

H-FC  
A6-B  
954C  
1

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CONTAMINACION ARSENICAL  
EFECTOS Y LOCALIZACION TISULAR



Tesis para optar al Grado de  
Magister en Ciencias Biológicas  
Mención Fisiología

TESISTA

NELSON LUIS FUENTES ESCOBAR

TUTOR

FERNANDO ZAMBRANO BARAHONA

1 9 7 9

DEDICATORIA

Por mi familia y a mi familia



## A G R A D E C I M I E N T O S

La realización de este trabajo fue posible por el valioso y constante apoyo de los Drs. Fernando Zambrano B. y Mario Rosenmann A., quienes ante una idea ajena a su quehacer investigador supieron entregar la capacidad y dedicación necesarias para concretarla.

A Fernando, Mireya y Miguel debo manifestarles mi agradecimiento por haberme hecho sentir como en mi laboratorio y haberme entregado su ayuda, su amistad y su aprecio. Debo mencionar especialmente a Eddie González T. y M. Inés Navarrete I. por su valiosa colaboración y poder ser su amigo.

A mis colegas del Grupo Biología Celular y Genética, Sede Antofagasta agradezco la oportunidad para intentar ser mejor.

## I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIALES Y METODOS	10
RESULTADOS	17
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS	32

## R E S U M E N

Ante una variada y amplia, pero discutible información respecto a la ubicación y efecto del arsénico en el organismo, hemos estudiado en ratas arsenicadas con el agua de bebida la concentración del elemento tóxico en ciertos órganos, en los diferentes componentes de la sangre, su efecto en el metabolismo máximo y en la relación oxígeno hemoglobina.

Los resultados obtenidos indican que la mayor parte del arsénico se encuentra en la sangre y específicamente en el componente hemina de la hemoglobina, mientras que en órganos la concentración es muy baja. Se obtiene una relación lineal ( $r = 0,87$ ) al correlacionar el metabolismo máximo con la concentración de arsénico en los glóbulos rojos. Además, en ratas arsenicadas se observa un aumento de 0,6 unidades en el valor de  $n$  (efecto cooperativo de los grupos hemina).

Se discute el efecto del arsénico en relación a la posible hipoxia tisular debido al aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno al

aumentar el efecto cooperativo de los grupos hemina por la interacción con el tóxico, dificultando así la entrega de la cantidad adecuada de oxígeno a los tejidos, sobre todo en estados de alta demanda energética.

También se discute otros efectos en los animales tratados y que se refiere a la velocidad de crecimiento, disminución de la presión arterial y aumento de la actividad total de citocromo oxidasa de hígado.

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

El arsenicismo crónico afecta a los organismos hasta ahora estudiados, provocando alteraciones en varios órganos y tejidos. Estas alteraciones dependen de la cantidad de arsénico ingerido, de la duración de la ingestión y de la sensibilidad del tejido, pudiendo variar desde lesiones morfológicas leves hasta favorecer el desarrollo de cáncer, provocando incluso la muerte por ingestión excesiva (1, 2, 3, 4).

A nivel celular se ha probado la acción inhibidora del arsénico, demostrando que reacciona con los grupos sulfhidrilos de las enzimas que catalizan las reacciones que permiten la utilización del oxígeno para liberar energía, como por ejemplo la deshidrogenasa succínica (5, 6).

Los compuestos de arsénico más tóxicos son los trivalentes inorgánicos y de ellos el trióxido presenta la mayor toxicidad (7). Se ha probado su rápida transformación en ácidos metilarsínico y dimetilarsínico a través de la vía digestiva, postulando una reacción en el intestino para explicar tan rápida transfor-

mación (8).

La dosis letal varía de acuerdo a la vía de incorporación, siendo de 23,6 mg/kg rata cuando se ingiere en el agua de bebida. Al mantener animales con una dieta contaminada con arsénico algunos criterios de toxicidad son la velocidad de crecimiento, la apariencia y actividad física (9). En el caso de la rata estos parámetros no se alteran significativamente con el arsénico, aunque se ha descrito una disminución en la velocidad de crecimiento y un rizamiento del pelo en casos de deficiencia de este elemento (10).

Luego de la ingestión de agua con arsénico, los mamíferos lo eliminan por la orina, siendo esta eliminación empleada como criterio para determinar el grado de intoxicación del organismo, aunque últimamente Feussner y colaboradores han puesto en duda este procedimiento por no haber encontrado relación directa entre la concentración en la orina y la concentración presente en tejidos humanos (11, 12).

Independiente de lo anterior, la presencia de cantidades apreciables de arsénico en la orina implica el paso de una cantidad más alta que lo normal

de este elemento a través del riñón. Este hecho sumado a efectos arsenicales como lo reportado sobre nefrosis en animales pequeños y en el hombre, los cambios vacuolares y dilatación de los túbulos contorneados proximales en rata y en mono rhesus, el aumento del volumen urinario y la presencia de proteínas y glóbulos rojos en envenenamiento subagudo, permiten sospechar un efecto del tóxico en la función renal de ratas que ingieren agua arsenicada (13, 14, 9).

Cuando la ingestión es mayor que la excreción, se produce una acumulación simultánea del arsénico en diversos tejidos y órganos cuya magnitud depende principalmente del tipo de compuesto, de la vía de ingestión y del animal estudiado. En general, se postula que la acumulación es mayor en hígado, pulmón, bazo y riñón y menor en otros órganos (15). Se deposita además en tejidos tales como piel, músculos y huesos, siendo el pelo y las uñas los mayores depósitos del organismo, razón por la que se les utiliza, con frecuencia, como indicadores del grado de contaminación (16). Estos últimos constituyen además, un efectivo sistema de eliminación del arsénico.

En la mayoría de los mamíferos la acumulación ocurre en los órganos y el elemento se halla en la sangre sólo unas pocas horas después de la ingestión (8). En diversos tipos de intoxicación por arsénico se ha descrito alteraciones en el hematocrito, en la concentración de hemoglobina, anemia, leucopenia, alteraciones en el contenido de hierro total y capacidad de enlace del hierro, demostrándose la normalización de dichos parámetros al eliminar la ingestión del arsénico (9).

En la rata la acumulación ocurre principalmente en la sangre, lo que hace que esta especie sea un excelente modelo para estudiar no tan sólo la localización a nivel molecular, sino que además el efecto de este elemento en el transporte de oxígeno, ya que se ha demostrado la asociación del arsénico con la molécula de hemoglobina (17, 18).

Por otra parte, existen numerosas evidencias experimentales del efecto del arsénico sobre el metabolismo. Una de estas es la disminución del consumo de oxígeno al poner compuestos arsenicados en el ensayo in vitro de preparaciones de glóbulos rojos y mitocondrias de hígado de rata (19). Se ha demostrado además, que la intoxicación

crónica también disminuye el consumo de oxígeno en homogeneizados de hepatocitos de ratón (20). Por otra parte, Norris y Elliot probaron que la causa de la muerte de ratas intoxicadas era una hipotermia que alcanzaba disminuciones de 5 a 7,5 °C en siete horas (21).

Paralelamente a lo anterior se probó que el arsénico afecta procesos metabólicos tales como la glicólisis al inhibir a las enzimas deshidrogenasa gliceraldehído fosfato, fosfoenolpiruvato carboquinasa, fosfoglucomutasa y deshidrogenasa láctica. En el ciclo de Krebs se ha descrito la inhibición de las deshidrogenasas málica, succínica, alfa ketoglutárica e isocítrica (9). También a nivel mitocondrial el arsenato desacopla la fosforilación oxidativa en el complejo X~I (22). Un hecho común a todas las inhibiciones indicadas es la presencia de un alto contenido de grupos sulfhidrilos en las enzimas, los cuales tienen una gran afinidad por el arsénico (23, 24).

Por lo expuesto podemos inferir que aún no se demuestra en forma precisa la localización del arsénico, puesto que los datos son contradictorios ya que admitiendo su presencia en la sangre aún a bajas concentraciones, se lo indica además, depositado en ciertos órganos, sin precisar

si éstos han sido perfundidos o no. Algunos de los valores señalados pueden ser ciertamente explicados sólo por la presencia de sangre en ellos como contaminante. Un objetivo del presente trabajo es determinar la cantidad de arsénico en órganos perfundidos, ya que en ratas existe una alta concentración del elemento en la sangre y más específicamente en la hemoglobina.

Aunque los antecedentes permiten predecir una ubicación del arsénico en la globina por la presencia de grupos sulfhidrilos, no hay pruebas para descartar su ubicación en el grupo hemina. Creemos que si se determina la localización exacta del arsénico en la molécula de hemoglobina se podrá explicar mejor cualquier acción que ejerza a nivel sanguíneo, por lo que otro de nuestros objetivos es determinar arsénico en sangre de ratas arsenicadas, aislar hemoglobina y separar y determinar arsénico en sus componentes hemina y globina.

No obstante la objeción de muchos autores sobre la experimentación en la rata debido a su peculiar acumulación de arsénico en la sangre, pensamos que el estudio de posibles efectos en el transporte de oxígeno en condiciones de alta demanda energética puede extrapolarse de

este animal a otros mamíferos, pues si bien es cierto que en estos últimos la acumulación es relativamente breve, una ingestión prolongada podría tener en ellos idénticos efectos por alteración de la hemoglobina.

La disminución del consumo de oxígeno por acción del arsénico in vivo, aunque se explica a través de la variada acción sobre el sistema glicolítico y de fosforilación, debido a esta misma acción múltiple y por encontrarse tan asociado a la hemoglobina podría también explicarse por una alteración en el transporte de oxígeno por esta proteína. Parte de esta tesis está dirigida a probar esta hipótesis, determinando la relación entre concentración de arsénico en la sangre y disminución del metabolismo máximo in vivo e investigando el efecto del arsénico sobre la interacción oxígeno - hemoglobina.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

En todos los experimentos se usaron ratas Sprague - Dowley hembras de 45 días de edad.

Un grupo de ratas de 65 g de peso inicial fueron mantenidas con alimentación normal ad libitum y con agua potable conteniendo trióxido de arsénico en cantidad suficiente para una concentración de arsénico de 4 mg/l (p.p.m.) Paralelamente se mantuvo un grupo control en idénticas condiciones, pero con agua potable como bebida.

El peso de los animales fue controlado periódicamente durante ochenta días.

Cada siete días las ratas eran colocadas en jaulas metabólicas, con libre acceso al alimento y al agua, para recibir la orina en timol. Se midió el volumen excretado en 24 horas y en muestras de ella se realizaron las determinaciones de iones sodio y potasio y de arsénico.

Al cabo de ochenta días los animales fueron anestesiados con nembutal sódico Abbott con dosis de 5 mg por cada 100 g. Se canuló la arteria carótida conectándola a un polígrafo Gilson por medio de un transductor Stat-ham para medir y registrar la presión arterial y la fre-

sangre fue investigada en la siguiente forma: Una vez determinado el arsénico en la sangre, un volumen de ella (5 ml) fue centrifugado a 1900 x g por 10 minutos, se separó el plasma de los glóbulos y en ambos se determinó arsénico. Los glóbulos rojos previamente lavados con suero fisiológico fueron hemolizados durante toda una noche resuspendiéndolos en una solución de ácido acético 0,2 %, se separó la hemoglobina por succión luego de centrifugar a 12000 x g durante 10 minutos, se lavaron las membranas precipitadas tres veces consecutivas con la solución de ácido acético y en ambas fracciones se determinó la cantidad de arsénico. Un ml del hemolizado ( 7 g Hb /100) fue agregado gota a gota en 25 ml de acetona ácida ( HCl 1 % v/v ) a -4 °C. El precipitado blanco de globina fue separado por centrifugación del sobrenadante de hemina y fue lavado tres veces con la acetona ácida (25). Luego se procedió a secarla al vacío. Tanto en la globina precipitada como en la solución de hemina se determinó proteínas, hierro y arsénico.

Otro grupo de ratas, intoxicadas durante sesenta días con agua con 12 p.p.m. de arsénico, fue utilizado para determinar su metabolismo máximo, midiendo el consu-

mo de oxígeno en un respirómetro manométrico de circuito cerrado y en una atmósfera 80% He - 20% O<sub>2</sub> a - 10 °C durante tres horas, de acuerdo a la técnica descrita por Rosenmann y Morrison (26).

Un tercer grupo de ratas fue intoxicado durante noventa días con agua que contenía 20 p.p.m. de arsénico. Al término de ellos se anestesiaron como se describió anteriormente, se expuso la aorta abdominal y por ella se extrajeron 5 - 8 ml de sangre, la que fue recibida en un tubo heparinizado. Muestras de 5 ml fueron centrifugadas a 1900 x g durante 10 minutos. El plasma fue descartado y el precipitado de elementos figurados fue lavado tres veces con 5 ml de una solución de Na Cl 0,9 %. Los glóbulos lavados fueron hemolizados tal como se describió más arriba. Enseguida se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos y se tomó una alícuota de 0,1 ml que fue llevada a un volumen final de 10 ml con buffer fosfato 0,04 M pH 7,4. De esta solución de hemoglobina se tomaron 6 ml los que se pusieron en un tonómetro, al cual se podía extraer el aire hasta lograr un vacío de 1 mm Hg. La solución se agitó durante 5 minutos en un baño a 20 °C y se determinó su densidad óptica a 540, 560 y 576 nm. Con estos valores de



absorbancia se obtuvo la concentración de desoxihemoglobina. Luego se fueron agregando cantidades conocidas de aire y se midió las absorbancias a las mismas longitudes de onda. Por último el tonómetro fue abierto y agitado por 5 minutos, al cabo de los cuales se midió la absorbancia a las tres longitudes de onda indicadas determinando así los valores de densidad óptica para la oxihemoglobina. Los detalles de la técnica y la confección de la curva de afinidad de oxígeno corresponden al método descrito por Benesch, McDuff y Benesch (27, 28).

#### Determinaciones

El arsénico fue determinado por el método de Gutzeit para producir la arsina y modificado para recibirla en dietilditiocarbamato de plata, para medir el complejo coloreado a 540 nm según Vasak y Sedivec (29, 30), previa digestión de la materia orgánica mediante ácido sulfúrico - ácido nítrico 1:5 v/v en caliente.

Las determinaciones de sodio y potasio se hicieron por fotometría de llama usando un fotómetro Eppendorf.

La concentración de hemoglobina fue medida de acuerdo al método de la cianmetahemoglobina tomando

20 microlitros de sangre o solución de hemoglobina y agregándola a 5 ml de reactivo de Drabkin, luego de 5 minutos se leyó a 540 nm usando como referencia una solución de reactivos. La concentración fue determinada empleando una curva de calibración confeccionada con soluciones estandar Merck (31).

El hierro hemínico fue medido por el método de la batofenantrolina según Nakashima y Sahai (32) en muestras digeridas con 0,1 ml de ácido perclórico concentrado y 0,1 ml de agua oxigenada en un baño hirviente. Luego de la digestión se agregó 0,1 ml de hidroxilamina 10 %, al cabo de 5 minutos se agregó 1 ml de batofenantrolina 1 mM y adicionando inmediatamente 1 ml de piridina. Se llevó a un volumen final de 5 ml con agua destilada y se leyó su absorbancia contra un blanco de reactivos a 533 nm, determinándose la concentración en una curva de calibración confeccionada con un estandar de sulfato ferroso 0,05 mg / ml.

Las proteínas de todos los ensayos se determinaron según el método de Lowry (33) usando como estandar una solución de albúmina de suero de bovino y leyendo la densidad óptica a 750 nm.

La determinación de actividad de citocromo c oxígeno óxidoreductasa (1.9.3.1.) fue ensayada según la técnica de Yonetani (34), usando como sustrato el citocromo c reducido (10 mg / ml) con ditionito y dializado 12 horas contra buffer fosfato 0,01 M pH 7,0. Se registró la disminución de la absorbancia del citocromo c reducido a 550 nm.

Las mediciones de densidad óptica fueron realizadas en un espectrofotómetro Beckman DU-2 con excepción de la absorbancia del citocromo c que se registró en un espectrofotómetro Unicam SP-800.

Todas las centrifugaciones fueron realizadas en una centrífuga refrigerada Sorvall RC 2-B.

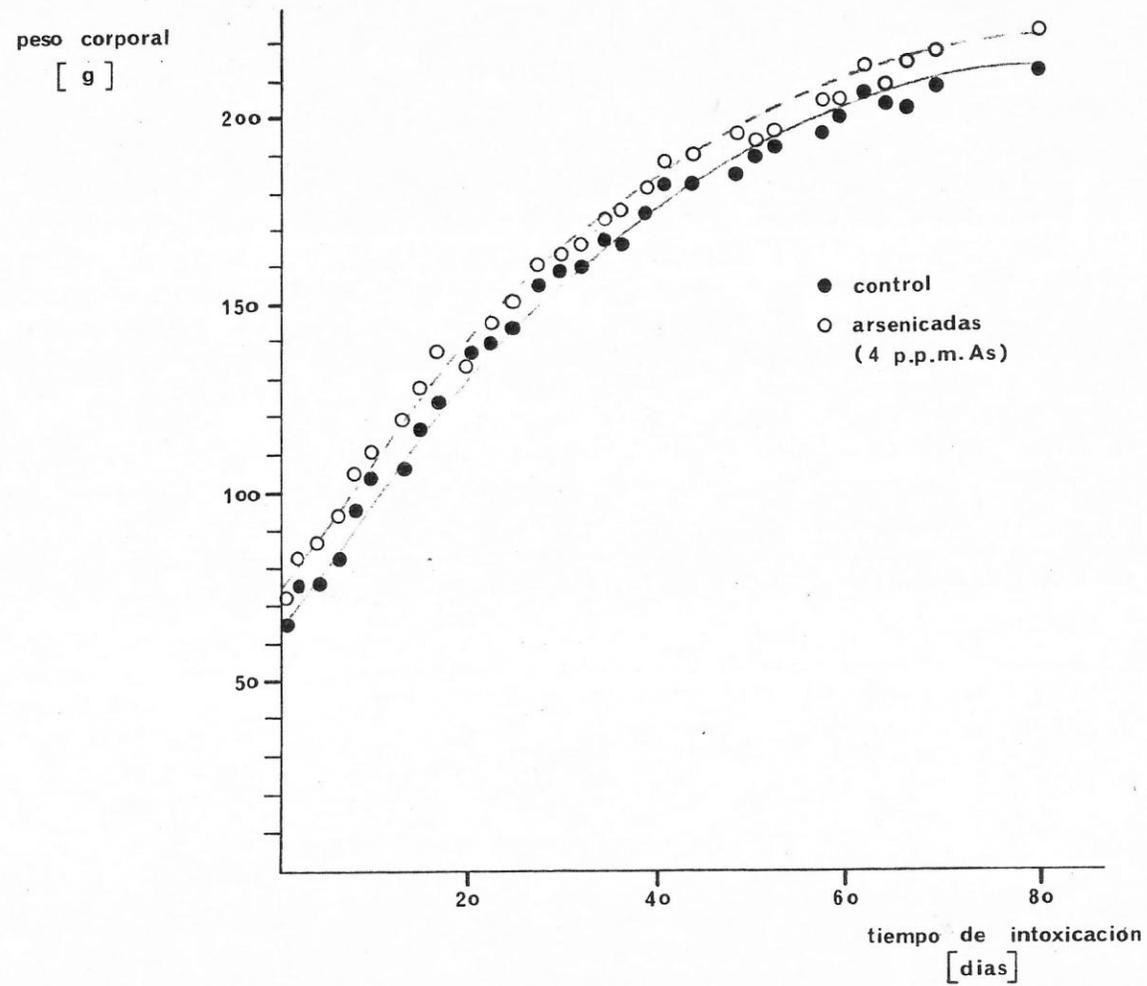
## R E S U L T A D O S

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento del grupo de ratas controles y del grupo de ratas arsenicadas durante 80 días con agua que contenía 4 p.p.m. de arsénico. Aunque las curvas son similares y no difieren significativamente en ninguna de las treinta medidas de peso, la curva de las ratas arsenicadas muestra un leve aumento sobre la de los controles. Igualmente se observa un pequeño aumento al determinar el peso ganado y la relación peso final/ peso inicial, como puede observarse en la Tabla 1.

El volumen de agua ingerida es en promedio 30 ml en 24 horas para ambos grupos. Al calcular el arsénico ingerido se nota que es superior a la cantidad de arsénico excretado en orina (Tabla 2) siendo el porcentaje de excreción menor cuando aumenta la cantidad de arsénico ingerido.

En la Tabla 3 se indican los valores para iones sodio y potasio y para arsénico encontrados en la orina recogida durante 24 horas. Se observa que a un aumento de la concentración de arsénico en el agua de

**Figura 1** Curva de peso corporal de ratas.



T A B L A 1.- PESO CORPORAL PROMEDIO DE RATAS

	PESO INICIAL [g]	PESO 80 DIAS [g]	PESO GANADO [g]	$\frac{\text{PESO FINAL}}{\text{PESO INICIAL}}$
CONTROL	66 $\pm$ 17	212 $\pm$ 18	146 $\pm$ 4,9	3,29 $\pm$ 0,68
ARSENICADAS (4 p.p.m. As)	63 $\pm$ 15	221 $\pm$ 20	158 $\pm$ 14,3	3,51 $\pm$ 0,22

Los valores corresponden al Promedio  $\pm$  Desviación estandar de cuatro animales.

T A B L A 2 .- ARSENICO INGERIDO Y ELIMINADO POR ORINA EN 24 HORAS

	Arsénico ingerido	Arsénico excretado	Porcentaje excreción
	[ug]	[ug]	[%]
CONTROL	0,9	0,4	44
ARSENICADAS (4 p.p.m. As)	128	2,6	2

Los valores corresponden al promedio de cuatro animales mantenidos durante 80 días.

Las cantidades de arsénico son el producto del volumen x concentración de agua y orina

T A B L A 3.- EXCRECION URINARIA DE SODIO POTASIO Y ARSEENICO

			CONTROL	ARSENICADAS (4 p.p.m. As)
SODIO	$\left[ \frac{\text{meq } 24 \text{ h}}{\text{g}} \right]^{0,73}$	$\times 10^{-2}$	$1,7 \pm 0,59$	$1,8 \pm 0,52$
POTASIO	$\left[ \frac{\text{meq } 24 \text{ h}}{\text{g}} \right]^{0,73}$	$\times 10^{-2}$	$2,8 \pm 0,80$	$2,5 \pm 0,80$
ARSEENICO	$\left[ \frac{\text{ug } 24 \text{ h}}{\text{g}} \right]^{0,73}$	$\times 10^{-2}$	$0,95 \pm 0,3$	$4,6 \pm 1,7$
VOLUMEN DE ORINA	[ml]		$5,1 \pm 1,7$	$4,9 \pm 1,0$

Los valores representan el Promedio  $\pm$  Desviación estandar de cuatro animales intoxicados durante 80 días.

bebida corresponde un aumento de la concentración del elemento en la orina. El grupo control consumió agua potable, la cual contiene normalmente 0,03 p.p.m. de arsénico, lo que explica la cantidad del tóxico en la orina de dicho grupo, valor 5 veces inferior al encontrado en el grupo arsenicado. El volumen urinario es similar en ambos grupos, encontrando un valor de 5 ml en 24 horas.

Las cantidades de sodio y potasio excretadas no presentan variaciones significativas entre los grupos y están indicadas como  $[\text{meq en 24 h / g}]^{0,73}$  para expresar la eliminación por unidad de superficie corporal (35).

La actividad total de citocromo c oxidasa, medida en 9 ratas intoxicadas durante 90 días con 20 p.p.m. de arsénico en el agua de bebida, dió como valor promedio  $117 \pm 39$  uM cit c /min, siendo 57% superior al valor promedio obtenido del mismo número de ratas controles,  $74,5 \pm 8,6$  uM cit c / min. Dicho cambio presenta un nivel significativo con  $P < 0,05$ .

Las Tablas 4 y 5 muestran los valores promedios de presión arterial, frecuencia cardíaca, hematocrito, concentración de hemoglobina y cantidad de hierro total en sangre. En la frecuencia cardíaca, aunque el valor

T A B L A 4.- EFECTO DEL ARSENICO SOBRE ALGUNOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS

	FRECUENCIA CARDIACA [latidos / min]	PRESION ARTERIAL [mm Hg]	HEMATOCRITO [%]
CONTROL	490 $\pm$ 14,1	146 $\pm$ 4,1	43,5 $\pm$ 2,3
ARSENICADAS (4 p.p.m.As)	495 $\pm$ 15,0	129 $\pm$ 18 *	41,2 $\pm$ 1,5

Los valores corresponden al Promedio  $\pm$  Desviación estandar de cuatro animales intoxicados durante 80 días.

\* P 0,025 al aplicar test de Student.

T A B L A 5.- CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA HIERRO Y ARSENICO EN SANGRE

	HEMOGLOBINA [g / 100 g]	HIERRO [ug/ml]	ARSENICO [ug/ml]
CONTROL	14,3 ± 1,2 (9)	439 ± 49 (4)	10,6 ± 0,82 (3)
ARSENICADAS (20 p.p.m. As)	13,6 ± 0,7 (7)	456 ± 16 (4)	208 ± 2,8 (3)

Los valores corresponden al Promedio ± Desviación estandar  
 Los números en paréntesis señalan el número de ratas mante-  
 nidas durante 90 días.

promedio del grupo experimental es un poco mayor no se diferencia en forma significativa de los controles. La presión arterial se observa disminuida en un 16 % en el grupo de animales arsenicados ( $P < 0,025$ ) a pesar que el grupo control muestra un aumento sobre el valor normal, 130 mm Hg. Las determinaciones de hematocrito y de hemoglobina muestran valores muy similares para los animales testigos y tratados estando éstos en rangos señalados como normales, 41 - 43 % hematocrito y 13 - 14 g /100 de hemoglobina. El valor promedio encontrado para hierro total es 460 ug /ml de sangre de igual hematocrito en ambos grupos, valor que corresponde a 0,33%, muy aproximado al 0,347 % que se calcula de la relación de pesos entre los cuatro átomos de hierro hemínico y la molécula de hemoglobina. La concentración de arsénico en la sangre del grupo tratado es 10 veces superior a la de los controles alcanzando un promedio de 98,5 ug As /ml de sangre cuando ingieren agua con 4 p.p.m. de arsénico y es 20 veces superior ( $\bar{X} = 208 \pm 2,8$ ) cuando ingieren agua con 20 p.p.m. del elemento.

Al extraer órganos de los animales perfundidos y analizar el arsénico en ellos se detectan cantidades

del elemento cuya variación entre animales controles y arsenicados depende del órgano (Tabla 6 ). Así, en el riñón y corazón se mantienen constante las concentraciones en ambos grupos, en cambio en el pulmón y bazo las concentraciones aumentan 34 y 10 veces respectivamente al expresar las concentraciones en ug As/ g de órgano. Cambios semejantes se encuentran al medir la concentración en ug As / mg proteínas. Se puede observar en la misma tabla que las proteínas de un mismo órgano de ratas controles e intoxicadas no difieren.

Al tabular los valores encontrados para concentraciones de arsénico en la sangre y alguno de sus componentes, puede observarse en la Tabla 7 que el 88% del arsénico de la sangre se recupera en la fracción de hemoglobina. Las determinaciones en membranas de glóbulos indican cantidades muy bajas del tóxico. Al separar la hemoglobina en sus componentes hemina y globina con acetona ácida el 99,5 % del arsénico se encuentra en la hemina.

La medición del consumo de oxígeno en los animales sometidos a - 10 °C muestra que en el caso de los arsenicados es un 20 % menor que en los controles

T A B L A 6 .- CONCENTRACION DE ARSENICO EN ORGANOS

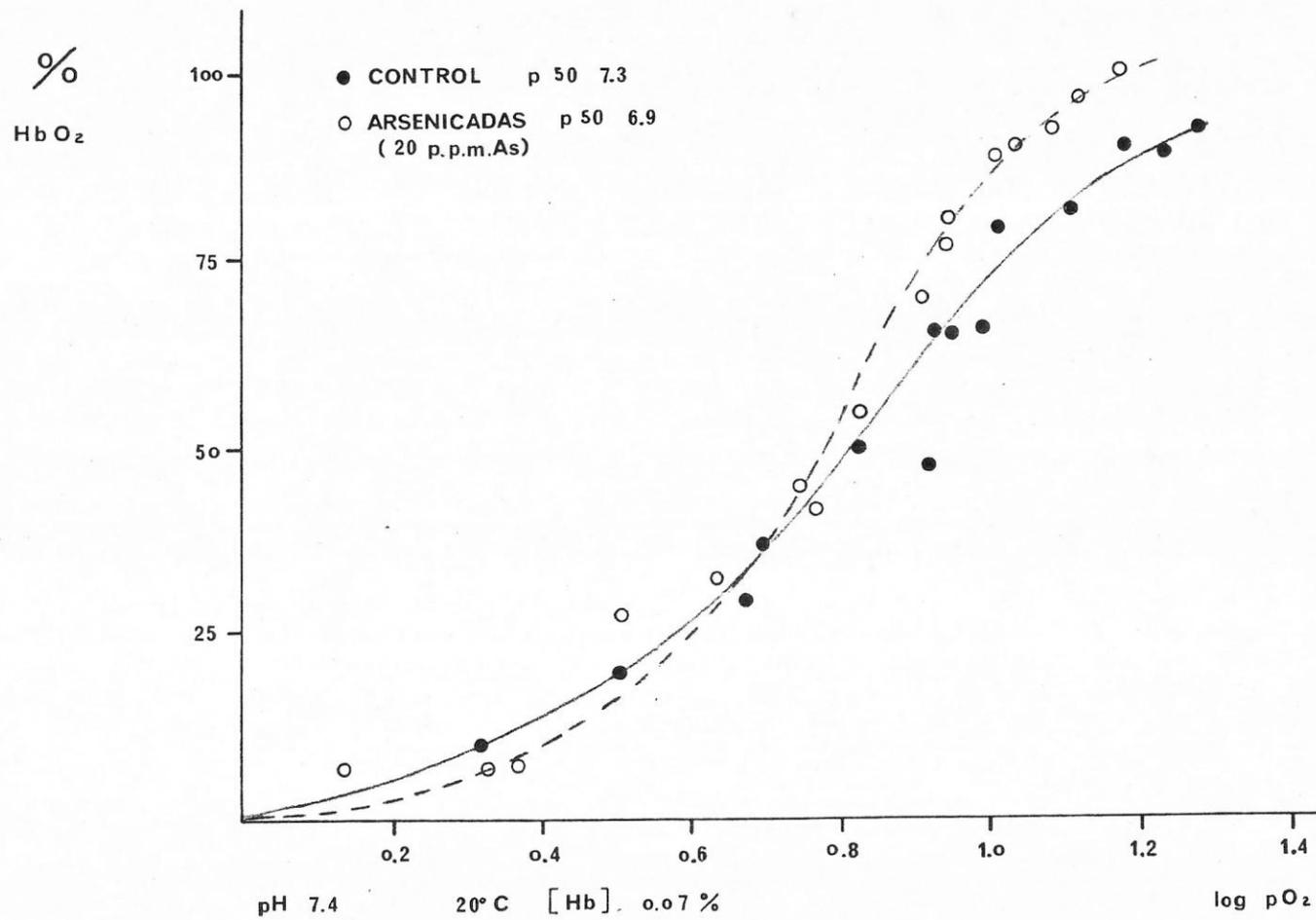
	ug / g órgano		ug / mg proteínas		mg prot./órgano	
	C	A	C	A	C	A
RINON	0,15	0,28	0,0013	0,0022	205	211
CORAZON	0,26	0,35	0,0017	0,0028	125	115
PULMON	0,13	3,38	0,0022	0,044	144	161
BAZO	0,70	7,30	0,0032	0,037	104	108
SANGRE	10,9	98,5				

Los valores corresponden al Promedio de órganos de cuatro animales

C = Control

A = Arsenicadas ( 4 p.p.m. As)

**Figura 3 Efecto del As en la curva de equilibrio de Hemoglobina de rata.**



T A B L A 7 .- LOCALIZACION DE ARSENICO EN LA SANGRE

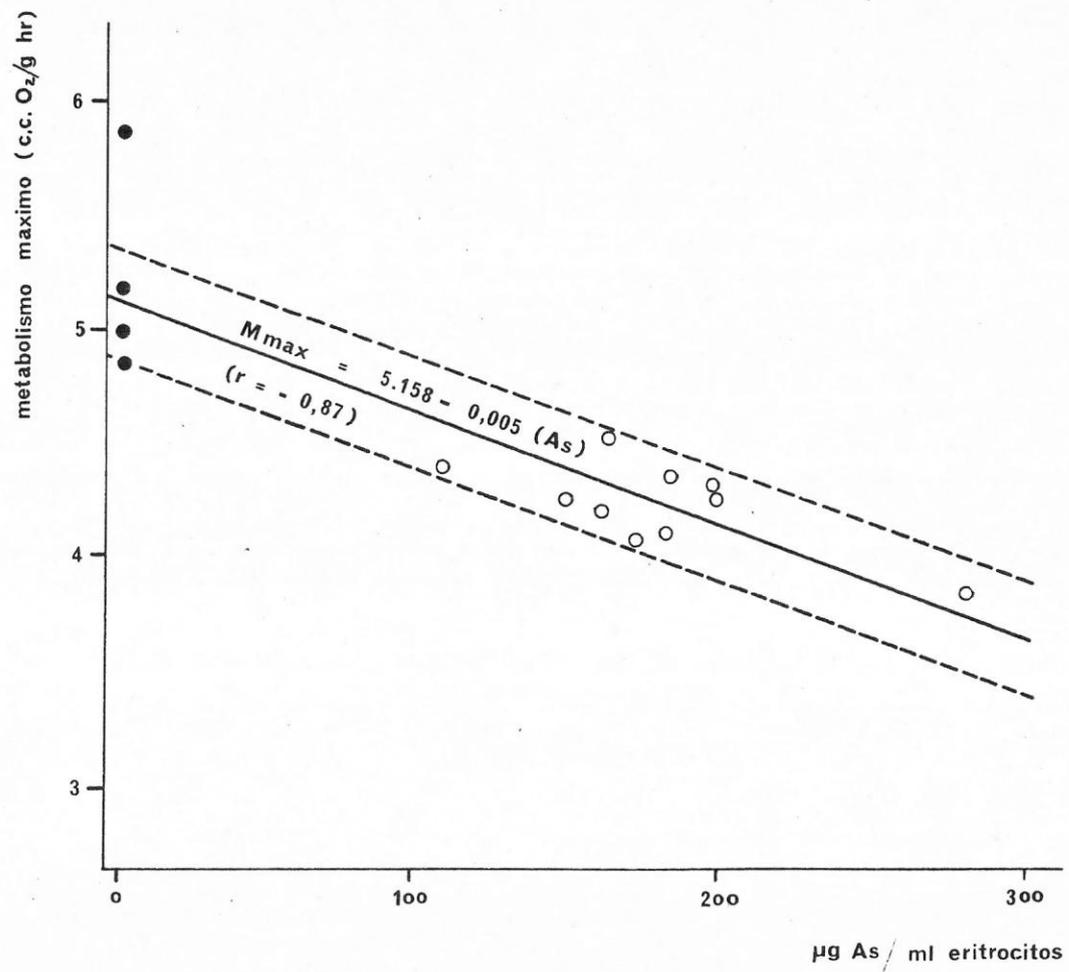
	SANGRE	HEMOGLOBINA	PLASMA Y MEMBRANAS	HEMINA	GLOBINA
PORCENTAJE	100	88	12	99,5	0,5
mg As / g Hb	1,6	1,4			

Los porcentajes de hemina y globina están en relación al total de arsénico presente en hemoglobina.

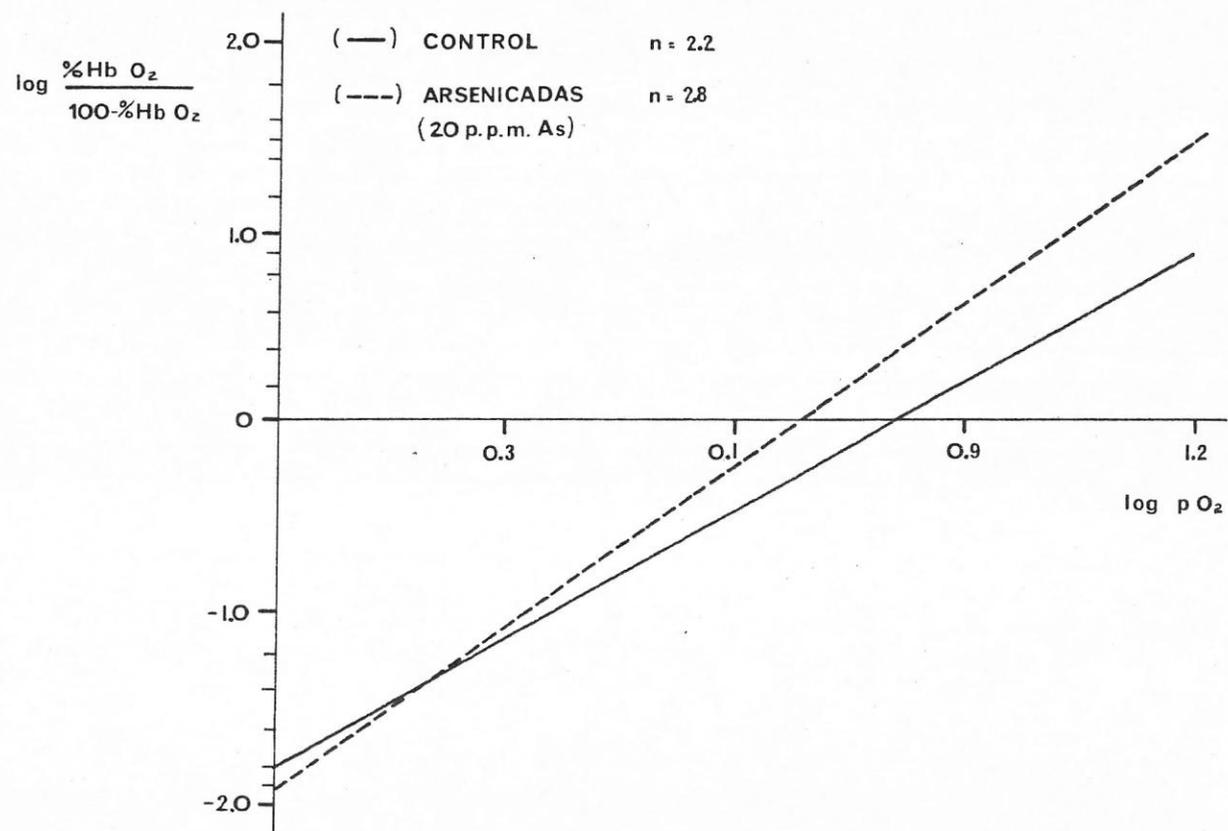
como se puede observar en la Figura 2, en que se grafica el consumo máximo de oxígeno y la concentración de arsénico en los glóbulos rojos. Los controles alcanzan un valor de 5,25 c.c. de  $O_2$  /g.h que es el valor descrito como normal para esta especie, en tanto que las ratas con 150 - 200 ug As / ml de eritrocitos sólo tienen un consumo promedio de 4,21 c.c. de  $O_2$  / g.h. La relación entre estos parámetros se muestra lineal al aplicar la regresión lineal a los valores experimentales ( $r = 0,87$ ).

En la Figura 3 se muestra las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina, graficadas en función del porcentaje de hemoglobina oxigenada y el log de la presión parcial de  $O_2$  mientras que en la Figura 4 se observa la transformación de dichas curvas en rectas, graficadas en función del log de  $\% HbO_2 / 100 - \% HbO_2$  y el log de la presión parcial de  $O_2$ . La pendiente de estas rectas determina el valor de  $n$ , que es una medida de la interacción cooperativa entre los grupos hemina para ligarse con el oxígeno (36). La comparación de los  $p_{50}$  ( presión de  $O_2$  a la cual está oxigenada el 50 % de la hemoglobina) de la hemoglobina de ratas arsenicadas y controles indica un leve desplazamiento de la curva

**Figura 2** Relación entre metabolismo máximo y concentración de As en eritrocitos.



**FIGURA 4 Efecto del As sobre la interacción hemina - hemina**



de los animales arsenicados hacia la izquierda, en tanto que el valor de  $n$  para este grupo es 0,6 unidades mayor que para los controles, los cuales presentan un valor 2,2 muy similar a los calculados para los datos determinados por Foreman (37) y por Gray (38). Estos resultados indican una mayor afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los animales intoxicados.

## DISCUSION

Estadísticamente no es significativo el efecto del arsénico sobre la velocidad de crecimiento de las ratas. Sin embargo, en este trabajo se confirma el hecho ya inferido de los trabajos de Schroeder (13) y de Tamura (39) que las ratas arsenicadas crónicamente por el agua de bebida con dosis de 5 y 8 p.p.m. respectivamente, tienen un crecimiento levemente superior a los controles. Esto se comprueba calculando, a partir de los datos de los trabajos mencionados, la relación peso final / peso inicial (% peso ganado) el cual es siempre mayor en los animales tratados, al igual que lo encontrado por nosotros en los grupos de 4 y 12 p.p.m.. No observamos lo mismo en el grupo de 20 p.p.m. Estos valores nos permiten señalar que habría una leve tendencia a un mayor crecimiento por efecto del arsénico, lo que relacionado con la disminución del crecimiento descrito para la deficiencia de arsénico en la rata (10), permitiría postular que el arsénico en dosis entre 4 y 12 p.p.m., parece favorecer el crecimiento de estos animales.

El paso del arsénico a través del riñón, aún provocando trastornos en la estructura del órgano de varias especies estudiadas, parece no influir en la elimi-

nación de los iones ni en la diuresis, por lo que podemos inferir que, aparentemente, en la rata este elemento ya transformado en ácido dimetilarsínico es rápidamente filtrado desde la sangre y excretado en la orina sin dañar el riñón.

El aumento de la actividad total de citocromo c oxidasa que se observa en las ratas arsenicadas podría ser explicado como un probable mecanismo de reacción de la célula, la cual ante una pequeña disminución de oxígeno sintetizaría más enzima, con lo que se mantendría el nivel de actividad normal. Sin embargo, ante requerimientos muy altos este mecanismo no estaría en condiciones de actuar por ser el sustrato el deficiente.

Otra posible explicación a este aumento es la activación de la enzima por el arsénico a bajas concentraciones, fenómeno ya descrito para otras enzimas, por ejemplo deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato y para el proceso de fosforilación.

Se ha descrito la acumulación de arsénico en diferentes órganos, pero en ninguna de estas determinaciones se ha realizado la perfusión del organismo del cual se han extraído, por lo que suponemos que en la me-

dición de la concentración de arsénico se ha incluido la correspondiente a la cantidad de sangre contenida en ellos. En riñón y corazón de animales arsenicados, o sea con 10 veces más arsénico en su sangre que los controles, pero suficientemente perfundidos encontramos que la cantidad de arsénico en ellos es igual que la existente en los órganos de ratas controles. Los valores encontrados en pulmón y bazo, 30 y 10 veces mayor en animales tratados, por no estar suficientemente perfundidos, pueden ser explicados simplemente por la presencia de menos de 0,1 ml de sangre contaminante, de manera que podemos señalar que el depósito de arsénico en los órganos propiamente tales es muy bajo, encontrándose prácticamente la totalidad del arsénico en la sangre. Esta acumulación, de acuerdo a los datos obtenidos, parece no influir en parámetros hematólogicos como hematocrito, concentración de hemoglobina y contenido de hierro hemínico. Por otra parte, sin influir en la frecuencia cardíaca, este elemento provocaría una disminución de la presión arterial, efecto que puede relacionarse con los datos reportados para varios casos de intoxicación en el hombre, en los cuales también se describe una disminución de la presión arterial (40,41). La

explicación de esta disminución podría buscarse en la variación de la resistencia periférica, ya que se ha descrito al arsénico como un potente veneno capilar. Con la dosis usada podríamos suponer un daño a las células de los capilares, lo que impediría la vasoconstricción necesaria para regular la presión. Por otra parte Tseng (9) ha sugerido un efecto sobre el control neural de las arterias. Naturalmente, es necesario diseñar experimentos específicamente en esa dirección para verificar esta hipótesis.

En el presente trabajo hemos encontrado que en la sangre de rata, el arsénico se encuentra casi en su totalidad asociado a la hemina, luego de efectuada la separación de la hemoglobina en sus dos componentes moleculares. Estos datos están en desacuerdo con los reportados por Hunter y colaboradores (42) en 1942 y por Lanz y colaboradores (17) en 1950, quienes lo encontraron en la globina. Ambos trabajos fueron hechos en animales arsenicados por vía intramuscular y el arsénico fue determinado como trazador radiactivo. Reiterando que la ubicación y acción del arsénico en el organismo depende de la vía de entrada, debemos suponer que en el caso de la contaminación crónica por vía oral el compuesto formado tendría

afinidad por el grupo hemina mientras que el compuesto inyectado por vía intramuscular tendría afinidad por la globina. Esta posible explicación está basada en el hecho que la transformación del arsénico inorgánico en ácido dimetilarsínico es mucho más lenta cuando es inyectado vía intramuscular que cuando se ingiere por vía digestiva (8). Hunter y Lanz determinaron el arsénico a más tardar luego de cuatro días de la inyección, por lo que podría pensarse que la transformación en ácido dimetilarsínico ha ocurrido en una pequeña fracción de la dosis administrada. Nosotros lo hemos determinado a lo menos 50 días después de iniciada la ingestión o sea que en nuestro experimento los mecanismos para transformar el arsénico han tenido el tiempo suficiente para lograr el cambio de casi todo el elemento.

Buscando un sistema más rápido de contaminación de la sangre intentamos contaminarla in vitro incubándola a 37 °C en buffer fosfato pH 7,4 glucosado y con solución de trióxido arsenioso ( 4 p.p.m.) durante dos horas. Sin embargo, luego de dializar la hemoglobina incubada y determinar arsénico en ella, no encontramos el elemento, lo que estaría indicando que la reacción ocu-

rre in vivo, o que su incorporación requiere de un tiempo mayor que dos horas de incubación, lo que nos parece dudoso.

Por último señalemos que Lanz determinó un 30% de radioactividad en hemina, proponiendo que ese porcentaje se debe a un rompimiento de enlaces entre arsénico y sulfhidrilos de la globina por efecto de la denaturación a 50 °C. Nosotros efectuamos la separación a -4°C para evitar la denaturación y no obstante encontramos el arsénico casi exclusivamente en la hemina, por lo que suponemos que ese 30 % corresponde al porcentaje de arsénico transformado en las condiciones del experimento de Lanz.

Con todos estos datos postulamos que el arsénico inorgánico por tener alta afinidad por los grupos sulfhidrilos se uniría in vivo a la globina, mientras que el ácido dimetilarsínico tendría más afinidad por la hemina.

Las mediciones de consumo máximo de oxígeno señalan que ante una alta exigencia energética la maquinaria metabólica se ve afectada por el arsénico, mientras que en condiciones de baja demanda energética este efec-

to no es notorio ya que el consumo de oxígeno de las ratas arsenicadas no se diferencia del consumo de los animales controles. La alta concentración en la sangre y la baja concentración en órganos sugiere que la principal acción del elemento se efectuaría a nivel de la sangre. Al graficar el consumo de oxígeno en función de la concentración de arsénico en la sangre se obtiene un coeficiente de correlación de 0,87 para la regresión lineal lo que está sugiriendo una relación directa entre ambos parámetros. Des esto podríamos inferir que el arsénico actuaría a nivel del transporte de oxígeno por la hemoglobina.

Los resultados obtenidos al estudiar las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina tienden a indicar una mayor afinidad cuando la hemoglobina está contaminada y dicha afinidad estaría aumentada principalmente por efecto sobre la acción cooperativa de los grupos hemina, ya que la variación de  $n$  es más evidente que la variación del  $p_{50}$ . Este efecto coincide con la localización que hemos encontrado para el arsénico en la molécula de hemoglobina, es decir, el arsénico interactuaría en la hemina en tal forma que aumentaría la afinidad de

dicha molécula por el oxígeno. Así, ante una alta demanda energética, la hemoglobina no podría entregar la cantidad de oxígeno necesaria a los tejidos, sumándose este efecto a las inhibiciones enzimáticas ya vastamente estudiadas a nivel citoplasmático y mitocondrial.

Finalmente, podemos indicar que otra de las situaciones que queda por ser analizada necesariamente es la medición, ante una demanda extrema de energía, de los parámetros que han mostrado alguna variación en condiciones normales de esfuerzo metabólico, como por ejemplo la afinidad por oxígeno de la hemoglobina y la actividad de citocromo c oxidasa. Un segundo aspecto es el estudio más específico del tipo y cantidad de enlaces que permiten la unión arsénico - hemina.

Sería interesante también diseñar un modelo experimental para determinar en forma exacta los rangos de concentración de arsénico presente en la célula y poder inferir de ello la exacta influencia del tóxico por su reacción con la hemoglobina.

## C O N C L U S I O N E S

1. El arsénico suministrado en dosis de 4 p.p.m. parece aumentar la velocidad de crecimiento de las ratas.
2. La mayor concentración del arsénico se encuentra en la sangre y su presencia en ella da cuenta de los valores encontrados en los órganos, en los cuales la concentración es muy pequeña.
3. Al separar la hemoglobina en sus dos componentes principales, hemina y globina, el arsénico se localiza en un 99,5 % en la hemina.
4. El metabolismo máximo se reduce en un 20 % en ratas que tienen en su sangre concentraciones de 150 - 200 ug As /ml de eritrocitos, encontrando una relación directa entre ambos parámetros.
5. La interacción hemoglobina - oxígeno parece ser favorecida por la presencia del arsénico en la molécula de hemina aumentando el efecto cooperativo de ella.
6. La reducción del metabolismo máximo puede explicarse por una hipoxia tisular debido al aumento de afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, dificultando su entrega a los tejidos.

## R E F E R E N C I A S

1. MC CUTCHEN, J., UTTERBACK, R. 1966.  
Chronic arsenic poisoning resembling muscular dystrophy.  
Southern Med. J. 59: 1139.
2. ROBSON, A., JELLIFFE, A. 1963.  
Medicinal arsenic poisoning and lung cancer  
British Med. J. 2: 207.
3. HADLER, H., COOK, G. 1979.  
The mitochondrial activation of sulfate and arsenate  
and their role in carcinogenesis.  
J. Environm. Pathol. Toxicol. 2: 601.
4. ZALDIVAR, R. 1974.  
Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs  
caussing endemic chronic poisoning.  
Beit. Pathol. 151: 384.
5. REIN, K., BORREBAEK, B., BREMER, J. 1979.  
Arsenite inhibits oxidation in isolated rat liver  
mitochondria.  
Biochim. Biophys. Acta 574: 487.

6. PETERS, R., SINCLAIR, H., THOMPSON, R. 1946.  
An analysis of the inhibition of piruvate oxidation by arsenicals in relation to the enzyme theory of vesication.  
Biochem. J. 40: 516.
7. FROST, D. 1967.  
Arsenicals in biology - retrospect and prospect.  
Fed Proc. 26: 194.
8. CHARBONNEAU, S., TAM, G., BRYCE, F., ZAWIDZKA, Z., SANDI, E. 1979.  
Metabolism of orally administered inorganic arsenic in the dog.  
Toxicol. Letters 3: 107.
9. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants, Arsenic. National Academy of Sciences, Washington D.C. 1977.
10. NIELSEN, F., GIVAND, S., MIRON, D. 1975.  
Evidence of a possible requirement for arsenic by the rat.  
Fed. Proc. 34: 923.

11. FREEMAN, H., UTHE, J., FLEMING, R., ODENSE, P.,  
ACKMAN, R., LANDRY, G., MUSIAL, C. 1979.  
Clearance of arsenic ingested by man from arsenic  
contaminated fish.  
Bull. Environm. Contam. Toxicol. 22: 224.
12. FEUSSNER, J., SHELBURNE, J., BREDEHOEFT, S., COHEN, H.  
1979.  
Arsenic- induced bone marrow toxicity: ultrastructural  
and electron-probe analysis.  
Blood 53: 820.
13. SCHROEDER, H., KANISAWA, M., FROST, D., MITCHENER, M.  
1968.  
Germanium, tin and arsenic in rats: effects on growth,  
survival, pathological lesions and life span.  
J. Nutrition 96: 37.
14. HEYWOOD, R., SORTWELL, R. 1979.  
Arsenic intoxication in the rhesus monkey.  
Toxicol. Letters 3: 137.
15. SCHROEDER, H., BALASSA, J. 1966.  
Abnormal trace metals in man: Arsenic.  
J. Chron. Dis. 19: 85.

16. WYTTENBACK, A., BARTHE, P., MARTIN, E. 1967.  
The content of arsenic in a case of acute lethal arsenic poisoning.  
J. Forensi Sci. Soc. 7: 194.
17. LANZ, H., WALLACE, P., HAMILTON, J. 1950.  
The metabolism of arsenic in laboratory animals using <sup>74</sup>As as a tracer.  
Univ. of Calif. Public. in Pharmacol. 2: 263.
18. FUENTES, N., ZAMBRANO, F., ROSENMANN, M. 1976.  
Contaminación arsenical: efectos y localización tisular  
Arch. Biol. Med. Exp. 11: R-73.
19. KONINGS, A. 1972.  
Inhibition of nuclear and mitochondrial respiration by arsenite.  
Experientia 28: 883.
20. BENCKO, V., SIMANE, Z. 1968.  
The effect of chronical intake of arsenic on the liver tissue respiration in mice.  
Experientia 24: 706
21. NORRIS, E., ELLIOT, H. 1945.  
Tolerance to arsenic trioxide in the albino rat.  
Amer. J. Physiol. 143: 635.

22. CRANE, R., LIPMANN, F. 1953.  
The effect of arsenate on aerobic phosphorylation  
J. Biol. Chem. 210: 235.
23. BOYER, P. 1959.  
Sulfhydryl and Disulfide Groups of Enzymes. In: The  
Enzymes, vol. I, cap. 11. Edit. por Boyer, P., Lardy,  
H., Mirback, K. Academic Press N.Y.
24. CIKUTOVIC, M., OLIVARES, A., LEIVA, S. 1976.  
Estudio citofotométrico del bloqueo de grupos SH en el  
arsenicismo crónico en ratas.  
Arch. Biol. Med. Exp. 11: R-64.
25. ROSSI- FANELLI, A., ANTONINI, E., CAPUTO, A. 1958.  
Pure native globin from human hemoglobin: preparation  
and some physico-chemical properties.  
Biochim. Biophys. Acta 28: 221.
26. ROSENMANN, M., MORRISON, P. 1974.  
Maximum oxygen consumption and heat loss facilitation  
in small homeotherms by He - O<sub>2</sub>.  
Amer. J. Physiol. 226: 490.

32. NAKASHIMA, F., SAHAI, K. 1961.  
Spectrophotometric determination of trace amounts of metals. I. Rapid spectrophotometric determination of traces of iron with bathophenanthroline.  
Chem. Abstr. 55: 23177.
33. LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A., RANDAD, R. 1951.  
Protein measurements with the Folin reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265.
34. YONETANI, T. 1968.  
Cytochrome oxidase. Beef heart. In: Methods in Enzymology. Edit. by Estabrook, R. and Pullman, M. vol. X pp. 332 Academic Press. New York.
35. KLEIBER, M. 1947.  
Body size and metabolic rate.  
Physiol. Rev 27: 511.
36. RIGGS, A., WOLBASH, R. 1956.  
Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin.  
J. Gen. Physiol. 39: 585.
37. FOREMAN, C. 1954.  
A comparative study of the oxygen dissociation of mammalian hemoglobin.  
J. Cell. Comp. Physiol. 44: 421.

38. GRAY, L., STEADMAN, J. 1964.  
Determination of the oxyhemoglobin dissociation curves  
for mouse and rat blood.  
J. Physiol. 175: 161.
39. TAMURA, S., KOBAYASHI, K., KOJIMA, H. 1974  
Studies on the arsenic metabolism. X. Effect of arse-  
nite upon the spontaneous activity in rats.  
Folia Pharmacol. Japonica 70: 193.
40. MONTERO, R., BEATO, J. 1952.  
Encefalopatía arsenical.  
Rev. Chil. Ped. 23: 179.
41. WEINBERG, S. 1960.  
The electrocardiogram in acute arsenic poisoning.  
Amer. Heart J. 60 : 971.
42. HUNTER, F., KIP, A., IRVINE, J. 1942.  
Radioactive tracer studies on arsenic injected as po-  
tassium arsenite. I. Excretion and localization in  
tissues.  
J. Pharmacol. Exper. Therap. 76: 207.