

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

EFECTO DEL GLUTATION EN LA  
TOXICIDAD AGUDA DEL ARSENICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

OSBALDO RAMOS SANCHEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1992

T

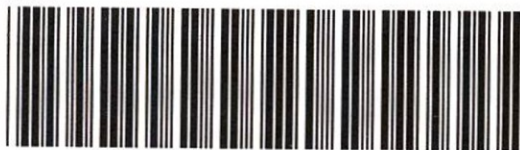
QP552

.G58

R3

c.1





1080075048

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

EFFECTO DEL GLUTATION EN LA TOXICIDAD AGUDA DEL ARSENICO

OSBALDO RAMOS SANCHEZ



T  
QP552  
.158  
R3



# LETALIDAD DEL ARSENICO EN COMBINACION CON BSO

	No. de ratas	No. de muertes	% de muerte
Arsénico	8	0	0
BSO	8	0	0
BSO+Arsénico	8	8	100

JURADO ASIGNADO:

M. EN C. ROSA DEL CARMEN MILAN SEGOVIA

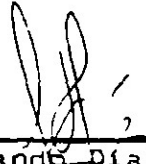
Q.F.B. MARIA DEL CARMEN TORRES PORTALES

Q.F.B. ROSA ELVIA MEDINA NOYOLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. LABORATORIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL.

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Diaz-Barriga Mtz.

SUSTENTANTE:

  
\_\_\_\_\_  
Osbaldo Ramos Sanchez.



"A veces son precisamente los ideales por los cuales mueren las personas los que les imposibilitan vivir y tabajar juntos."

Anónimo

Dedico ésta tesis a mis padres Jorge Ramos Alemán Y Carmen Sánchez Vega y a mis hermanos Jorge, Pedro, Sergio e Israel, con quienes he compartido momentos muy felices en mi vida y que, gracias a ellos, he logrado conseguir una de mis metas más anheladas.

### **Agradecimientos:**

Doy mis más profundas gracias a mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias Químicas, con quienes pasé momentos que permanecerán en mi corazón toda la vida.

Muchísimas gracias a mis asesores Fernando Díaz-Barriga y Leticia Yáñez por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

Un gracias enorme a mis compañeros del Laboratorio de Toxicología Ambiental, Lety, Lili y Jesús, por su paciencia y gran ayuda en la elaboración de esta tesis.

A Don Angel, por su infinito trabajo.

A Martha Rodríguez G., por su colaboración en la realización de los dibujos incluidos en este trabajo.

Y a todas las personas que de alguna forma se sientan comprometidas con mi vida, a quienes les doy mi más profundo agradecimiento y amistad por siempre.



El amor más fuerte y más  
puro no es el que sube  
desde la impresión, sino  
el que desciende desde la  
admiración.

A Magda

## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS. . . . .	viii
LISTA DE FIGURAS . . . . .	ix
LISTA DE TABLAS. . . . .	x
RESUMEN. . . . .	xi
1.0.- INTRODUCCION: . . . . .	1
1.1.- Glutation . . . . .	1
1.2.- Arsénico. . . . .	5
1.3.- Arsénico y su relación con el glutacion . . . . .	8
1.4.- N-acetil-L-cisteína . . . . .	10
1.5.- Butionina . . . . .	11
2.0.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS. . . . .	12
3.0.- MATERIALES Y METODOS . . . . .	13
3.1.- Equipo. . . . .	13
3.2.- Reactivos . . . . .	14
3.3.- Preparación de soluciones . . . . .	15
3.4.- Metodología . . . . .	18
4.0.- RESULTADOS . . . . .	24
5.0.- DISCUSION. . . . .	56
6.0.- CONCLUSIONES . . . . .	59
7.0.- BIBLIOGRAFIA . . . . .	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
BSO	Dl-butionin-[S,R]-sulfoximina
SOD	Superóxido dismutasa
MMA	Acido monometilarsónico
DMA	Acido dimetilarsínico
BAL	2,3 dimercaptopropanol
AsI	Arsénico inorgánico
SAMe	S-adenosil metionina
NAC	N-acetil-L-cisteína
PDS	2,2' ditiopiridina
TBA	Acido tiobarbitúrico
SDS	Dodecil (o lauril) sulfato de sodio
TMP	1,1,3,3, Tetrametoxipropano
MDA	Malonildialdehído
LPO	Lípidos peroxidados



## LISTA DE FIGURAS

1.	Propuesta de lesiones bioquímicas causadas por arsenicales trivalentes. . . . .	7
2	Vías del metabolismo del Arsénico inorgánico en hígado mamífero . . . . .	9
3	Efecto de la administración de NAC en la síntesis de GSH hepático. . . . .	.25
4	Efecto de la administración de BSO en la síntesis de GSH hepático. . . . .	.27
5	Toxicidad peritoneal aguda del arsénico en ratas hembra . . . . .	.30
6-A	Efecto de la interacción NAC-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en hígado. . . . .	.39
6-B	Efecto de la interacción NAC-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en corazón . . . . .	.42
6-C	Efecto de la interacción NAC-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en riñón . . . . .	.44
6-D	Efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en hígado. . . . .	.47
6-E	Efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en corazón . . . . .	.49
6-F	Efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en riñón . . . . .	.51

## LISTA DE TABLAS

1	Tipos de radicales libres. . . . .	4
2	Fórmula de algunos compuestos de Arsénico. . . . .	5
3	Determinación de la DL50 de arsénico vía intraperitoneal en ratas hembra. . . . .	32
4	Letalidad del Arsénico en combinación con BSO. . . .	34
5	Letalidad del Arsénico en combinación con NAC. . . .	36
6	Distribución del Arsénico en los tejidos . . . . .	54

## RESUMEN

La estimulación de la síntesis hepática de glutatión lograda por la administración oral de N-acetil-L-cisteína, (NAC), protegió contra la toxicidad del arsénico; en ratas tratadas con dicho fármaco e intoxicadas con la DL<sub>100</sub> de arsénico (18.2 mg/kg de arsenito de sodio), el número de muertes registradas disminuyó a un 50%.

La administración de la dosis mencionada de arsénico produjo, 1 hora después, daño peroxidativo en hígado, corazón y riñón. El daño evaluado por la generación del MDA, producto formado en la cadena de reacciones de la LPD, disminuyó significativamente en ratas pretratadas con NAC.

Por otra parte, las concentraciones de GSH en los mismos órganos disminuyeron significativamente 1 hora después de la administración de la misma dosis de arsénico. El efecto fue evitado por la previa administración de NAC, logándose, en riñón, concentraciones mayores, en ratas tratadas con NAC + As, que las cuantificadas en ratas control.

Aunado a tales resultados, la administración del inhibidor de la síntesis de GSH, la DL-butionin-[S,R]-sulfoximina, (BSO), potenció en forma drástica, el efecto tóxico del arsénico. La DL<sub>0</sub> (14.8 mg/kg como NaAsO<sub>2</sub>) del metal produjo, en ratas tratadas 4 horas antes con BSO, un 100% de muertes dentro de las primeras 24 horas de observación.

La sola administración de BSO provocó un daño peroxidativo significativo, debido a la inhibición de GSH. Asimismo, el arsénico (DL<sub>0</sub>), produjo tal efecto, pero en mayor magnitud. La combinación BSO + As produjo el mayor daño. Como era de esperarse, las concentraciones de GSH disminuyeron en ratas tratadas con arsénico o BSO, observándose que la combinación BSO + As registró la mayor disminución. En este grupo de ratas, la distribución del arsénico varió significativamente en riñón y piel con respecto a ratas tratadas únicamente con arsénico. En riñón, la cantidad de arsénico disminuyó un 60%, en tanto que en piel, significó un aumento del 60%.



## INTRODUCCION.

### 11- GLUTATION:

Es un tripeptido ubicuo entre las especies y presente en todas las células de los animales. Está constituido por glicina, cisteína y ácido glutámico unido mediante un enlace peptídico poco frecuente en el que interviene su grupo  $\gamma$ -carboxilo en lugar del grupo  $\alpha$ -carboxilo (1). El glutation (GSH) fue reconocido hace más de 100 años y su estructura se estableció en 1953 (3).

El glutation ( $\gamma$ -Glu-CysH-Gly) (GSH) está presente en niveles típicamente altos (0.1-10 mM), siendo así el tiol celular de mayor prevalencia y el péptido de bajo peso molecular más abundante. En muchas células, el GSH aporta más del 90% del total del sulfuro no proteínico (2).

El hígado es el órgano de mayor importancia en la biosíntesis y transporte del GSH (4), donde es sintetizado por acciones secuenciales de las enzimas  $\gamma$ -glutamilcisteín sintetasa y GSH sintetasa (Ciclo del  $\gamma$ -Glutamilo) (1,5). El Ciclo del  $\gamma$ -Glutamilo fue desarrollado por A. Meister y colaboradores para interpretar el mecanismo de transporte de aminoácidos al interior celular de ciertos tejidos animales (1,3). Este ciclo constituye un ejemplo de transposición de grupo, según el cual el sustrato transportado aparece en el interior celular en una forma química distinta. El ciclo del  $\gamma$ -glutamilo comprende una secuencia de seis enzimas, una de las cuales está ligada a la membrana, mientras que las otras residen en el citosol (1,3).

En las células de mamíferos, menos del 0.2% del total de GSH se presenta como glutation oxidado (GSSG). Normalmente poco glutation reducido es enlazado a compuestos de bajo peso molecular y a proteínas como mezclas disulfuras (6). Este tripeptido es secretado de las células, de tal forma que las células que tienen  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa enlazada a la membrana plasmática, pueden utilizar al glutation secretado (5).

Experimentos en ratas quirúrgicamente privadas de uno o ambos riñones (7) y tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa, la D- $\gamma$ -glutamil-( $\alpha$  carboxi)fenilhidrazina establecieron que la actividad de la  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa renal contribuye al uso de aproximadamente un tercio del GSH total del plasma sanguíneo.

Las células que carecen de actividad apreciable de transpeptidasa (ej. hepatocitos) también secretan GSH; tal molécula secretada de dichas células es transportada por el plasma sanguíneo al riñón y a otros tejidos que tienen cantidades substanciales de transpeptidasa (7).

Se han reportado evidencias de exportación de GSSG de eritrocitos (9) en presencia de oxidantes fuertes. Es probable que el desplazamiento de GSH provea un medio de aportación de un tiol a la membrana celular donde puede funcionar en fenómenos asociados con transporte, protección y probablemente en otros aspectos relacionados con la actividad de la membrana celular.

Hanh et al. (8) encontraron que GSH administrado por vía intravenosa a ratas es depurado rápidamente del plasma y que, suprimiendo las arterias renales se disminuyó la utilización de dicho compuesto. Estos trabajos concluyeron que la degradación de GSH ocurre principalmente en el riñón, pero también obtuvieron evidencias que concuerdan con la degradación extrarrenal de GSH.

La interacción de GSH con varios tipos de compuestos es catalizada por las GSH S-transferasas. Los GSH S-conjugados son típicamente convertidos a ácidos mercaptúricos y así son excretados (10). Sin embargo, pueden ocurrir otras reacciones, tales como un desdoblamiento del grupo GSH del conjugado y del grupo N-acetil del mercapturato. Esto ocasiona que a pesar de que muchos compuestos, por conjugación con GSH disminuyen su toxicidad, en otros compuestos suceda lo contrario. (5).

#### FUNCIONES DEL GLUTATION:

Estudios en los que fue inhibido el metabolismo del GSH han contribuido substancialmente a esclarecer la función del GSH y proveen de modelos animales de ciertas enfermedades congénitas. Por ejemplo, se ha utilizado ampliamente la DL-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO), un inhibidor irreversible de la  $\gamma$ -glutamylcistein sintetasa (11). Algunos estudios realizados con este compuesto apoyan la conclusión que la porción S-alkil de la sulfoximina se fija al sitio de la enzima que normalmente une al aminoácido aceptor.

A. En combinación con la superóxido dismutasa, (SOD), actúa como un importante mecanismo de defensa en forma de antioxidante biológico. La combinación GSH-SOD actúa en la degradación del peróxido de hidrógeno y lípidos hidroperoxidados. El GSH reacciona también fácilmente con una amplia variedad de especies de radicales libres, incluyendo radicales peroxi, fenoxi y semiquinona. Se considera, por lo tanto, que el GSH también funciona como un eliminador de radicales libres y en la reparación de daño biológico mediado por ellos (12,13).

Un radical puede ser definido en términos generales como una especie que contiene uno o más electrones no apareados. Un electrón no apareado puede estar asociado con varios átomos, como se ilustra en la tabla 1. La generación de radicales libres es un proceso que en condiciones normales no causa daño al organismo, sin embargo, las sustancias tóxicas pueden aumentar la concentración

de tales especies, pudiendo ocasionar efectos nocivos. La tabla 1 muestra los tipos de radicales libres que en un momento dado pueden ocasionar daño a la membrana celular, vía peroxidación de lípidos membranales (14). En la cadena de reacciones de la LPO, uno de los productos formados, el malonildialdehído (MDA), producto sumamente tóxico y cancerígeno (14), puede ser cuantificado mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA).

B. El GSH protege a las células de electrófilos potencialmente tóxicos formados vía el metabolismo de xenobióticos y en reacciones que han sido asociadas con los procesos de detoxificación. Los compuestos que forman conjugados con GSH son procesados por las  $\gamma$ -glutamil transpeptidasas y dipeptidasas a cisteín-S-conjugados, los cuales generalmente son excretados en orina como sus correspondientes ácidos mercaptúricos (conjugados N-acetil-L-cisteína S-sustituídos) (12).

C. El GSH juega un importante papel en la detoxificación de carcinógenos químicos. Se ha reportado que las reacciones de conjugación entre los supuestos intermediarios activos de estos carcinógenos y el GSH son catalizadas por enzimas GSH S-transferasas, reduciendo así la concentración utilizable de estas especies carcinógenas para reaccionar con macromoléculas celulares (15).

D. En las células mamíferas, la principal defensa contra la peroxidación de lípidos es un sistema dependiente de glutatión reducido (GSH). Se sabe que el citosol de hígado de rata contiene una enzima GSH-dependiente que inhibe la peroxidación de lípidos microsomal y mitocondrial. En 1957, la actividad de la glutatión peroxidasa fue identificada en eritrocitos y luego en el citosol de muchas células mamíferas, especialmente del hígado (16).

E. El glutatión interacciona directamente con metales, tales como cadmio y plomo (17); asimismo, juega un importante papel en la respuesta celular temprana contra la toxicidad del cadmio (18). La administración de BSO a ratas decremanta la excreción biliar de cobre exógeno, presumiblemente como resultado de una depleción de GSH hepático (20,32).

TABLA 1. TIPOS DE RADICALES LIBRES.

Tipo de radical	Ejemplo	Comentarios
.H-centrado	Atomo de H (1 protón, 1 electrón)	-La remoción de un átomo de H de un carbono a menudo inicia la cadena de reacciones de los radicales.
.C-centrado	Radical triclorometil .CCl <sub>3</sub>	-principales agentes en la toxicidad del CCl <sub>4</sub> .
	Radicales C-centrado en los lípidos de membrana	-Producido por la remoción de un átomo de H en el sitio de la cadena del ácido graso de los lípidos de membrana.
.S-centrado	Radicales Tiil, R-S	-Producido durante la oxidación de compuestos tioles.
.N-centrado	Radical fenildiazina C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N=N <sup>•</sup>	-envuelto en la toxicidad de la fenilhidrazina a los eritrocitos
.O-centrado	inorgánicos: Superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) hidroxilo (OH <sup>-</sup> )  orgánicos: Rad. alcoxy (RO <sup>•</sup> ) Rad. peroxi (RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	-Agentes importantes en el estress oxidativo  -Producido durante la peroxidación de lípidos. -Radicales C-centrado generalmente reaccionan fácilmente con O <sub>2</sub> para producir radicales peroxi.
Iones de metales de transición.	Cu <sup>+</sup> /Cu <sup>+2</sup> Fe <sup>+2</sup> /Fe <sup>+3</sup> Ti(III)/Ti(IV)	-Gran habilidad para aceptar y donar electrones sencillos, lo que los hace importantes catalizadores de las reacciones de los radicales libres.

## 1.2.- ARSENICO:

El arsénico se clasifica como un metaloide, ya que exhibe tanto propiedades metálicas como no metálicas, y por lo tanto es capaz de llevar a cabo un amplio campo de reacciones químicas. Puede aparecer con valencia de -3, 0, +3, o +5. El arsénico está presente en rocas o minerales como el sulfuro de realgar ( $As_4S_4$ ) y la orpimenta ( $As_2O_3$ ); también se le encuentra como arsenidos y sulfarsenidos de metales pesados. Es raro encontrar al arsénico en su forma elemental.

En términos de producción industrial, el trióxido de arsénico es el compuesto más importante y es el punto de partida para la manufactura de muchos otros arsenicales comerciales usados como insecticidas, herbicidas, desecadores de algodón, preservadores de alimentos, aditivos en aleaciones, y en la manufactura de vidrio, cerámica, colorantes y semiconductores (19).

La tabla 2 muestra las fórmulas de algunos compuestos de arsénico comúnmente presentes en la naturaleza. Se incluyen arsenicales inorgánicos y orgánicos, prevaleciendo en la naturaleza, los arsenicales orgánicos (20); siendo el óxido de arsénico trivalente el de mayor prevalencia en el aire.

TABLA 2. Fórmula de algunos compuestos de arsénico.

Trióxido de arsénico (óxido arsenioso)	$As_2O_3$ (ó $As_4O_6$ )
Arsenito	$AsO_3^-$ , $AsO_2^-$
Arsenato	$AsO_4^{-3}$ , $HAsO_4^{-2}$ , $H_2AsO_4^-$
Trisulfuro de As	$As_2S_3$
Arseniuro de Galio	$GaAs$
Acido metilarsonico (MMA)	$CH_3AsO(OH)_2$
Acido dimetilarsonico (DMA)	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Arsenobetaina	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
Arsenocolina	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH^-$
Arsina	$ASH_3$
Trimetilarcina	$(CH_3)_3As$
Oxido de trimetilarcina	$(CH_3)_3As=O$

Los mecanismos de la biotransformación del arsénico en mamíferos no ha sido aun completamente elucidada, pero es probable que la metilación tenga lugar principalmente en el hígado (21), con arsénico en su estado más bajo de oxidación (Buchet y Lauwerys, 1985). El arsénico difunde a las células hepáticas y se

enlaza extensivamente a componentes intracelulares que favorece su acumulación en la célula. Los compuestos de arsénico pentavalente son reducidos *in vivo* a compuestos trivalentes más tóxicos. Sin embargo, la ingestión de arsénico trivalente por animales experimentales y humanos es seguida por la excreción de cierto porcentaje de la dosis administrada como arsénico pentavalente (Bencko et. al., 1976).

Estudios en animales han mostrado que más del 50% del arsenato administrado es reducido inicialmente a arsenito (Vahter y Marafante, 1985), parte del cual es posteriormente metilado. El arsénico trivalente es más tóxico que su forma pentavalente y los MMA y DMA son los de menor toxicidad. (NAS, 1977). Por lo tanto, la metilación del arsénico inorgánico puede ser considerado un mecanismo de detoxificación.

La mayor parte del arsénico excretado en orina está en forma de ácido dimetilarsínico, (DMA), indicando una metilación *in vivo*. Sin embargo, a dosis muy altas, la eficiencia de la metilación decrece ya que se llega a su saturación (28,30). El GSH regula el metabolismo de As III a través de varios mecanismos: facilitación de la difusión del As III a la célula, estimulación de la primera reacción de metilación e incremento de la excreción de DMA por la célula (21).

Generalmente, el pretratamiento con Butionin sulfoximina (inhibidor de la síntesis de GSH) resulta en un decremento de la metilación del arsénico, siendo el primer paso de la metilación la reacción afectada. Del mismo modo, los animales pretratados con BSD, disminuyen la entrada de arsénico inorgánico a la célula hepática (20).

Algunos estudios han mostrado que del 6% al 9% de  $As^{74}$  trivalente o pentavalente administrado oralmente a ratones fue eliminado en las heces (Vahter y Norin, 1980), indicando que existe una importante absorción por el tracto gastrointestinal (19,20). La principal ruta de excreción del arsénico absorbido es la vía urinaria.

La vida media biológica del arsénico inorgánico ingerido es de 10 horas aproximadamente y de 50 al 80% se excreta alrededor de 3 días.

#### MECANISMO DE TOXICIDAD DEL AS TRIVALENTE.

Szincicz y Forth (43) propusieron que uno de los principales efectos tóxicos del As III es la depleción de carbohidratos la cual resulta principalmente de la inhibición de la gluconeogénesis. Estos autores sugieren que los blancos primarios del  $As^{+3}$  son piruvato deshidrogenasa, tiolasa y

glutation reductasa, según figura 1. La inhibición del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa causada por el enlace del arsénico trivalente a la porción dihidrolipoil provoca un decremento de Acetil CoA, produciendo la inhibición del metabolismo del piruvato y la inhibición del ciclo del ácido cítrico, todo lo cual contribuye a una gluconeogénesis disminuida. Estas inhibiciones, además del estrés causado por la intoxicación más la inhibición de la tiolasa, resulta en una depleción de carbohidratos.

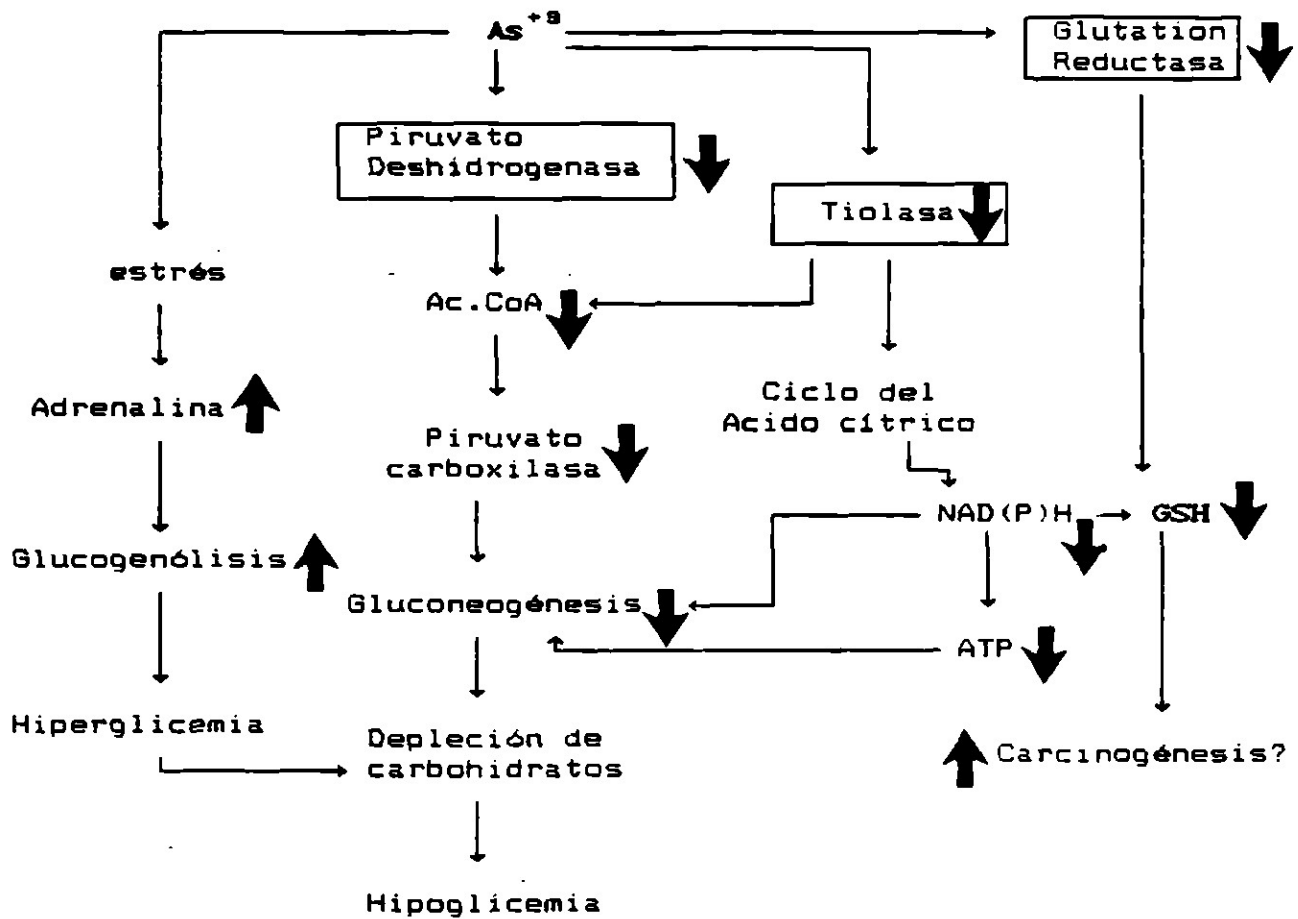


Fig 1. Propuesta de lesiones bioquímicas causada por arsenicales trivalentes.

↓ Decremento      ↑ Incremento       Bco. Primario

### 13.- ARSENICO Y SU RELACION CON GSH

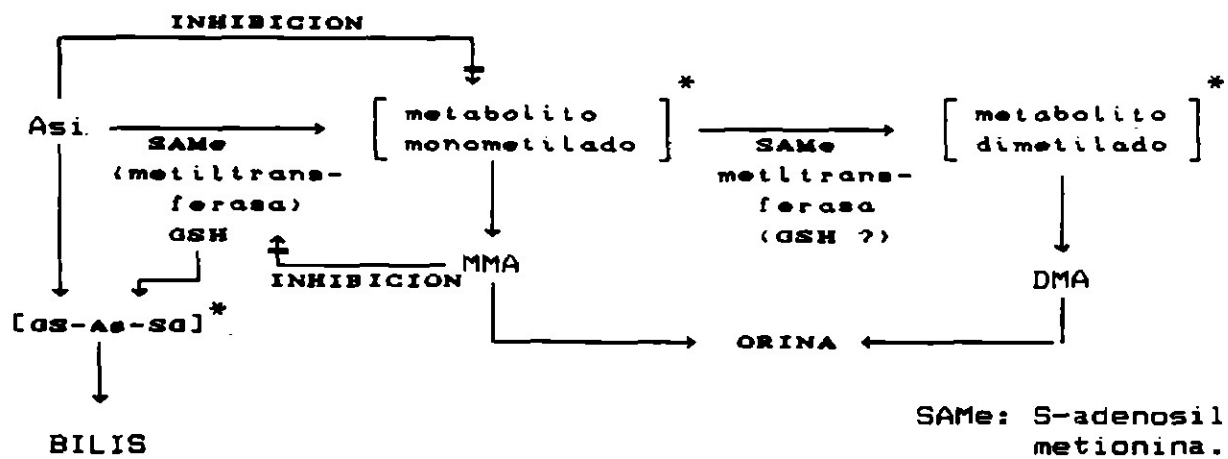
Se sabe desde hace algunos años que los compuestos trivalentes del arsénico son las principales formas tóxicas, y que los compuestos con arsénico pentavalente tienen poco efecto en la actividad enzimática. Un número de proteínas y sistemas enzimáticos que contienen grupos sulfhidrilos son alterados por exposición al arsénico. Algunas alteraciones pueden ser revertidas por la adición de un exceso de un monotiol como el glutatión; aquellas enzimas que contienen dos grupos tiol pueden ser invertidas por ditioles tal como el 2,3-dimercaptopropanol (BAL) pero no por monotioles.

Experimentos *in vivo* (28) e *in vitro* (29, 31) han confirmado el importante papel del GSH hepático en el metabolismo del arsénico inorgánico. Una depleción del glutatión hepático por arriba del 90 % del valor control conduce a una excreción urinaria deprimida de MMA y DMA y a una excreción urinaria incrementada de arsénico inorgánico (Asi). Cuando la depleción del GSH es menos severa, la cantidad de arsénico excretado en la orina después de una dosis de  $\text{NaAsO}_2$  no es significativamente diferente de los encontrados en los animales no pretratados, pero la proporción de las tres formas metabólicas es diferente: MMA es reducido tomando en cuenta que el As y el DMA tienden a incrementarse. Estos cambios se asemejan a los encontrados en pacientes con insuficiencia renal.

El GSH puede actuar a través de diferentes mecanismos: protección de grupos tiol lábiles, activación de enzimas metilantes, regulación de la concentración de arsénico trivalente libre, etc.

Los resultados de un estudio con citosol de hígado de rata y arsénico inorgánico (30), concuerdan con una ruta que envuelve dos pasos de metilación del arsénico (Figura 2). Un metabolito monometilado se forma primero, el cual puede ser nuevo y rápidamente metilado a un derivado dimetilado o bien ser espontáneamente oxidado a MMA. El metabolito dimetilado da origen a DMA. En dicho estudio, no se encontró evidencia de un derivado trimetilado, así como tampoco en orina de ratas y humanos tratados con arsénico inorgánico. La primera reacción de metilación, considerada limitante, puede ser estimulada por el GSH, y es catalizada por una enzima diferente a la que transfiere el segundo grupo metilo. La última es sensible a inhibición por arsénico inorgánico. Cuando dicha reacción es inhibida, la acumulación de MMA que resulta puede reducir la "cantidad" de la primera reacción de metilación. Una cantidad excesiva de grupos tiol puede bloquearla también por disminuir la cantidad de arsénico trivalente libre. Es posible, sin embargo, que la inhibición de la reacción de metilación por tioles conduzca a un incremento en la excreción biliar del arsénico inorgánico, ya que existe alguna relación entre la excreción biliar de arsénico y el GSH (33).





\* No identificado

Fig. 2. Vías del metabolismo del arsénico inorgánico en hígado mamífero.

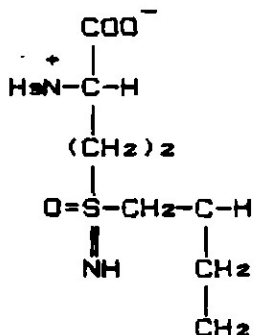
#### 14.- N-ACETIL-L-CISTEINA:

Es un fármaco utilizado para el tratamiento de sobredosis de paracetamol (acetaminofen) y la bronquitis crónica. Se cree, que su mecanismo de acción en hígado es aportar precursores de glutatión. (24,38,39). El mecanismo de acción involucrado en el tratamiento de la bronquitis crónica es menos conocido. De esta forma, no se sabe si la N-acetilcisteína (NAC) actúa como un antioxidante o si alguno de sus metabolitos es la especie molecular activa.

Durante la depleción del glutatión por acetaminofen, la NAC promueve el reabastecimiento de GSH muy por encima de concentraciones control (38). Siempre ha sido difícil determinar si esta elevación de GSH resultó debido a la disminución de la inhibición por retroalimentación (a nivel de  $\gamma$ -Glutamylcistein sintetasa) o por estimulación de la síntesis atribuible a concentraciones mayores a las normales de L-cisteína, o a una combinación de estos efectos. La rápida desacetilación *in vivo* y su habilidad de producir acumulación de glutatión sobre concentraciones hepáticas normales, indican que la disponibilidad de L-cisteína contribuye substancialmente a los procesos de regulación de periodos cortos.

La concentración de glutatión hepática parece ser regulada por inhibición por retroalimentación de la enzima  $\gamma$ -glutamylcistein sintetasa ya sea por el glutatión en sí, o bien por biodisponibilidad limitada del aminoácido precursor del sulfuro, L-cisteína (24). La conjugación con sulfato inorgánico sirve como una vía de eliminación primaria para drogas fenólicas y agentes químicos ambientales. Por lo tanto, el sulfato inorgánico puede ser movilizado cuando la demanda de sulfatación es alta. Mucho del sulfato inorgánico se deriva de la oxidación de aminoácidos de la dieta que contienen azufre, como L-cisteína y L-metionina. En consecuencia, la sulfatación de fármacos y las reacciones de conjugación del glutatión dependen de un precursor común: L-cisteína (24). Por lo tanto, altas concentraciones de L-cisteína, provenientes del fármaco N-acetil-L-cisteína serán utilizados en la síntesis de glutatión por el hígado, principal órgano envuelto en la síntesis de esta biomolécula (24).

## 15.- BUTIONINA:



$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$   
P.M. 222.3 g/n

DL-butionin-[S-R]-sulfoximina ó (S-n-butil homocistein sulfoximina), es el más potente de una serie de análogos de la metionin sulfoximina; compuestos con gran poder de inhibición de la enzima  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa.

Los resultados de la experimentación con este compuesto apoyan la conclusión de que la parte S-alquil de la sulfoximina se enlaza al sitio activo de la enzima que normalmente fija al aminoácido aceptor, tales como glicina, alanina y  $\alpha$ -aminobutirato. La inyección de BSO disminuye los niveles de glutation en hígado y en riñón a concentraciones que representan un 30 y 20% de los niveles control respectivamente (11).

El uso de BSO se ha extendido en gran forma en laboratorios experimentales para estudiar algunas funciones del GSH, usando para esto, la inhibición de su síntesis en diversos órganos como testículos (40), hígado y riñón (11), así como embriones (41), organismos completos (2,15) y cultivos celulares (18, 42). El uso de éste fármaco ha contribuido substancialmente para esclarecer y suponer un gran número de las propiedades y funciones del glutation, desde su interacción con xenobióticos, radicales endógenos, coparticipación en reacciones de detoxificación hasta su posible participación en procesos de defensa contra carcinógenos químicos.

## 2.0.- HIPOTESIS DE TRABAJO:

Ya que diversos trabajos citan la participación del GSH en los procesos de detoxificación del arsénico por reacciones de metilación y su expulsión posterior del organismo en forma metilada, es posible que la depleción de los niveles tisulares de glutatión potencien la toxicidad del metal por aumentar la concentración de especie tóxica. Lo contrario es de esperarse en sistemas con altos niveles de GSH. Por otra parte, posiblemente, al variar las concentraciones de esta molécula, la distribución del arsénico administrado sea diferente a los encontrados en organismos con niveles normales de glutatión, lo que podría, por tanto, modificar su toxicidad.

Se ha postulado también, que la administración de xenobióticos puede causar la generación de radicales libres, especies que en un momento dado puede causar un efecto tóxico a la célula. En el presente trabajo se empleará la peroxidación de lípidos celulares como un indicador de daño a la célula para evaluar el efecto tóxico temprano del arsénico en la rata, en condiciones con niveles altos y depletados en glutatión, empleando dos fármacos para lograr tales efectos (N-acetil-L-cisteína (NAC) y DL-butionin-[S,R]-sulfoximina, BSO, respectivamente).

### 3.0.- MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1.- EQUIPO.

##### ESPECTROFOTOMETRIA:

Espectrofotómetro UV/V Milton Roy Plus Mod. 1001  
Juego de celdillas de cuarzo  
Juego de celdillas de vidrio y plástico

##### ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA:

Espectrofotómetro Perkin-Elmer 23-80  
Generador de hidruros Perkin-Elmer MSH-10  
Fuente de poder para lámparas con descarga sin electrodo Perkin-Elmer.  
Campanas de extracción  
Lámpara para arsénico  
Registrador R-100-A

##### USO GENERAL:

Congeladores  
Refrigeradores  
Termoagitadores  
Centrífugas clínicas  
Platos calientes  
Vórtex  
Potenciómetro  
Micropipetas de 5, 10-50, 40-200 y 200-1000  $\mu$ l.  
Homogeneizadores con pestle de teflón  
Hieleras  
Cuarto frío (4 °C).  
Campanas de extracción

### 3.2.- REACTIVOS:

REACTIVO	LABORATORIO
Fosfato de Potasio Dibásico ( $K_2HPO_4$ )	J.T. Baker
Fosfato de Potasio Monobásico ( $KH_2PO_4$ )	J.T. Baker
Acido Sulfosalicílico	SIGMA Chemical Co.
Sacarosa	M.C. y B.
Cloruro de Sodio	J.T. Baker
2,2' Ditiopiridina	Aldrich
Glutation (forma reducida)	SIGMA Chemical Co.
Hidróxido de Potasio	J.T. Baker
Hidróxido de Sodio	J.T. Baker
N-acetil-L-Cisteína	SIGMA Chemical Co.
DL-Butionin-(S,R)-sulfoximina	SIGMA Chemical Co.
Acido Tiobarbitúrico	SIGMA Chemical Co.
Dodecil-Sulfato de Sodio	SIGMA Chemical Co.
Acido Acético Glacial	Mallinckrodt
Acido Clorhídrico	Merck
1,1,3,3, Tetrametoxipropano	SIGMA Chemical Co.
Cloroformo	J. T. Baker
Metanol Absoluto	J. T. Baker
Acido Nítrico	Mallinckrodt
Acido Sulfúrico	Merck
Acido Perclórico	Merck
Borohidruro de Sodio	SIGMA Chemical Co.

### 3.3.- PREPARACION DE REACTIVOS EMPLEADOS:

#### SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE GRUPOS SH NO PROTEICOS Y PREPARACION DE TEJIDOS:

##### Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.2

###### Soluciones patrón:

-Fosfato monobásico de Potasio: Pesar 10.21 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y aforar a 250 ml con agua destilada. Conc. = 0.3 M.

-Fosfato dibásico de Potasio: Pesar 26.12 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y aforar a 500 ml con agua destilada. Conc. = 0.3 M.

Para 250 ml de solución de fosfatos 0.2 M pH 7.2:

47.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 M  
119.25 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 M

Ajustar el pH a 7.2 con KOH (5 N ó 2.5 N) ó HCl (1:10)  
Aforar a 250 ml con agua destilada  
Guardar en refrigeración.

##### SOLUCION DE FOSFATOS 0.2 M pH 7.2, 0.9 % KCl (Solución para perfundir)

Para 250 ml de solución:

47.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 M  
119.25 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 M  
2.25 g de KCl

Ajustar el pH a 7.2 con KOH (5 N ó 2.5 N) ó HCl (1:10)  
Aforar a 250 ml con agua destilada  
Dura tres días a 4 °C

##### SOLUCION DE FOSFATOS 0.2 M pH 7.2, 1.15 % DE KCl, 125 mM DE SACAROSA. (Solución para homogeneizar)

Para 250 ml de solución:

47.5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 M  
119.25 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 M  
2.875 g de KCl  
10.7 g de sacarosa

Ajustar el pH a 7.2 con KOH (5 N ó 2.5 N) ó HCl (1:10)  
Aforar a 250 ml con agua destilada  
Dura tres días a 4 °C

#### **SOLUCION DE NaCl 0.15 M**

Pesar 4.383 g. de NaCl y aforar a 500 ml con agua destilada.

#### **ACIDO SULFOSALICILICO AL 10 %**

Pesar 2.5 g de ác. sulfosalicílico y disolver en agua destilada. Aforar a 25 ml.

Dura 2 días en frasco ámbar y a 4 °C

#### **SOLUCION DE 2,2' DITIODIPYRIDINA (PDS)**

(Prepararla al momento de su uso)

Pesar 0.0023 g de PDS y disolver en 0.6 ml de HCl al 10 %

Agregar 8 ml de solución de fosfatos 0.2 M, pH 7.2 fríos

Ajustar el pH a 7.2 con KOH 5 N o 2.5 N

Aforar a 10 ml con solución de fosfatos pH 7.2 fríos.

#### **SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE LIPIDOS PEROXIDADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS:**

##### **SOLUCION DE ACIDO TIIOBARBITURICO (TBA) AL 0.8 %**

Pesar 0.2 g de TBA y disolver en 25 ml de NaOH 0.05 M.

##### **HIDROXIDO DE SODIO 0.05 M**

Pesar 0.1 g de NaOH, disolver y aforar a 50 ml con agua destilada.

##### **ACIDO ACETICO AL 20 %, pH 3.5**

100 ml de ácido acético glacial se mezclan con agua destilada, se ajusta el pH a 3.5 con NaOH al 30 % y se afora el volumen a 500 ml con agua destilada.

##### **LAURIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 8.1 %**

0.81 g de SDS se disuelven y aforan a 10 ml con agua destilada.



**CLOROFORMO-METANOL 2:1**

100 ml de  $\text{CHCl}_3$  se mezclan perfectamente con 50 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

**SOLUCIONES PARA LA CUANTIFICACION DE ARSENICO EN LOS TEJIDOS:**

-NaOH 1% : Pesar 2 g de hidróxido de sodio, disolver y aforar a 200 ml con agua desionizada.

-Borohidruro de sodio al 3% : Pesar 6 g de borohidruro de sodio, disolver y aforar a 200 ml con NaOH 1%.

-Soluciones concentradas de ácido nítrico, sulfúrico y perclórico.

-Acido clorhídrico al 3% : Diluir 30 ml de ácido clorhídrico concentrado en agua desionizada y aforar a 1000 ml.

### 3.4.- METODOLOGIA

EL trabajo se llevó a cabo en ratas wistar hembras (200 50 g) a las cuales se les mantuvo con alimentación (Purina Chow) y agua de bebida *ad libitum* durante el período de experimentación. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical.

#### I. Cuantificación de grupos SH no proteicos.

Más del 80 por ciento de los grupos SH no proteicos pertenecen a Glutation. Por lo tanto, una forma aproximada para conocer los niveles tisulares de esta molécula es la cuantificación de los SH no proteicos.

En el presente estudio se trabajó con tres diferentes órganos (hígado, corazón y riñon) de una misma rata, los cuales se perfundieron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.2 conteniendo 0.9 % de KCl. Enseguida, los órganos se homogeneizaron con fosfatos 0.2 M pH 7.2, 125 mM de sacarosa, 1.15 % de KCl en una proporción 1:9 p/v. El homogenado se desproteinizó con ácido sulfosalicílico al 10 % y se centrifugó durante 15 minutos a 3000 r.p.m. El sobrenadante se tomó como la fuente de grupos SH no proteicos.

Todo el procedimiento anterior se realizó a una temperatura de 4°C.

La cuantificación de los grupos SH del sobrenadante se llevó a cabo mediante la técnica que se basa en la reacción de este grupo con la 2,2' ditiopiridina,(23), e interpolando la densidad óptica del producto formado a  $\lambda$  343 nm en una curva estándar realizada con glutation reducido (GSH) según:

#### DILUCIONES:

0.004 g. de glutation reducido se disuelven en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.2 (Fosfatos). Se preparan los siguientes Stock:

Tubo	Solución de GSH (ml)	Fosfatos (ml)	Concentración $\mu$ g/ml	Conc. final (si 0.3 $\rightarrow$ 3 ml) ( $\mu$ g/ml)
1	0.375	2.625	50	5
2	0.75	2.25	100	10
3	1.5	1.5	200	20
4	2.25	0.75	300	30
5	3.0	0.0	400	40

Agitar los tubos y mantenerlos en frío

## CURVA PATRON DE GSH Y MUESTRAS

(Preparada y mantenida en frío).

Tubo	Conc. GSH μg/ml	GSH stock (ml)	PDS (ml)	Fosfatos (ml)
bco	—	—	0.3	2.7
bco	—	—	0.3	2.7
1	5	0.3	0.3	2.4
2	5	0.3	0.3	2.4
3	10	0.3	0.3	2.4
4	10	0.3	0.3	2.4
5	20	0.3	0.3	2.4
6	20	0.3	0.3	2.4
7	30	0.3	0.3	2.4
8	30	0.3	0.3	2.4
9	40	0.3	0.3	2.4
10	40	0.3	0.3	2.4

### Muestras tisulares:

	Sobrenadante (ml)	PDS (ml)	Fosfatos (ml)
Bco	0.15	—	2.85
Bco	0.15	—	2.85
1	0.15	0.3	2.55
2	0.15	0.3	2.55
3	0.15	0.3	2.55

Agitar. Dejar reaccionar durante dos horas (sólo la curva estándar) y leer la densidad óptica a  $\lambda$  343 nm.

Una vez hecha la mezcla del sobrenadante con 2,2' ditiopiridina (PDS) y con los fosfatos, leer la D.O. antes de los diez minutos transcurridos, para evitar la oxidación del GSH presente.

## 2. ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE GSH

El principal órgano involucrado en la síntesis de glutatión es el hígado, por lo que su cuantificación en ratas estimuladas se llevó a cabo en este órgano.

Para lograr la estimulación de la síntesis de GSH, las ratas fueron tratadas con una solución de N-acetil-L-cisteína (NAC) disuelta en agua destilada estéril y ajustada a pH 7.0 con NaOH al 20 %. La concentración final fue de 120 mg/ml. Se administró una dosis oral única de 1200 mg/Kg de peso, (24). Enseguida se cuantificaron los grupos SH no proteicos a los siguientes tiempos transcurridos a la administración: 30, 60, 120, 180 y 360 minutos.

### 3. INHIBICION DE LA SINTESIS DE GSH

Las ratas fueron tratadas con una sola dosis subcutánea (en el lomo) de 0.89 g/kg, (11), de DL-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO) disuelta en solución de NaCl 0.2 M estéril. Se cuantificaron los grupos SH no proteicos a los 60, 120, 240, y 360 minutos transcurridos después de la administración del inhibidor.

Se determinaron además, los niveles tisulares de glutation en ratas controles tratadas con solución de NaCl al 0.9 % por las mismas vías y a los mismos tiempos que las ratas deprimidas y estimuladas, respectivamente.

### 4. DETERMINACION DE LA DL50 DE ARSENICO (i.p.)

Se formaron 7 grupos, cada uno de ellos conteniendo un mínimo de 5 ratas (n = 5-9) asignadas al azar. Enseguida, se les administró, vía i.p. un volumen medio de 0.3 ml de arsenito de sodio en NaCl al 0.9 % estéril, según las dosis: 14.3, 15.0, 15.24, 15.70, 16.20, 18.20, y 20.0 mg/kg para cada grupo respectivo. Se observaron las ratas durante 72 horas y se anotaron el número de muertes acontecidas. Los resultados se corrigieron por el método de Litchfiel y Wilcoxon, para límites de confianza al 95 % (26).

### 5. PRUEBAS DE LETALIDAD

#### a. Letalidad del Arsénico en combinación con BSO

Un número de ratas igual a las expuestas al arsénico en la DL50 con la dosis mínima experimentada (14.3 mg/kg) fueron tratadas con butionina a una dosis de 0.89 g/kg. En el punto de máxima inhibición, se les administró la dosis anteriormente señalada de arsenito de sodio. Se observaron las ratas por un lapso de 72 horas y se anotaron el número de muertes acontecidas.

#### b. Letalidad del arsénico en combinación con NAC.

Un número específico de ratas fueron tratadas con N-acetil-L-cisteína a una dosis de 1200 mg/kg por vía oral. En el punto de síntesis máxima, se les administró la mínima dosis de arsenito de sodio que causó el 100 % de muerte experimentada en la DL50. Se observaron las ratas por espacio de 72 horas y se anotó el número de muertes al final del periodo.

Además se realizaron pruebas de letalidad con arsénico (en ambas dosis), con N-acetil-L- cisteína y con butionina solas como controles.

#### 6. EVALUACION DE UN INDICADOR DE DAÑO CELULAR

Se determinó la peroxidación de los lípidos de membrana de los tres órganos anteriormente citados como un indicador de daño a la célula y por tanto al organismo; en ratas tratadas con las drogas solas y en combinación con arsénico, en las mismas dosis administradas en las pruebas de letalidad. Al mismo tiempo, se determinaron los niveles tisulares de GSH en los mismos órganos y condiciones.

Para tal efecto, los órganos fueron perfundidos con solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.2 conteniendo 0.9 % de KCl y homogeneizados con fosfatos pH 7.2, 1.15 % KCl, 125 mM de sacarosa en proporción 1:9 p/v. Una alícuota del homogenado se hizo reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA), (25). La densidad óptica del compuesto colorido formado se midió a  $\lambda$  532 nm y se interpoló en una curva estándar de Tetrametoxipropano (TMP) como estándar externo.

En el mismo procedimiento, una alícuota del homogenado se desproteinizó con ácido sulfosalicílico al 10 % y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se tomó como fuente de GSH.

Para la curva estándar de TMP, 10  $\mu$ l de tetrametoxipropano se disolvieron y aforaron a 10 ml con agua destilada para una concentración de 6029 nmoles.

Se realizaron los siguientes stock:

tubo	TMP (ml)	Agua dest. (ml)	Conc. (nM)	Conc. Final (nM)
1	0.005	5.995	10	1.0
2	0.0125	5.9875	25	2.5
3	0.025	5.975	50	5.0
4	0.05	5.950	100	10.0
5	0.10	5.900	200	20.0

**CURVA ESTANDAR DE TMP (Estándar externo)**

tubo	TMP (ml)	SDS (ml)	Ac. Acético (ml)	TBA (ml)	Agua Dest. (ml)
bco	—	0.1	0.75	0.75	0.4
bco	—	0.1	0.75	0.75	0.4
1 2 (1)	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
3 4 (2)	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
5 6 (3)	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
7 8 (4)	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
9 10 (5)	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3

**MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Tubo	Homogenado (ml)	SDS (ml)	Ac. Acético (ml)	TBA (ml)	Agua Dest. (ml)
bco	0.1	0.1	0.75	—	1.05
bco	0.1	0.1	0.75	—	1.05
1	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
2	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3
3	0.1	0.1	0.75	0.75	0.3

Los tubos se incuban durante 90 minutos en baño de glicerina, provistos de condensadores para evitar la evaporación. Transcurrido el tiempo de incubación, se enfrían inmediatamente en hielo. La coloración se extrae con 2.5 ml de una mezcla de Cloroformo-Metanol 2:1 v/v y 0.5 ml de agua. Se agitan durante 1 minuto en vórtex. Las capas se separan por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 10 minutos. Se obtiene la capa cloroformo-metanólica (colorida) y se lee la densidad óptica a  $\lambda$  532 nm. La intensidad del color del producto formado a partir de la muestra biológica se interpola en la curva estándar obteniéndose el resultado en nm de MDA.

Para la determinación del daño celular producido a nivel de membrana, las ratas fueron tratadas con butionina y NAC respectivamente, en las condiciones anteriormente citadas. el arsénico fue administrado en las mismas dosis y vía que las ya mencionadas en el punto de inhibición y síntesis máxima, respectivamente. Enseguida, se les sacrificó a los 60 minutos transcurridos a la administración del arsénico y se cuantificaron las sustancias reactivas al TBA (lípidos peroxidados) y los grupos SH no proteicos (GSH).

#### DISTRIBUCION DEL ARSENICO EN LOS TEJIDOS.

Bajo las mismas condiciones ya descritas, se determinó la distribución del arsénico en 6 diferentes órganos y tejidos: hígado, corazón, riñón, ovarios, pulmón y piel, en 2 grupos de ratas, conteniendo cada uno de ellos, un mínimo de tres animales. Dichos grupos fueron:

- a). NaCl-Arsénico (14.8 mg/kg, DLo)
- b). Butionina-Arsénico (14.8 mg/kg, DLo)

Las ratas fueron sacrificadas 60 minutos transcurridos después de la administración del arsénico. Se extrajeron los órganos y la piel (de la parte del lomo) e inmediatamente se perfundieron con agua desionizada. Se limpiaron perfectamente de tejido conectivo y la piel fue rasurada. El exceso de humedad fue eliminado con una gasa. Se pesaron los tejidos y una porción de cada uno de ellos se digirió con 8 ml de ácido nítrico, 0.5 ml de ácido sulfúrico y 0.5 ml de ácido perclórico (soluciones concentradas) a una temperatura de 70 °C por un mínimo de 9 horas. Se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 25 ml de ácido clorhídrico al 3%. Una alícuota de esta solución fue utilizada para leer la cantidad de arsénico en el tejido por método de absorción atómica, usando Generador de Hidruros. La lectura registrada se interpoló en una curva estándar de arsénico conteniendo 10, 20 y 40 ppm de As.

#### ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos fueron analizados por dos pruebas estadísticas (27):

T-student: Para los datos en los que se compararon dos diferentes valores medios: Cinética de los niveles de GSH en función del tiempo y distribución del arsénico en los tejidos.

Prueba de Newman-Keuls para valores múltiples: Para datos en los que se comparan más de dos valores medios: Lipoperoxidación y GSH en hígado, corazón y riñón.

#### 4.0.- RESULTADOS:

##### 1. EFECTO DE NAC EN LA SINTESIS DE GLUTATION HEPATICO.

El efecto causado por la administración de N-acetil-L-cisteína en la concentración del glutatión hepático en el curso del tiempo, es mostrado en la Figura 3. La administración de 1200 mg/kg de NAC (24) elevó la concentración de GSH a los 60 minutos transcurridos después de la administración, a un 163% del control ( $P < 0.001$ ). Niveles significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) fueron detectados desde los 30 minutos. La concentración de GSH tendió a disminuir a partir de los 60 minutos, a las 6 horas, los niveles de glutatión en el hígado no fueron diferentes a los valores control.

##### 2. EFECTO DE BSO EN LA CONCENTRACION DE GSH HEPATICO.

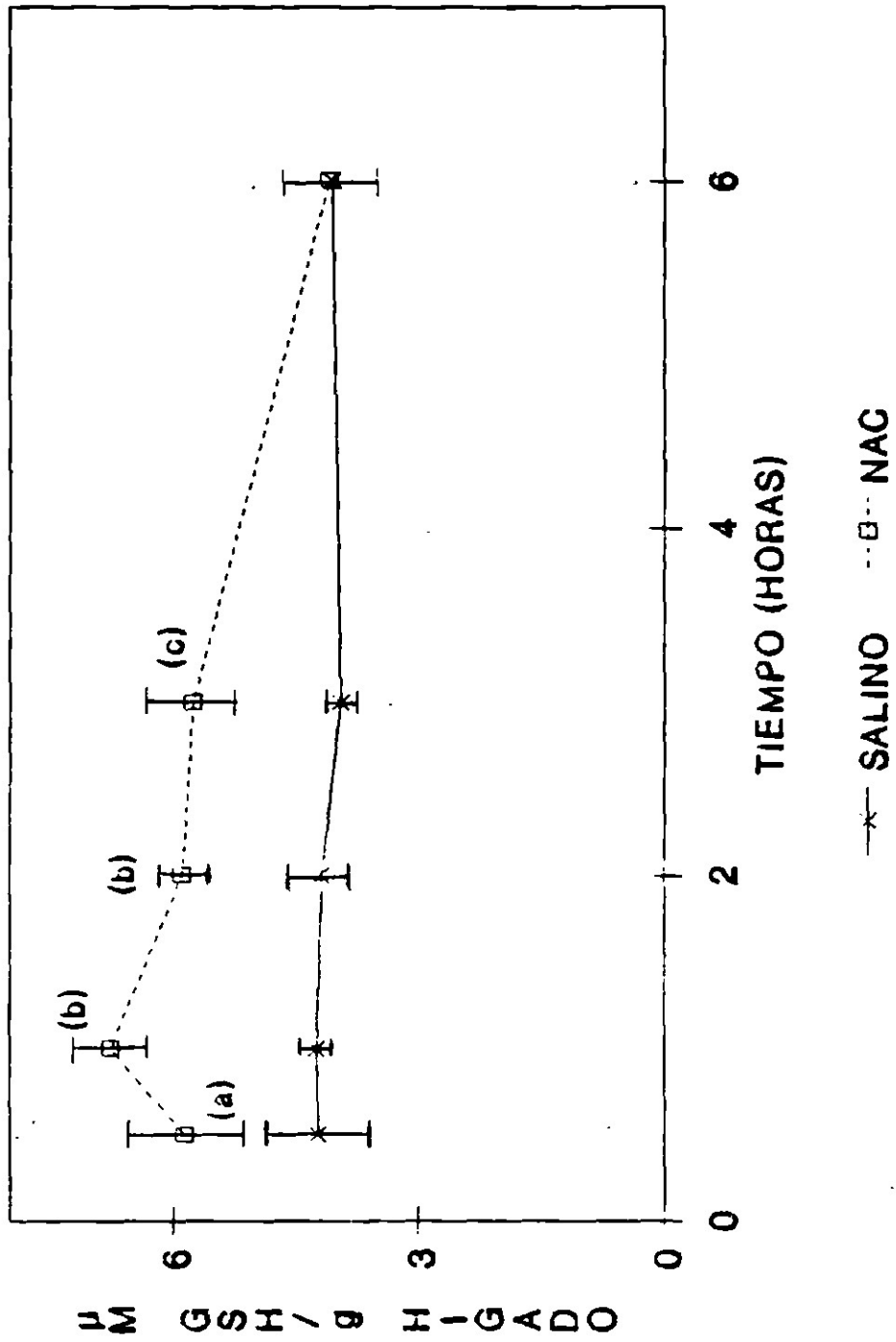
La Figura 4 muestra el efecto causado por la administración de BSO en los niveles del GSH hepático en el curso del tiempo. 0.89 g/kg de DL-butionin-[S,R]-Sulfoximina (11) causaron una disminución del 14% ( $P < 0.005$ ) desde los 60 minutos después de su administración. La inhibición de la síntesis llegó a su punto máximo a las 4 horas (65% con respecto al control,  $P < 0.001$ ) y se mantuvo bajo hasta las 6 horas. Por tanto, BSO tiene un efecto inhibitor de la síntesis de GSH hepático, logrando un punto de máxima inhibición a la 4 horas transcurridas a su administración subcutánea de 0.89 g/kg (4mM).



### FIGURA 3

Efecto de la administración de NAC en la síntesis de GSH hepático. NAC fue administrado por vía oral (1200 mg/kg). Los valores mostrados son la media  $\pm$  D.E de 3 (salino) y 4 (NAC) experimentos. (a)  $P < 0.05$ , (b)  $P < 0.001$ ; c)  $P < 0.005$  con respecto al control salino.

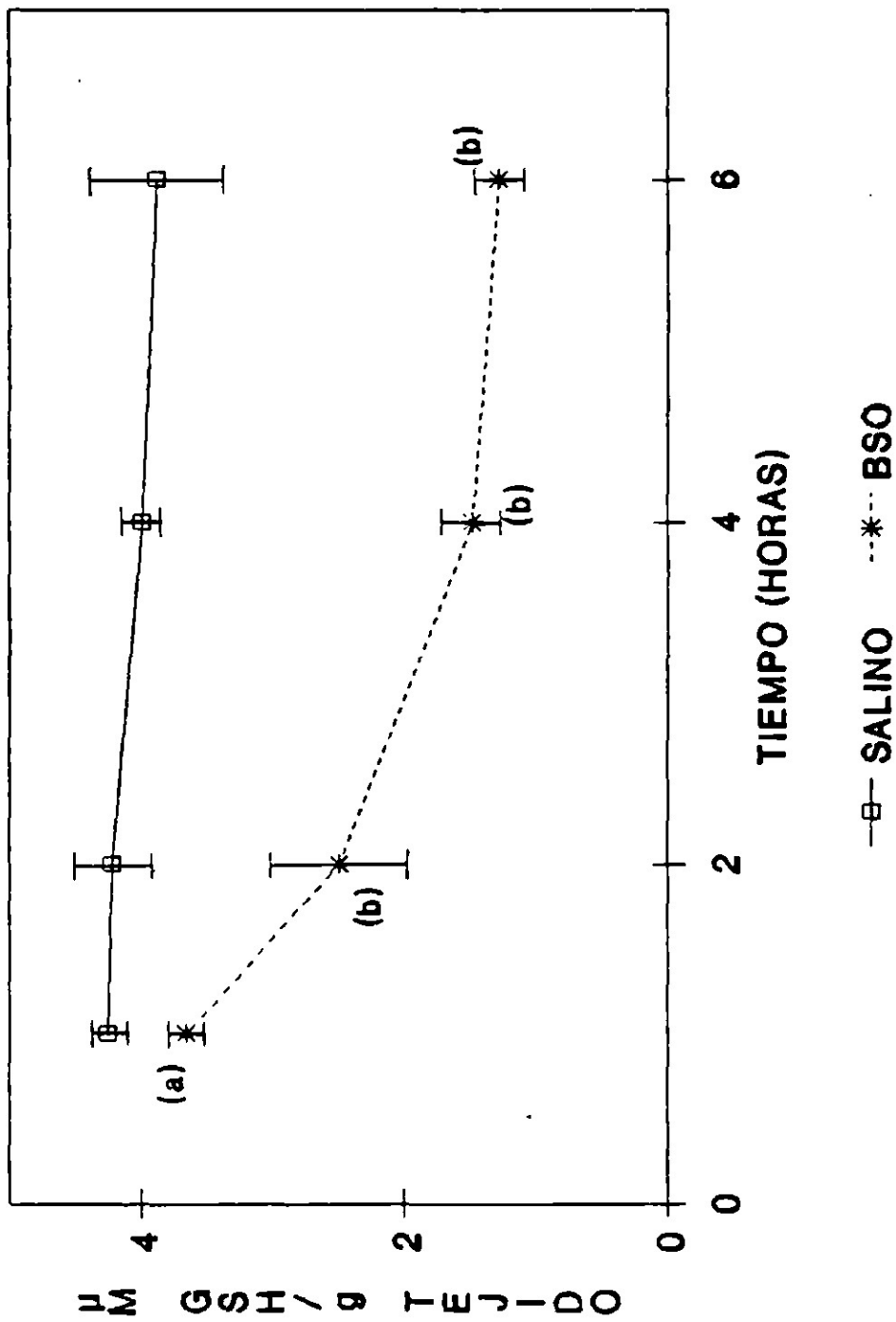
# EFECTO DE NAC EN LA SINTESIS DE GSH HEPATICO



#### FIGURA 4

Efecto de la administración de BSO en la síntesis de GSH hepático. El BSO fue administrado por vía s.c. (4 mmol/kg). Los valores mostrados son la media  $\pm$ D.E. de 3 experimentos. (a)  $P < 0.005$ ; (b)  $P < 0.001$  con respecto a los niveles control.

# EFFECTO DE BSO EN LA SINTESIS DE GSH HEPATICO



### 3. DL<sub>50</sub> PARA As

Con el objeto de fijar los valores DL<sub>0</sub> y DL<sub>100</sub> de As por vía intraperitoneal en ratas hembra, se realizó una valoración de la curva dosis-letalidad del arsénico. La DL<sub>0</sub> a las 72 horas después de la administración de arsénico resultó ser 14.8 mg/kg. por otra parte, 18.2 mg/kg de arsénico causaron un 100% de letalidad a las 72 horas. La figura 5 nos muestra una línea con una pendiente alta, lo que da cuenta de una toxicidad del arsénico en ratas hembra, igualmente alta. La Tabla 3 presenta los grupos experimentales empleados para la determinación de la DL<sub>50</sub> y los resultados obtenidos en ella. Un valor de DL<sub>50</sub> de 15.72 mg/kg fue calculado.

### 4. LETALIDAD DEL ARSENICO EN COMBINACION CON BSO.

Para comprobar el efecto de los niveles de GSH en la protección contra la toxicidad del arsénico, un número igual de ratas fueron tratadas con el inhibidor específico de la síntesis de GSH, BSO, en el punto de máxima inhibición (4 horas transcurridas a la administración, Fig 4), la administración de la DL<sub>0</sub> de NaAsO<sub>2</sub> en conjunto con BSO causó un 100% de muerte (Tabla 4). Por otra parte, el total de muertes acontecidas en el grupo BSO-As DL<sub>0</sub>, se registraron dentro de las primeras 24 horas, ocurriendo muertes en tiempos tan tempranos como las 2 horas.

### 5. LETALIDAD DEL ARSENICO EN COMBINACION CON NAC.

Para evaluar el efecto de un aumento en las concentraciones hepáticas de GSH en la toxicidad aguda del arsénico, 1200 mg/kg de NAC fueron administrados, vía oral, a 8 ratas. A los 60 minutos transcurridos (tiempo al cual los niveles de GSH hepático se encontraron en su nivel máximo, Fig 3) se les administró 18.2 mg/kg de NaAsO<sub>2</sub> (DL<sub>100</sub> experimental) y se observaron durante 72 horas. La Tabla 5 muestra el efecto causado por la administración de NAC en la toxicidad aguda del arsénico. En presencia de altas concentraciones hepáticas de GSH, la toxicidad del arsénico disminuye. Además, en el grupo salino-As DL<sub>100</sub>, las muertes ocurrieron dentro de las primeras 24 horas, mientras que en el grupo NAC-As DL<sub>100</sub>, sólo habían ocurrido 3 muertes en el mismo lapso de tiempo. la cuarta muerte sucedió dentro de las 48 horas transcurridas.

#### FIGURA 5

**Toxicidad peritoneal aguda del arsénico en ratas hembra.** Las ratas fueron asignadas al azar a cada uno de los grupos correspondientes y los análisis Probit para la mortalidad a las 72 horas después del tratamiento fueron determinados como se describió previamente (26).



### TABLA 3

**Determinación de la DL50 de Arsénico via intraperitoneal en ratas hembra. Grupos experimentales utilizados y dosis empleadas. Los análisis Probit para la letalidad a las 72 horas transcurridas a la administración del arsénico fueron determinadas como se describe (26). Entre paréntesis los límites de confianza al 95 % para la DL50.**



## DETERMINACION DE LA DL50 DE ARSENICO

DOSIS mg/kg	No. DE RATAS	No. DE MUERTES	% DE MUERTE	PROBIT
14.80	8	0	0	2.48
15.00	5	0	0	3.04
16.24	9	1	11.11	3.606
15.70	9	4	44.44	4.823
16.20	8	7	87.50	6.136
18.20	8	8	100.0	-----
20.00	5	5	100.0	-----

**DL50: 15.72 mg/kg (15.356-16.090)**

#### TABLA 4

**Letalidad del arsénico en combinación con BSO.**  
El metal (14.8 mg/, DLo) fue administrado en el punto de máxima inhibición de la síntesis de GSH. Las ratas fueron observadas y registrado el número de muertes acontecidas en un lapso de 72 horas. La administración de BSO (0.89 g/kg) causó una depleción del 63% en los niveles de GSH hepático a las 4 horas seguidas a su administración.

# LETALIDAD DEL ARSENICO EN COMBINACION CON BSO

	No. de ratas	No. de muertes	% de muerte
Arsénico	8	0	0
BSO	8	0	0
BSO+Arsénico	8	8	100

#### **TABLA 5**

**Letalidad del arsénico en combinación con NAC.**  
El arsénico (18.2 mg/kg, DL<sub>100</sub>) fue administrado en el punto de máxima síntesis de GSH. El número de muertes mostradas ocurrieron en un lapso de 72 horas. La administración de NAC (1200 mg/kg) causó un aumento del 60% en los niveles hepáticos de GSH a los 60 minutos después de la administración.

# LETALIDAD DEL ARSENICO EN COMBINACION CON NAC

	No. de ratas	No. de muertes	% de muerte
Arsénico	8	8	100
NAC	8	0	0
NAC+Arsénico	8	4	50

## 6. EVALUACION DE UN INDICADOR DE DAÑO CELULAR.

### Niveles de glutathion y lípidos peroxidados en tres diferentes órganos.

Para la cuantificación de los niveles de GSH y lípidos peroxidados en hígado, corazón y riñón, el sacrificio de los animales empleados para tal efecto se realizó 1 hora después de la administración de las dosis respectivas de arsénico, esto con el propósito de evitar la muerte espontánea del animal (resultados antes mencionados).

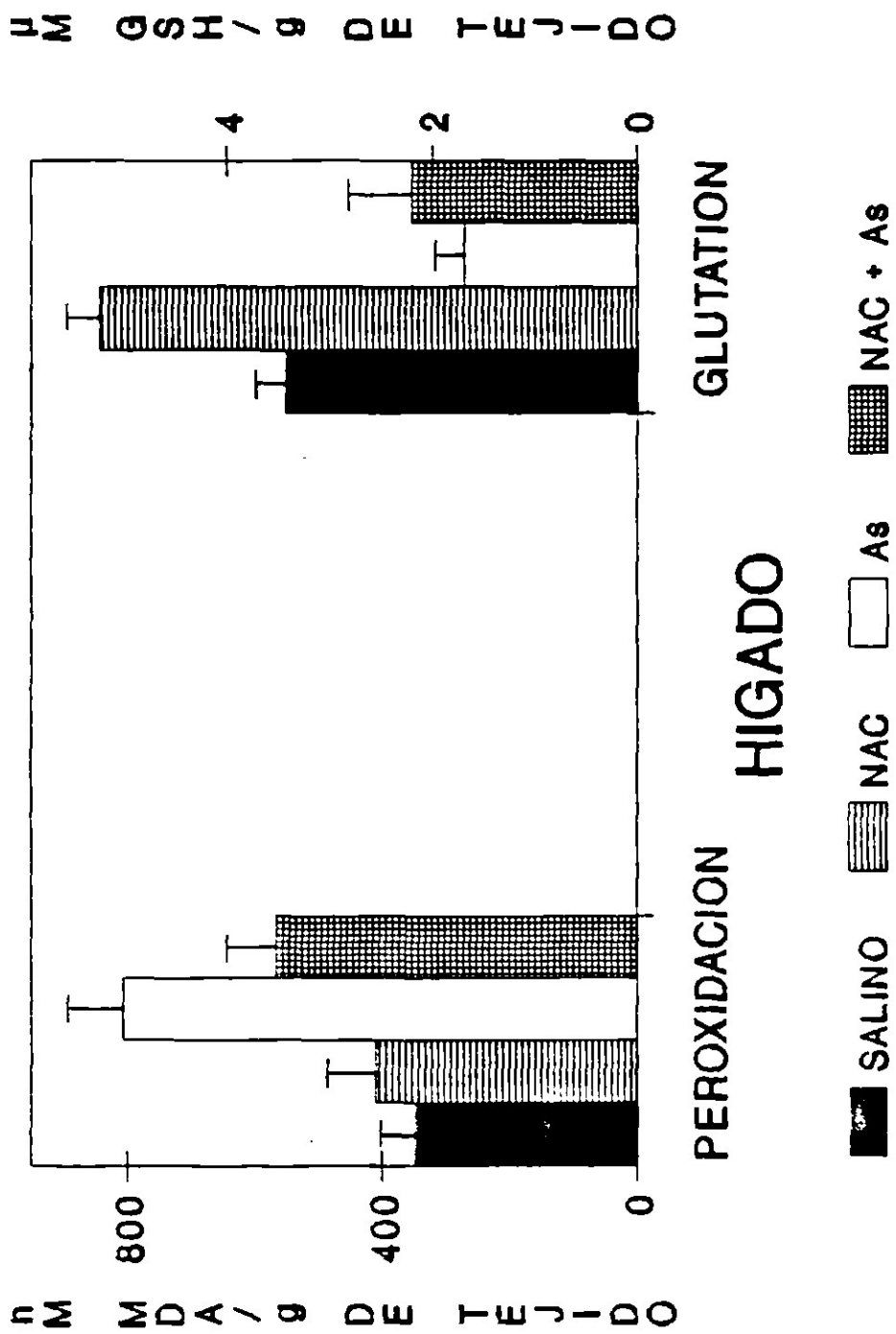
#### 6.1 Efecto de la interacción NAC-As DL<sub>100</sub>

-*Hígado*: La figura 6-A muestra el efecto producido por la interacción NAC-As en los niveles de lípidos peroxidados (LPO) y glutathion en el hígado. La administración de la DL<sub>100</sub> de arsénico causó una elevación en la lipoperoxidación de un 130% con respecto a los niveles control ( $P < 0.001$ ). De la misma forma, las ratas intoxicadas con la misma dosis de arsénico, pero previamente tratadas con NAC, presentaron niveles de LPO estadísticamente menores al grupo salino-As DL<sub>100</sub> ( $P < 0.001$ ). Por otra parte, la administración de NAC-salino no causó lipoperoxidación significativa en el grupo de ratas experimentadas ( $P > 0.05$  con respecto al control). Los niveles de glutathion en este órgano variaron significativamente de acuerdo al tratamiento impuesto a los diferentes grupos ensayados. La administración de NAC elevó los niveles de GSH hepático aproximadamente un 53% por arriba de la concentración control ( $P < 0.001$ ). La adición de la DL<sub>100</sub> de arsénico al sistema redujo los niveles de glutathion, tanto en el grupo pretratado con NAC como en el grupo administrado previamente con salino ( $P < 0.01$  contra el grupo NAC-As DL<sub>100</sub>,  $P < 0.001$  con respecto al control salino-salino).

**FIGURA 6-A**

**Efecto de la interacción NAC-As (18.2 mg/kg DL<sub>100</sub>) en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en hígado. El arsénico (18.2mg/kg, DL<sub>100</sub>) fue administrado 1 hora después de la administración de NAC (1200 mg/kg). las ratas fueron sacrificadas 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media  $\pm$ D.E. de 6 animales. Peroxidación: As Vs NAC, Vs NAC-As y Vs control,  $P < 0.001$ ; NAC-As Vs control y Vs NAC  $P < 0.001$ . Glutathion: NAC Vs control, Vs. NAC-As y Vs. As  $P < 0.001$ , control Vs As y Vs NAC-As  $P < 0.001$ ; NAC-As Vs. As  $P < 0.01$ .**

**EFFECTO DE LA INTERACCION NAC-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**





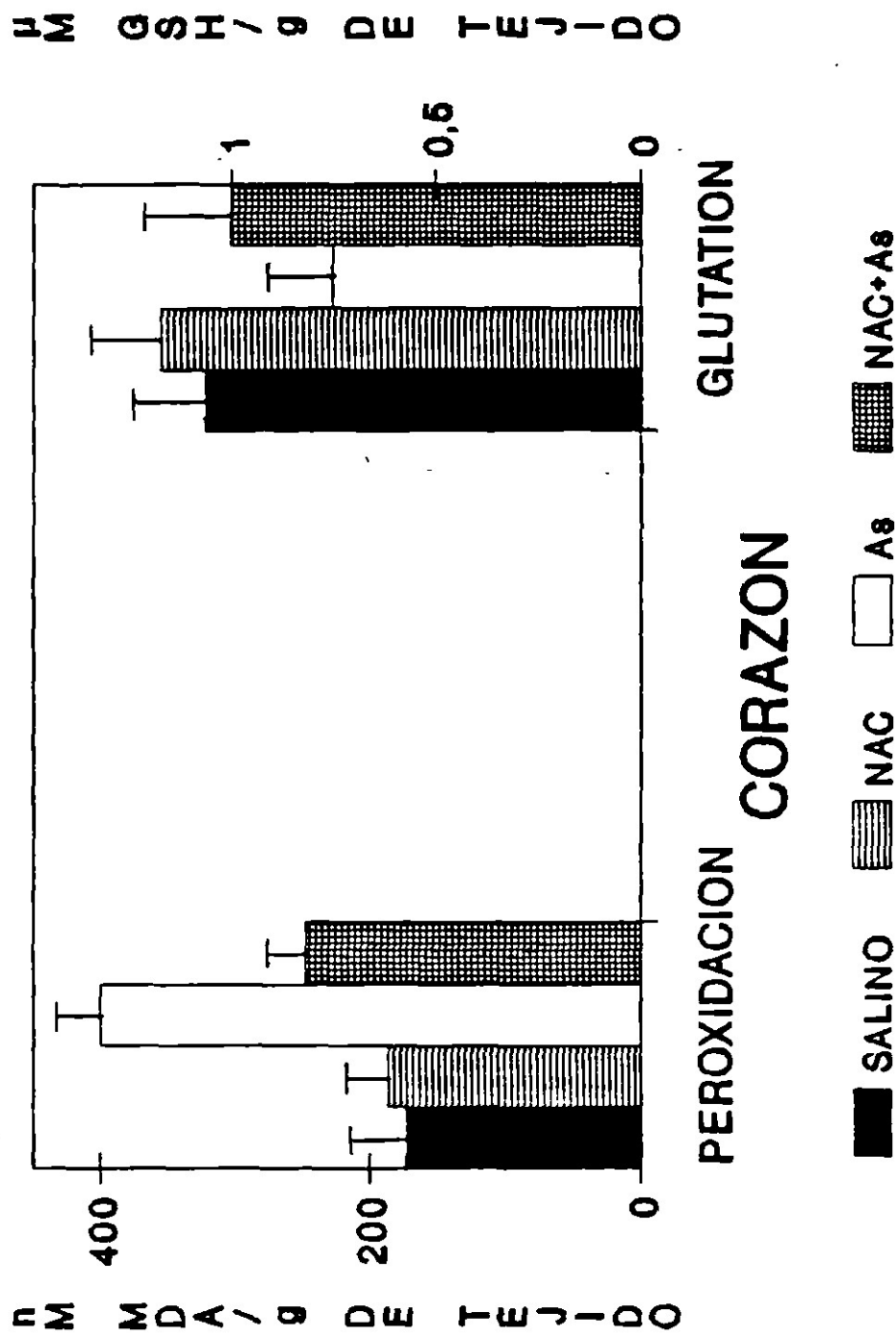
-Corazón: Un efecto un tanto similar fue observado en corazón. La figura 6-B muestra los niveles de GSH y peroxidación de lípidos a efecto de la interacción NAC-As DL100. La administración de 1200 mg/kg de NAC no varió los niveles normales de glutatión ni tuvo efecto lipoperoxidativo en éste órgano ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, el arsénico causó peroxidación de lípidos y simultáneamente, depleción en la concentración de GSH ( $P < 0.001$  con respecto al control salino). La previa administración de NAC previno, en forma parcial, el daño celular causado por la DL100 As ( $P < 0.001$ ), así como la disminución de GSH ( $P < 0.025$ ), aún y cuando los niveles de LPO no disminuyeron a un nivel normal ( $P < 0.001$ ); la concentración de GSH en este grupo no tuvo diferencias con respecto al control salino ( $P < 0.05$ )

-Riñón: La figura 6-C muestra los niveles de GSH y LPO en éste órgano a razón de la interacción NAC-As. NAC elevó los niveles de GSH 30% por arriba de los niveles control ( $P < 0.025$ ) sin tener efecto peroxidativo ( $P > 0.05$  con respecto al control salino). La administración de 14.8 mg/kg de  $\text{NaAsO}_2$  depletó la concentración tisular de glutatión a un 50 % de los niveles control, a la vez que la lipoperoxidación aumentó ( $P < 0.001$  con respecto al control salino). La previa administración de NAC a ratas posteriormente intoxicadas con arsénico, previno, en forma parcial, la peroxidación de lípidos ( $P < 0.05$ ), simultáneamente, altos niveles de GSH, iguales a los cuantificados en ratas tratadas solo con NAC ( $P > 0.05$ ), fueron detectados en estos animales.

#### FIGURA 6-B

**Efecto de la interacción NAC-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en corazón.**  
El arsénico (18.2 mg/kg, DL100) fue administrado 1 hora después de la administración de NAC (1200 mg/kg). Los animales fueron sacrificados 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media  $\pm$  D.E. de 6 experimentos. **Peroxidación:** As Vs. control, Vs NAC y Vs NAC-As  $P < 0.001$ , NAC-As Vs control  $P < 0.001$  y NAC-As Vs NAC  $P < 0.005$ . **Glutathion:** As Vs. NaCl y Vs. NAC  $P < 0.001$ ; NAC-As Vs As  $P < 0.025$ .

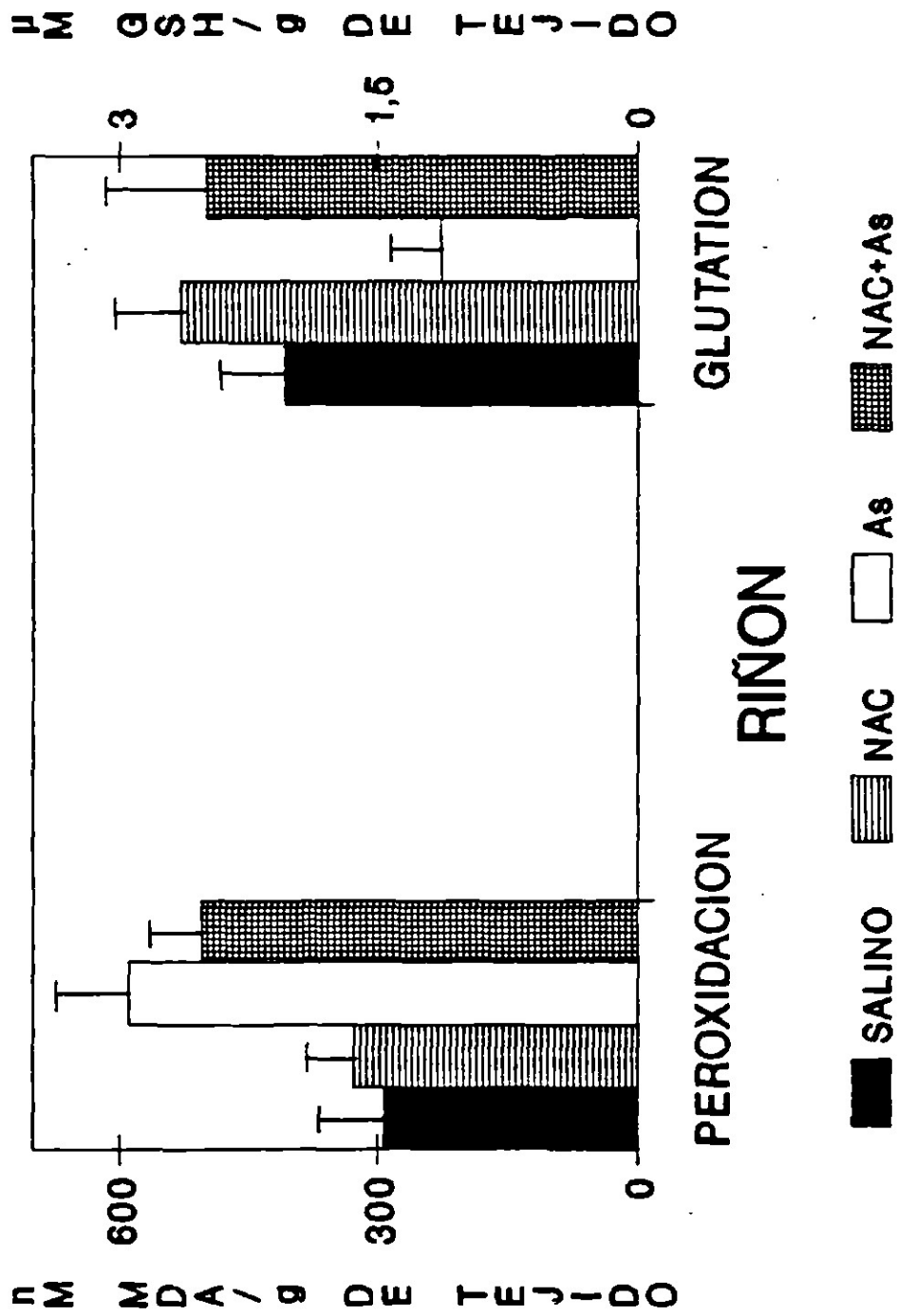
**EFFECTO DE LA INTERACCION NAC-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**



**FIGURA 6-C**

**Efecto de la interacción NAC-As en los niveles de GSH y peroxidación de lípidos en riñón.** El arsénico (18.2 mg/kg, DL100) fue administrado 1 hora después de la administración de NAC (1200 mg/kg). Las ratas fueron sacrificadas 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media  $\pm$ D.E. de 6 experimentos. **peroxidación:** As Vs. control y Vs. NAC P < 0.001, Vs NAC-As P < 0.05; NAC-As Vs. control y Vs. NAC P < 0.001. **Glutation:** As Vs. NAC, Vs. NAC-As y Vs. control P < 0.001; control Vs. NAC P < 0.025, Vs NAC-As P < 0.05.

**EFFECTO DE LA INTERACCION NAC-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**



## 6.2. Efecto de la interacción BSO-As DLo.

-**Hígado:** La figura 6-D representa el efecto producido por la interacción BSO-As DLo en el hígado. BSO causó una inhibición del 65% en la síntesis del glutatión hepático con respecto a los niveles control ( $P < 0.001$ ), a la vez que causó lipoperoxidación en este órgano ( $P < 0.001$  con respecto al control salino). La peroxidación de lípidos causada por BSO fue tal, que no hubo diferencia con el efecto observado por la administración de la DLo de As en el otro grupo de ratas, aún y cuando los niveles de GSH, entre estos dos grupos, sí lo fueron ( $P < 0.001$ ). En ratas deprimidas en GSH (por BSO) e intoxicadas con arsénico, los niveles de LPO, como era de esperarse, aumentaron considerablemente, a la vez que las concentraciones de GSH disminuyeron en forma notable.

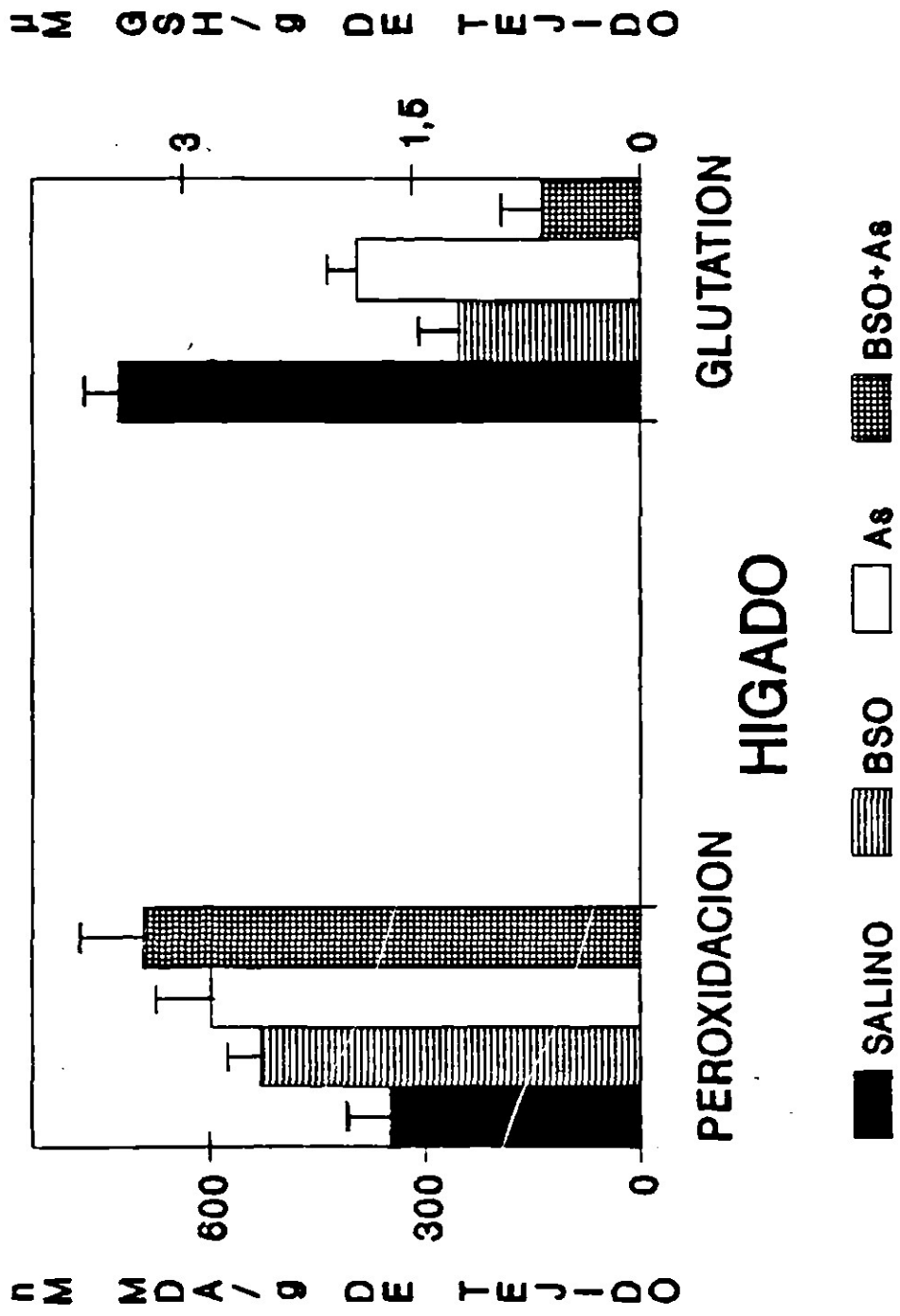
-**Corazón:** La administración de BSO, DLo de As o la combinación BSO-As DLo, no produjo variaciones significativas en los niveles de GSH comparadas con los control, ni entre ellos (figura 6-E), aún y cuando los LPO representaron daño a la célula cardíaca. 14.8 mg/kg de  $\text{NaAsO}_2$  causó, en corazón, una aumento del 80% de los lípidos peroxidados a los niveles control ( $P < 0.001$ , fig. 6-E), en tanto que BSO no tuvo efecto peroxidativo. La interacción BSO-As, elevó los LPO a un punto máximo ( $P < 0.05$  con respecto al grupo As DLo).

-**Riñón:** En este órgano, Los resultados son un tanto diferentes. La administración de 4 mM/kg de BSO causó una sensible disminución de la concentración de glutatión en el riñón, simultáneo a un aumento en los niveles de lípidos peroxidados de la célula renal ( $P < 0.001$  con respecto al control salino, figura 6-F). El daño celular causado por BSO fue tal, que no hubo diferencias significativas con respecto al causado por la administración de 14.8 mg/kg de  $\text{NaAsO}_2$ , sin embargo, la depleción en las concentraciones de GSH observadas por la administración de estos fármacos, no fueron estadísticamente iguales ( $P < 0.001$ , DLo As Vs control:  $P < 0.005$ ). La combinación BSO-As DLo elevó los LPO al punto máximo, aún y cuando no fueron diferentes a los causados por BSO solo ( $P > 0.05$ ), pero sí mayores a los causados por la administración de As solo ( $P < 0.005$ ). Al mismo tiempo, BSO-As causó en riñón una disminución, al 25% de los niveles control, de los niveles de glutatión ( $P < 0.01$  con respecto al grupo BSO,  $P < 0.001$  con respecto a los grupos DLo As y control salino).

**FIGURA 6-D**

**Efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y lípidos peroxidados en hígado.**  
El arsénico (14.8 mg/kg, DLo) fue administrado 4 horas después de BSO (0.89 g/kg). Los animales fueron sacrificados 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media  $\pm$  D.E. de 6 experimentos individuales. **Peroxidación:** BSO-As; As y BSO, Vs. NaCl  $P < 0.001$ ; BSO-As Vs. BSO  $P < 0.005$ ; BSO-As Vs As  $P < 0.025$ . **Glutation:** BSO-As Vs control, Vs. As y Vs BSO  $P < 0.001$ ; BSO Vs control y Vs As  $P < 0.001$ ; As Vs control  $P < 0.001$ .

**EFFECTO DE LA INTERACCION BSO-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**





#### FIGURA 8-E

**Efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y lípidos peroxidados en corazón.** El arsénico (14.8 mg/kg, DLo) fue administrado 4 horas después de la administración de BSO (0.89 g/kg). Las ratas fueron sacrificadas 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media  $\pm$  D.E. de 6 experimentos. **Peroxidación:** BSO-As Vs control y Vs BSO  $P < 0.001$ , Vs As  $P < 0.05$ ; As Vs. control  $P < 0.001$ , Vs BSO  $P < 0.005$ . **Glutation:** No existe diferencias significativas en los niveles de GSH en corazón entre estos 4 grupos.

**EFFECTO DE LA INTERACCION BSO-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**

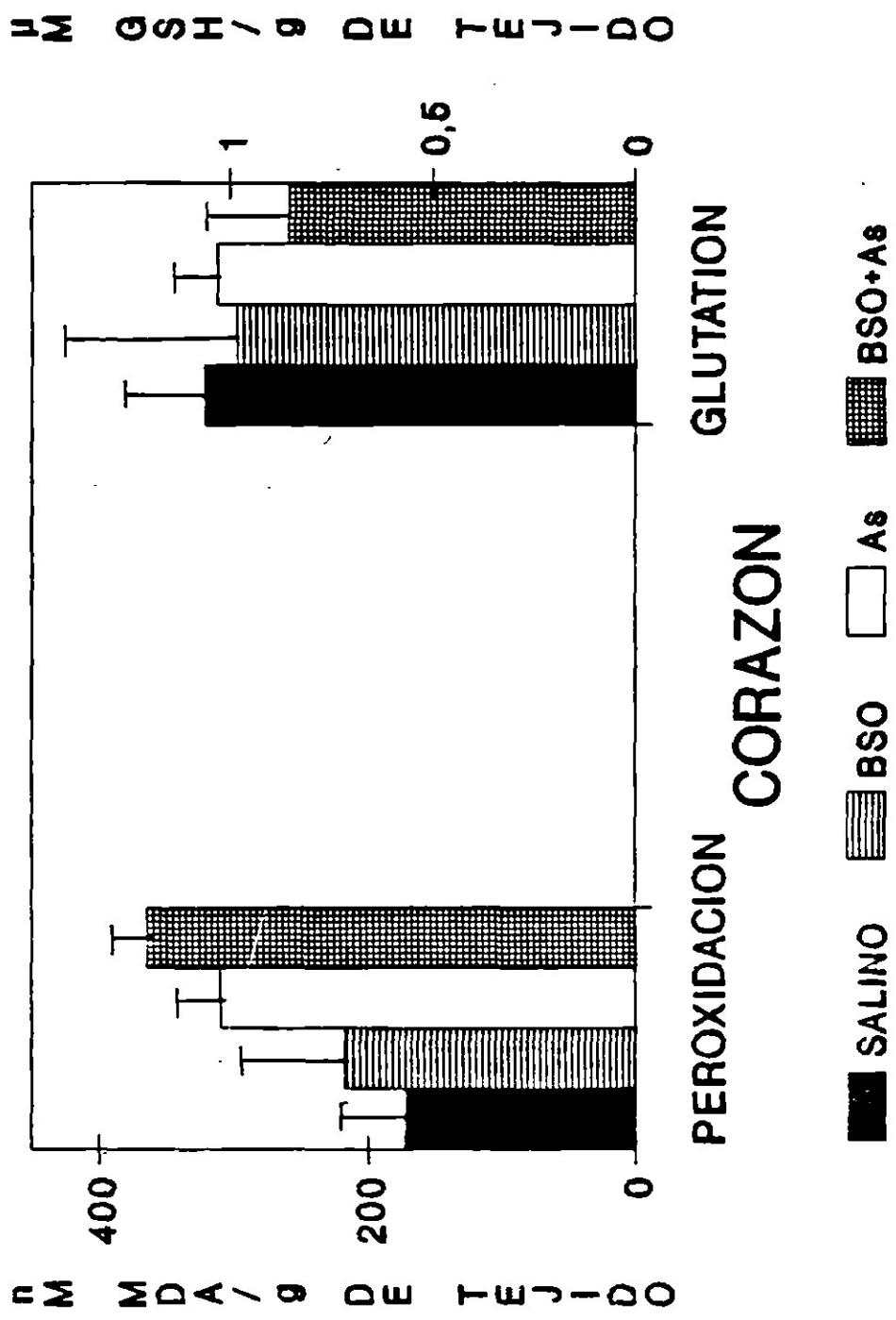
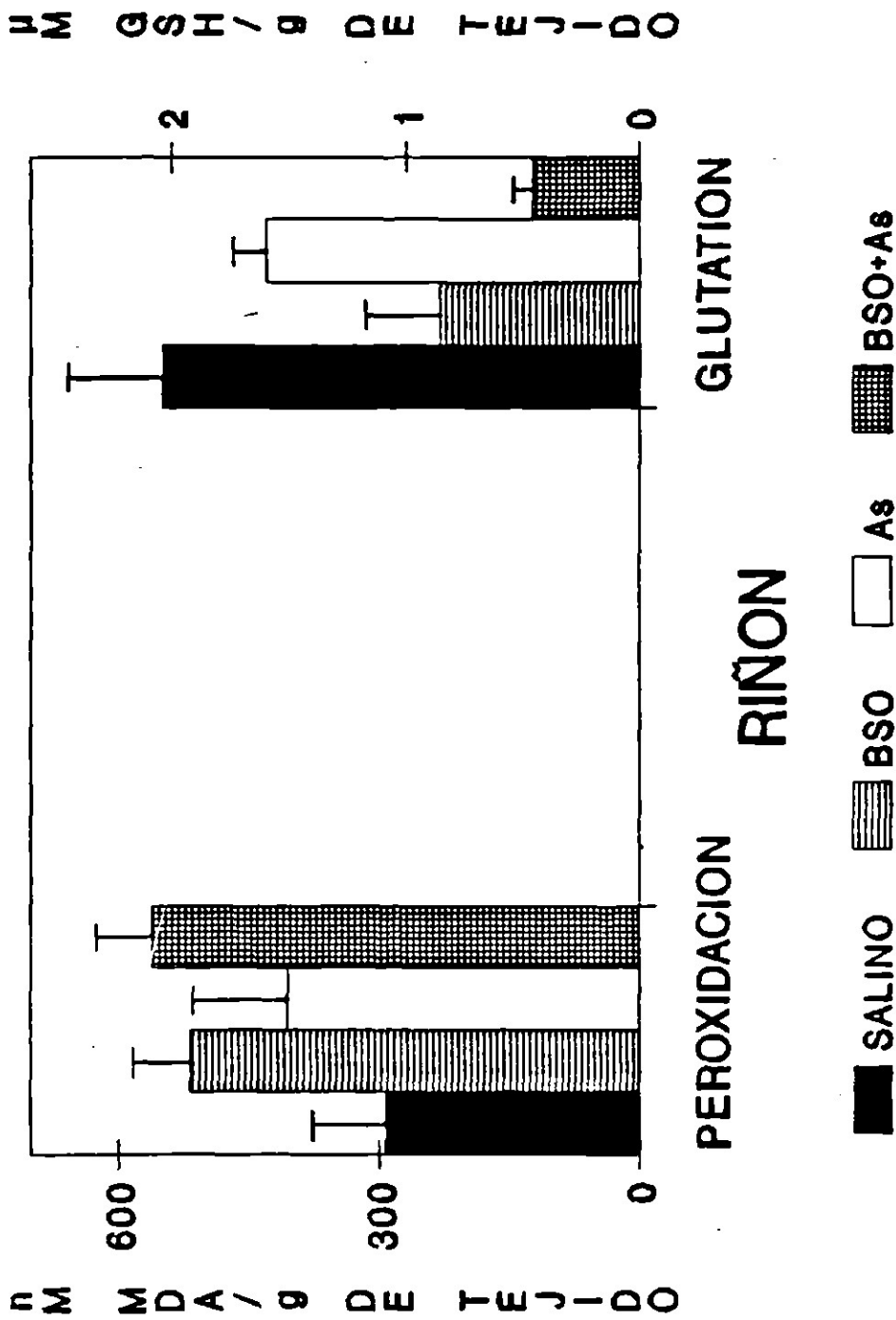


FIGURA 6-F

efecto de la interacción BSO-As en los niveles de GSH y lípidos peroxidados en riñón. El arsénico (14.8 mg/kg, DLo) fue administrado 4 horas después de BSO (0.89 g/kg). Los animales fueron sacrificados 1 hora después de la administración del metal. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  D.E. de 6 experimentos. Peroxidación: BSO-As Vs control  $P < 0.001$ , Vs As  $P < 0.005$ ; BSO Vs control  $P < 0.001$  As Vs control  $P < 0.025$ . Glutathione: BSO-As Vs control, y Vs. As  $P < 0.001$ , Vs. BSO  $P < 0.01$ ; BSO Vs. As y Vs. control  $P < 0.001$ ; As Vs. control  $P < 0.005$ .

**EFFECTO DE LA INTERACCION BSO-As  
EN LOS NIVELES DE  
GLUTATION Y PEROXIDACION DE LIPIDOS**



## 7. DISTRIBUCION DEL ARSENICO EN LOS TEJIDOS.

La TABLA 6 muestra el contenido de arsénico en 6 diferentes tejidos 1 hora después de la administración de una dosis intraperitoneal única de 14.8 mg/kg de  $\text{NaAsO}_2$  4 horas después de la administración de 4 mM/kg de BSO o salino. El contenido de arsénico en piel, en ratas tratadas con BSO previo a la administración del tóxico, aumentó aproximadamente un 60% con respecto al grupo no pretratado ( $P < 0.001$ ). Mientras tanto; el arsénico presente en el riñón de ratas no pretratadas con BSO, significa un 60% por arriba del cuantificado en ratas administradas con BSO y expuestas al arsénico. En los demás órganos analizados, el contenido de arsénico entre los dos grupos de ratas, no fueron diferentes.

#### TABLA 6

Distribución del arsénico en los tejidos. El arsénico (14.8 mg/kg, DLo) fue administrado 4 horas después de BSO o salino. Las ratas fueron sacrificadas 1 hora después de la administración del metal. Los valores mostrados son la media de un mínimo de 6 determinaciones por tejido. Entre paréntesis se da la desviación estándar observada.

\*  $P < 0.001$ .

DISTRIBUCION DEL ARSENICO EN LOS TEJIDOS (mg/g tej.)

**TRATAMIENTO**

	<b>NaCl-As</b>	<b>BSO-As</b>
Hígado	16.82 ( 3.09)	18.60 ( 4.47)
Riñón	29.38 ( 3.28)	17.83 ( 3.29) *
Corazón	10.69 ( 1.18)	11.47 ( 4.02)
Pulmón	5.19 ( 0.93)	5.97 ( 1.41)
Piel	4.51 ( 0.74)	7.26 ( 0.88) *
Ovario	16.19 ( 4.13)	18.28 ( 6.16)

## 5.0.- DISCUSION.

El glutatión, un tripeptido en cuya fórmula química interviene un resto de aminoácido con un grupo SH, es una molécula de gran importancia en toxicología. Su papel en la detoxificación del organismo de un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos ha recibido una gran atención en los últimos años. De especial interés son los procesos de detoxificación de metales mediados por procesos dependientes de glutatión (12, 17, 21). Dentro de los metales, el arsénico, un metaloide con gran afinidad a grupos sulfhidrilos, ha sido reconocido que se elimina del organismo por reacciones en las cuales participa el glutatión en su forma reducida (GSH) (20,28). La metilación del arsénico es la principal vía metabólica por la cual el metaloide disminuye su toxicidad. En esta vía, el GSH participa como un estimulador (33). De tal forma, la disminución en un 63% de los niveles de GSH logrados por la administración de BSO (un inhibidor específico de  $\gamma$ -glutamylcistein sintetasa (11)), potencia drásticamente la toxicidad del arsénico, evaluada por la letalidad producida por la DL<sub>0</sub> experimental (la DL<sub>0</sub> se convirtió en DL<sub>100</sub> en ratas intoxicadas con arsénico previamente tratadas con BSO). Por otra parte, la administración de N-acetil-L-cisteína provocó un aumento en los niveles hepáticos de GSH (60% con respecto al control), disminuyendo la letalidad de la DL<sub>100</sub> en ratas (en ratas estimuladas en la síntesis de GSH, la DL<sub>100</sub> experimental se convirtió en DL<sub>50</sub>). Estos resultados dan cuenta de que una disminución o aumento en los niveles celulares de glutatión, afectan en forma inversa la toxicidad del metaloide, esto es, con niveles bajos de GSH, la toxicidad aumenta, y viceversa. Ahora bien, la curva obtenida en la DL<sub>50</sub>, con una pendiente alta, es indicativa de una gran agresividad del arsénico y elevada susceptibilidad de las ratas hembra a este metal, ya que un ligero aumento en la dosis administrada provocó un drástico efecto potenciador de su toxicidad.

Por otra parte, el arsénico disminuyó en forma dosis-dependiente los niveles celulares de GSH en hígado y riñón, órganos envueltos en síntesis intensa de esta molécula, pero no en corazón, posiblemente por una pobre síntesis de glutatión en este órgano. De la misma forma, la butionina (BSO) inhibió la síntesis de GSH en los dos órganos anteriormente citados, pero no en corazón, donde los niveles de glutatión no fueron diferentes a los normales, ya que posiblemente la molécula de GSH presente en corazón provenga del hígado, donde existe transporte de este órgano a otros a través de la sangre. Además, el glutatión participa en una serie de reacciones de protección a la célula, entre ellos, en combinación con superóxido dismutasa (SOD), actúa como un importante mecanismo de defensa antioxidante. La peroxidación de lípidos de la membrana celular es un proceso normal en todos los tejidos vivientes, donde la generación de radicales de oxígeno ocurre por la reducción del oxígeno a agua.



Este proceso se lleva a cabo en una magnitud que en condiciones normales no provoca daño celular (34). La principal protección contra peroxidación celular es un sistema dependiente de glutatión (16): la disminución de las concentraciones de GSH a efecto del arsénico y butionina produjeron un efecto concomitante de potenciación del daño celular, ya que la cantidad de radicales libres producidos por procesos normales y por rompimientos de compuestos peroxidados (16) no fué posible neutralizarla. Aún más, la combinación BSO-As resultó ser aún más tóxica que los fármacos solos en los tres órganos analizados, donde los niveles de GSH, a excepción de corazón, fueron también más bajos. La dosis mayor de arsénico empleada produjo, de la misma forma, una depleción dramática de los niveles de GSH en los tres órganos, a la vez que un aumento de la concentración de lípidos peroxidados. La administración de NAC previno, de forma total, en corazón y riñón, la depleción de GSH, no así en hígado, donde sólo previno de forma parcial. Sin embargo, el daño a la célula en este grupo de ratas (NAC-As) persistió aún por encima de los niveles normales, pero por debajo de los valores observados en el grupo de ratas tratadas con arsénico solo. Para explicar la disminución del GSH observada en las ratas tratadas con NaAsO<sub>2</sub>, se ha sugerido que el consumo de esta molécula puede deberse a la excreción del metal (vía bilis, para el caso del hígado) unido en forma de complejo al GSH (33,29), mientras que para este mismo órgano y para el riñón y corazón, la metilación del arsénico inorgánico consumiría glutatión en su primera reacción, disminuyendo de esta forma su concentración (21, 32, 35). Algunos autores (36) sugieren, para explicar la depleción tan drástica de los niveles de GSH hepáticos en ratas tratadas con arsenicales, que ocurre una reabsorción del arsénico previamente excretado en bilis por un mecanismo dependiente de glutatión, siendo nuevamente excretado por el mecanismo mencionado, equivaliendo de esta forma, un número de 5 a 6 moléculas de GSH por cada molécula de arsénico.

Tratando de comprobar si la variación en los niveles de GSH celulares influye en la distribución del arsénico en los tejidos, las ratas fueron tratadas con la combinación BSO-As. La concentración del arsénico en todos los tejidos, con excepción de riñón y piel, fue la misma que en el grupo tratado con arsénico solo. La disminución de un 60% de la concentración del arsénico en riñón en el grupo BSO-As con aumento simultáneo del mismo porcentaje en piel, nos lleva a una hipótesis: La disminución de GSH en riñón impide la fijación del arsénico, proveniente del hígado, en este órgano, migrando el metal a un tejido rico en queratina, (37), proteína con gran cantidad de grupos SH, pudiendo fijarse el metaloide, por tanto, a esta proteína y aumentando de esta forma, la concentración en este tejido.

El efecto letal producido por el arsénico (DL<sub>50</sub>) en combinación con BSO y la protección ofrecida por NAC contra la DL<sub>50</sub> de este metal da cuenta del importante papel del glutatión

contra la toxicidad del arsénico, esto evaluado también por la protección del GSH en contra de la peroxidación de los lípidos de membrana observada en los animales tratados. La BSO en conjunto con arsénico (DL0) tuvieron mayor cantidad de lípidos peroxidados (LPO) que ningún otro grupo, a excepción de las ratas tratadas con la DL100 de arsénico, que pretratadas con NAC disminuyeron significativamente dichos niveles de LPO.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos llevan a resaltar el importante papel del glutatión en la detoxificación del arsénico inorgánico del organismo, así como a determinar la distribución del metal en el mismo cuando dicho tripeptido disminuye, lo que serviría de base para futuras investigaciones en los cuales los niveles de GSH se encuentra deprimidos por efecto de una desnutrición, factor que hace más sensible al organismo a intoxicaciones por agentes químicos. De la misma forma, nos muestra la protección efectiva de esta molécula en contra del daño celular, causado por peroxidación de lípidos membranales, donde es de gran relevancia.

## 6.0.- CONCLUSIONES:

1. Se demostró que la NAC estimula la síntesis hepática de GSH en ratas hembra, lográndose un pico de síntesis máxima a los 60 minutos después de la administración.

2. Se demostró que la BSO inhibe la síntesis hepática de glutatión en ratas, con inhibición máxima desde las cuatro horas y manteniéndose así hasta las 6 horas.

3. Se demostró que el arsénico es muy agresivo a las ratas hembra Wistar, indicado por la pendiente en la curva de la DL<sub>50</sub>.

4. De la misma forma, el arsénico causa peroxidación de lípidos en hígado, corazón y riñón de rata en las dos dosis empleadas (DL<sub>0</sub> y DL<sub>100</sub>) a los 60 minutos después de la administración por vía i.p., con simultánea depleción de los niveles de GSH en los órganos anteriormente citados.

5. La previa administración de NAC previene en forma parcial, el daño peroxidativo causada por la DL<sub>100</sub> de As en hígado corazón y riñón, en tanto que BSO potencia tal daño causado por la DL<sub>0</sub>. En estos efectos, existe correlación negativa con los niveles de GSH en los órganos anteriores.

6. Se demostró, que una disminución en los niveles de GSH previos a la administración de arsénico, aumenta la concentración del metal en piel, en tanto que disminuye en riñón.

## 7.0.- BIBLIOGRAFIA

- 1 A. L. Lehninger, Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a. Edición, Ed. Omega. 1978.
- 2 C. McGowan and W. E. Donaldson, Changes in organ nonprotein sulphhydryl and glutathione concentrations during acute and chronic administration of inorganic lead to chicks. Biol. Tr. Element Res., 10 (1986) 37-46.
- 3 A. Meister, On the discovery of glutathione. Trends Biochem Sci., 13 (1988) 185-188.
- 4 W. G. Bottje, A. S. Hassan and K. R. Holmes, Evidence for the association between total hepatic blood flow and hepatic glutathione content. Biochemical Pharmacology, 35:10 (1986) 1629-1632.
- 5 A. Meister, Minireview. Glutathione metabolism and its selective modification. The Journal of Biological Chemistry, 263:33 (1988) 17205-17208.
- 6 T. Higashi, M. Furukawa, K. Hikita, A. Naruse, N. Tateishi and Y. Sakamoto, Re-evaluation on protein-bound glutathione in rat liver. J. Biochem., 98 (1985) 1661-1667.
- 7 O. W. Griffith and A. Meister, Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:11 (1979) 5606-5610.
- 8 R. Hanh, A. Wendel and L. Flohe, The rate of extracellular glutathione in the rat. Biochim. Biophys. Acta. 539 (1978) 324-337.
- 9 G. M. Bartoli and H. Sies, Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. Febs Letters, 86:1 (1978) 89-91
- 10 M. Russel and A. Holmgren. Construction and characterization of glutaredoxin-negative mutants of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., 85 (1988) 990-994.
- 11 O. W. Griffith and A. Meister. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-Butyl Homocysteine Sulfoximine). The Journal of Biological Chemistry, 254:16 (1979) 7558-7560.
- 12 L. A. Videla, Citotoxicidad de xenobióticos: un problema metabólico. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, pp 35-40, 1988.

- 13 R. Munday and C. C. Winterbourn, Reduced Glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. *Bioch. Pharmacology*, 38:24 (1989) 4349-4352.
- 14 B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, Editorial: Free radicals and antioxidant protection: Mechanism and significance in toxicology and disease. *Human toxicol.*, 1 (1988) 1-13.
- 15 A. N. Tacchi, D. E. Jensen and P. N. Magee, Effect of glutathione modulation using buthionine sulfoximine on DNA methylation by dimethyl nitrosamine in the rat. *Bioch. Pharmacology*, 36:6 (1987) 881-885.
- 16 A. A. Horton and J. S. Bus, Lipid peroxidation and mechanism of toxicity, *CRC Critical reviews in toxicology*, 18 (1987) 27-65.
- 17 D. L. Eaton, N. H. Stacey, K. Wong and C. D. Klaassen, Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicology and applied Pharmacology*, 55 (1980) 393-402.
- 18 Y. Kang and M D. Enger, Glutathione is involved in the early cadmium citotoxic response in human lung carcinoma cells. *Toxicology*, 48 (1988) 93-101.
- 19 Casarett and Doulls, *Toxicology. The basic Science of Poisons*. 3a. Edition Ed. Mcmillan, 1986.
- 20 M. E. Vahter, *Arsenic*, National Institute of Environmental Medicine. Sweden.
- 21 B. Georis, A. Cárdenas, J. P. Buchet and R. Lauwerys, Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicology*, 53 (1990) 73-84.
- 22 H. V. Aposhian and M. M. Aposhian, Newer developments in arsenic toxicity. *Journal of the American College of Toxicology*, 8:7 (1989) 1297-1305.
- 23 D. R. Grassetti and J. R. Murray jr., Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 119 (1967) 41-49.
- 24 B. K. Wong, H.C. Chan and G. B. Corcoran, Selective effects of N-acetylcysteine stereoisomers on hepatic glutathione and plasma sulfite in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86 (1986) 421-429.

- 25 H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95 (1979) 351-358.
- 26 J. T. Litchfield and F. J. Wilcoxon, A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99 (1949).
- 27 J. H. Zar, *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1974.
- 28 J. P. Buchet and R. R. Lauwerys, Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol Appl. Pharm.*, 91 (1987) 65-74.
- 29 F. Díaz-Barriga, E. Llamas, J. Mejía, L. Carrizales, M. Santoyo, L. Vega-Vega and L. Yáñez, Arsenic-cadmium interaction in rats. *Toxicology*, 64 (1990) 191-203.
- 30 J. P. Buchet and R. Lauwerys, Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Bioch. Pharmacology*, 37:16 (1988) 3149-3153.
- 31 L. Yáñez, L. Carrizales, M. T. Zanatta, J. Mejía, L. Batres, and F. Díaz-Barriga. Arsenic-cadmium interaction in rats: Toxic effects in the heart and tissue metal shifts. *Toxicology*, 67 (1991) 227-234.
- 32 H. Nederbragt, Effect of the glutathione-depleting agents diethylmaleate, phorone and buthionine sulfoximine on biliary cooper excretion in rats. *Biochemical Pharmacology*, 38:20 (1989) 3399-3406.
- 33 I. Anundi, J. Hogberg and M. Vanter, GSH release in bile as influenced by arsenite. *FEBS Letter*, 145 (1982) 285-288.
- 34 J. G. Zinska, M. Sklodowska and W. Wasowicz, Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomed. Biochim. Acta*, 47:1 (1988) 19-24.
- 35 A. Gyurasics, F. Varga and Z. Gregus, Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochemical Pharmacology*, 42:3 (1991) 465-468.
- 36 A. Gyurasics, F. Varga and Z. Gregus, Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous glutathione and xenobiotics with glutathione-dependent hepatobiliary transport. *Biochemical Pharmacology*, 41:617 (1991) 937-944.
- 37 G. J. Tortora and N. P. Anagnostakos, *Principios de Anatomía y Fisiología*. 3a. Edición. Ed. Harla. 1984; pp. 107.

- 38 M. K. Bruno, S. D. Cohen and E. A. Khairallah. Antidotal effectiveness of N-acetylcysteine in reversing acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacology*, 37:22 (1988) 4319-4325.
- 39 M. J. Smikstein, G. L. Knapp, K. W. Kulig and B. H. Rumack, Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the National Multicenter Study (1976 to 1985). *The New England Journal of Medicine*, 319 (1988) 1557-1562.
- 40 V. L. Slott, R. E. Linder, L. F. Strader and S.D. Perrault, Unilateral depletion of testicular glutathione levels in the rat following intratesticular injections of diethylmaleate and Buthionine sulfoximine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98 (1989) 369-373.
- 41 V. L. Slott and B. F. Hales, Effect of glutathione depletion by buthionine sulfoximine on rat embryonic development in vitro. *Biochem. Pharmacology*, 36:5 (1987) 683-688.
- 42 T. Ochi, F. Otsuka, K. Takahashi and M. Ohsawa, Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured chinese hamster cells, *Chem. Biol. Interactions*, 65 (1988) 1-14.
- 43 L. Szinicz and W. Forth, Effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on gluconeogenesis. *Arch. Toxicology*, 8:7 (1989) 1297-1305.



