beckman L. y Norderson I.(1979a). Occupational and enviromental risks in and around a smelters in Northern Sweden. VI. Congenital malformations. *Hereditas*, 90:297-302.

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

88.- Offergelt J.A., Roels H., Buchet J.P., Boeckx M. y Lauwerys R.(1992). Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites. *Brit. J. of Ind. Med.*, 49:387-393.

89.- Paredes S.R., Juknat G., Batlle A. y Conti H.(1985). Beneficial effect of S-adenosyl-L-methionine and lead intoxication. Another approach clinical therapy. *J. Int. Biochem.*, 15:625-629.

90.- Pershagen G., Nordberg G. y Bjorkland N.(1984). Experimental evidence on the pulmonary carcinogenicity of arsenic trioxide. *Arch. Toxicol., Suppl* 7:403-404.

91.- Placidi G. F., Stramentionoli G., Pezzoli C. y Cassano G. (1977). Distribution of S-Adenosyl-L-(methyl-¹⁴C)methionine in animals. *Arzneimittel-Forschung*, 27:1680-1684.

92.- Robinson A.L.(1985). GaAs readied for high-speed microcircuits. *Science*, 219:275-277.

93.- Rowland I.R. y Davies M.J.(1982). Reduction and methylation of sodium arsenate in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, 2:294-299.

94.- Ruffmann R. y Wendel A.(1991). GSH rescue by N-acetyl cysteine. *Klin. Wochenschr.*, 69:857-862.

95.- Schroeder H.A. y Balassa J.J.(1966). Abnormal trace metals in man: Arsenic. *J. Chron. Dis.*, 19:85-106.

96.- Scoot N., Hatlelid M.K., Mackenzie E.N. y Carter E.D.(1993). Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.*, 6:102-106.

97.- Shannon R.L. y Strayer D.S.(1989). Arsenic induced skin toxicity. *Human. Toxicol.*, 8:99-104.

98.- Shapiro S.K. y Schlenk F.(1965). Transmethylation and methionine biosynthesis. The University of Chicago Press. Chicago.

99.- Sies H. y Graf P.(1985). Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopresin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem. J.*, 226:545-549.

100.- Squibb S.K., y Fowler B.A.(1983). The toxicity of arsenic and its compounds in: Biological and enviromental effects of arsenic. Fowler Ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

101.- Stramentinoli G.(1987). Pharmacologic aspects of S-adenosylmethionine. *Amer. J. of Med.*, 83(suppl 5A):35-42.

102.- Stramentinoli G. y Catto E.(1976). Pharamacokinetics studies of S-Adenosyl-L-Methionine (SAME) in several animal species. *Pharmacol. Res. Commun.*, 8:211-218.

103.- Stramentinoli G., Gualano M. y Galli-Kienle M.(1979a). Intestinal Absortion of S-adenosyl methionine. *J. of Pharmacol. Exper.* 209:323-326.

104.- Stramentinoli G., Pezzoli C. y Galli-Kienle M.(1979b). Protective role of S-adenosyl-L-methionine again acetaminophen-induced mortality and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharmacol.* 28:3567-3571.

105.- Tam G.H., Charbonneau S.M., Bryce F. y Lacroix G.(1978). Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of ⁷⁵As. *Annal. Biochem.*, 86:505-511.

106.- Tam G.K., Charbonneau S.M., Bryce F., Pomroy C., y Sandi E. (1979). Metabolism of inorganic arsenic [^{74}As] in human following oral ingestion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50:319-322.

107.- Tseng W.P., Chu H.M., How S.W., Fong J.M., Lin C.S. y Yeh S. (1968). Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenic in Taiwan. *J. Natl. Cancer Ins.*, 48:453-63.

108.- U.S.A. Occupational Safety and Health Administration.(1983). Occupational Exposure to Inorganic Arsenic. *Fed. Reg.*, 48:1864-1903.

109.- Vahter M.(1983). Metabolism of arsenic in biological and environmental effects of arsenic. Fowler Ed. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

110.- Vahter M. y Envall J.(1983). In vivo reduction of arsenate in mice and rabbits. *Environ. Res.*, 32:14-24.

111.- Vahter M., Friberg L., Rahnster B., Nygren A. y Nolin P. (1986). Airborn arsenic and urinary excretion of metabolites of inorganic arsenic among smelters workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 57:79-91.

- 112.- Vahter M., Marafante E. y Dencker L.(1984). Tissue distribution and retention of As-dimethylarsinic acid in mice and rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13:259-264.
- 113.- Vahter M. y Norin H.(1980). Metabolism of ⁷⁴As labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ. Res.*, 21:446-457.
- 114.- Valle B.L., Ulmer D.D. y Wacker W.E.(1960). Arsenic toxicology and biochemistry. *Arch. Ind. Health*, 21:132-151.
- 115.- Vidal-Lozano A. y Abud-Ochoa A.(1979). Arsenicismo crónico. *Bol. Med. Hosp. Inf.*, 36:849-861.
- 116.- Walsh P.R., Duce R.A. y Fasching J.L.(1979). Considerations of the enrichment, source and flux of arsenic in the troposphere. *J. Geophys. Res.*, 84:1719-1726.
- 117.- W.H.O.(1984). Guidelines for drinking-water quality. Vol 1. Recommendations. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 118.- W.H.O.(1992). Revision of the W.H.O. guidelines for drinking-water quality. Report of the final task group meeting. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

119.- Yamauchi, H., Kaise, T. y Yamamura Y.(1986). Metabolism and excretion of orally administered arsenobetaine in the hamster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:350-355.

120.- Yamauchi H. y Yamamura Y.(1985). Metabolism and excretion of orally administrated arsenic trioxide in the hamster. *Toxicology*, 34:113-121.

121.- Zaldivar R. y Guillier A.(1977). Enviromental and clinical investigations on endemic chronic arsenic poisoning in infant and children. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg.*, 165:226-234.