

Tesis de Posgrado

Modificaciones de parámetros bioquímicos por efecto del cadmio

Kesten, Eva Marta

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kesten, Eva Marta. (1982). Modificaciones de parámetros bioquímicos por efecto del cadmio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1716_Kesten.pdf

Cita tipo Chicago:

Kesten, Eva Marta. "Modificaciones de parámetros bioquímicos por efecto del cadmio". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1716_Kesten.pdf

MODIFICACIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

POR EFECTO DEL CADMIO

POR

EVA MARTA KESTEN

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas
de la Universidad de
Buenos Aires

Director: Dra Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

Trabajo realizado en el Centro de Investigaciones sobre
Porfirinas y Porfirias (CIPYP) y en la Cátedra de Toxicología
y Química Legal (Departamento de Química Biológica - Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales)

Setiembre 1982

1716
ej. 2

A mi madre

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a la Dra Alcira Batlle de Albertoni por haber asumido la Dirección de este trabajo, por la orientación que le ha dado, por su singular interés y de dicación y por la oportunidad que me ha brindado de tomar parte en el campo de las porfirinas y por todo cuanto he podido apren der de ella.

Deseo manifestar también mi agradecimiento al Dr Alberto Plate ex Profesor de la Cátedra de Toxicología y Química Legal, quien dada la importancia del tema lo puso en marcha, siendo inicialmente mi Director de Tesis, pero en particular le debo mi reconocimiento por todas las enseñanzas que de él he recogido a lo largo de tantos años.

Deseo enfatizar mi hondo agradecimiento a las Dras Ana María Stella de Rosellini y Eva Adela Wider, del Centro de In-vestigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), por su cons tante interés, apoyo e invaluable colaboración.

Agradezco

A la Dra Rosa S. Graells de Kempny, Profesora a cargo de la Cátedra de Toxicología y Química Legal, por su constante apo-yo y aliento, y por haber puesto generosamente a mi disposición laboratorios, aparatos y personal para la realización de este trabajo.

Al Dr José A. Castro, de CITEFA, por la provisión total de los animales de laboratorio.

A la Dra Julia. P. de Albinatti, Directora del Departa-mento de Química Inorgánica, Analítica y Física de esta Facul-tad, por haber facilitado el espectrofotómetro de absorción ató mica.

Al Dr Luis García Vior, del Departamento de Química Inor-gánica, Analítica y Física, por haberme iniciado en el uso del espectrofotómetro de absorción atómica.

Al Dr Carlos P. Lantos y a la Dra Ana María Brunengo, por haber facilitado instalaciones de sus respectivos laborato-

rios.

A los Lics Jorge Kempny, Elisa Lombardo y Sergio Paredes, por su eficiente colaboración en algunas de las experiencias.

Al Lic César Polo, del CIPYP, por el gran esmero y dedicación puestos al transcribir el manuscrito.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Toxicología por su apoyo y a todos los integrantes del CIPYP por su colaboración e interés.

A todas aquellas personas involucradas en tareas relacionadas con la experimentación animal mi profundo reconocimiento por su eficiente colaboración.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
ALA-S	ALA-Sintetasa
ALA-D	ALA-Dehidrasa
PBGasa	Porfobilinogenasa
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
DTPA	Acido dietilentriamino pentaacético
BAL	2,3-dimercaptopropanol
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
AIA	Alil isopropil acetamida
PCMB	p-cloromercuribenzoato
DDC	Dicarbetoxi-dihidrocolidina
GSH	Glutati3n
PM	Peso molecular
MT	Metalotioneína
DNA	Acido desoxirribonucleico
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
GR	Gl3bulos rojos
RIA	Radioinmunoensayo
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
s.c.	subcutánea
a.a.s.	Espectrometría de absorci3n at3mica
DMO	Destrucci3n de materia orgánica
S	Desviaci3n standard

C O N T E N I D O

OBJETIVOS	i
I. EL CADMIO	1
I.1 GENERALIDADES	1
I.2 FUENTES DE CADMIO EN LA CORTEZA TERRESTRE	4
I.3 USOS DEL CADMIO	5
I.4 FUENTES DE DISPERSION DEL CADMIO EN LA BIOSFERA	6
I.5 CADMIO EN LA REPUBLICA ARGENTINA	8
I.6 DATOS SOBRE DISPERSION DE CADMIO EN AIRE, AGUA, SUELO Y SERES HUMANOS	10
I.7 PRINCIPIOS SOBRE ABSORCION, DISTRIBUCION y ELIMI- NACION DE DROGAS Y TOXICOS	11
I.8 BIOCOMPLEJOS DE LOS METALES PESADOS	12
I.9 ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION DEL CADMIO	13
I.9.1 Absorción gastrointestinal del cadmio	13
I.9.2 Transporte y distribución del cadmio	14
I.9.2.1 Cadmio en sangre	14
I.9.2.2 Distribución tisular del cadmio	14
I.9.3 Excreción del cadmio	16
I.9.4 Vida media biológica del cadmio	16
I.10 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ABSORCION Y DISTRI- BUCION DEL CADMIO	17
I.10.1 Estado nutricional	17

I.10.1.1	Proteínas	17
I.10.1.2	Calcio	17
I.10.1.3	Hierro	18
I.10.1.4	Cobre y zinc	19
I.10.1.5	Selenio	21
I.10.1.6	Vitaminas	22
I.10.2	Efecto de la edad y dietas lácteas	22
I.10.3	Sexo	23
I.11	METALOTIONEINAS	25
I.11.1	Generalidades	25
I.11.2	Propiedades	26
I.11.3	Algunos metales inductores de metalotioneínas	27
I.11.4	Inducción y síntesis de las cadmio y zinc-tio neínas	30
I.11.5	Cinética de la síntesis y degradación	32
I.11.5.1	Cinética de la síntesis y degradación en hí gado	32
I.11.5.1.1	Respuesta al cadmio	32
I.11.5.1.2	Respuesta al zinc	34
I.11.5.1.3	Respuesta al cobre	35
I.11.5.2	Cinética de la síntesis y degradación en ri ñón	36
I.11.6	Síntesis de metalotioneínas en otros órganos	39
I.11.7	Funciones biológicas de las metalotioneínas	40
I.11.7.1	Rol en el metabolismo intermedio	41
I.11.7.2	Regulación del metabolismo del zinc	42
I.11.7.3	Acumulación del exceso de zinc	42
I.11.7.4	Función de conservación	43
I.11.7.5	Absorción del zinc	43

I.11.7.6 Rol de almacenamiento y regulatorio de las cobre-tioneínas	44
I.11.7.7 Función de las metalotioneínas en el desarrollo fetal y postnatal	44
I.11.7.8 Transporte de metales	45
I.11.7.9 Respuesta inmune	46
I.11.7.10 Función de la tioneína en las intoxicaciones con metales	47
I.11.7.10.1 Función protectora	47
I.11.7.10.2 Toxicidad potencial de la cadmio-tioneína	51
I.11.7.10.3 Progresión de la etapa tolerante a la etapa tóxica, luego de la administración crónica de sales inorgánicas de cadmio	52
I.12 TERAPIA DE LA INTOXICACION CON CADMIO	55
I.13 ZINC Y CADMIO	58
I.14 VITAMINA C Y CADMIO	61
I.15 ACIDO FOLICO Y CADMIO	64
II. LA BIOSINTESIS DEL HEMO Y EL CADMIO	65
II.1 INTRODUCCION	65
II.2 LAS ENZIMAS DEL CAMINO DE LOS TETRAPIRROLES	68
II.2.1 Succinil CoA Sintetasa	68
II.2.2 Acido δ -aminolevúlico Sintetasa	68
II.2.3 Acido δ -aminolevúlico Dehidrasa	69
II.2.4 Porfobilinogenasa	71
II.2.5 Decarboxilasa	72
II.2.6 Coproporfirinogenasa	73

II.2.7 Protoporfirinógeno Oxidasa	74
II.2.8 Ferroquelatasa	74
II.3 BIODERADACION DEL HEMO	75
II.3.1 Hemooxigenasa	75
II.3.2 Biliverdina Reductasa	75
II.4 CONTROL BIOLÓGICO DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO	78
II.5 PORFIRIA EXPERIMENTAL	82
II.5.1 Generalidades	82
II.5.2 Mecanismos de acción de los compuestos porfirinogénicos	84
II.6 ESTUDIOS ACERCA DE LOS EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS	87
II.6.1 Efectos <i>in vitro</i>	87
II.6.1.1 Acción del cadmio sobre las primeras enzimas de la biosíntesis	87
II.6.1.2 Acción del cadmio sobre el ALA-D	87
II.6.1.3 Interpretaciones acerca del efecto de los metales sobre el ALA-D	89
II.6.1.4 Acción del cadmio sobre la Porfobilinogenasa	90
II.6.1.5 Acción del cadmio sobre la Decarboxilasa	91
II.6.1.6 Acción del cadmio sobre la Ferroquelatasa	91
II.6.2 Efectos <i>in vivo</i>	91
II.6.2.1 Acción del cadmio sobre el ALA-D	92
II.6.2.2 Acción sobre la excreción de porfirinas y ALA	93
II.6.2.3 Acción del cadmio sobre la Hemooxigenasa y citocromo P ₄₅₀	93

III. MATERIALES Y METODOS	95
III.1 MATERIALES	95
III.2 METODOS	96
III.2.1 Recolección de la orina y de las heces	96
III.2.2 Obtención de los órganos y sangre	96
III.2.3 Obtención de las enzimas	96
III.2.3.1 Glóbulos rojos	96
III.2.3.2 Organos (hígado, riñón y bazo)	96
III.2.4 Determinación de la excreción de intermedia- rios de la biosíntesis del hemo	97
III.2.4.1 Determinación de ALA y PBG en orina	97
III.2.4.1.1 Generalidades	97
III.2.4.1.2 Determinación colorimétrica del PBG	97
III.2.4.1.3 Determinación colorimétrica del ALA	98
III.2.4.1.4 Preparación de las resinas y columnas	99
III.2.4.1.5 Procedimiento para la determinación de PBG y ALA en orina	99
III.2.4.2 Estimación de porfirinas	100
III.2.4.2.1 Estimación de porfirinas esterificadas totales en orina	100
III.2.4.2.2 Estimación de porfirinas esterificadas totales en heces	101
III.2.4.2.3 Separación cromatográfica de las porfiri- nas esterificadas	102
III.2.4.2.4 Estimación de porfirinas libres en orina	103
III.2.4.2.4.1 Generalidades	103
III.2.4.2.4.2 Procedimiento	104
III.2.4.2.4.3 Observaciones	105
III.2.5 Determinaciones enzimáticas	105

III.2.5.1 Determinación de la actividad enzimática de ALA-D	105
III.2.5.1.1 Sistema de incubación	105
III.2.5.1.2 Cuantificación del PBG formado	106
III.2.5.1.3 Unidad enzimática	106
III.2.5.1.4 Estimación del contenido proteico	106
III.2.5.2 Determinación de la actividad enzimática de PBGasa y Deaminasa	107
III.2.5.2.1 Soluciones de PBG	107
III.2.5.2.2 Sistema de incubación	107
III.2.5.2.3 Estimación espectrofotométrica de las porfirinas	108
III.2.5.2.4 Unidad enzimática	108
III.2.5.3 Efecto de distintos compuestos <i>in vitro</i>	108
III.2.5.4 Expresión de los resultados de actividad enzimática en las experiencias <i>in vivo</i>	108
III.2.6 Determinación del contenido de cadmio y de otros metales	109
III.2.6.1 Generalidades	109
III.2.6.2 Espectrometría de absorción atómica	110
III.2.6.2.1 Fundamentos	110
III.2.6.2.2 Evolución de la técnica: dificultades y soluciones	110
III.2.6.3 Procedimiento empleado	114
III.2.6.3.1 Aspectos generales	114
III.2.6.3.2 Fracción en la cual se efectuaron las <u>de</u> terminaciones de elementos metálicos	115
III.2.6.3.3 Destrucción de la materia orgánica	116
III.2.6.3.4 Condiciones de trabajo para la a.a.s.	117
III.2.6.3.5 Cálculo de las concentraciones	117

III.2.7 Determinación de vitamina C (ácido L-ascórbico) en drogas e inyectables	117
III.2.7.1 El problema de la inestabilidad de la vitamina C	117
III.2.7.2 Espectro ultravioleta (UV) del ácido ascórbico	121
III.2.7.3 Espectro UV y estabilidad de las drogas utilizadas	122
III.2.8 Dosis y forma de administración del cadmio, zinc y vitamina C. Experiencias <i>in vivo</i>	122
III.2.8.1 Generalidades	122
III.2.8.2 Antecedentes sobre dosis de cadmio empleadas en intoxicaciones experimentales	123
III.2.8.2.1 Intoxicaciones a largo plazo por contaminación del agua de bebida	123
III.2.8.2.2 Intoxicaciones crónicas obtenidas por inyección i.p. o s.c.	123
III.2.8.3 Antecedentes sobre dosis de zinc empleadas en diversas experiencias	124
III.2.8.4 Antecedentes sobre dosis de ácido ascórbico empleadas en terapéutica	124
III.2.8.5 Antecedentes sobre dosis de ácido fólico empleadas en terapéutica	124
III.2.8.6 Dosis de cadmio, zinc y ácido ascórbico empleadas	125
III.2.9 Evaluación estadística	125
IV. PARTE EXPERIMENTAL	126
IV.1 ESTUDIOS PRELIMINARES	126

IV.1.1 Eficiencia de extracción de la fracción enzimática de hígado, riñón y bazo	126
IV.1.2 Hemólisis de los glóbulos rojos	126
IV.1.3 Dilución de los glóbulos rojos	126
IV.1.4 Estudio de la influencia del plasma en las actividades de ALA-D y PBGasa	126
IV.1.5 Estabilidad de las enzimas en los órganos y en los homogenatos	127
IV.1.5.1 ALA-D	127
Iv.1.5.2 PBGasa y Deaminasa	132
IV.1.6 Expresión de las actividades enzimáticas en las experiencias <i>in vivo</i>	132
IV.1.7 Valores normales de actividades enzimáticas	133
IV.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	134
IV.2.1 Efecto del cadmio sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa	134
IV.2.2 Efectos del zinc sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa	140
IV.2.3 Efecto del ácido fólico sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa	146
IV.2.4 Efecto del ácido L-ascórbico sobre las acti- vidades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa	146
IV.2.5 Efecto del glutati6n en las determinaciones de ALA-D	146
IV.2.6 Efectos del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibici6n del ALA-D con cadmio. Influencia del glutati6n	150
IV.2.7 Efecto del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibici6n con cadmio de ALA-D, PBGasa y Deami- nasa	154

IV.2.8 Efectos del ascórbico-zinc y fólico-zinc sobre las enzimas	161
IV.2.9 Discusión y conclusiones	161
IV.3 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	168
IV.3.1 Patología observada en los animales durante la intoxicación crónica con cadmio	168
IV.3.1.1 Aspectos experimentales	168
IV.3.1.2 Discusión y conclusiones	172
IV.3.2 Actividad de las enzimas de la biosíntesis del hemo luego de la administración de cadmio por vía oral durante períodos prolongados	172
IV.3.3 Actividad de las enzimas de la biosíntesis del hemo luego de la administración de cadmio por vía i.p.	177
IV.3.4 Estudio del efecto de posibles agentes tera - péuticos: ácido ascórbico y zinc	179
IV.3.4.1 Estudio de los efectos cadmio-zinc	182
IV.3.4.1.1 Efectos del cadmio	183
IV.3.4.1.2 Efectos del zinc	183
IV.3.4.1.3 Estudio de los efectos cadmio-zinc	183
IV.3.4.2 Estudio de los efectos cadmio-ascórbico	188
IV.3.4.2.1 Efectos del cadmio	188
IV.3.4.2.2 Efectos del ácido ascórbico	188
IV.3.4.2.3 Efectos cadmio-ascórbico	194
IV.3.5 Acumulación de cadmio, zinc y cobre	194
IV.3.5.1 Administración de cadmio por vía oral - Acumulación del metal en órganos	194
IV.3.5.2 Administración de cadmio por vía i.p.	194
IV.3.5.2.1 Concentración de cadmio en órganos y GR	194

IV.3.5.2.2	Concentración de cadmio en órganos y GR en las experiencias cadmio-ascórbico	199
IV.3.5.2.3	Acumulación de cadmio en órganos en las experiencias cadmio-zinc	199
IV.3.5.2.4	Efecto del cadmio sobre la acumulación de zinc en órganos. Influencia de la adminis- tración de zinc	204
IV.3.5.2.5	Efecto del cadmio sobre la acumulación de cobre en riñón. Influencia de la adminis- tración de zinc y de ascórbico	208
IV.3.6	Correlación entre actividades enzimáticas y concentración de metales	212
IV.3.7	Discusión y conclusiones sobre actividad enzi- mática y terapia	216
IV.3.8	Diuresis durante las experiencias de adminis- tración oral de cadmio	233
IV.3.9	Excreción urinaria de cadmio durante las expe- riencias <i>in vivo</i>	235
IV.3.9.1	Administración de cadmio por vía oral	235
IV.3.9.2	Administración de cadmio por vía i.p.	235
IV.3.10	Excreción de productos intermedios de la bio- síntesis del hemo	237
IV.3.10.1	Excreción de productos intermedios de la biosíntesis del hemo en las experiencias de administración oral de cadmio	237
IV.3.10.1.1	Excreción de ALA y PBG	237
IV.3.10.1.2	Excreción de porfirinas en orina	237
IV.3.10.1.3	Excreción de porfirinas en heces	240
IV.3.10.2	Excreción de precursores y porfirinas en orina y en heces, luego de la administra -	

ción de cadmio por vía i.p.	240
IV.3.10.3 Efecto del agregado de cadmio a la solución de esterificación de las porfirinas en heces	243
IV.3.10.4 Discusión y conclusiones	243
 BIBLIOGRAFIA	 245
 RESUMEN	 269

OBJETIVOS

Los efectos tóxicos de los metales sobre los organismos vivos han sido considerados como un problema para la salud de las personas expuestas a los mismos por razones laborales y también para la población en general, especialmente si reside en áreas industrializadas, aunque muchos contaminantes preexisten en el medio naturalmente debido a determinados tipos de suelos, aguas y alimentos. Este problema se ha visto agudizado por el gran desarrollo tecnológico que ha desencadenado el uso masivo de dichos metales, no sólo desde el punto de vista cuantitativo, sino también por la creciente incorporación a los procesos de elementos que en cierto modo no se consideraban riesgosos para la salud debido a su escasa incidencia.

Ciertos metales y sus compuestos, cuando actúan como contaminantes del medio ambiente y son absorbidos por el organismo vivo pueden comportarse como agentes etiológicos de enfermedades profesionales o de intoxicaciones crónicas (con plomo, mercurio, bismuto, cadmio, manganeso, berilio, bario, etc).

Uno de los medios fundamentales para lograr los objetivos de los programas de higiene ambiental es la identificación de las condiciones del medio y de los cambios biológicos que anuncian las primeras fases del deterioro de la salud. Como no siempre se dispone de métodos técnicos para esa identificación, y no siempre se aplican medidas preventivas, sigue siendo necesaria la detección precoz del deterioro de la salud.

Las modificaciones de los parámetros bioquímicos medidos en diversos medios biológicos figuran con frecuencia entre los indicadores más sensibles de las alteraciones precoces de la salud debidas a la presencia de agentes nocivos en el medio de trabajo. Esas modificaciones representan una reacción a la exposición al agente nocivo y, en ciertos casos, pueden indicar un verdadero efecto sobre la salud. En otros casos pueden indicar simplemente la existencia de mecanismos homeostáticos y compensatorios que son reversibles. Pueden también ser el efecto de lesiones celulares menores pero que no llegan a alterar la salud porque el proceso de regeneración es suficiente para corregirlas. Es por lo tanto esencial proceder a una eva-

luación cuantitativa de los parámetros bioquímicos y al establecimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta.

Los progresos en el conocimiento de los caminos metabólicos y de las técnicas de análisis han permitido identificar y medir numerosos parámetros bioquímicos que antes no se conocían. Muchos de ellos sólo sirven todavía para la investigación, unos porque exigen un material complejo y otros porque aún se desconoce el significado de las modificaciones observadas. Por eso, cuando se trata de seleccionar parámetros bioquímicos específicos, un criterio importante es su valor predictivo en lo que se refiere a la exposición y a la alteración inminente o existente de la salud. Son raros los parámetros cuyo valor predictivo se ha comprobado; algunos sólo son visibles cuando se utilizan en estudios epidemiológicos.

Como las células y los tejidos sólo pueden aportar un número limitado de respuestas a una gran variedad de agresiones, las modificaciones observadas son con frecuencia no específicas. A veces, la naturaleza cuantitativa del cambio, proporciona una especificidad algo mayor, pero en la mayoría de los casos será indispensable disponer de un medio independiente que permita probar la exposición a un agente particular para confirmar la relación de causa a efecto.

Refiriéndonos a los metales, el plomo tiene uso masivo y provoca una intoxicación conocida con el nombre de saturnismo. Como el plomo ejerce un efecto característico en el camino biosintético del hemo, se producen modificaciones de actividades enzimáticas, y alteraciones en la concentración en sangre o en orina de ciertos precursores. Antes que se presenten síntomas de intoxicación, se observan cambios precoces reversibles de dichos parámetros de laboratorio. Aunque no se trata de parámetros específicos, son útiles para el estudio de grupos de obreros. En los casos de intoxicación crónica esos parámetros son indicadores cuantitativos de respuesta. Las determinaciones de plomo en sangre y plomo en orina se consideran también indicadores cuantitativos de la exposición.

Se sabe que otros metales también producen alteraciones en el camino biosintético del hemo.

El cadmio tiene al presente una utilización industrial cada vez mayor, y su presencia en el medio ambiente ocasiona efectos tóxicos sobre los organismos expuestos.

El cadmio es un subproducto de la fabricación del zinc o plomo. Industrialmente se usa en aleaciones, en pigmentos y en los reactores nucleares como absorbedor de neutrones. La fabricación de soldadura para aluminio, amalgamas dentales, lámparas incandescentes, bombas de humo, munición de armas de bajo calibre y baterías, ofrece oportunidades adicionales para la exposición industrial. El cadmio de los efluentes industriales, así como el de las emisiones de los vehículos a motor, contribuye a la contaminación del aire. Las concentraciones elevadas en el agua de bebida pueden deberse a pérdidas de cadmio de las cañerías o a contaminación industrial.

El cadmio forma biocomplejos en el organismo, que son causa de su prolongado tiempo de residencia en el mismo y que lo hacen un tóxico acumulativo. El metal se deposita pincipalmente en riñón y en hígado.

La exposición durante un tiempo prolongado al cadmio ha estado relacionada con el desarrollo de varios síntomas y signos: insuficiencia respiratoria, trastornos renales, osteomalacia, anemia, anosmia y coloración amarilla de los dientes. Existe una seria preocupación acerca del rol potencial del cadmio en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y en particular de la hipertensión. Algunos estudios también han sugerido que el cadmio podría ser carcinogénico.

Si bien el control de la concentración de metal en fluidos biológicos se considera en general un parámetro específico de la intoxicación por cada metal, no hay datos que demuestren que la concentración de cadmio en sangre se pueda usar para estimar los niveles de cadmio en los órganos de seres humanos. No existe todavía un nivel umbral en sangre que tenga valor para el control de los obreros o de poblaciones expuestas al cadmio en los alimentos o en el aire ambiental.

Diversas investigaciones indican que en grupos de individuos expuestos a concentraciones no demasiado elevadas de

cadmio y que tienen una función renal normal, puede existir una relación entre el cadmio total retenido en el cuerpo y la excreción urinaria. Debido a la existencia de una gran dispersión, el valor predictivo es bajo para casos aislados. Durante la exposición en ambientes laborales, las relaciones entre cadmio retenido y excreción urinaria pueden ser variables, debido especialmente a lesiones renales asociadas.

A pesar de que es cuantiosa la información existente acerca del cadmio y sus efectos, aún no se sabe cual es su mecanismo de acción y es todavía más escaso el conocimiento acerca de su acción sobre el metabolismo de las porfirinas; sin embargo, en virtud de sus propiedades debería poseer efectos significativos sobre ese camino metabólico.

De allí que se considere importante determinar los efectos del cadmio sobre el metabolismo de las porfirinas, así como intentar establecer alguna correlación entre el aumento o disminución de alguna actividad enzimática, o de la excreción de algún metabolito y las concentraciones de cadmio acumuladas en los distintos órganos. También sería interesante esclarecer el o los mecanismos por los cuales se producen dichas alteraciones.

Para poder cumplir con los objetivos propuestos se necesita un conocimiento profundo no sólo acerca de la toxicología del cadmio sino muy especialmente de la dinámica de su absorción, distribución, y excreción. Interesa conocer las características de los cadmio-complejos biosintetizados por el organismo, su estabilidad y su toxicidad. Además, es importante tener en cuenta que los elementos tóxicos interaccionan muchas veces con los esenciales, pudiendo la presencia de cantidades adecuadas de estos últimos en la dieta contribuir en algunos casos a la protección del hombre y de los animales a los efectos de bajos niveles de metales tóxicos. Algo análogo ocurre en relación con las vitaminas. Por ello la administración de dosis controladas de ciertos elementos esenciales y/o vitaminas paralelamente al cadmio, podría atenuar la toxicidad del tóxico, y de los estudios dosis-efecto sobre enzimas de la biosíntesis del hemo podría surgir un mayor conocimiento acerca del mecanismo de acción del cadmio sobre la biosíntesis de estos pigmentos vitales.

Ello constituiría una contribución al terreno todavía poco explorado del conocimiento de parámetros bioquímicos útiles para la detección precoz del deterioro de la salud por contaminantes menos difundidos pero de utilización creciente.

INTRODUCCIÓN

I. EL CADMIO

I.1 GENERALIDADES

Los metales constituyen una fracción importante de la biosfera y parece probable que durante el proceso de la evolución que dió origen a los mamíferos haya prevalecido la composición metálica de la corteza terrestre. Así surgió el hombre como un ser heterotrófico que requiere tanto nutrientes orgánicos como inorgánicos para sus procesos vitales.

El plomo, el mercurio, el cadmio y otros metales pesados, son elementos no esenciales que resultan tóxicos a bajos niveles, por lo cual constituyen un problema para la salud de las personas expuestas a los mismos por razones laborales, así como para la población en general.

El cadmio y el zinc pertenecen a la misma "familia" de metales. El cadmio se obtiene como subproducto de la producción del zinc, pero también tiene muchas aplicaciones industriales, entre las cuales podemos mencionar el galvanizado de metales y aleaciones, fabricación de pigmentos, baterías, estabilizantes para plásticos y colectores de energía solar (Environmental Science and Technology, 1977).

El cadmio es y seguirá siendo importante para la economía tecnológica mundial (Environ. Sci. and Technol., 1977).

Desde hace mucho tiempo atrás se reconoce que el cadmio es un elemento muy tóxico para los seres vivos. Sin embargo, es de reciente data una seria preocupación por sus posibles efectos a largo plazo sobre la salud humana. Esto se debe a su creciente consumo y a su consiguiente dispersión en el ambiente, pero en especial, debido a la aparición a fines de la década del 40 y a comienzos de la del 50 de la enfermedad de Itai-itai en la Bahía de Toyama, Japón. Esta enfermedad se producía en mujeres de más de cincuenta años de vida, que habían tenido varios embarazos. Se caracterizaba por dolores lumbares y de las piernas, deformaciones del esqueleto, susceptibilidad a múltiples fracturas después de ligero esfuerzo físico y desde dificultades al caminar hasta parálisis (Belliles, 1975). Eran también características de dicha dolencia proteinuria, enzimuria, glucosuria, aminoaciduria, hipercalc*u*

uria, hipouricemia, hipercreatinemia e hipocloremia (Nogawa, 1978). Se demostrò que el cadmio de una fundición, ubicada a aguas arriba de la bahía era el causante de la enfermedad (Beliles, 1975). El cadmio era transportado por el agua y concentrado en los arrozales a niveles bastante altos (Fleischer, Sarofim, Fassett, Hammond, Schacklette, Nisbet y Epstein, 1974). Se ha estimado que la ingesta diaria promedio de cadmio en el área endémica estaba entre los 500 y 800 $\mu\text{g}/\text{día}$, mientras que la ingesta del metal fuera del área era de 30-50 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Fukushima, 1973; Kjelström, Shiroishi y Evrin, 1977).

Pero la enfermedad de Itai-itai representa sólo una de las facetas de la intoxicación con cadmio, que puede ocasionar síntomas muy diversos, los cuales dependen de una multiplicidad de factores.

Las principales manifestaciones de la intoxicación aguda observadas en el hombre son trastornos gastrointestinales después de la ingestión y neumonitis química después de la inhalación de vapor de óxido de cadmio. En animales se han observado también efectos tóxicos en otros órganos (sistema cardiovascular, riñón, hígado, sistema hematopoyético, páncreas, sistema inmunológico, aparato reproductor).

Varios signos y síntomas se han relacionado en particular con la exposición humana a largo plazo: insuficiencia respiratoria, trastornos renales, osteomalacia, anemia, anosmia y coloración amarilla de los dientes. También se puede inducir en ratas hipertensión por administración de cadmio durante largos períodos. Estas últimas observaciones han dado lugar a una gran preocupación debido a que el cadmio podría ser un causante potencial de enfermedades cardiovasculares y de hipertensión en el hombre. Algunos estudios también indican que el cadmio podría ser carcinogénico (IARC, 1973, 1976).

Actualmente se tratan de adoptar mayores medidas de seguridad con el objeto de disminuir los riesgos que ocasiona el uso del cadmio.

Se realizan también esfuerzos para entender mejor su complicado mecanismo de acción en el organismo, para encontrar formas adecuadas de evaluar la salud de los individuos expuestos a dicho metal y para hallar tratamientos adecuados para

prevenir o neutralizar su toxicidad.

I.2 FUENTES DE CADMIO EN LA CORTEZA TERRESTRE

Se estima que la concentración del cadmio en la corteza terrestre es de 0,15 ppm.

El cadmio es un elemento que se acumula naturalmente en los depósitos de sulfuros, donde acompaña al zinc y al mercurio, y en mucho menor grado, al plomo y al cobre. En los mismos se encuentra como CdS, CdSe, CdO, CdCO₃, (Hg, Cd)S con 11,7% de Cd. El compuesto más común es el CdS. Casi todo el cadmio acompaña como elemento menor a los sulfuros de otros elementos especialmente a los de zinc, en algunos de los cuales llega a estar en una proporción de 5%, aunque otros contienen en promedio 0,3% de cadmio. El PbS llega a tener 5.000 ppm de cadmio, aunque en dicho mineral se ha informado un contenido medio de 10 ppm.

La concentración de cadmio es baja en todas las rocas ígneas y su contenido en las mismas no está asociado con ningún elemento mayor ni con el zinc, variando mucho la relación Cd/Zn en todos los tipos de rocas ígneas. Se encuentran mayores concentraciones de cadmio en esquistos (especialmente en los ricos en materia orgánica), sedimentos oceánicos y lacustres, fosforitas y nódulos oceánicos de manganeso (Fleischer et al., 1974).

Toda la producción mundial de cadmio proviene de los sulfuros de zinc, plomo y cobre de los cuales se recupera como un subproducto.

I.3 USOS DEL CADMIO

A pesar de que el cadmio es un subproducto tiene muchas aplicaciones. La producción mundial de cadmio en los últimos años ha oscilado entre 11.000-14.000 toneladas métricas por año.

Los cuatro mayores consumidores de cadmio son los Estados Unidos, Alemania Occidental, Gran Bretaña y Japón.

El principal uso del cadmio que alcanza el 35% es en el galvanizado (depósito electrolítico de cadmio sobre la superficie de acero, hierro, cobre, bronce y otros metales y aleaciones para protegerlos de la corrosión), seguido por la producción de pigmentos (23%), como el amarillo de sulfuro de cadmio. Otros usos incluyen estabilizantes para cloruro de polivinilo (PVC) (alrededor del 16%) y baterías de níquel-cadmio (13%). Sin embargo estos porcentajes están sujetos a modificaciones, pues por ejemplo la fabricación de baterías es un rubro en creciente actividad. Un uso nuevo del cadmio lo constituyen los colectores de energía solar, que podrían llegar a consumir en el futuro un 50% del metal. Por su capacidad de absorber neutrones el cadmio también se emplea en las barras de control de algunos reactores nucleares (Environ. Sci. and Technol., 1977).

I.4 FUENTES DE DISPERSION DEL CADMIO EN LA BIOSFERA

Ni bien el hombre empezó a producir metales, empezó a contaminar el ambiente con cadmio, ya que éste constituye una impureza normal del zinc, cobre y plomo.

Durante este siglo el cadmio y sus compuestos han sido empleados en forma creciente por las industrias, con el consiguiente aumento de la contaminación ambiental. El cadmio puede ser emitido a la atmósfera por las fundiciones, y por las industrias que lo usan para la fabricación de acumuladores, aleaciones, pinturas y plásticos. También contribuyen la incineración de residuos y el tratamiento de chatarra. Otra fuente es la contaminación del suelo con fertilizantes obtenidos con residuos provenientes de plantas de tratamiento de aguas.

Una parte del cadmio del aire es inhalada por los seres humanos y animales, pero la mayor parte se deposita en el suelo y agua.

El cadmio depositado en el agua puede dar lugar a un aumento de la concentración del metal en organismos del agua potable. En casos de inundación o irrigación la cantidad de cadmio presente en el suelo podría incrementarse llevando consiguientemente a un aumento del mismo en productos agrícolas como arroz y trigo (Friberg, Piscator, Nordberg y Kjellström, 1974).

Algunos autores han intentado confeccionar diagramas de flujo del cadmio en la biosfera. La Figura 1 fue tomada de Fleischer et al. (1974).

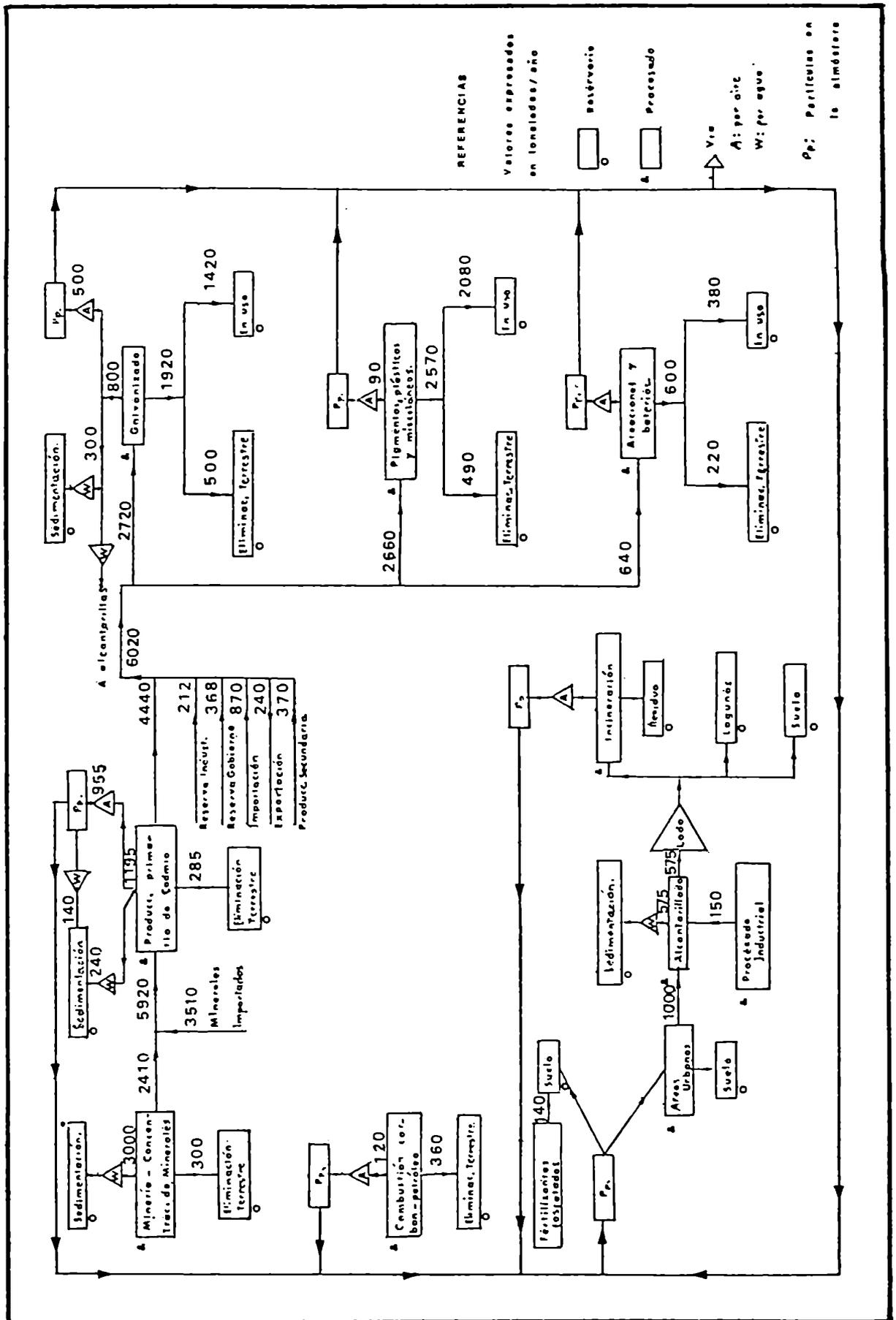


Figura 1: Fuentes, usos y redistribución del cadmio en la biosfera. El estudio corresponde a los Estados Unidos (año 1968) (Tomado de Fleischer et al., 1974).

I.5 CADMIO EN LA REPUBLICA ARGENTINA

El cadmio en nuestro país se obtiene como subproducto de la elaboración de zinc electrolítico. Se produce en Río Tercero (Córdoba) y en San Lorenzo (Santa Fe).

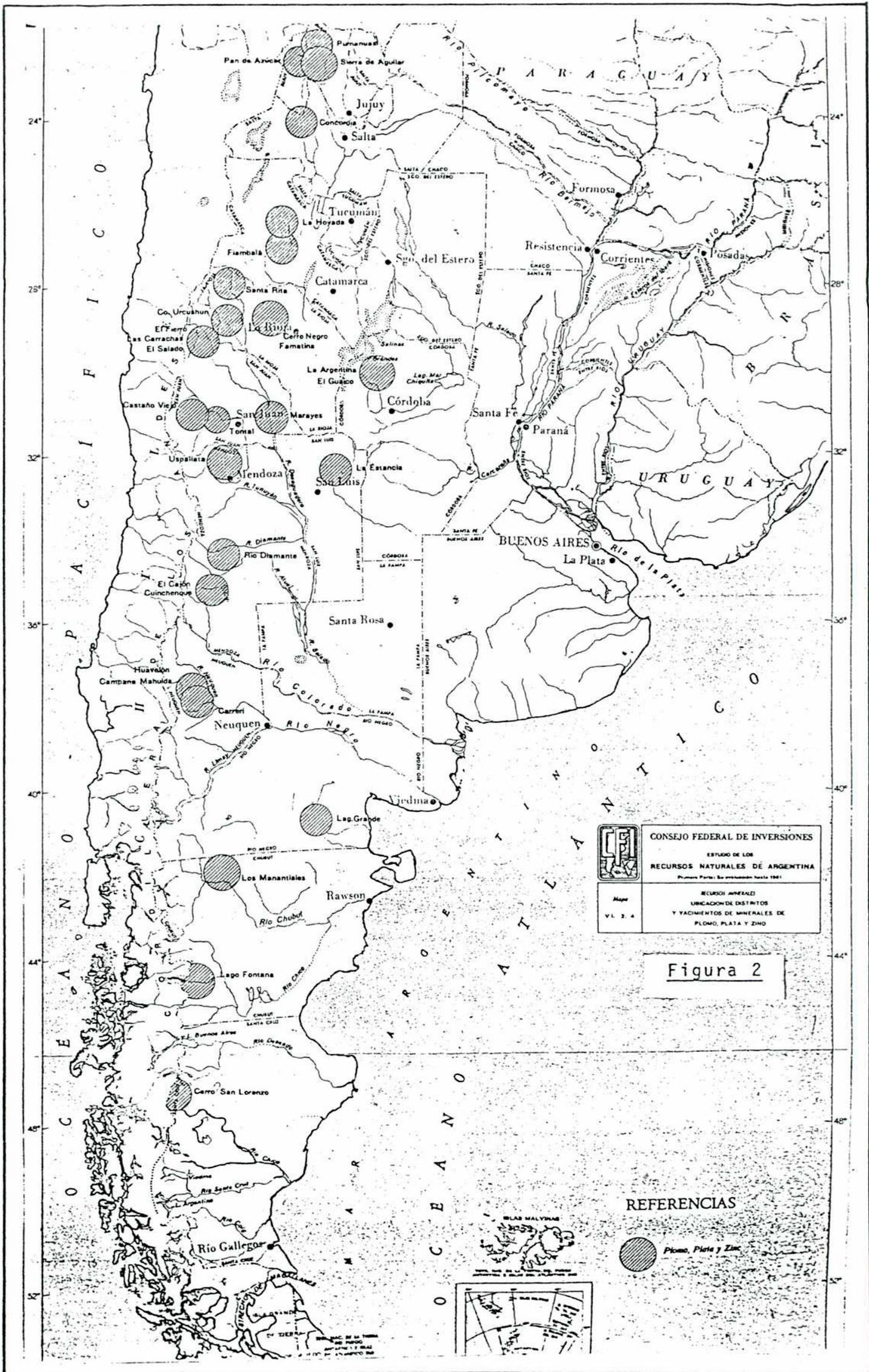
En 1967 - 1977 el consumo aparente osciló entre 36,7 y 57,7 toneladas anuales y casi la totalidad de dicho metal ha sido producido en el país. Se espera una demanda futura creciente en razón de la expansión de los sectores que lo requieren en sus elaboraciones (Cámara de la Industria Química, 1978).

Es interesante mencionar que también la demanda de zinc, de alrededor de 40.000 toneladas está cubierta casi totalmente por producción nacional (Carlevari, 1980).

En la zona cordillerana de nuestro país hay una mineralización profusa de plomo predominantemente como PbS y de zinc como ZnS (Consejo Federal de Inversiones, 1966). En la Figura 2 se puede ver la distribución de los principales yacimientos. Estos datos nos indican que en nuestro país existe abundancia de los minerales que suelen contener cadmio, y que además hay suficiente producción del mismo, a partir de esos minerales, de modo que es de interés ocuparse del estudio de la contaminación del ambiente, así como de las personas ocupacionalmente relacionadas con dicho metal.

Por supuesto, la minería y la metalurgia local no deben ser los únicos causantes de la contaminación del ambiente, ya que seguramente el uso de muchos productos provenientes de países más altamente industrializados contribuye a la dispersión del cadmio, así como también el metal incorporado al aire y agua.

De un intento de búsqueda de datos acerca de la dispersión de cadmio en nuestro país se ha encontrado que la información es muy fragmentaria.



I.6 DATOS SOBRE DISPERSION DE CADMIO EN AIRE, AGUA, SUELO Y SERES HUMANOS

Las concentraciones de cadmio en aire generalmente oscilan entre 0,001 y 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pero pueden llegar a 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ cerca de una fuente de emisión como una fundición. Para el ambiente laboral el valor umbral límite (VUL) es de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

El agua de mar contiene alrededor de 0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$, el agua dulce sin contaminación 1 $\mu\text{g}/\text{l}$, mientras que el límite de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) para el agua potable es de 10 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Las concentraciones en suelo son generalmente menores de 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ (1 ppm) pero pueden llegar a 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ como resultado del depósito del cadmio proveniente del aire, irrigación con agua contaminada, o la aplicación de fertilizantes obtenidos de aguas cloacales. En circunstancias especiales como en el caso de la pequeña localidad de Shipham en Somerset, Inglaterra, se han encontrado en suelo concentraciones de hasta 1.000 ppm. Sin embargo, la incorporación de cadmio en las plantas no está necesariamente relacionada con su concentración en el suelo, ya que depende, entre otros factores del pH del mismo.

Para la población general la principal fuente de cadmio es la alimenticia, conteniendo la dieta media de 0,01 a 0,04 $\mu\text{g}/\text{g}$. La ingesta diaria de cadmio dependerá entonces de la cantidad de alimento consumido. En áreas no contaminadas se encuentra dentro del rango de 10-80 $\mu\text{g}/\text{día}$, mientras que el límite recomendado por la WHO es de 400-500 $\mu\text{g}/\text{semana}$. De ello se absorbe en el tracto digestivo alrededor de 5%, de modo que la absorción diaria a través del intestino oscila entre 0,5-4 μg .

Es difícil definir un valor normal para el cadmio, así como determinar qué niveles de exposición pueden ser dañinos ahora o en el futuro (Morgan, 1979).

I.7 PRINCIPIOS SOBRE ABSORCION, DISTRIBUCION Y ELIMINACION DE DROGAS Y TOXICOS

En general las sustancias que ingresan al organismo por vía oral, respiratoria o cutánea, luego de pasar a la sangre llegan a los tejidos de cada órgano, a una velocidad determinada por el flujo de la sangre a través de dicho órgano y por la rapidez del pasaje de las moléculas de la sustancia en estudio, a través del lecho capilar hacia las células del órgano en particular.

En el plasma, algunas de las moléculas pueden estar unidas a proteínas por lo cual no pueden salir libremente del mismo.

Las sustancias en estudio pueden permanecer en solución en los compartimientos fluidos o localizarse por procesos de adsorción o partición en partículas subcelulares, macromoléculas o depósitos grasos.

Su eliminación se realiza, por excreción de la sustancia sin modificar y/o de sus metabolitos. La proporción, en la cual cada uno de estos procesos tiene lugar, queda determinada por las propiedades físicas y químicas de la sustancia y por su interacción con los tejidos especializados responsables de las reacciones de eliminación. El riñón es, en muchos casos, la principal vía de eliminación; otra es la excreción en el tracto gastrointestinal, directamente de la sangre o por intermedio de la bilis; el sudor también puede jugar un papel en este proceso. Los agentes volátiles se eliminan por los pulmones. El hígado tiene a menudo una gran importancia en el metabolismo, aunque la degradación de las sustancias se puede producir también en otros tejidos.

Resumiendo, la vida media de la sustancia ingresada depende de un modo complejo de las velocidades relativas de todos los procesos recién mencionados.

I.8 BIOCOMPLEJOS DE LOS METALES PESADOS

Muchos metales pesados forman una amplia variedad de complejos con moléculas orgánicas. Esto juega un papel importante no sólo en el efecto bioquímico del metal, sino también en el transporte del mismo por el cuerpo, en su excreción biliar y recirculación enterohepática, en el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de envenenamientos con metales pesados, y en la interacción de un metal pesado y otro elemento.

El cadmio forma biocomplejos importantes cuyo significado biológico resultará más claro, luego de la lectura de los capítulos subsiguientes.

I.9 ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION DEL CADMIO

I.9.1 Absorción gastrointestinal del cadmio

Se han realizado varios estudios sobre la absorción intestinal del cadmio en animales de experimentación. En general, en el cuerpo se acumula sólo una pequeña proporción del cadmio de la dieta. Así se han obtenido valores de absorción que van desde un 0,3% en ratas (Kello y Kostial, 1977 a) hasta alrededor de 7% en aves de corral (Sell, 1975) y 25% en humanos (Suzuki y Lu, 1976). Además de reflejar una diferencia entre especies, estas variaciones son también una consecuencia del uso de diferentes técnicas para medir la absorción de cadmio. En humanos por ejemplo, Yamagata e Iwashima (1975) encontraron una absorción de 4,4% y Friberg et al. (1974) calcularon una absorción de 8-10%.

Todavía no se conoce bien el mecanismo de absorción del cadmio a través de la mucosa gastrointestinal. Se ha sugerido que el cadmio se une en la mucosa a la metalotioneína (Squibb, Cousins, Silbon y Levin, 1976; Valberg, Sorbie y Hamilton, 1976), y que esto limita la absorción del metal durante la exposición a bajos niveles del mismo. Sin embargo, el cadmio también se une a otros componentes no identificados de la mucosa con pesos moleculares muy variables (Washko y Cousins, 1977), los cuales pueden tener también participación en el proceso de absorción.

Una característica de la absorción del cadmio es que se halla influenciada en grado considerable por los metales esenciales hierro, calcio, cobre y posiblemente zinc. Existe una competencia entre el cadmio y algunos de estos metales por los sitios de unión en la mucosa, si bien se sabe que en muchos casos no hay interacción entre los metales mismos, y además que los procesos de absorción de hierro, calcio y cobre son diferentes. Puede ser que no exista un mecanismo específico para la absorción del cadmio y que el metal utilice sistemas transportadores que se han desarrollado para la absorción de otros metales esenciales.

I.9.2 Transporte y distribución del cadmio

I.9.2.1 Cadmio en sangre

Después de la absorción o inyección, el cadmio es transportado por la sangre a los distintos órganos. La desaparición del metal de la sangre tiene lugar rápidamente y en dos fases distintas, una rápida y otra lenta. La duración de la primer fase es de 30 minutos (Johnson y Miller, 1970; Perry y Erlanger, 1971), aunque para Matsubara-Khan (1974) es de un día. Según Perry y Erlanger (1971) la velocidad de desaparición del cadmio dependería de la dosis. Se supone que el decaimiento rápido inicial del metal está asociado con su eliminación del plasma, pero parte del cadmio se transfiere posteriormente a los glóbulos rojos (Shaikh y Lucis, 1972).

En general las concentraciones en sangre son bajas comparadas con las de otros tejidos.

No se sabe todavía bien a que fracciones proteicas se halla unido el cadmio en la sangre. Nordberg (1977) ha confirmado que a los 20 minutos y 4 horas después de la administración de $^{109}\text{CdCl}_2$ a ratones la mayor parte del metal estaba unido a las proteínas plasmáticas más abundantes. Sin embargo, luego de 24-96 horas el cadmio se encontraba asociado principalmente a una fracción de bajo peso molecular, sugiriéndose que se trataba de metalotioneínas. En hemolizados de eritrocitos de ratón recogidos 24 horas o más luego de una inyección única o varias inyecciones de cadmio, se observó que la mayor proporción del catión estaba asociada a una proteína con igual peso molecular que la metalotioneína. Se ha sugerido entonces que la metalotioneína actúa como un medio de transporte del cadmio en sangre. El cadmio, en esta forma puede ser filtrado por la membrana glomerular y reabsorbido subsiguientemente por los túbulos.

I.9.2.2 Distribución tisular del cadmio

La distribución del cadmio en los tejidos, después de la administración oral y parenteral del metal depende de la dosis, de la vía de administración y de la frecuencia de la misma.

El cadmio se deposita principalmente en hígado y riñón.

La acumulación en los otros órganos como bazo, páncreas, corazón, pulmones y testículo es generalmente mucho menor.

Las concentraciones de cadmio en el hígado de ratas, a las que se les ha administrado unos pocos días antes una dosis única de cadmio, son generalmente dos o tres veces mayores que en los riñones (Moore, Stara y Crocker, 1973; Washko y Cousins, 1976; Sasser y Jarboe, 1977), aunque en un estudio Decker, Byerrum y Hoppert (1957) encontraron que los riñones tenían la mayor concentración después de 8 horas.

Cuando el cadmio se administra por vía parenteral se aprecia más la capacidad del hígado para acumular el metal. Sabbioni y Marafante (1975 a) encontraron 40-50% de una dosis intraperitoneal (i.p.) de 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cadmio en el hígado de ratas después de 24 horas. En ratas (Cempel y Webb, 1976) y en ratones (Shaikh y Lucis, 1972) el máximo ingreso de cadmio en hígado se produce entre 1 y 3 horas después de la inyección y las concentraciones elevadas se mantienen un considerable tiempo después, reteniéndose un 60% de la dosis inyectada en el hígado después de 2-5 semanas (Kello y Kostial, 1977 b).

En los riñones las concentraciones de cadmio son inicialmente mucho menores que en el hígado, usualmente sólo 1-5% de la dosis y aumenta mucho más lentamente después de la administración (Decker et al., 1957; Burch y Walsh, 1959; Shaikh y Lucis, 1972; Cempel y Webb, 1976). Se produce con el tiempo una disminución gradual de la relación de concentraciones entre el hígado y los riñones, lo que indica que el cadmio se transfiere lentamente a los riñones (Nordberg, 1972).

En experimentos de ingestión oral a largo plazo de cadmio en ratas, cerdos y ovejas, se encontraron en riñón las mayores concentraciones (Decker, Byerrum, Decker, Hoppert y Langham, 1958; Cousins, Barber y Trout, 1973; Doyle, Pfander, Grebing y Pierce, 1974; Perry, Erlanger y Perry, 1977; Sabbioni, Marafante, Amantini, Ubertalli y Pietra, 1978). El cociente de las concentraciones de cadmio en hígado y riñón es a menudo 0,3-0,4, pero esta relación aumenta a alrededor de 0,7 al incrementarse la ingestión del metal (Decker et al., 1958; Doyle et al., 1974; Perry et al., 1977).

I.9.3 Excreción del cadmio

Se ha expuesto anteriormente que la asimilación del cadmio dietario en el hombre y en animales de experimentación es un proceso relativamente ineficiente, existiendo en general una absorción de apenas 2% del metal. Como además el cadmio se retiene luego ávidamente, resulta también limitada la capacidad de los animales para eliminarlo. Pequeñas cantidades se pierden por orina, cabellos y sudor; pero son las heces la principal vía de excreción del cadmio.

Aparentemente la eliminación fecal del cadmio se debe originar a partir de su eliminación en la mucosa intestinal, por subsiguiente descamación de la misma (Valberg et al., 1976).

I.9.4 Vida media biológica del cadmio

Friberg et al. (1974) han discutido los métodos usados para la estimación de la vida media biológica del cadmio en seres humanos y han sugerido que el valor para ésta oscila entre 10 y 30 años. Los mismos autores han calculado para ratas y ratones una vida media de 100-300 días, comparado con 250-500 días en perros y más de 4 años en monos.

I.10 Factores que influyen en la absorción y distribución del cadmio

I.10.1 Estado nutricional

Se considera que una dieta deficiente puede exacerbar significativamente los efectos tóxicos del cadmio. Se sospecha que la baja calidad nutritiva de la dieta consumida por las víctimas de la enfermedad de Itai-itai fue uno de los principales factores que llevaron al desarrollo de la enfermedad (Frigberg et al., 1974).

I.10.1.1 Proteínas

Muto y Omori (1977) observaron que las ratas que recibían una dieta con bajo contenido proteico, eran más susceptibles a la inclusión de 200 mg Cd/kg de dieta, que las ratas que recibían una dieta normal balanceada. Las concentraciones de cadmio en hígado y riñones eran el doble que en los controles bien alimentados. El efecto de la deficiencia de proteínas sobre la acumulación de cadmio en riñón era mucho menor, sin embargo, que el producido por una deficiencia de calcio y fósforo.

I.10.1.2 Calcio

Estudios con ratones y ratas en período de crecimiento o embarazo que recibían 25-50 mg Cd/kg de dieta demostraron que una baja ingesta diaria de calcio puede exacerbar la severidad de la intoxicación con cadmio. Un agregado de cadmio a la dieta dió lugar a un menor crecimiento, anemia y mineralización reducida en los huesos, en animales que recibían menos de 0,1% de calcio en la dieta, mientras que los animales con cantidades adecuadas de calcio no se veían afectados (Larsson y Piscator, 1971; Itokawa, Abe, Tabei y Tanaka, 1974; Pond y Walker, 1975; Washko y Cousins, 1975). Estos últimos efectos se relacionaron con una acumulación aumentada de cadmio en los tejidos. Dependiendo de la ingesta total se ha encontrado en hígado y riñón de animales deficientes en calcio concentraciones 50-300% superiores a los controles (Larsson y Piscator, 1971; Kobayasha, Nakahara y Hasegawa, 1971; Itokawa et al., 1974;

Washko y Cousins, 1977). También se han observado concentraciones más elevadas de cadmio en el fémur y pulmón de ratas con dietas deficientes en calcio (Kawamura, Yoshida, Noshino e Itokawa, 1978; Washko y Cousins, 1977).

La acumulación aumentada de cadmio en los animales deficientes en calcio parece deberse a una mayor absorción intestinal del metal, según lo demostrado en estudios realizados con ^{109}Cd . En estos estudios se observó que la deficiencia de calcio no tenía efecto sobre la distribución y acumulación de cadmio cuando este último metal ingresaba por vía parenteral (Washko y Cousins, 1977).

Según Washko y Cousins (1977), en la fracción proteica de bajo peso molecular de la mucosa intestinal hay dos cadmio-proteínas separadas con funciones diferentes. Una es probablemente metalotioneína y la otra es una proteína que une calcio pero que tiene casi la misma afinidad para unir cadmio (Bredderman y Wasserman, 1974). Cuando se administra una dieta baja en calcio se induce la síntesis de la proteína que une calcio (Bar y Wasserman, 1973) y como consecuencia tendría lugar un aumento de la incorporación de cadmio en dicha proteína y un transporte mayor de este metal a la circulación (Washko y Cousins, 1977). Esta hipótesis está de acuerdo con observaciones sobre el efecto antagónico del cadmio en la absorción intestinal del calcio (Ando, Sayato, Tonomura y Osawa, 1977). Sin embargo Hamilton y Smith (1977) encontraron que la incorporación de cadmio a intestino de rata *in vitro* no varía con el pretratamiento de los animales con una dieta deficiente en calcio, ni con la incorporación de calcio al medio, contrariamente a lo esperado.

I.10.1.3 Hierro

El diagnóstico de anemia en trabajadores industriales expuestos al cadmio, llevó a pensar que el cadmio podría tener efectos adversos sobre el metabolismo del hierro. Esto se confirmó en animales de experimentación intoxicados con cadmio, en los cuales se observaba una disminución de la concentración de hierro en hígado, duodeno y suero (Bunn y Matrone, 1966; Fox, Fry, Harland, Schertel y Weeks, 1971; Jacobs, Jones,

Fox y Fry, 1978); la cual se podía revertir por administración oral o parenteral de hierro (Fox et al., 1971; Pond y Walker, 1972). Parecería entonces que el cadmio puede inducir un estado de deficiencia de hierro por interferencia con su absorción intestinal (Freeland y Cousins, 1973; Hamilton y Valberg, 1974).

Los niveles de hierro en los animales también tienen influencia sobre el metabolismo del cadmio. La absorción de una dosis oral de cadmio era 2 a 7 veces mayor en ratas y ratones deficientes en hierro que en controles (Valberg et al., 1976; Ragan, 1977) y a su vez, el suplemento de hierro y ascórbico en la dieta reducía el contenido de cadmio en ratas (Maji y Yoshida, 1974).

La incorporación a mucosa de cadmio en un líquido de perfusión duodenal era mayor en ratones que tenían una capacidad de absorción de hierro aumentada y disminuía por agregado de hierro al medio de perfusión, lo cual sugeriría la existencia de un camino común de ingreso al organismo (Hamilton y Valberg, 1974).

I.10.1.4 Cobre y Zinc

Se sabe bien que existen interacciones antagónicas complejas entre cadmio, cobre y zinc en animales (Bremner, 1974, 1978). La ingesta elevada de cadmio en la dieta puede producir estados de deficiencia de ambos metales esenciales, manifestándose por medio de fallas en el crecimiento, paraqueratosis, anemia, ruptura de la aorta, rarefacción del esqueleto y menor viabilidad de los descendientes (Hill, Matrone, Payne y Valberg, 1963; Supplee, 1963; Bunn y Matrone, 1966; Petering, Johnson y Stemmer, 1971; Campbell y Mills, 1974). El desarrollo de estas lesiones se ve acompañado generalmente por cambios en las concentraciones tisulares de cobre y zinc y se puede evitar por suplemento de ambos metales en la dieta (Hill y Matrone, 1970). Bremner (1978) trató la posible implicancia de la metalotioneína en estas interacciones.

- El tratamiento con cobre y zinc puede modificar las concentraciones de cadmio en los tejidos. Por ejemplo, el contenido de cadmio en riñón de ratas se reducía en un 33-50% cuando

la concentración de cobre en la dieta aumentaba de 2,6 a 7,8 mg/kg o la concentración de zinc de 30 a 1.000 mg/kg (Campbell, Davies y Mills, 1978).

De estudios llevados a cabo con el objeto de aclarar el significado biológico de los efectos del cobre y del zinc sobre la toxicidad del cadmio, Jacobs et al. (1978) encontraron en la codorniz japonesa que la retención de este último en hígado y riñón podía reducirse a un tercio, simplemente aumentando al doble las dosis empleadas de cobre, zinc y manganeso, que eran de 5, 30 y 12 mg/kg en la dieta respectivamente. Este efecto se hacía evidente a dosis de cadmio de 20 a 1.000 μ g/kg que son próximas a las encontradas en dietas humanas. La mayor parte del cadmio retenido se encontraba en el tracto gastrointestinal. Hahn y Evans (1975) encontraron evidencias en ratas que sugerirían que los niveles de zinc pueden tener influencia sobre la distribución de cadmio entre las proteínas intestinales, a pesar de que no pudieron detectar ningún efecto significativo en la absorción de dicho metal.

Se ha observado que la concentración y distribución de cadmio en los tejidos, se encuentra alterada por efecto del cobre y del zinc, en experimentos en los cuales se inyectaron los metales. Así las concentraciones de cadmio aumentaban en el hígado pero decrecían en los riñones de ratas a las que se había inyectado 24 horas antes cadmio y un exceso de cobre o de zinc (Shank y Vetter, 1974). El cadmio en el hígado también aumentaba cuando el zinc se inyectaba 24 horas antes que el primer metal (Gunn, Gould y Anderson, 1968). El efecto del tratamiento con zinc consistía en aumentar la incorporación de cadmio en la metalotioneína hepática (Webb, 1972 b).

En contraste, la inyección de cobre junto con cadmio decrece la unión del cadmio a la metalotioneína hepática, y aumenta la toxicidad de este último metal (Irons y Smith, 1976). Esto está de acuerdo con otras observaciones acerca del desplazamiento del cadmio de la metalotioneína hepática ovina (Brenner, 1978).

El cobre, no solamente cuproso (Rupp y Weser, 1974), sino también cúprico (Suzuki, Kubota y Takenaka, 1977), posee *in vitro* una mayor afinidad para la metalotioneína que el zinc

y el cadmio. La metalotioneína de riñón, inducida por exposición al cadmio, tiene un alto contenido de cobre (Stonard y Webb, 1976; Suzuki et al., 1977; Suzuki, 1979). Estos dos factores tienen relación con los efectos adversos del cadmio para los riñones, pues se reemplaza cadmio en la metalotioneína por cobre y se libera cadmio tóxico en el riñón.

Nomiyama (1978) introdujo una relación *in vivo* entre el contenido de cobre y la alteración del riñón, según la cual, el contenido de cobre del riñón tiene una vinculación más directa que el cadmio urinario con la excreción de β_2 -microglobulina, un marcador sensible y posible de la disfunción tubular renal.

Por otro lado, Suzuki y Yamamura (1979), inyectando a ratas diversos complejos de cadmio, llegaron a la conclusión que el contenido de cobre en la metalotioneína de riñón dependía de la forma química en que se encontraba el cadmio.

I.10.1.5 Selenio

Se ha demostrado que la inyección de compuestos de selenio a ratas tiene un efecto marcado sobre la distribución de cadmio en el cuerpo (Parizek, Ostadalova, Benes y Babicky, 1968; Gunn, Gould y Anderson, 1968; Chen, Whanger y Weswig, 1975 a; Gasiewicz y Smith, 1976; Magos y Webb, 1976).

El selenio protege contra la necrosis de los testículos inducida por el cadmio (Gunn et al., 1968). La inyección de selenio induce cambios considerables en la distribución de cadmio en los testículos, con un desplazamiento marcado del cadmio de las proteínas de bajo a las de alto peso molecular en el citosol y un aumento masivo de la concentración de cadmio en testículos (Chen et al., 1975 a). Una redistribución similar se observó en el hígado y en los riñones, y en todos los casos las proteínas de alto peso molecular parecían contener también selenio.

Una asociación análoga entre cadmio y selenio se encontró en la sangre de ratas a las cuales se había administrado ambos metales. Al igual que en los testículos, el selenio provocaba un aumento en la concentración total de cadmio en sangre (Magos y Webb, 1976) con un desplazamiento del metal hacia

proteínas de peso molecular más alto (Chen et al., 1975 a). Sin embargo estas eran diferentes de las proteínas presentes en testículos, hígado y riñón.

Todavía se sabe poco acerca de la naturaleza de la unión del cadmio y del selenio a estas proteínas, pero aparentemente la toxicidad del cadmio se reduce al producirse esa asociación conjunta con el selenio a las mismas.

I.10.1.6 Vitaminas

Las variaciones en el contenido vitamínico de los animales también tienen influencia sobre la acumulación de cadmio en los tejidos. Así, la absorción de cadmio se encontró aumentada en gallinas deficientes en vitamina D (Worker y Migicovsky, 1961), en tanto que la acumulación de cadmio en tejidos de codorniz japonesa disminuyó por administración suplementaria de ascórbico (Fox et al., 1971). El último efecto probablemente fue una consecuencia de un aumento de la absorción de hierro en los animales a los cuales se les dió un suplemento de vitamina C.

En otros estudios se observó que las concentraciones de cadmio en hígado y riñones de ratas deficientes en piridoxina que recibían 100 mg Cd/kg de dieta eran menores que las de los animales que recibían un suplemento de piridoxina (Stowe, Goyer, Medley y Cates, 1974). Se sugirió que cantidades excesivas de piridoxina podían aumentar los efectos tóxicos del cadmio en seres humanos.

I.10.2 Efecto de la edad y dietas lácteas

Los animales muy jóvenes retienen una proporción inusualmente alta de cualquier metal presente en la dieta. El cadmio no constituye una excepción. La edad y el consumo de dietas lácteas tienen un efecto considerable en la retención del metal. Kello y Kostial (1977 a) encontraron que la retención de ^{115m}Cd era 14-18 veces mayor en ratas jóvenes que recibían una dieta de leche de vaca con respecto a ratas de la misma edad que recibían alimento sólido normal. La retención se medía por conteo de todo el cuerpo siete días después de la administra -

ción del isótopo y se hacía evidente en ratas de 3 a 52 semanas.

Sasser y Jarboe (1977) han confirmado que la retención de cadmio es muy alta en animales recién nacidos con valores de 12, 5 y 0,5% para ratas de sólo 2 y 24 horas y para ratas recién destetadas respectivamente. Sin embargo, por lo menos 60% del cadmio retenido por las ratas recién nacidas estaba todavía en el tracto gastrointestinal 15 días después de la administración, lo que demuestra que el compartimiento intestinal del cadmio en las ratas recién nacidas es grande y relativamente inmóvil.

La retención en todo el cuerpo de ^{115}mCd administrado por vía i.p. también depende de la edad (Kello y Kostial, 1977 b). Por ejemplo, los valores de retención en ratas de una semana y de un año de edad eran 88 y 73% respectivamente cuando se medían 15 días después de la administración del isótopo. Pero en los animales más jóvenes había relativamente menos ^{115}mCd en hígado, riñón y sangre, y teniendo en cuenta los hallazgos de Sasser y Jarboe (1977) es probable que la mayor parte del isótopo estuviera unida al tracto gastrointestinal de las ratas más jóvenes.

I.10.3 Sexo

La indicación más obvia de que existen diferencias en cuanto al sexo, en el metabolismo del cadmio y la susceptibilidad a su envenenamiento, es el hecho de que la enfermedad de Itai-itai se produce casi exclusivamente en mujeres. Además se ven más afectadas mujeres multíparas postmenopáusicas, lo que sugiere que debe haber alguna influencia hormonal en el metabolismo del cadmio. La existencia de diferencias relacionadas con el sexo se ha confirmado en algunos estudios experimentales con animales. Las ratas macho son más susceptibles que las hembras a la toxicidad crónica con cadmio de acuerdo con la tasa de mortalidad (Johns, Finks y Alsberg, 1923) pero menos susceptibles a la toxicidad aguda (Cempel y Webb, 1976). La potenciación, por acción del cadmio del tiempo de sueño con hexobarbital es mayor en ratas macho que en hembras (Hadley, Miya y Bousquet, 1974).

Estas diferencias en respuesta no están necesariamente relacionadas con diferencias en la absorción y distribución del cadmio. Sin embargo, hay evidencias que las mujeres japonesas acumulan más cadmio que los hombres (Sumino, Hayakawa y Shibata, 1975) y las concentraciones hepáticas y renales de cadmio son mayores en ratas hembra que en machos, tanto después de una inyección única, como después de la administración de cadmio a largo plazo (Cempel y Webb, 1976; Stonard y Webb, 1976).

La vida media biológica estimada para el cadmio en ratón es mayor para las hembras que para los machos (Matsubara-Khan, 1974).

I .11 METALOTIONEINAS

I .11.1 Generalidades

Se trata de un grupo de metaloproteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular con alta afinidad hacia el mercurio, cadmio, zinc, plata y cobre. Las unidades proteicas tienen una composición similar de aminoácidos y se denominan tioneínas debido a su alto contenido de restos tioles.

La tioneína unida a metales se conoce como metalotioneína. La tioneína unida a un metal en particular, por ejemplo zinc, se puede nombrar como zinc-tioneína; cuando la metalotioneína contiene dos metales en relaciones atómicas similares, por ejemplo cadmio y zinc, se denomina (cadmio, zinc)-tioneína (Cherian y Goyer, 1978).

Margoshes y Vallee (1957) aislaron por primera vez una tioneína a partir de riñón de caballo. Posteriormente Kägi y Vallee (1960, 1961) estudiaron algunas de sus características. En los años subsiguientes esta proteína se aisló de riñón humano (Pulido, Kägi y Vallee, 1966), de hígado humano (Bühler y Kägi, 1974) y de muchos tejidos de varias especies animales (Piscator, 1964; Nordberg, Nordberg, Piscator y Vestberg, 1972; Webb, 1972 a; Weser, Rupp, Donay, Linnemann, Voelter, Voetsch y Jung, 1973; Cherian, 1974).

A pesar de hallarse normalmente en los tejidos trazas de tioneína, luego de la exposición a dosis subletales de metales como el cadmio (Shaikh y Lucis, 1970), el zinc (Webb 1972 b), el mercurio (Piotrowski, Trojanowska, Wisniewska-Knypl y Bolanowska, 1974), la plata (Winge, Premakumar y Rajagopalan, 1975 a), y el cobre (Bremner y Young, 1976), aumenta significativamente su concentración en los tejidos. Dicha proteína puede tener, por lo tanto, un rol importante en el metabolismo y toxicidad de metales.

También inducen la síntesis de metalotioneína otros factores como la restricción de la ingesta de alimentos (Bremner y Davies, 1975); los agentes alquilantes (Kotsonis y Klaassen, 1979); el frío, el calor, los ejercicios agotadores y la into-

xicación con Cl_4C (Oh, Deagen, Whanger y Weswig, 1978); las infecciones bacterianas (Sobocinski, Canterbury, Mapes y Dinterman, 1978) y las reacciones de hipersensibilidad (Sobocinski, Canterbury, Hauer y Beall, 1979).

I.11.2 Propiedades

Las metalotioneínas aisladas de diferentes órganos de varias especies muestran sin embargo ciertas propiedades características comunes. Tienen bajo peso molecular (6000-10000), de 6 a 11% de metal y un 30% de cisteína, y carecen completamente de aminoácidos aromáticos. Los iones metálicos en la metalotioneína se unen a la proteína a través de los átomos de azufre de tres residuos cisteínicos. Estas proteínas no contienen ningún puente disulfuro (Kojima, Berger, Vallee y Kägi, 1976).

La mínima absorbancia de estas proteínas a 280 nm se debe a la ausencia de aminoácidos aromáticos y la alta absorbancia a 250 nm, al enlace cadmio-mercaptida. La absorbancia a 250 nm disminuye cuando el cadmio en la metalotioneína se reemplaza por zinc, mercurio o cobre.

Las metalotioneínas son estables al calor y resisten un calentamiento de 60-85°C durante dos a diez minutos (Webb, 1972 a; Cherian, 1974; Shaikh y Smith, 1975; Winge et al., 1975 a; Cherian y Clarkson, 1976).

Según Cherian y Goyer (1978) no han sido detectadas metalotioneínas en ningún fluido biológico en ausencia de efectos patológicos, y se las considera proteínas tisulares localizadas en el citoplasma. Sin embargo Kägi y Nordberg (1979) señalan que tampoco se han encontrado metalotioneínas en el suero de animales expuestos durante breves lapsos a zinc, cadmio, cobre y mercurio, debido a la carencia de métodos adecuados para su medición. Garvey y Chang (1981) han utilizado radioinmunoensayo (RIA) para medir metalotioneínas en plasma de ratas luego de una, dos o tres inyecciones con dosis subletales de sales de cadmio o de zinc, y han hallado diferencias significativas con controles que recibían únicamente solución fisiológica.

Por otro lado, hay datos acerca de la microheterogeneidad de la metalotioneína (Kägi, Himmelhoch, Whanger, Bethune y Vallee, 1974). Luego de la inyección repetida de las sales de cadmio, zinc y cobre, se han aislado dos formas de metalotioneína de hígado de rata mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico (Shaikh y Lucis, 1976; Winge y Rajagopalan, 1972; Bühler y Kägi, 1974) y de enfocado isoeléctrico (Nordberg et al., 1972; Weser et al., 1973; Cherian, 1974). También se aislaron proteínas similares de riñón de rata por enfocado isoeléctrico luego de la exposición a vapor de mercurio (Cherian y Clarkson, 1976). Se observaron sólo ligeras variaciones en la composición aminoacídica de dichas proteínas, en tanto que las diferencias en puntos isoeléctricos podrían estar relacionadas con distintos contenidos de zinc y con las relaciones cadmio:zinc. Nordberg y Nordberg (1975) postularon que una de dichas proteínas podría tener cierto rol en el transporte del cadmio del hígado al riñón.

Suzuki (1980) desarrolló un método analítico novedoso que torna mucho más sencilla la investigación de isometalotioneínas. La salida de un cromatógrafo líquido de alta presión, equipado con una columna de permeación de geles, se conecta directamente al tubo del nebulizador de un espectrofotómetro de absorción atómica y la columna se eluye con una solución tamporada alcalina. Se analizan las isometalotioneínas en los sobrenadantes a 170.000 g en una hora, con un pequeño consumo de muestra.

I.11.3 Algunos metales inductores de metalotioneínas

Luego del tratamiento con dosis subletales de ciertos metales, se induce la síntesis de metalotioneínas especialmente en hígado, riñón y bazo, pero también en otros órganos.

Como puede verse en la Tabla I tomada de Cherian y Goyer (1978), la síntesis de tioneínas inducidas por diversos metales parece ser específica de ciertos órganos.

El cadmio en dosis relativamente bajas induce la síntesis de metalotioneínas, principalmente en hígado y riñón. La mayoría de las investigaciones relativas a la cadmio-tioneína

TABLA I

Síntesis de proteínas con propiedades
de MT en varios órganos por efecto de
diversas sales metálicas

METAL	HIGADO	RIÑON	BAZO	HUESO
bismuto	?	+		
cadmio	+	+	+	?
cobre	+	+		
plomo				
mercurio		+		
plata	+	+	?	
zinc	+			
oro	?	+		

+ indica síntesis; - falta de síntesis; ? no hay evidencia experimental definida

La síntesis se produce luego de la administración parenteral u oral de las sales de los metales.

se han realizado en dichos órganos y dado que han de exponerse a lo largo de todo este capítulo, no vamos a enumerarlas aquí.

La inyección repetida de pequeñas dosis de cloruro mercurio induce la síntesis de proteínas semejantes a las metalotioneínas en riñón, pero no en otros órganos (Piotrowski et al., 1974). La exposición repetida a vapor de mercurio tiene efectos similares (Cherian y Clarkson, 1976).

En respuesta al zinc (en concentraciones mayores de 30 $\mu\text{g/g}$ tejido) se sintetizan metalotioneínas hepáticas (Bremner, Davis y Mills, 1973; Cherian, 1977 a), pero a diferencia del cadmio y el mercurio, el zinc no tiene influencia en la síntesis de metalotioneínas renales (Cherian, 1977 a). Esto se puede explicar parcialmente por el hecho de que el zinc no se acumula en el riñón en las intoxicaciones crónicas.

También existen datos que sugieren que el cobre en altas concentraciones induce la síntesis de la cobre-tioneína en hígado y riñón (Bloomer y Sourkes, 1973; Winge, Premakumar, Wiley y Rajagopalan, 1975 b; Bremner y Davies, 1976). Sin embargo la quelatina ha sido aislada de hígado de rata después de la inyección repetida de cobre (Winge et al., 1975 b). Esta proteína difiere de la metalotioneína en su composición de aminoácidos, especialmente en cisteína y en su comportamiento en cromatografía de intercambio aniónico.

Estudios más recientes sugieren que la cobre-tioneína es inestable y el complejo cobre-cisteína se libera de dicha proteína fácilmente durante el aislamiento en presencia de oxígeno.

Bremner y Davies (1975) han separado (cobre, zinc)-tioneínas de hígado de rata bajo condiciones anaeróbicas, y estas proteínas son similares en composición de aminoácidos a la cadmio-tioneína. Prinz y Weser (1975) también obtuvieron cobre-tioneína de levadura crecida en un medio con alto contenido de cobre, en condiciones anaeróbicas. Rupp, Voelter y Weser (1975) encontraron que las características espectrales de esta proteína y la cobre-tioneína preparada *in vitro* a partir de la cadmio-tioneína por adición de cobre, eran idénticas.

A pesar de que la proteína mitocondrocupreína aislada en 1974 por Porter tiene peso molecular más alto que la tioneína, ambas poseen idéntica composición de aminoácidos. Como se obtiene de los lisosomas del hígado, se podría tratar de una forma polimerizada de la cobre-tioneína atrapada por dichas organelas.

Las sales de plata se han manifestado también como inductores de la metalotioneína en hígado y riñón (Winge et al., 1975 a). Asimismo las sales de oro (Turkall, Bianchine y Leber, 1977) y de bismuto (Szymanska, Mogilnicka y Kaszper, 1977) inducirían la metalotioneína de riñón.

I.11.4 Inducción y síntesis de las cadmio y zinc-tioneínas

Luego que Piscator (1964) postulara que la tioneína es una proteína inducible, se demostró que la formación de metalotioneínas hepáticas en respuesta a la administración parenteral de cadmio está acompañada por una incorporación rápida de aminoácidos radioactivos marcados en la apoproteína, mayor que en otras proteínas solubles del hígado (Shaikh y Lucis, 1970; Brenner y Davies, 1974; Cherian y Clarkson, 1976; Shaikh y Smith, 1976, 1977).

Webb (1972 a) no encontró evidencias de la presencia de la apoproteína tioneína, en el hígado de rata macho, y llegó a la conclusión de que la síntesis se inducía en ese órgano en respuesta a la incorporación del ión tóxico. Estableció que la administración de cicloheximida, en dosis que inhibían la síntesis de proteína hepática en los animales controles (1 mg/kg cada 2 horas), impedía la producción de metalotioneína. Observó además que la cicloheximida no interfería con el ingreso del cadmio al hígado, pero afectaba la distribución intracelular del elemento. Cuando se inhibía la síntesis de proteínas el cadmio estaba asociado únicamente a las proteínas de alto peso molecular del citosol, mientras que en ausencia de cicloheximida, la mayor parte del cadmio de dicha fracción se hallaba como metalotioneína. Sugirió que esta diferencia en el modelo de distribución del cadmio se debía a la ausencia de síntesis de tioneína. En 1974 Squibb y Cousins demostraron que la cicloheximida inhibía también la incorporación de cisteína tritiada en la

metalotioneína, luego de la administración de cadmio.

Webb (1972 a) observó que la actinomicina D inyectada i. p. en dosis de 100 µg/kg cada 24 horas durante cinco días no tenía efecto sobre la síntesis de la metalotioneína luego de la administración de cadmio (2,4 mg/kg) suministrado 2 horas antes de la última dosis del antibiótico.

Squibb y Cousins (1974) sin embargo, encontraron que la síntesis de esta metaloproteína medida por la incorporación de ^{115}mCd y ^3H -cisteína se inhibía por efecto de una dosis única de actinomicina D (800 µg/kg) cuando esta se administraba de 30 minutos a 4 horas antes, pero no 3 horas después que el cadmio (0,53 mg/kg). De estos datos los autores dedujeron que la síntesis de cadmio-tioneína es inducible, siendo controlada a nivel transcripcional y precedida por la síntesis del mRNA(s) adecuado.

Hasta ahora, se desconoce el mecanismo que regula la síntesis de cadmio-tioneína, sin embargo, como lo afirman Bryan, Hidalgo, Koppa y Smith (1979), está claro que en hígado de rata intervienen controles a nivel transcripcional; estos controles responden a los niveles de cadmio que llegan a la célula y la síntesis de tioneína disminuye cuando los niveles citoplasmáticos de dicha proteína atrapan el cadmio intracelular.

En hígado de rata el zinc normalmente se encuentra en fracciones proteicas de más alto peso molecular que las tioneínas, pero luego de la inyección de cadmio se acumula en esta última fracción obteniéndose así una (cadmio, zinc)-tioneína. Paralelamente se observa un aumento en la concentración de zinc con respecto a los controles (Sugawara, 1977).

La administración parenteral de dosis suficientemente altas de zinc provoca un aumento del contenido de zinc-tioneína del hígado (Webb, 1972 a) y la incorporación de ^{65}Zn y/o de aminoácidos marcados con ^{14}C a dicha proteína (Davies, Bremner y Mills, 1973; Richards, Bluestone, Newkirk y Cousins, 1974; Richards y Cousins, 1975 a, b).

La administración de actinomicina D (Richards y Cousins, 1975 a) o de cicloheximida (Squibb y Cousins, 1974) puede blo-

quear la síntesis de la zinc-tioneína. Basándose en estos datos Richards y Cousins (1975 b) propusieron que la zinc-tioneína se sintetiza *de novo* por un mecanismo estimulado por el zinc, que implica transcripción. O sea que existe un paralelo entre la administración de altas dosis de zinc y dosis más bajas de cadmio.

Panemangalore y Brady (1978) sostienen que las fluctuaciones de los niveles intracelulares de zinc pueden constituir un importante mecanismo en la inducción y subsiguiente control de los niveles de zinc-tioneína.

I.11.5 Cinética de la síntesis y degradación

I.11.5.1 Cinética de la síntesis y degradación en hígado

I.11.5.1.1 Respuesta al cadmio

En ratas se pudo medir la biosíntesis de (cadmio, zinc) - tioneína en relación con la dosis de cadmio, marcando simultáneamente el cadmio y un aminoácido (por ejemplo ^{109}Cd y ^{35}S -cisteína - Sabbioni y Marafante, 1975 b). Se comprobó que el contenido de metalotioneína en hígado de ratas macho adultas era proporcional a la dosis de cadmio, cuando ésta no sobrepasaba los 0,85 mg/kg peso. Con dosis más altas, hasta 1,6 mg/kg el contenido de metalotioneína y de cadmio no aumentaba, o sea que el hígado posee una capacidad limitada para producir tioneína, en respuesta a una única dosis aguda de cadmio, aunque se considera que las dosis usadas pueden haber sido suficientes para limitar, por inhibición de mecanismos de transporte, el ingreso hepático del cadmio. Estas limitaciones no se observan a dosis inferiores, ya que las ratas toleran la administración a intervalos diarios y durante varias semanas de pequeñas cantidades de cadmio (por ejemplo 0,5-0,8 mg/kg). Bajo estas últimas condiciones la síntesis de tioneína aumenta en proporción al contenido de cadmio del hígado, y también aumenta la proporción de cadmio unido a la tioneína (Sabbioni y Marafante, 1975 b).

Sato y Nagai (1980) hallaron que luego de la administración s.c. de 0,3 mg Cd/kg durante cuatro meses comienza a bajar el contenido de cadmio y zinc en hígado.

Chen et al. (1975 b) calcularon una vida media de 4,2 días para la tioneína correspondiente a la metalotioneína de hígado de rata inducida por el cadmio, a partir de la velocidad de pérdida de ^{14}C -cisteína. El catión zinc también se eliminaba de la metalotioneína a la misma velocidad que el ^{14}C , mientras que el cadmio unido a la tioneína permanecía constante. Previamente Lucis, Lucis y Aterman (1971) habían observado que existe una continua degradación y síntesis de la apoproteína, a pesar de que el cadmio permanece unido a la metalotioneína. De acuerdo con lo sugerido por Shaikh y Smith (1976) y Probst, Bousquet y Miya (1977 a), este recambio de la proteína sin pérdida de cadmio implica que el catión que se libera en la degradación de la metalotioneína, inicia nueva síntesis de dicha proteína y se asocia a la misma. Ello explicaría por qué, en ratas en las cuales la metalotioneína hepática ha sido inducida por una única inyección de cadmio, la síntesis en respuesta a una segunda dosis del catión se produce sin retardo (Cempel y Webb, 1976), aún cuando ésta se administra luego de un intervalo de 8-10 meses.

Shaikh y Smith (1976) trabajando con ^{35}S -cisteína y perfeccionando las condiciones experimentales calcularon para la cadmio-tioneína una vida media biológica de 2,8 días.

En ratas (Webb, 1972 a, b), así como en ratones (Nordberg, Piscator y Lind, 1971 a; Nordberg, Piscator y Nordberg, 1971 b), a intervalos cortos después de la administración de una dosis única de cadmio, el hígado capta el catión que se une a las organelas celulares y particularmente a las proteínas de alto peso molecular del citosol. Una vez que comienza la síntesis de tioneína, el cadmio se transfiere de estos sitios de unión iniciales a los sitios de alta afinidad de la nueva proteína. Por ello, decrecen los contenidos del catión en las fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal. También disminuye la cantidad de cadmio en las proteínas solubles de alto peso molecular, a pesar de que aumenta el contenido total del catión en el citosol. Tanaka, Sueda y Okahara (1974) observaron que estos cambios en la distribución intracelular del cadmio en hígado de rata se producían entre 1 y 6 horas después de la inyección intravenosa (i.v.) de ^{109}Cd (1 mg/kg). Los estudios de Cempel y Webb (1976)

establecieron que, en ratas macho, hay un período de 3-4 horas entre la administración de cadmio (1,6 mg/kg i.v.) y la iniciación de la síntesis de metalotioneína hepática. Una vez que dicha síntesis comienza, el contenido de cadmio asociado a la tioneína aumenta rápidamente, completándose dicho proceso en 4-5 horas más. En ratas hembra, sin embargo, un 5% del cadmio total de la fracción soluble del hígado está presente como metalotioneína una hora después de la administración del catión. Ello parece deberse al reemplazo por cadmio del zinc de la zinc-tioneína, que está presente en baja concentración en el hígado del animal hembra. Durante las siguientes 2-3 horas la cantidad de cadmio asociado a la tioneína aumenta primero lentamente, y después rápidamente hasta llegar a un máximo que se produce a igual tiempo que en el macho.

I.11.5.1.2 Respuesta al zinc

A pesar de que la zinc, o (zinc, cobre)-tioneínas, parecen estar a menudo presentes en bajas concentraciones en el hígado de varias especies de mamíferos, la síntesis aumentada de metalotioneína luego de la inyección i.p. de zinc se inicia luego de transcurrido un tiempo. Davies, Bremner y Mills (1973) demostraron que la síntesis hepática de zinc-tioneína en ratas, en respuesta a la inyección i.p. de zinc (300 µg/animal), empezaba luego de 2 horas y alcanzaba un máximo a las 18 horas. Squibb, Cousins y Feldman (1977) utilizando ³⁵S-cisteína y ⁶⁵Zn (2 mg/rata) llegan a la conclusión que la síntesis de tioneína precede a la unión del catión a la misma. De acuerdo con estos autores la estimulación de la síntesis de zinc-tioneína es casi 5 veces mayor luego de una segunda dosis de 2 mg de zinc, que luego de la primer dosis recibida 20 horas antes. Los autores sugieren que ello se debe a que la primer dosis aumenta la capacidad del hígado de sintetizar metalotioneína. Como la inyección de zinc estimula la producción de tioneína-mRNA, la actinomicina D, que impide la transcripción de DNA como mRNA, inhibe la inducción de tioneína por el zinc, y también por el cadmio. Squibb et al. (1977) hallaron que la síntesis de tioneína luego de la segunda inyección también se inhibía por pretratamiento con actinomicina D. Ello implica la producción de nuevo mRNA y, por lo tanto, que el reservorio de tioneína mRNA inducido por

la primer dosis de zinc, tiene una vida media corta. Como las tioneínas inducidas en el hígado de rata por el zinc y por el cadmio tienen idéntica composición de aminoácidos y propiedades electroforéticas similares (Winge et al., 1975 a), presumiblemente ambos cationes estimulan la producción del mismo mensajero. Es improbable entonces que el mensajero inducido por el cadmio, aún cuando esté estabilizado por el metal, tenga una vida media extremadamente larga. La síntesis inmediata de cadmio-tioneína, que se produce en el hígado de ratas tratadas con cadmio en respuesta a una segunda dosis del catión, aún si esta se administra varios meses después, sugiere entonces que la concentración de mRNA necesaria, se mantiene por el recambio de la metalotioneína (Webb, 1977).

La concentración hepática de zinc-tioneína en ratas deficientes en zinc alcanza un máximo siete horas después de la inyección del metal, decreciendo luego alrededor de un 50% en 24 horas (Bremner y Davies, 1975). En ratas normales, luego de la administración i.p. de zinc, se llega a una concentración máxima de este catión en hígado a las 24 horas, y luego decrece al nivel control a las 48 horas (Richards y Cousins, 1975 a). Feldman y Cousins (1976) han demostrado que la zinc-tioneína hepática inducida por el zinc tiene una rápida velocidad de recambio (vida media 18-19 horas). Es posible entonces, que la vida media de la (cadmio, zinc)-tioneína inducida por el cadmio en el hígado de rata, varíe con la relación Cd/Zn en la molécula.

I.11.5.1.3 Respuesta al cobre

Los mecanismos que operan en la inducción y síntesis de la cobre-quelatina y/o de la (cobre, zinc)-tioneína en respuesta al cobre parecen ser muy similares a aquellos que controlan la producción de (cadmio, zinc)-tioneína en respuesta al cadmio.

Así, luego de la administración parenteral de cobre, este se acumula inicialmente en la fracción proteica de alto peso molecular del citosol hepático, la subsiguiente eliminación del catión de estas proteínas se correlaciona con la síntesis de tioneína, que comienza pasadas las dos horas (Bremner y Da-

vies, 1974). A medida que progresa la síntesis, aumenta el contenido de zinc unido a la tioneína en paralelo con el de cobre. Bremner, Hoekstra, Davies y Young (1978) han demostrado que la vida media de la apoproteína de la metalotioneína inducida por el cobre en el hígado de rata depende de las concentraciones de zinc en el animal, y se reduce en deficiencia del último metal. Terao y Owens (1973) informaron que se produce un rápido recambio de la tioneína asociada con cobre, con una vida media de seis horas, en hígado de rata luego de la administración i.v. de ^{67}Cu .

I.11.5.2 Cinética de la síntesis y degradación en riñón

Inicialmente se consideró que en el riñón se acumulaba cadmio asociado a la tioneína sintetizada en el hígado, que por filtración glomerular y reabsorción tubular lograba ubicarse en dicho órgano (Piscator, 1964).

Probst, Bousquet y Miya (1977, a, b) llegan a la conclusión de que el hígado es el principal sitio de la síntesis de metalotioneína inducida por el cadmio. Sin embargo otras experiencias sugieren, que la síntesis de tioneína se produce también en el riñón, una vez que la concentración de cadmio sobrepasa el umbral necesario, y es independiente de la del hígado. Por ejemplo, se ha demostrado que la síntesis de metalotioneína se produce en cultivos de células de corteza renal de cerdo, cuando se hacen desarrollar *in vitro* en presencia de cadmio (Webb y Daniel, 1975). Además, las metalotioneínas hepáticas y renales de rata, inducidas por el cadmio difieren mucho en sus contenidos de zinc y de cobre (Stonard y Webb, 1976).

Cousins (1979) considera improbable que el cadmio sea transportado del hígado al riñón como metalotioneína. La Figura 3, muestra los conceptos de Cousins. Cuando el cadmio entra a las células de la mucosa intestinal participa en la inducción de la metalotioneína intestinal. Dicha proteína, a su vez, se cuestra una porción importante del cadmio de la dieta, que ingresa así al interior de las células de la mucosa intestinal. El cadmio transportado por el plasma llega al hígado y se incorpora a la metalotioneína hepática. Cousins ha logrado demostrar que la cadmio-tioneína hepática puede sufrir degradación, aun -

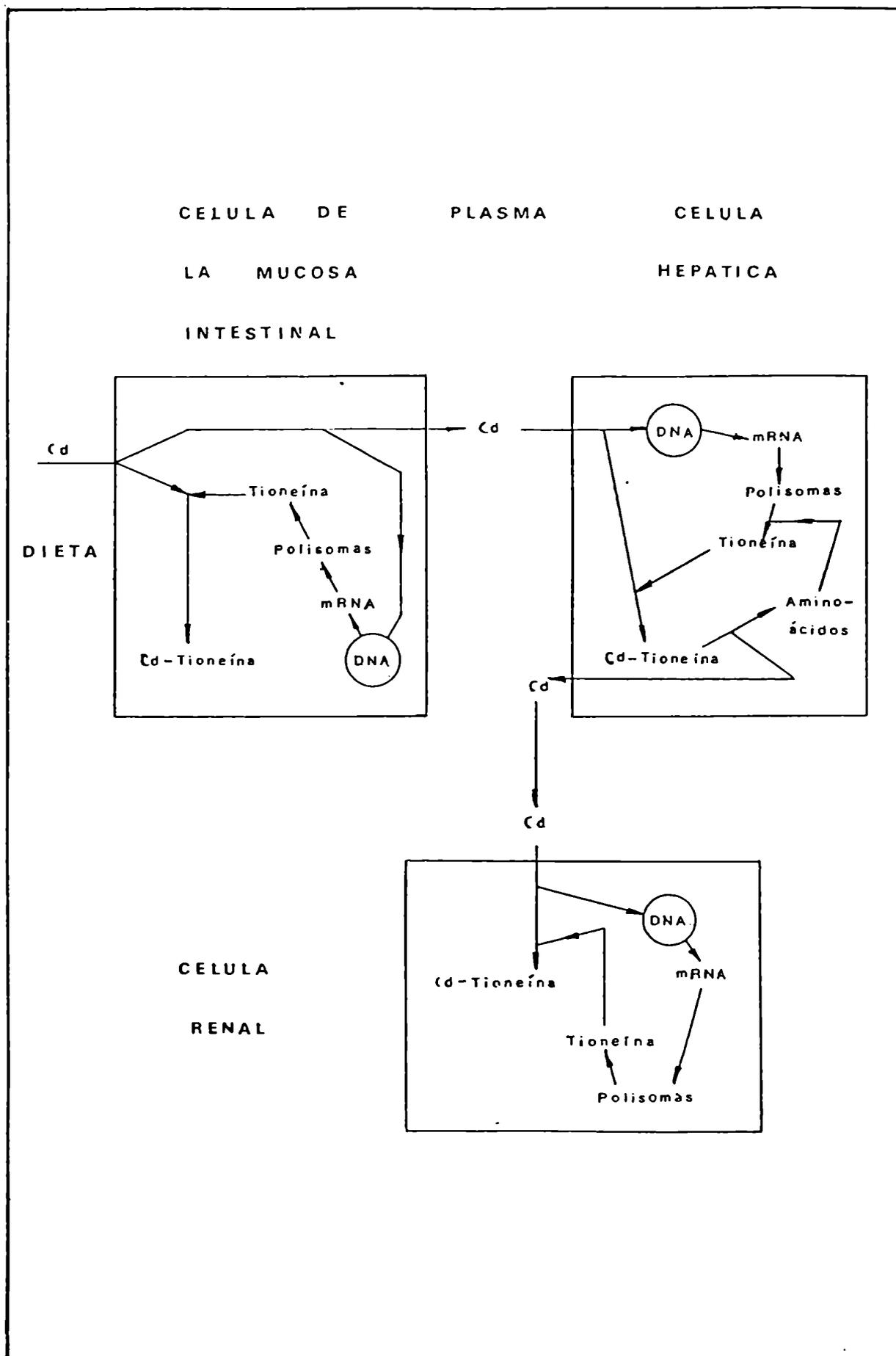


Figura 3: Esquema adaptado de Cousins (1979) que ilustra aspectos del transporte del cadmio y de la biosíntesis de cadmio-tioneína. El riñón sintetizaría su propia metalotioneína.

que la velocidad de dicho proceso es mucho menor que en el caso de la tioneína o la zinc-metalotioneína. El cadmio liberado interaccionaría con otros componentes celulares. Eventualmente el cadmio se puede depositar en la célula renal, la cual sintetiza su propia metalotioneína.

Tanaka, Nomura, Onosaka y Min (1981) sugieren que la metalotioneína hepática se puede liberar a la sangre y transportarse al riñón y orina en cierto tipo de desórdenes hepáticos.

Sin embargo, Garvey y Chang (1981) han detectado mediante RIA aumentos de metalotioneína en plasma, luego de una, dos o tres inyecciones con dosis subletales de cadmio.

Existen pocas investigaciones relativas a la síntesis de tioneína en el riñón en respuesta a cadmio u otros cationes. Estudios simultáneos de la biosíntesis de metalotioneínas hepáticas y renales permitieron a Shaikh y Smith (1975, 1977) llegar a la conclusión de que los residuos de cisteína se incorporan directamente en las metaloproteínas de ambos órganos, pero a diferente velocidad. Así se encontró que mientras que la incorporación de ^{14}C o ^{35}S -cist(e)ina en la metalotioneína hepática comenzaba luego de 2-3 horas y era máxima entre 8 y 12 horas después de la administración de cadmio, la biosíntesis de la proteína renal comenzaba luego de una hora y alcanzaba un máximo a las 4 horas. Como el tratamiento con cicloheximida inhibía la incorporación del precursor marcado en las tioneínas de hígado y de riñón, mientras que el tratamiento con actinomicina D impedía la síntesis de proteína sólo en el hígado, Shaikh y Smith (1975, 1977) atribuyeron las diferencias en el curso del tiempo de la síntesis de tioneína en dichos órganos a diferencias en los mecanismos de control.

En el hígado existe aparentemente un control transcripcional y en el riñón un control traslacional de la síntesis de tioneína, luego de la exposición al cadmio. Shaikh y Smith (1977) sugieren que los riñones de los controles pueden tener más metalotioneína que el hígado, y así puede ser mayor la concentración de mRNAs específico. En el hígado, que luego de una exposición aguda acumula más cadmio que el riñón, se necesita producir nuevo mRNA para que empiece la síntesis aumentada de

tioneína. En el riñón, parte del cadmio asimilado se une inmediatamente a la metalotioneína, y además la concentración de mRNAs citoplasmático es suficiente para la traslación sin atraso de proteína adicional.

La vida media de la apoproteína de la cadmio-tioneína renal (5 días; Shaikh y Smith, 1976) es casi el doble que la de la proteína hepática inducida por el cadmio (2,8 días; Shaikh y Smith, 1975, 1976). Sin embargo, no existen diferencias significativas en la vida media de las metalotioneínas hepáticas y renales inducidas por el cobre en ratas, con concentraciones endógenas normales de zinc (Bremner et al., 1978).

Suzuki y Yamamura (1980) analizaron mediante la técnica mencionada en I.11.2 las variaciones con el tiempo de isometalotioneínas en hígado y riñón; luego de una inyección de cloruro de cadmio a ratas comprobaron que tanto las relaciones de metalotioneína I/II como de Cd/Zn en cada isometalotioneína en hígado variaban con el tiempo. El cadmio en los sobrenadantes de riñón aumentaba lenta pero constantemente con el tiempo y se hallaba presente como tres isometalotioneínas. Los autores sugieren que estas diferencias pueden estar relacionadas con la distinta resistencia de las isometalotioneínas frente a las enzimas proteolíticas y a las constantes de estabilidad entre metales e isotioneínas.

I.11.6 Síntesis de metalotioneínas en otros órganos

Se ha prestado poca atención a la síntesis de cadmio-tioneína en otros tejidos, pero en general en órganos distintos del hígado, riñón, intestino, bazo y páncreas, las concentraciones del catión son bajas y es posible que no alcancen los niveles necesarios para la síntesis de tioneínas.

A pesar de que el cadmio se acumula en bazo (en rata es aproximadamente 1:10 de la concentración en hígado) Webb y Verschoyle (1976) no pudieron detectar cadmio-tioneína en bazo de ratas, luego de la inyección i.v. de ^{109}Cd (1,0 mg/kg). Amacher y Ewing (1975) aislaron pequeñas cantidades de proteínas que unen cadmio de los bazos de ratas y perros, después de la administración parenteral de múltiples dosis de cadmio. Es-

tas proteínas aparentemente tienen mayor peso molecular, que las metalotioneínas de riñón de rata, aunque otras propiedades son similares.

También la ingestión continua de pequeñas cantidades de cadmio (2,1 $\mu\text{g}/\text{día}$) durante dos años conduce a la acumulación de cadmio-tioneína en el páncreas (Sabbioni, Marafante, Pietra, Amantini y Ubertalli, 1978). Sin embargo, parece que la cinética de la síntesis de metalotioneína en ese órgano en respuesta al catión administrado parenteralmente es muy distinta que en hígado (Yau y Mennear, 1977). En páncreas también se ha hallado zinc-tioneína (Bremner y Davies, 1974).

Después de inyecciones repetidas de cadmio, la mayor parte del metal en sangre se halla en los eritrocitos y por lo menos un 60% parece estar unido a la tioneína (Nordberg et al., 1971 a, b). Nordberg (1977) sugiere en base a sus experiencias que las metalotioneínas existen tanto en eritrocitos como en plasma. Garvey y Chang (1981) han detectado mediante RIA metalotioneínas en plasma, luego de una, dos o tres inyecciones con 0,8 mg Cd/kg.

Hildebrand y Cram (1979) estudiaron cultivos de células sanguíneas incubadas con cadmio y encontraron una proteína con características similares a la cadmio-tioneína.

Garty, Wong y Klaassen (1981) hallaron en ratas inyectadas con 1 mg Cd/kg i.v. (intravenoso) que el cadmio en los eritrocitos se encuentra distribuido entre citosol y fantasmas. Luego de 5 y de 60 horas el cadmio citosólico se halla unido principalmente a proteínas de alto peso molecular (PM). A las 60 horas el metal se asocia también a una proteína con PM similar al de la metalotioneína pero que difiere de ella en otras características.

Suzuki, Yamada y Shimizu (1981) han logrado detectar dos isometalotioneínas en timo de ratón.

I.11.7 Funciones biológicas de las metalotioneínas

Respecto a las funciones biológicas de las metalotioneínas, se han sugerido varias, entre las cuales podemos considerar:

- i) Rol en el metabolismo intermedio
- ii) Regulación del metabolismo del zinc
- iii) Acumulación del exceso de zinc
- iv) Función de conservación
- v) Absorción del zinc
- vi) Rol de almacenamiento y regulatorio de las cobre-tioneínas
- vii) Función en el desarrollo fetal y postnatal
- viii) Transporte de metales
- ix) Respuesta inmune
- x) Función en las intoxicaciones con metales

I.11.7.1 Rol en el metabolismo intermedio

Se ha propuesto que la proteína libre puede ser la molécula biológicamente activa, que actuaría en el mantenimiento de los potenciales de óxido-reducción y transporte iónico (Kägi et al., 1974), o como un reservorio metabólico de residuos de cisteína (Weser, Rupp, Donay, Linnemann, Voelter, Voetsch y Jung, 1973). Para impedir la oxidación y preservar estas funciones sería necesaria la coordinación de los grupos sulfhidrilos de la tioneína a un catión adecuado (por ejemplo zinc) (Sokolowski y Weser, 1975).

Otra posibilidad sería que el derivado de cobre de la tioneína fuera la forma activa. El descubrimiento de una cobre-tioneína (cuprodoxina) oxidable en forma reversible condujo a Prinz y Weser (1975 b) a proponer una función para esta metaloproteína en sistemas bioenergéticos, particularmente cuando el contenido de la citocromo c oxidasa es bajo, como en el caso de fetos y en levaduras crecidas anaeróbicamente. Según Prinz y Weser la biosíntesis de zinc-tioneína es un requerimiento previo para la producción de cuprodoxina.

Weser et al. (1973) también han discutido la posibilidad de que la tioneína, o su complejo con el zinc, puedan tener una función enzimática esencial, aunque todavía desconocida.

Todas estas hipótesis explicarían la acumulación de metalotioneínas en animales expuestos a iones metálicos tóxicos (por ejemplo cadmio y mercurio, ya que estos cationes serían potentes inhibidores de la función de la tioneína o metalotioneína) en cuyo caso para superar la inhibición aumentaría la síntesis de RNA y de la proteína.

I.11.7.2 Regulación del metabolismo del zinc

Es difícil conciliar algunas de las sugerencias e hipótesis anteriores con la inducción de la síntesis de tioneína que se produce en hígado de rata (Bremner et al., 1973), ruminantes (Bremner y Marshall, 1974) y en cerdos jóvenes, cuando la concentración de zinc hepático excede un umbral claramente definido. La sugerencia (Webb, 1972 a, b) de que la tioneína participa en la regulación del metabolismo del zinc ha encontrado fuerte apoyo experimental (Bremner et al., 1973; Bühler y Kägi, 1974; Richards et al., 1974; Chen, Eakin y Whanger, 1974; Chen, Whanger y Weswig, 1975, b, c), y de acuerdo con Richards y Cousins (1976) existe poca duda de que la tioneína sea una proteína reguladora, con una función específica en el metabolismo del zinc.

I.11.7.3 Acumulación del exceso de zinc

Chen, Vasey y Whanger (1977) han demostrado que la zinc-tioneína que se acumula con rapidez en el hígado de ratas en respuesta a la administración de altos niveles de zinc, se agota en tres días, cuando los animales se transfieren a una dieta deficiente en zinc. Al mismo tiempo se produce una aumentada excreción urinaria y fecal del zinc, asociada con compuestos de bajo peso molecular; la zinc-tioneína, sin embargo, no se puede detectar en orina ni en bilis. Estos autores llegan a la conclusión de que la tioneína juega un papel fundamental en la acumulación del exceso del zinc, más que en el almacenamiento del catión para su posterior utilización.

I.11.7.4 Función de conservación

Se sugiere sin embargo, una función de conservación cuando se forma zinc-tioneína hepática en ratas durante el trauma post-quirúrgico (Bremner y Davies, 1975) y en respuesta a la inanición (Bremner et al., 1973; Richards y Cousins, 1976).

I.11.7.5 Absorción del zinc

Evans, Dubois y Hambridge (1973 a) y Evans, Grace y Hahn (1973 b), demostraron que la concentración de zinc en el plasma controlaba el contenido de dicho metal en la mucosa intestinal, y esta última mediaba, por lo menos en parte, el proceso de absorción del zinc. Previamente, el aislamiento de proteínas tentativamente identificadas como tioneínas, con alta afinidad por el zinc y cobre de la mucosa intestinal de gallina (Starcher, 1969), rata (Evans y Cornatzer, 1970) y vaca (Evans, Majors y Cornatzer, 1970), condujo a la suposición de que la tioneína tenía una función reguladora en la absorción y/o transporte de dichos cationes. Trabajos posteriores (Hahn y Evans, 1973; Evans et al., 1973 a, b; Evans, Grace y Hahn, 1974; Evans y Hahn, 1974; Evans, Wolenez y Grace, 1975; Evans y Winter, 1975), sin embargo, establecieron que a) la zinc-tioneína no está presente en la mucosa intestinal de ratas deficientes en zinc después de la administración oral de zinc (es decir cuando la velocidad de absorción es alta) y b) la tioneína no es mediador de la absorción de zinc y ésta se produce por interacciones entre un péptido de bajo peso molecular (Evans y Hahn, 1974) que actúa como ligante del zinc en la mucosa intestinal y el grado de saturación de los sitios de unión de cationes de la albúmina sérica (Suso y Edwards, 1971; Evans et al., 1975) o transferrina (Evans y Winter, 1975).

Richards y Cousins (1975 a, b, 1976) encontraron que la absorción intestinal de ^{65}Zn disminuía en ratas que recibían una dosis de 2 mg de zinc, pero no se hallaba afectada en ratas que se trataban con actinomicina D antes de la administración del zinc. La absorción del zinc se relacionó inversamente con la síntesis de zinc-tioneína en la mucosa intestinal y directamente con el contenido en este tejido del péptido de zinc de bajo peso molecular. En controles, cuando las velocidades de ab-

sorción eran altas, se encontraban grandes cantidades de zinc en la forma mencionada en último lugar. Los autores sugieren que la unión del zinc a la tioneína de los hepatocitos y células de la mucosa intestinal, o su liberación de los mismos está relacionada directamente con la concentración de zinc en el suero. Se considera que la síntesis de dicha proteína en el hígado controla el ingreso y almacenamiento del zinc para su futuro uso, mientras que en la mucosa intestinal provee una fuente alternativa que puede asociar cationes y competir con el ligante de bajo peso molecular, que funciona en la absorción del zinc, regulando así la transferencia del catión a la sangre. La síntesis de tioneína en el intestino de rata en respuesta a la administración oral de cadmio, que se ha demostrado por estudios con ^3H -cisteína (Sugawara y Sugawara, 1975), puede tener importancia en la inhibición de la absorción del zinc por el cadmio.

I.11.7.6 Rol de almacenamiento y regulatorio de las cobre-tioneínas

Para las proteínas inducibles que unen cobre del hígado y del intestino se han propuesto similares funciones de almacenamiento, regulatorias y de transporte. Winge et al. (1975 b) sugieren que la quelatina, una metaloproteína que muestra diferencias con la tioneína, puede actuar al mismo tiempo como protectora contra la citotoxicidad del cobre y como un mecanismo de almacenamiento y homeostático para esta catión en el hígado.

Davies y Campbell (1977) señalan que la interpretación de los resultados de muchas experiencias es difícil, ya que las proteínas que contienen cobre todavía no están bien caracterizadas.

I.11.7.7 Función de las metalotioneínas en el desarrollo fetal y postnatal

Las proteínas que asocian cobre del hígado de varias especies animales, en contraste con las proteínas intestinales, se han caracterizado como (cobre, zinc)-tioneínas. Estas metalotioneínas y/o las zinc-tioneínas parecen estar presentes en

grandes cantidades en ciertos tejidos fetales y pueden jugar un papel importante en el desarrollo pre y postnatal (Kägi et al., 1974).

1.11.7.8 Transporte de metales

Se ha especulado acerca de que las metalotioneínas podrían jugar un papel en el transporte de ciertos metales del hígado al riñón, fenómeno observable con el transcurso del tiempo en los diversos estudios de exposición al cadmio.

Sin embargo, algunas evidencias experimentales no apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, la síntesis de cadmio-tioneína puede hacer disminuir el transporte de la forma difusible de cadmio y por lo tanto su excreción biliar (Cherian, 1977 b). El transporte de cadmio del hígado al riñón podría realizarse por medio de quelación por aminoácidos azufrados de péptidos de bajo peso molecular. Un gran porcentaje de cadmio en la bilis ha sido identificado como cadmio-glutación (Cherian y Vostal, 1977). Otra posible forma de transporte sería una unión débil a proteínas plasmáticas como la albúmina (Cherian y Goyer, 1978). Uno de los mayores argumentos en contra de un rol transportador del cadmio para la cadmio-tioneína es su potencial efecto nefrotóxico (Cherian, Goyer y Richardson, 1976 a). Si bien trazas de cadmio-tioneína en plasma causan daño renal, los efectos nefrotóxicos de una exposición prolongada al cadmio aparecen recién luego de un período de tiempo muy largo (Cherian, Goyer y Richardson, 1977).

Según Kägi y Nordberg (1979) la metalotioneína aparece en sangre y orina luego de una exposición continua al cadmio, y se ha postulado que el ensayo de metalotioneínas en plasma y orina podría ser útil como indicador específico de la intoxicación con cadmio.

Tanaka et al. (1981) produjeron experimentalmente, mediante administración de tetracloruro de carbono un desorden hepático en ratas expuestas a ^{109}Cd . Observaron entonces una disminución del cadmio hepático y un aumento de cadmio en plasma, riñón y orina. El cadmio tanto en el sobrenadante hepático como en el riñón, plasma y orina de las ratas tratadas con tetraclo-

ruro de carbono, se hallaba principalmente en la forma de metalotioneína. Estos resultados sugieren que la metalotioneína hepática se puede liberar a la sangre y transportarse al riñón y orina en cierto tipo de desórdenes hepáticos.

Sin embargo Garvey y Chang (1981) han detectado mediante RIA aumentos de metalotioneína en plasma, luego de una, dos o tres inyecciones con dosis subletales de cadmio.

I.11.7.9 Respuesta inmune

La síntesis inducida de metalotioneína por bajas dosis de metales tóxicos y la protección contra dosis subsiguientes más altas del metal se describe más adelante (I.11.7.10.1). Salta a la vista una analogía con la síntesis por efecto de un antígeno de inmunoglobulinas en las respuestas inmunes en general.

El timo, los nódulos linfáticos y el bazo son órganos relacionados con la inmunidad, y varios autores han detectado modificaciones y/o formación de metalotioneínas en dichos órganos.

La administración de una dosis subletal de cadmio ocasiona una atrofia tímica transitoria caracterizada por una disminución de peso (Suzuki et al., 1981). La deficiencia de zinc también produce una involución del timo, y además una disminución de la capacidad inmune humoral (Jardieu y Fraker, 1979). Suzuki et al. (1981) suponen que la involución del timo, luego de la administración de cadmio podría deberse a una deficiencia de zinc. Estos últimos autores logran además detectar las dos isometalotioneínas en timo de ratón.

Por otro lado, Amacher y Ewing (1975) y Suzuki, Motomura, Tsuchiya y Yamamura (1980), han informado que el cadmio induce metalotioneínas en bazo.

Hildebrand y Cram (1979) estudiaron cultivos de células sanguíneas incubadas con cadmio y encontraron que la metalotioneína se induce sólo en los linfocitos pero no en los eritrocitos maduros.

Al presente se sabe poco acerca del efecto de la síntesis de metalotioneína en la respuesta inmune del cuerpo, ya sea a nivel de los linfocitos T (dependientes del timo) que intervienen en la inmunidad celular o los B (derivados de la médula ósea) que actúan en la inmunidad humoral.

I.11.7.10 Función de la tioneína en las intoxicaciones con metales

Desde el punto de vista de la salud ambiental y ocupacional, y también de las intoxicaciones accidentales y alimentarias, resulta interesante que los metales inducen la síntesis de tioneínas, ya que dicho fenómeno parece modificar los efectos patológicos de la exposición a los mismos.

I.11.7.10.1 Función protectora

Como la primer metalotioneína aislada tenía un alto contenido de cadmio, se supuso que una función de la misma era proveer un mecanismo de defensa contra ese catión tóxico y aparentemente no esencial. Kägi y Vallee (1960, 1961) ya consideraron esa posibilidad, y Piscator (1964) confirmó que en hígado de conejo se formaban grandes cantidades de metaloproteínas en respuesta a la administración repetida de cadmio. Dicho autor propuso que una vez que se ha iniciado la síntesis de tioneína, el animal se hace resistente al cadmio y puede tolerar altas dosis del mismo. La importancia toxicológica de esta hipótesis estimuló muchas investigaciones sobre la síntesis de metalotioneínas en respuesta a la exposición al cadmio y otros cationes bivalentes. Numerosos estudios posteriores (Nordberg, 1971; Nordberg et al., 1971 a, b; Squibb y Cousins, 1974; Stonard y Webb, 1976; Friberg et al., 1974) demostraron que la exposición prolongada a bajas dosis de cadmio por inyección o ingestión puede conducir a la acumulación de altas concentraciones del catión y establecieron claramente que la metalotioneína cumplía una función en la detoxificación. Una alta proporción del cadmio retenido por el animal se acumula en el hígado y los riñones y la mayor parte se une firmemente a la proteína inducible. Sólo una pequeña parte (quizás 10%) del metal en dichos órganos queda potencialmente disponible para interferir con enzimas esenciales y procesos funcionales.

Se reconoce que el mecanismo de detoxificación provisto por la síntesis inducible de tioneína no queda restringido al cadmio, sino que probablemente actúa también en condiciones de exposición crónica a bajos niveles de mercurio (Piotrowski, Bolanowska y Sapota, 1973) o a concentraciones elevadas de cobre y zinc (Bremner y Davies, 1973). A pesar de que estos dos últimos cationes son esenciales, a ciertas concentraciones son también potencialmente muy tóxicos; el zinc por ejemplo inhibe la Na, K-ATPasa del riñón de rata, tanto como el cadmio, e inhibe la fosforilación oxidativa más que el mercurio, mientras que el cobre en concentraciones extremadamente bajas, inactiva a la lipoamida oxidoreductasa y es tan efectivo como el mercurio en la inducción de cambios de la permeabilidad pasiva de las mitocondrias aisladas (Webb, 1977). Los ditiolos funcionales se consideran muy vulnerables a los metales pesados y en condiciones fisiológicas la protección contra los efectos de dichos metales se puede lograr con un quelante de afinidad más alta, por ejemplo un politiol como en la tioneína.

Se debe señalar que muchos cationes ni inducen la síntesis de la tioneína, ni se unen a la misma. Shaikh y Lucis (1970) y Webb (1972 a) informaron que el cobalto, níquel y plomo no inducen la síntesis de la proteína en cuestión, mientras que Sabbioni y Marafante (1975 a) encontraron que 37 de 42 diferentes iones metálicos no tenían efecto ni sobre la síntesis ni sobre el contenido catiónico de la metalotioneína inducida por el cadmio en el hígado de rata.

La síntesis de tioneína probablemente tiene poco significado en relación con la toxicidad de una única dosis aguda de cadmio, a pesar de que Shaikh y Smith (1977) hallaron un aumento de la toxicidad administrando a los animales cadmio e inhibidores de la síntesis de proteínas, pero no se descarta que ello podría deberse a un efecto sinérgico entre metal e inhibidor.

Se sabe que el pretratamiento de animales de experimentación con una dosis baja de cadmio, protege contra una subsiguiente dosis letal del catión (Terhaar, Ris, Roudabush y Fassett, 1965). Dicho tratamiento previo con cadmio, o con una dosis alta de zinc también protege contra el daño testicular

que se induce en machos (Parizek, 1960; Gunn, Gould y Anderson, 1961), contra la hemorragia placentaria (Parizek, 1964) y contra las malformaciones teratogénicas (Ferm y Carpenter, 1967, 1968; Semba, Ohta y Yanamura, 1974). Como las dosis de pretratamiento con cadmio y zinc estimulan la formación de las correspondientes metalotioneínas, se ha considerado la posibilidad de que dichas metalotioneínas también protejan contra los efectos de una exposición aguda al cadmio (Webb, 1972 b; Suzuki y Yoshikawa, 1974; Leber y Miya, 1976; Squibb, Cousins, Silbon y Levin, 1976; Probst et al., 1977 a, b). Si los sitios de unión de cationes en estas metalotioneínas están completamente saturados con zinc o, luego de la inducción con cadmio, con cadmio y zinc, la protección podría producirse al reemplazar el cadmio al zinc en las proteínas presintetizadas. Otra posibilidad, es que el pretratamiento dispare el mecanismo de síntesis, de modo que la producción de tioneína se realice más rápidamente cuando el animal recibe una dosis subsiguiente de cadmio. Ambas hipótesis tienen algún apoyo experimental. Así, la administración de cadmio a ratas pretratadas con zinc ocasiona un desplazamiento de este último metal de la zinc-tioneína hepática (Webb, 1972 b) y de la (zinc, cadmio)-tioneína (Suzuki y Yoshikawa, 1974; Leber y Miya, 1976). Yoshikawa (1973) y Suzuki y Yoshikawa (1974) llegan a la conclusión de que este reemplazo de zinc conduce a una acumulación e inmovilización de cadmio en el hígado del animal pretratado y así disminuye la posibilidad de distribución del catión en los otros órganos. Leber y Miya (1976) encuentran que la tolerancia al cadmio en ratones aumenta con la dosis de pretratamiento, otro tanto sucede con la concentración de (cadmio, zinc)-tioneína. Después de la administración de la dosis letal, todo el zinc de la tioneína puede reemplazarse por cadmio. Probst et al. (1977 b) informan también una correlación positiva entre la concentración hepática de (cadmio, zinc)-tioneína en ratones pretratados con cadmio y la LD 50 del cadmio; ambas aumentan en proporción a la dosis de pretratamiento. Squibb et al. (1976) hallan que el pretratamiento de ratas con una dosis oral de 20 mg/kg protege contra una segunda dosis de 100 mg/kg, también administrada oralmente después de un intervalo de 24 horas, pero aumenta el depósito de cadmio en hígado, riñones y testículos. En los controles no pretratados, luego de la administración oral de 100 mg/kg de cadmio la síntesis de tioneína

hepática tarda más en realizarse y en las primeras 1-3 horas el catión se asocia con las proteínas de alto peso molecular del citosol hepático. En las ratas pretratadas, la síntesis de tioneína se produce rápidamente y en todo momento luego de la administración de la segunda dosis, el cadmio en la fracción soluble del hígado está asociado a esta proteína.

Otras observaciones, sin embargo, no parecen estar de acuerdo con la premisa de que la (cadmio, zinc)-tioneína preinducida protege contra la toxicidad aguda del cadmio. Webb y Verschoyle (1976), por ejemplo, han demostrado que mientras que el hígado de las ratas pretratadas con cadmio mantiene su contenido de (cadmio, zinc)-tioneína y su capacidad de sintetizar de inmediato esta metalotioneína, durante un período de 9-14 días, la tolerancia al cadmio es máxima durante 1-3 días luego de la dosis inicial, disminuyendo después con el tiempo. De acuerdo con las observaciones de Yoshikawa (1973), Cherian y Vostal (1974) y Squibb et al. (1976), la deposición de cadmio en el hígado era mucho mayor en las ratas pretratadas, que en las que no lo estaban. En el riñón se unía la mayor parte del cadmio a la metalotioneína citoplasmática y menos a los componentes particulados, pero en los otros órganos (bazo, páncreas, cerebro y corazón) la distribución intracelular del catión no se alteraba con el tratamiento. Por otro lado, las ratas en las cuales se indujo la síntesis de zinc-tioneína por restricción del alimento, eran tan susceptibles al cadmio como los animales alimentados normalmente (Webb y Verschoyle, 1976). Webb y Magos (1976) llegan también a la conclusión de que la protección del cadmio contra la nefrotoxicidad del mercurio no se puede explicar por la presencia en los riñones de (cadmio, zinc)-tioneína. A pesar de que la incorporación de mercurio en la metalotioneína presintetizada se produce por desplazamiento de cadmio y zinc de la misma, y que el mercurio se incorpora a la metalotioneína que se va sintetizando, no hay que olvidar que el mercurio se incorpora también en otros componentes celulares del riñón. Con dosis de mercurio normalmente nefrotóxicas, la incorporación aumentada de este catión en los componentes nombrados en último lugar, es mayor que en la metalotioneína, y los autores consideran que el cadmio protegé contra un efecto tubular directo del mercurio.

I.11.7.10.2 Toxicidad potencial de la cadmio-tioneína

Se ha investigado la influencia directa de la cadmio-tioneína en la patogénesis de la nefropatía inducida por el cadmio. Nordberg (1971) había demostrado que la cadmio-tioneína administrada parenteralmente a ratones puede protegerlos de los efectos agudos del cadmio como la necrosis testicular. Luego se observó que este complejo metal-proteína puede dañar las células tubulares renales (Nordberg, Goyer y Nordberg, 1975). Cherian y Shaikh (1975) y Tanaka, Sueda, Onosaka y Okahara (1975) han demostrado que la distribución de cadmio proveniente de la cadmio-tioneína en varios órganos es diferente de la obtenida luego de la inyección de sales de cadmio. La cadmio-tioneína se acumula preferencialmente en el riñón, produciéndose una importante excreción urinaria de cadmio, mientras que las sales de cadmio se depositan en su mayor parte en el hígado.

Estudios ultraestructurales revelaron que la cadmio-tioneína causa cambios morfológicos en la membrana plasmática de las células del lineamiento tubular renal y daños a las mitocondrias (Cherian et al., 1976 a). Dosis similares de cloruro de cadmio o de zinc-tioneína no tienen ningún efecto en la morfología de las células renales (Cherian, Kirby y Goyer, 1976 b). En la actualidad se acepta generalmente que la cadmio-tioneína administrada parenteralmente es una potente nefrotoxina. Sin embargo, no se conoce aún con certeza el mecanismo por el cual la cadmio-tioneína manifiesta su toxicidad. Existen dos teorías que están parcialmente apoyadas por evidencia experimental:

- i) el complejo cadmio-tioneína mismo es la nefrotoxina (Webb, 1975; Cherian et al., 1976 a) y
- ii) los iones cadmio liberados de la cadmio-tioneína por los sistemas lisosomales en las células tubulares renales son los agentes tóxicos (Webb y Etienne, 1977).

La inyección i.v. de cadmio-tioneína marcada con ^{109}Cd o ^{14}C y ^{35}S -cisteína revelaron que la cadmio-tioneína intacta puede alcanzar las células renales, y puede filtrarse a la orina sin una degradación mayor del complejo metal-proteína, permaneciendo más del 95% del cadmio en el riñón unido a la metalotio-

neína (Cherian y Shaikh, 1975).

El rol de los lisosomas en la patogénesis de la cadmio-tioneína ha sido investigado. Se observó un mayor número de lisosomas presentes, y un aumento en las actividades enzimáticas lisosomales siete días después de la inyección de cadmio-tioneína. Sin embargo, esto puede ser una respuesta secundaria al daño de la célula renal causado por el complejo cadmio-proteína, más que un efecto tóxico primario de la cadmio-tioneína misma (Cherian y Goyer, 1978).

I.11.7.10.3 Progresión de la etapa tolerante a la etapa tóxica, luego de la administración crónica de sales inorgánicas de cadmio

Se ha investigado en detalle la influencia de la cadmio-tioneína en la toxicidad renal del cadmio en ratas, luego de administración prolongada de sales inorgánicas del elemento (Goyer y Cherian, 1977; Cherian et al., 1977).

Estos estudios indicaron que en el envenenamiento crónico con cadmio existen dos etapas. La primera es una fase tolerante, en la cual la síntesis de la cadmio-tioneína tiene lugar y permanece intracelularmente. Durante esta fase la proteína intracelular cadmio-tioneína puede proteger de los efectos tóxicos del cadmio y no se puede detectar en el plasma, ni se observan daños en la morfología de la célula renal. La segunda etapa es una fase tóxica, caracterizada por proteinuria y glicosuria y aparece más adelante entre los efectos tóxicos del cadmio. Se puede observar entonces el daño tubular renal y la cadmio-tioneína se puede aislar del plasma de rata. De modo que el daño renal en el envenenamiento con cadmio inducido experimentalmente se puede correlacionar directamente con la presencia extracelular de cadmio-tioneína.

Sato y Nagai (1980) administrando 0,3 mg/kg de cadmio subcutáneo (s.c.) durante 4 meses observaron que durante la primer semana el 97% del cadmio en hígado y riñón estaba unido a la metalotioneína. A las 9, 12 y 16 semanas, la mayor parte del cadmio estaba unido a la metalotioneína pero aparecían cuatro fracciones adicionales de más alto peso molecular que tenían u-

nido cadmio (trabajando con el sobrenadante a 27.000 g) y sugieren que esta redistribución podría tener una influencia en la toxicidad.

Gonick, Indraprasit, Rosen, Neustein, van de Velde y Raghavan (1979) han demostrado que la administración repetida de cadmio a ratas normales conduce al desarrollo del síndrome de Fanconi (defecto generalizado del transporte de membranas) y que la aparición de la disfunción tubular renal coincide con la inhibición del sistema de transporte ATP-Na,K-ATPasa cortical renal, ya que bajan los niveles de ATP y la actividad de la Na,K-ATPasa.

Raghavan y Gonick (1980) sugieren que la metalotioneína pierde la capacidad de unir cadmio antes de que haya suficiente cadmio libre para inhibir al sistema ATP-Na,K-ATPasa. Sus resultados se basan en las siguientes experiencias. Administraron 0,6 mg Cd/kg por día durante catorce días. El día quince inyectaron 1,8 mg Cd/kg. Dividieron los animales en los grupos pre-Fanconi (sacrificados luego de catorce inyecciones) y Fanconi (sacrificados dos días después de la inyección número quince). Los animales del grupo Fanconi presentaban glucosuria y aminoaciduria pero estas anomalías tubulares renales no se hallaron en el grupo pre-Fanconi. El hígado y la corteza renal del grupo Fanconi tenían menor capacidad de incorporar cadmio radioactivo, inyectado 24 horas antes del sacrificio. Los estudios de distribución de cadmio marcado, en la fracción soluble del citoplasma, indicaron que en los animales pre-Fanconi, la mayor parte del cadmio se unía a la metalotioneína, mientras que en los animales del grupo Fanconi el cadmio se distribuía por igual entre la metalotioneína y las proteínas de alto peso molecular. En la corteza renal dichos cambios estaban asociados con un desplazamiento de la fracción soluble del citoplasma a las fracciones mitocondrial y microsomal. Ello podría originar una inhibición de las enzimas responsables de la fosforilación oxidativa y del transporte activo (por ejemplo Na,K-ATPasa) y se produciría una alteración del transporte tubular.

Como corolario de este capítulo, habría que poner énfasis en el hecho de que la síntesis de cadmio-tioneína no se puede considerar de manera aislada, sino que se debería integrar

con todos los aspectos de la fisiología celular y del metabolismo de los elementos trazas, que influyen en la toxicidad del cadmio.

I.12 TERAPIA DE LA INTOXICACION CON CADMIO

La terapia de la intoxicación con cadmio tiene como objetivos eliminar el catión tóxico del cuerpo o anular sus efectos.

Como la toxicidad de los metales pesados se produce por interacciones con ligantes biológicos, se puede a veces alcanzar el primer objetivo por medio del uso de agentes quelantes competitivos de alta afinidad y bajo peso molecular. A pesar de que los agentes quelantes se han usado con éxito en el tratamiento de la intoxicación con plomo (Chisholm, 1968) en general estos compuestos carecen de especificidad. Muchas veces se producen efectos laterales, por interferencia con el metabolismo de varios cationes esenciales. Como lo señalara Schubert (1955) la eficacia de un ligante para asociar un ión metálico *in vivo* está determinada no sólo por la constante de formación del complejo catión-ligante, sino por un número de otros factores, como las constantes de protonación del ligante y las constantes de equilibrio del ión con otros ligantes. Estos equilibrios no son simples, ya que cada ligante puede formar cantidades significativas de más de una clase de complejos.

Al estudiar los efectos de distintos quelantes en el tratamiento del envenenamiento con cadmio, hay que tener en cuenta que muchas veces se produce redistribución del catión y aumento del depósito en el riñón. A menudo se reduce la toxicidad aguda, pero luego se desarrolla severo daño renal. En estudios con conejos Mac Farland (1960) verificó este hecho para el 2,3-dimercaptopropanol (BAL), agente efectivo en el tratamiento de muchas intoxicaciones con metales. Otros autores informaron efectos similares, y también mayor depósito en los testículos en distintas especies animales, usando BAL, cisteína y β,β -dimetilcisteína (penicilamina) (Dalhamn y Friberg, 1955; Gunn, Gould y Anderson, 1966; Niemeier, 1967; Kennedy, 1968; Ogawa, Suzuki y Tsuzuki, 1972).

El glicósido del BAL no sufre del mismo defecto, pues se forman complejos menos liposolubles. La excreción del cadmio se produce en igual grado que con el BAL, pero no se observa alteración renal (Gilman, Phillips, Allen y Koelle, 1946;

Tepperman, 1947). Sin embargo, luego de la administración de una dosis baja de cadmio resulta menos significativa la redistribución del catión, después del tratamiento con BAL. En ratas, la inyección intramuscular de BAL (5 mg) al quinto y sexto día después del tratamiento con 24 nmoles de $^{109}\text{CdCl}_2$ no altera las funciones renales. Dicho quelante produce un aumento temporario de la excreción urinaria y una elevación de la excreción fecal, que se prolonga durante varios días (Shaikh y Lucis, 1972).

Como los agentes quelantes más conocidos son solubles en agua, su efectividad depende de un funcionamiento renal normal (Burgen, Martz, Forney, Steinrauf y Blickenstaff, 1976; May y Williams, 1977).

Se ha tratado de aumentar la excreción biliar y fecal de cadmio por administración de tiocolesterol (Burgen et al., 1976). Dicho agente (240 mg/kg i.p.) reducía la mortalidad después de una dosis aguda de CdCl_2 (10 mg/kg i.p.), pero no protegía contra los efectos del cadmio administrado oralmente.

El EDTA y otros ácidos aminopolicarboxílicos aparentan ser más activos en la eliminación de cadmio administrado parenteralmente que el BAL, penicilamina y otros compuestos tiólicos (Sivjakov y Braun, 1959; Ogawa et al., 1972). De estos compuestos el más efectivo parece ser el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), siempre y cuando se administre al mismo tiempo o inmediatamente después que el catión (Niemeier, 1967; Ogawa et al., 1972). Si la administración del quelante se retrasa, la efectividad disminuye proporcionalmente al tiempo transcurrido. Luego de 24 horas, el DTPA no tiene más efecto en la eliminación del cadmio en ratones (Ogawa et al., 1972). Parece que el DTPA y compuestos similares actúan principalmente sobre el cadmio que circula en el plasma. Rahman, Rosenthal, Cerny y Moretti (1974) utilizaron agentes quelantes encapsulados con lípidos, aumentando así la deposición del quelante en los tejidos y en el caso del plomo y el plutonio, aumentando la excreción de los metales. No se han determinado los efectos de los quelantes encapsulados para el caso del cadmio.

Tratándose del cadmio, la inducción de la tioneína complica la terapia por quelación.

Tepperman, 1947). Sin embargo, luego de la administración de una dosis baja de cadmio resulta menos significativa la redistribución del catión, después del tratamiento con BAL. En ratas, la inyección intramuscular de BAL (5 mg) al quinto y sexto día después del tratamiento con 24 nmoles de $^{109}\text{CdCl}_2$ no altera las funciones renales. Dicho quelante produce un aumento temporario de la excreción urinaria y una elevación de la excreción fecal, que se prolonga durante varios días (Shaikh y Lucis, 1972).

Como los agentes quelantes más conocidos son solubles en agua, su efectividad depende de un funcionamiento renal normal (Burgen, Martz, Forney, Steinrauf y Blickenstaff, 1976; May y Williams, 1977).

Se ha tratado de aumentar la excreción biliar y fecal de cadmio por administración de tiocolesterol (Burgen et al., 1976). Dicho agente (240 mg/kg i.p.) reducía la mortalidad después de una dosis aguda de CdCl_2 (10 mg/kg i.p.), pero no protegía contra los efectos del cadmio administrado oralmente.

El EDTA y otros ácidos aminopolicarboxílicos aparentan ser más activos en la eliminación de cadmio administrado parenteralmente que el BAL, penicilamina y otros compuestos tiólicos (Sivjakov y Braun, 1959; Ogawa et al., 1972). De estos compuestos el más efectivo parece ser el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), siempre y cuando se administre al mismo tiempo o inmediatamente después que el catión (Niemeier, 1967; Ogawa et al., 1972). Si la administración del complejante se retrasa, la efectividad disminuye proporcionalmente al tiempo transcurrido. Luego de 24 horas, el DTPA no tiene más efecto en la eliminación del cadmio en ratones (Ogawa et al., 1972). Parece que el DTPA y compuestos similares actúan principalmente sobre el cadmio que circula en el plasma. Rahman, Rosenthal, Cerny y Moretti (1974) utilizaron agentes quelantes encapsulados con lípidos, aumentando así la deposición del quelante en los tejidos y en el caso del plomo y el plutonio, aumentando la excreción de los metales. No se han determinado los efectos de los quelantes encapsulados para el caso del cadmio.

Tratándose del cadmio, la inducción de la tioneína complica la terapia por quelación.

Por ello se hace necesario buscar terapias alternativas.

I. 13 ZINC Y CADMIO

Varios mecanismos rigen las interacciones de los elementos inorgánicos en el organismo, éstos usualmente implican competencias por los sitios de unión y transporte en las metaloproteínas y otros componentes funcionales, y se pueden producir durante la absorción, distribución y excreción.

El zinc es un elemento esencial. En algunos países se ha recomendado el uso de sales de zinc como suplemento de la dieta o como medicamento.

El zinc se diferencia de otros elementos trazas, en que no parece existir un depósito funcional del mismo. Casi todo el zinc se halla atrapado en los huesos o en las proteínas, por lo cual se desarrollan síntomas de carencia inmediatamente después de administrar una dieta deficiente en el metal (Golden y Golden, 1981).

Como se ha señalado ya, el zinc tiene varias propiedades físico-químicas similares al cadmio y acompaña a este último metal en la naturaleza. El zinc revierte algunos efectos tóxicos del cadmio. Parizek (1957) y Gunn, Gould y Anderson (1961) observaron que administrando simultáneamente por vía subcutánea a zinc y cadmio a ratas, se evitaba el severo daño testicular observado cuando el cadmio se administraba solo. Gunn, Gould y Anderson (1963) informaron también que el zinc prevenía tumores de los testículos. Schroeder y Buckman (1967) demostraron que la inyección de un quelante de zinc podía reducir la hipertensión sanguínea observada en ratas tratadas con cadmio. Además el zinc se opone a otras alteraciones provocadas por el cadmio, como disturbios en la homeostasis de la glucosa y en la función hepática y pancreática (Merali y Singhal, 1976). La administración de zinc antes del cadmio produce un marcado aumento de la Dosis Letal 50 (DL 50) de este último en ratones (Leber y Miya, 1976).

Todos estos hechos llevarían a suponer que el cadmio produce una disminución en el contenido de zinc de los tejidos. Sin embargo, se ha observado lo contrario. El cadmio provoca una acumulación de zinc debido a que la metalotioneína induci-

da por el cadmio lo secuestra. Como consecuencia de ello, el contenido de zinc hepático en ratas se eleva sobre los valores controles (Webb, 1972; Sugawara, 1977; Sato y Nagai, 1980; Bonner, King y Parke, 1981).

El origen del zinc metalotioneínico no está completamente establecido. Winge, Premakumar y Rajagopalan (1978) han sugerido que la imposibilidad de los tejidos de eliminar cadmio, conduce a un "atrapamiento" de zinc, que depende de la concentración de cadmio. El zinc depositado en el hígado proviene principalmente de una reducción de la excreción fecal en general, y en particular del metal, siendo la dieta también un factor contribuyente.

En las intoxicaciones a largo plazo con dosis subletales de cadmio, el zinc acumulado (conjuntamente con el cadmio) en la fracción metalotioneínica de hígado y riñón no impide que al excederse un cierto nivel de cadmio en dichos órganos, se altere la distribución subcelular del último metal, y se comienzan a observar síntomas de toxicidad renal como glucosuria, aminoaciduria y proteinuria.

La relación entre el cadmio adsorbido, el zinc endógeno y la toxicidad se estudió en diversas condiciones experimentales (Sugawara, 1977; Sato y Nagai, 1980; Suzuki y Yamamura, 1980; Whanger, Ridlington y Holcomb, 1980). Cain y Holt (1979) observaron que en el hígado de ratas la relación cadmio:zinc determina la velocidad de degradación de la metalotioneína.

Bonner, King y Parke (1981) estudiaron el efecto de la administración de 2000 ppm de zinc, como sulfato de zinc, en la dieta, sobre la toxicidad del cadmio administrado en forma subcutánea en dosis de 1,5 mg Cd/kg durante 28 días. Observaron que los animales tratados con ambos metales tienen mayor concentración de cadmio en hígado, en comparación con los que reciben únicamente este último metal. La administración de zinc no altera el desarrollo de la lesión renal, que se manifiesta por la pérdida de trazas de metales en orina. Estos autores encuentran que la alta concentración de zinc dietario no interfiere con la variación de las concentraciones de cobre inducidas por el cadmio en los distintos tejidos.

Petering, Johnson y Stemmer (1971) han sugerido que por lo menos parte de la toxicidad del cadmio podía deberse a que actúa como un antimetabolito del zinc.

Por otro lado, El-Gazzar, Boyle y Petering (1979) han hallado que la ingestión de niveles muy bajos de cadmio, puede afectar en hígado de ratas el metabolismo del zinc, sin la formación de cadmio o de zinc-metalotioneínas. Sus estudios sugieren que se necesita evaluar mejor los disturbios del metabolismo del zinc como un factor causante de los efectos crónicos para la salud por parte del cadmio.

Como los metales esenciales son cofactores de varias enzimas, el aumento o disminución de los niveles de los mismos podría ser un índice de la correspondiente actividad enzimática.

En particular el zinc ejerce un rol esencial sobre el ALA-D, enzima del camino biosintético del hemo que, como se verá en el capítulo II.2.3 es una típica enzima sulfhidrúlica.

Algunos estudios indican que el zinc activa la enzima tanto *in vitro* (Abdulla y Haeger-Aronsen, 1971; Davis y Avram, 1978, 1980; Nelson, Hughes y Meredith, 1981), como *in vivo* (Finelli, Murthy, Peirano y Petering, 1974; Finelli, Klauder, Karaffa y Petering, 1975; Abdulla, Svensson y Haeger-Aronsen, 1979).

Sería factible que el cadmio, o los desequilibrios de los metales esenciales ocasionados por el mismo, afectaran a dicha enzima y también otras del camino del hemo.

Por otro lado la administración de zinc exógeno durante las intoxicaciones con cadmio podría modificar la actividad de dichas enzimas, y ejercer un efecto protector.

I.14 VITAMINA C Y CADMIO

El ácido L-ascórbico es la conocida vitamina C (Figura 4 A).

El ácido L-ascórbico previene y cura el síndrome de deficiencia de vitamina C, aunque se le han encontrado otros usos terapéuticos.

La vida media de la vitamina C en el organismo humano está inversamente relacionada con la dosis, siendo aproximadamente de diez días (Kallner, Hartmann y Hornig, 1981).

En general se recomienda para los seres humanos una ingesta diaria de 100 mg de ácido ascórbico, pero Pauling (1970, 1971) ha sugerido de 2 a 9 g diarios, dependiendo de la variabilidad individual.

Se ha hallado que el ácido L-ascórbico puede aumentar la absorción de hierro de la dieta. Esto tiene importancia en las interrelaciones entre el hierro y otros elementos, en especial a nivel de la absorción intestinal (Fox, 1975).

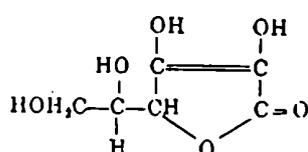
Según Fox (1975) la vitamina C produce un efecto beneficioso en la intoxicación con varios metales, entre ellos el cadmio. Papaioannou, Sohler y Pfeiffer (1978) usaron con éxito 60 mg de zinc y 2 g de vitamina C por día en el tratamiento de obreros expuestos al plomo. Los niveles de plomo en sangre bajaban de valores tóxicos a niveles permisibles.

Suzuki y Yoshida (1978) estudiaron los efectos del hierro (400 ppm en la dieta) y ácido ascórbico (1% en la dieta) en la toxicidad crónica de ratas, a las que se administraba 50 ppm de cadmio en el alimento durante 180 días. Observaron que dicho tratamiento evitaba la anemia y el retardo en el crecimiento y reducía los niveles tisulares de cadmio. Sin embargo la concentración de zinc en hígado, riñón y hueso no se normalizaba. Si estos compuestos se administraban 90 días después de la ingesta de la dieta con cadmio, los efectos eran similares.

La administración de cantidades variables de cadmio provoca una disminución del contenido de ascórbico en el tejido hepá

A

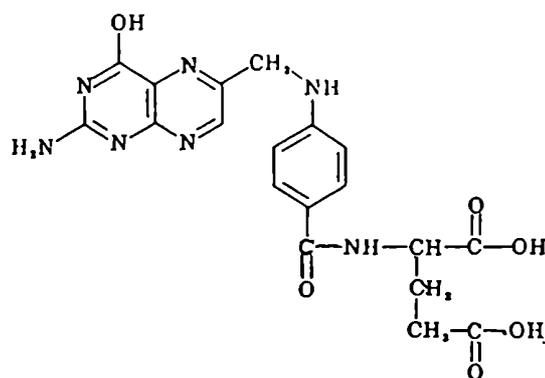
Vitamina C (ácido L-ascórbico)

Fórmula molecular: $C_6H_8O_6$

Peso molecular: 176,13

B

Acido fólico

Fórmula molecular: $C_{19}H_{19}N_7O_6$

Peso molecular: 441,41

Figura 4

tico y renal de ratas por disminución de la síntesis (Chatterjee, Banerjee y Rudrapal, 1973; Rudrapal, Chatterjee y Chatterjee, 1974). El suplemento de ácido ascórbico al grupo de ratas intoxicadas aumenta el contenido tisular de esta vitamina con respecto a las ratas normales, pero no llega al nivel de los controles con suplemento de ascórbico (Rudrapal et al., 1974).

Se verificó además que la actividad de la dehidroascorbata era más alta en ratas intoxicadas con cadmio y que un suplemento de ácido L-ascórbico no hacía descender ésta a niveles normales (Chatterjee, Majumder, Banerjee, Roy, Ray y Rudrapal, 1975). Otros estudios de administración de ácido L-ascórbico a ratas intoxicadas con cadmio en relación con la velocidad de crecimiento, niveles de hemoglobina y de enzimas, demostraron que dicha vitamina parecería llevar a una especie de protección contra la toxicidad del metal (Chatterjee et al., 1973).

Todavía no se conocen los mecanismos por los cuales el ácido L-ascórbico, se acepta que en condiciones biológicas puede comportarse como agente reductor. Por otro lado el ascórbico y algunos de sus metabolitos se podrían unir a elementos inorgánicos afectando su movimiento a través de las membranas biológicas.

Degwitz, Walsch, Dubberstein y Winter (1975) trabajando con cobayos alimentados con una dieta carente en vitamina C, encontraron que el nivel de citocromo P₄₅₀ de hígado, riñón y adrenales, desciende. El nivel de dicho citocromo se normaliza por administración de ácido δ -aminolevulínico, el sustrato clave para la biosíntesis del hemo. Ello sugeriría que el metabolismo del hemo se modifica por la falta de vitamina.

El zinc no tiene tendencia a sufrir oxidación o reducción y según Solomons, Jacob, Pineda y Viteri (1979), la vitamina C no influye en su absorción.

I. 15 ACIDO FOLICO Y CADMIO

Resulta interesante también investigar cómo actúa el ácido fólico (Figura 4 B) en las intoxicaciones con metales que interfieren en el metabolismo del hemo, por cuanto esta vitamina se está usando actualmente con éxito en el tratamiento de pacientes con ciertas porfirias (Wider de Xifra, Batlle, Stella y Malamud, 1980).

Se ha demostrado que en *Euglena gracilis* existe un factor que activa la PBGasa, regulando su actividad, y que dicho factor se puede reemplazar por ácido fólico (Juknat de Geralnik, Rossetti y Batlle, 1981).

Por otro lado, existen antecedentes (Tephly, 1975) de que los derivados de la pteridina protegen a la Deaminasa de la inhibición por plomo. El ácido fólico se usa además para el tratamiento de determinados tipos de anemia.

II. LA BIOSINTESIS DEL HEMO Y EL CADMIO

II.1 INTRODUCCION

Se ha mencionado ya que, entre otros efectos, se ha encontrado que el cadmio produce importantes alteraciones hematológicas tanto en el hombre como en animales de experimentación. Sin embargo, no se ha prestado demasiada atención al estudio de la acción del cadmio sobre la biosíntesis de las porfirinas y las enzimas involucradas en este camino metabólico.

El cadmio, análogamente al plomo y otros metales pesados, es inhibidor de aquellas enzimas cuya actividad depende de la presencia de grupos sulfhidrilos libres. Una de las manifestaciones más evidentes del efecto del plomo, por ejemplo, es el disturbio que produce en la biosíntesis del hemo dando lugar a una porfirinuria o porfiria secundaria, por inhibición, en primer lugar de la enzima ALA-Dehidrasa, si bien también ejerce acción sobre otras enzimas. Es de esperar, que el cadmio presente un comportamiento similar al del plomo.

La estructura tetrapirrólica es una de las bases primordiales para la supervivencia en la mayoría de los sistemas biológicos terrestres. Es la responsable del color rojo de la hemoglobina y del verde de la clorofila, los dos pigmentos más importantes de la materia viviente, involucrados en los procesos fundamentales de la respiración y fotosíntesis. Agreguemos que las porfirinas en general, que son tetrapirroles participan asimismo en un número de reacciones metabólicas de gran significado fisiológico, como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, y otras.

El papel vital y ubicuo de las porfirinas, y el hecho de que la mayoría de los sistemas biológicos no las requieren como factores de crecimiento, nos está indicando, por un lado, que las células vivientes son capaces de sintetizar sus propios tetrapirroles, y además que pueden hacerlo a partir de precursores más simples.

La elucidación de las primeras etapas en el camino de la biosíntesis del hemo, fue el resultado de una serie de bri -

llantes trabajos con compuestos radioactivos provenientes de los laboratorios de Shemin, Rimington, Neuberger y Granick. Estos estudios, establecieron las bases para los posteriores avances en este campo y demostraron que el mismo camino biosintético opera en todas las formas vivientes. Es decir, todas las células aeróbicas, de animales, plantas y bacterias, son capaces de sintetizar sus tetrapirroles, a través de un camino cuyas etapas, hasta la formación de protoporfirina IX, son exactamente coincidentes, cuando el producto final es hemo, clorofila o bacterioclorofilas, produciéndose luego las ramificaciones específicas. Las corrinas, en cambio, se biosintetizan a partir del uroporfirinógeno III.

En la Figura 5 se ilustra esquemáticamente el camino biosintético de los tetrapirroles.

Sabemos que el metabolismo está regulado por un intrincado mosaico de enzimas, sujetas a un fino control genético. Una falla en este control puede llevar a la formación defectuosa de una o más enzimas específicas, dando lugar así a un error innato del metabolismo, que puede manifestarse en distintas formas. Las expresiones clínicas de estas enfermedades, también son variables y cualquier sistema del organismo puede estar afectado; así como también puede esperarse una desviación genética ocasional en cualquier camino metabólico.

Las porfirias abarcan un grupo de enfermedades, en las cuales ocurren desórdenes en el metabolismo de las porfirinas, que pueden ser hereditarios y por ende pertenecer a la familia de errores congénitos del metabolismo, o adquiridos.

Las manifestaciones clínicas y bioquímicas, específicas para cada tipo de porfiria, están relacionadas con el tejido en el cual ocurre y se expresa fundamentalmente la falla metabólica, así como la o las etapas en el camino biosintético de las porfirinas, en las cuales ha ocurrido dicha falla.

Para apreciar fácilmente las causas de desórdenes en el metabolismo de las porfirinas es esencial un conocimiento previo del camino normal de la biosíntesis del hemo.

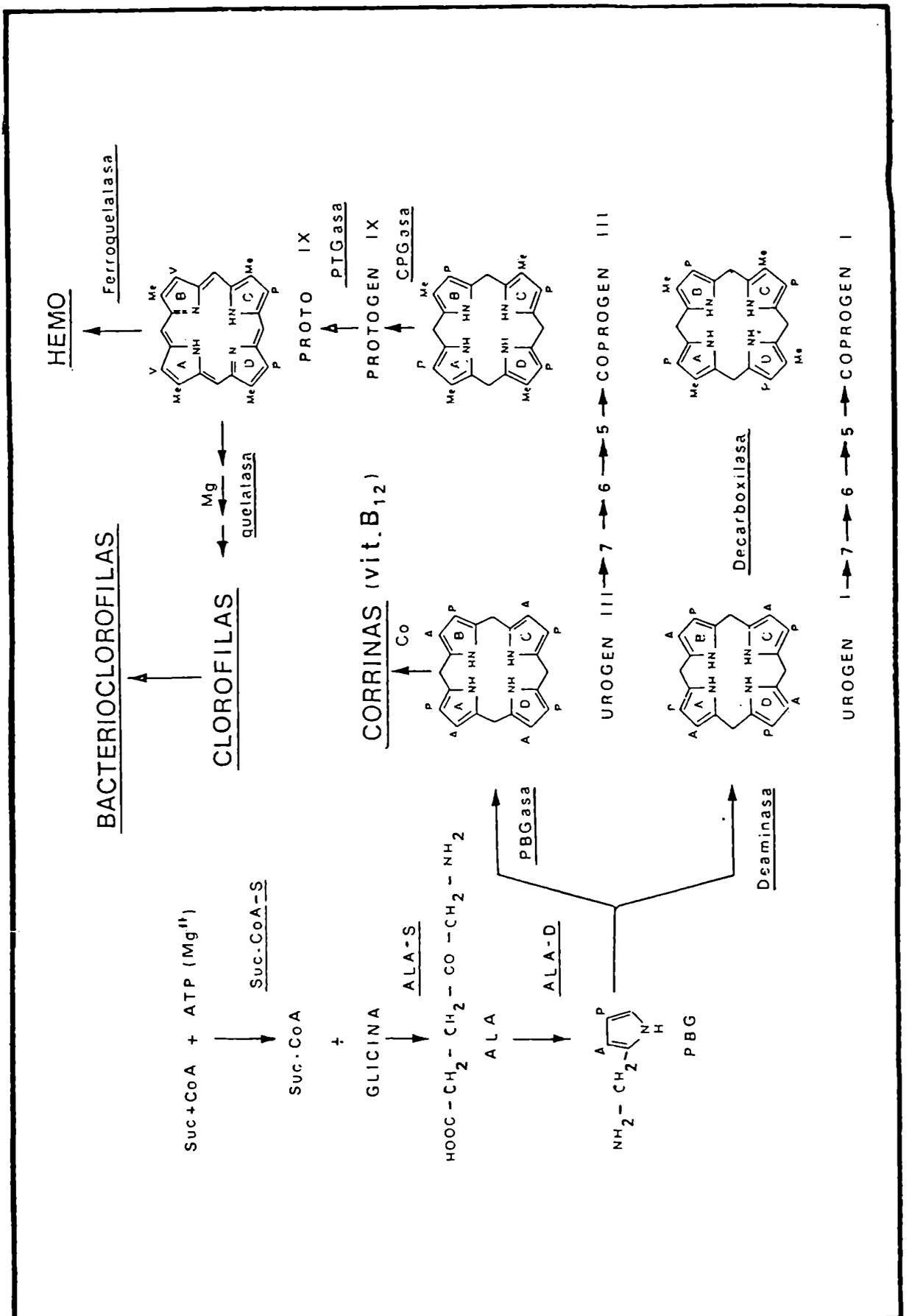


Figura 5: Esquema de la biosíntesis del hemo

II.2 LAS ENZIMAS DEL CAMINO DE LOS TETRAPIRROLES

II.2.1 Succinil CoA Sintetasa

Existen numerosas evidencias experimentales que indican que la Succinil CoA Sintetasa (Suc CoA-S) desempeña un importante rol en la biosíntesis de los tetrapirroles y su control (Wider de Xifra y Tigier, 1971; Batlle, Llambías, Wider de Xifra y Tigier, 1975).

Esta enzima fue descubierta por Kaufman en 1951, desde entonces ha sido detectada, aislada y purificada a partir de numerosas fuentes, como corazón de cerdo, riñón, hojas de espinaca, leguminosas, trigo y tabaco, mitocondrias de alcaucil, callos de soya y *E. coli* (Nishimura y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

II.2.2 Acido δ -aminolevúlico Sintetasa

La formación de ALA a partir de glicocola y succinil CoA, es la primer etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de porfirinas, catalizada por la enzima δ -aminolevúlico Sintetasa (ALA-S).

A pesar de su supuesta ubicuidad, el ALA-S ha sido encontrada en extractos libres de células de *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, eritrocitos de aves, hígados de cobayo y rata, en espinaca y extractos de callos de soya. Sin embargo, no ha podido detectarse en protopláستidos y cloroplastos, como tampoco en la fracción mitocondrial de plantas superiores. La primera detección en un sistema de origen vegetal fue reportada por Wider de Xifra, Batlle y Tigier (1971).

Se acepta que el ALA-S es una de las enzimas claves en el camino metabólico del hemo y se la considera la enzima limitante en la mayoría de los tejidos estudiados.

La excreción elevada de ALA y PBG en las porfirias de tipo hepático agudo, ha llevado a investigar las causas o fallas congénitas, generadoras de esta anomalía. Es importante señalar

que del estudio de modelos experimentales de porfiria, en los cuales se induce una síntesis exacerbada de precursores y/o porfirinas, mediante la administración de ciertos compuestos llamados porfirinogénicos, ya sea en animales enteros o cultivos de células, se observó que, en todos los casos, la actividad del ALA-S estaba significativamente incrementada. Estos datos estaban indicando muy claramente, que sin lugar a dudas el ALA-S es la enzima limitante, que controla el camino de la biosíntesis de las porfirinas, y que cambios en su actividad son una de las causas principales de los disturbios bioquímicos que observamos en las porfirias.

Es interesante también agregar aquí, que además de existir una gran gama de compuestos capaces de provocar un aumento de la actividad del ALA-S, se encontraron otros, como por ejemplo la hemina, que por el contrario actúan inhibiendo la enzima.

Estos dos efectos, que sólo hemos esbozado, son elementos fundamentales dentro del mecanismo de la regulación de la biosíntesis de las porfirinas.

II.2.3 Acido δ -aminolevúlico Dehidrasa

La enzima δ -aminolevúlico Dehidrasa (ALA-D), cataliza la síntesis del primer intermediario aromático, el monopirrol porfobilinógeno (PBG) a partir de dos moléculas de ALA.

Esta enzima ha sido detectada en una gran cantidad de sistemas biológicos y se posee una muy amplia información acerca de ella. Ha sido aislada, purificada y caracterizada a partir de las fuentes más variadas dentro de la escala zoológica y del reino vegetal, y se ha logrado cristalizar a partir de hígado bovino (Shemin, 1976).

En aquellos tejidos en los cuales también se ha detectado el ALA-S, la actividad del ALA-D es generalmente mucho mayor. A diferencia con el ALA-S, que es particulada, el ALA-D es una enzima localizada en el citoplasma. Esto implica que en las células, el ALA debe salir de la mitocondria y pasar al citoplasma antes de poder convertirse en PBG.

En general se comporta como una enzima termoestable y típicamente sulfhidrónica, en la mayoría de los casos requiere la presencia de un activador tiólico para exhibir el máximo de actividad. La inhiben agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilos, tales como el PCMB, el AIA y metales pesados, como el plomo, mercurio y cadmio.

En muchos tejidos se ha comprobado, además, que la actividad de la enzima depende de la presencia de ciertos cationes, postulándose que, por ejemplo, el zinc y el cobre forman parte de la estructura misma de la proteína enzimática, tratándose entonces de una metaloenzima. En general los iones zinc, magnesio, aluminio y manganeso, a ciertas concentraciones, producen la activación del ALA-D.

Uno de los principales problemas que aquejan actualmente al hombre, como hemos venido mencionando es el de la contaminación ambiental. Como consecuencia de ello, muchas son las enfermedades adquiridas, entre las cuales la porfiria ocupa un lugar de importancia.

De los contaminantes ambientales tóxicos, ciertos metales como plomo, mercurio y cadmio juegan un papel relevante.

La intoxicación crónica por plomo, conocida como plumbismo o saturnismo, provoca, como dijimos al comienzo de este capítulo, a nivel del metabolismo celular, una significativa inhibición de enzimas sulfhidrónicas que se manifiesta con mayor sensibilidad sobre algunas etapas del camino del hemo. Una de las características bioquímicas de la intoxicación por plomo es una acumulación de ALA y coproporfirina en orina y glóbulos rojos. Si bien el mecanismo real no está completamente dilucidado, se ha establecido, que en estos casos, se observa una inhibición significativa de la actividad del ALA-D, que puede llegar hasta un 80-90% en los estados más graves, proponiéndose que este efecto se debe a un bloqueo de los grupos sulfhidrilos del sitio activo de la enzima, por el plomo. De manera, que la determinación de la actividad del ALA-D, se está tomando como un dato adicional de importancia para confirmar un diagnóstico de saturnismo (Chisholm, 1964). Sería importante y útil que pudiera contarse con un parámetro similar para la detección temprana de

una intoxicación por cadmio.

II.2.4 Porfobilinogénasa

En 1957, Lockwood y Rimington, designaron con el nombre de Porfobilinogénasa (PBGasa) al complejo enzimático que cataliza la ciclización de cuatro moléculas de PBG, para dar el uroporfirinógeno III, el intermediario fisiológico de la biosíntesis del hemo, clorofilas y corrinas. La PBGasa es un complejo enzimático, formado al menos por dos enzimas diferentes la uroporfirinógeno I Sintetasa o Deaminasa, que es una proteína termoestable, y la uroporfirinógeno III Cosintetasa o Isomerasa, que es termolábil.

La Deaminasa cataliza la condensación de cuatro moles de PBG, con eliminación de cuatro iones amonio y posterior cierre del anillo reducido, dando lugar al uroporfirinógeno I. La Isomerasa, no puede usar al PBG como sustrato, es decir es incapaz de actuar sobre el monopirrol solo, tampoco puede emplear al uroporfirinógeno I; sin embargo, cuando funciona conjuntamente con la Deaminasa, constituye el complejo de la PBGasa, el que, a partir de cuatro moles de PBG produce el uroporfirinógeno III, resultado de la condensación cabeza a cola de tres pirroles y un cuarto en posición invertida.

Este sistema enzimático se ha detectado en tejidos de fuentes muy diversas, tales como bacterias, algas, protozoos, plantas superiores, eritrocitos de conejos, aves y humanos, hígado bovino. Una reciente y completa actualización acerca de esta enzima puede encontrarse en el trabajo de Battlè y Rossetti (1977).

En la mayoría de los sistemas estudiados la PBGasa es una enzima citoplasmática.

La PBGasa, así como sus componentes Deaminasa e Isomerasa, se ha aislado, y purificado a partir de numerosos tejidos y estudiado sus propiedades.

La PBGasa, Deaminasa e Isomerasa son también enzimas sulfhidrúlicas, los grupos sulfhidrilos podrían estar involucrados en el centro activo de las enzimas, así como intervenir

en la asociación de la Deaminasa con la Isomerasa, para formar el complejo activo de la PBGasa.

Una de las formas más raras de porfiria, y al mismo tiempo la primera descrita en 1874, es la Porfiria Congénita Eritropoyética, cuyas características bioquímicas son una elevada excreción de porfirinas de la serie I, particularmente uroporfirina I y coproporfirina I. Teniendo en cuenta las propiedades y funcionamiento de la PBGasa, es evidente que los disturbios en el camino metabólico del hemo, responsables de esta porfiria, deben estar estrechamente vinculados con esta enzima; notemos por ejemplo, que una deficiencia de Isomerasa va a desviar el camino normal de biosíntesis de la serie III hacia la vía lateral no fisiológica de la serie I.

En otro tipo de porfiria hepática, la llamada Porfiria Aguda Intermitente, tanto en su fase latente como aguda, el paciente excreta cantidades muy aumentadas de los precursores ALA y PBG, pero los niveles de porfirinas están por lo general, dentro de los rangos normales. Si hacemos una revisión de lo ya discutido acerca de las enzimas involucradas en el camino del hemo, fácilmente podríamos postular que en este caso debe existir alguna falla a nivel del ALA-S, que era la enzima limitante, pero también algún tipo de bloqueo en el consumo de ese exceso de ALA y PBG producido, que necesariamente se acumula y excreta, pues de lo contrario deberíamos encontrar además un incremento de porfirinas; es entonces lógico investigar que sucede a nivel de la PBGasa.

II.2.5 Decarboxilasa

La etapa siguiente en el camino biosintético del hemo involucra la decarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético, del uroporfirinógeno, a los cuatro restos metilos del coproporfirinógeno. Esta reacción es catalizada por la Decarboxilasa o uroporfirinógeno-carboxilasa.

Durante la formación enzimática de coproporfirinógeno, a partir de uroporfirinógeno III o I, se detecta la presencia de intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos, estos resultados sugieren que el proceso se lleva a cabo en etapas; sin embargo

hasta el momento, sólo se ha aislado una proteína responsable de la decarboxilación del porfirinógeno octacarboxílico en el tetracarboxílico, que no se ha podido desdoblar en subunidades o en más de una enzima, postulándose entonces que la Decarboxilasa es una única proteína, que posee posiblemente dos o más sitios activos y actúa en forma secuencial sobre su sustrato.

Existen varios hechos experimentales que apoyan la teoría de que la decarboxilación de los uroporfirinógenos es un proceso en etapas. Desde mucho tiempo atrás se había observado que, por ejemplo, de la orina de pacientes con Porfiria Cutánea Tardía, se podían aislar cantidades elevadas de porfirinas con 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos particularmente uro y firiaporfirinas. Este cuadro anormal puede ser la consecuencia de una falla en el control del camino de la síntesis y de un bloqueo a nivel de la etapa de decarboxilación.

II.2.6 Coproporfirinogenasa

La conversión de coproporfirinógeno III en protoporfirinógeno IX es catalizada por la Coproporfirinogenasa (CPGasa) o coproporfirinógeno-decarboxilasa o coproporfirinógeno-oxidasa o coprogenasa. Esta transformación implica una decarboxilación oxidativa de los dos restos de ácido propiónico situados en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B del coproporfirinógeno III a dos restos vinilo.

Esta enzima ha sido aislada de varias fuentes y purificada en algunos casos; un gran número de propiedades se han determinado con la enzima purificada proveniente de hígado de rata (Batlle, Benson y Rimington, 1965).

Recordemos que una de las características bioquímicas de la intoxicación por plomo era una elevada excreción de ALA y coproporfirina. Existen además otros tipos de porfirias, denominadas genéricamente Coproporfirias, hepática y eritropoyética, que también exhiben niveles urinarios significativamente incrementados de coproporfirina. En todos estos casos, así como en similares de intoxicación por metales pesados, se desprende que es natural una investigación de la CPGasa.

II.2.7 Protoporfirinógeno Oxidasa

La consideración de la existencia de una Protoporfirinógeno IX Oxidasa o Protogen Oxidasa en el camino de los tetrapirroles, es de muy reciente data.

Esta enzima cataliza la deshidrogenación del protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX, por pérdida de seis átomos de hidrógeno.

La Protogen Oxidasa podría también estar ligada a alguno de los disturbios del metabolismo del hemo, en los cuales haya una acumulación de protoporfirina.

II.2.8 Ferroquelatasa

La inserción del hierro en las distintas porfirinas, particularmente la protoporfirina IX, da lugar a la formación de los hemos, con la consecuente pérdida de dos protones. La enzima que cataliza este proceso se conoce como Hemo Sintetasa o Proto-Hemo-Ferro-liasa o Ferroquelatasa, nombre sugerido por Rimington en 1958 y empleado por la mayoría de los investigadores.

Es otra enzima particulada, ubicada en la mitocondria de células animales, cloroplastos de vegetales o cromatóforos de bacterias fotosintéticas.

Respecto a su especificidad, es absolutamente específica por el hierro, lo cual es muy significativo, por cuanto *in vivo*, la enzima, frente a una posible serie de cationes divalentes, debe seleccionar al hierro entre todos ellos. En cuanto a las porfirinas, además de la protoporfirina, meso y deuteroporfirina pueden funcionar como sustratos, pero en la célula, sólo protoporfirina se encontrará disponible. Es también una enzima sulfhidrónica.

En aquellos casos de porfirias caracterizados por una acumulación de protoporfirina, es de esperar que la razón de este disturbio sean una falla a nivel de la formación y/o utilización de este compuesto, y lo más lógico sería buscar un bloqueo en la etapa de la quelatasa.

II.3 BIODEGRADACION DEL HEMO

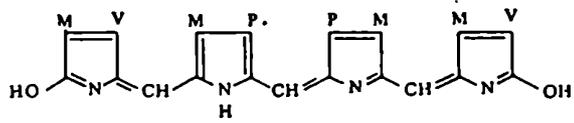
II.3.1 Hemooxigenasa

La secuencia catabólica de la degradación del hemo, comienza con una ruptura reductiva del anillo del hemo. Las posiciones más vulnerables en el macrociclo a un ataque oxidativo, son los puentes de carbono que unen los anillos pirrólicos. Esta reacción produce tetrapirroles lineales, que se conocen genéricamente como pigmentos biliares. La enzima que actúa es la Hemooxigenasa, y por cuanto hay cuatro posiciones diferentes (α , β , γ y δ) en las cuales puede romperse el anillo, la Hemooxigenasa podría producir potencialmente cuatro biliverdinas diferentes (O'Carra, 1975). Sin embargo, la reacción es específica, principalmente para la posición α , en la cual la ruptura tiene lugar entre los anillos A y B para producir biliverdina IX α (Figura 6 A). La reacción de esta enzima microsomal requiere NADPH y oxígeno, los productos son biliverdina y monóxido de carbono. También es necesaria la NADPH citocromo c reductasa, y si bien la Hemooxigenasa puede actuar sobre varios sustratos para producir las correspondientes biliverdinas, el protohemo IX es el mejor sustrato para esta enzima. En las células intactas, primeramente las hemoproteínas deben separar su proteína del hemo por acción de enzimas proteolíticas, liberando a este último para que pueda ser metabolizado y esta sería la etapa limitante que controlaría la degradación del hemo.

II.3.2 Biliverdina Reductasa

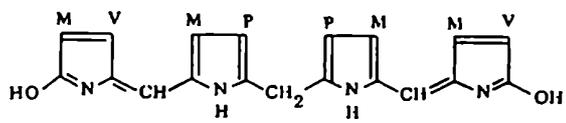
No se ha encontrado aún función o papel metabólico alguno para los pigmentos biliares en los sistemas de mamíferos; aparentemente son sólo productos de degradación destinados en última instancia para una rápida excreción. En la mayoría de los invertebrados no mamíferos, el producto inicial, biliverdina, se excreta como tal. Curiosamente, los mamíferos transforman este compuesto inocuo, fácilmente eliminable en la bilirrubina (Figura 6 B), un compuesto tóxico, muy insoluble, a través de una reacción reductora que requiere NADPH, por acción de la Biliverdina Reductasa (O'Carra, 1975): Esta enzima, de peso molecular 70.000, no contiene flavina, ni hemo, ni metales, y tampoco la

(A)



Biliverdina IX α

(B)



Bilirrubina IX α

Figura 6

inhiben los reactivos sulfhidrúlicos. Como consecuencia de la formación de un derivado tóxico e insoluble como la bilirrubina, el organismo necesita conjugarlo con ácido glucurónico para dar lugar a un glucurónido de la bilirrubina que es soluble, y puede así transportarse, por intermedio de la bilis, a los intestinos para excretarse finalmente en las heces, generalmente después de la conversión en mesobilirrubinógeno, estercobilinógeno, estercobilina y urobilina (O'Carra; 1975).

II.4 CONTROL BIOLÓGICO DE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO

En contraste con la gran importancia biológica de los hemos, no se conoce otro rol fisiológico para las porfirinas libres y sus precursores específicos ALA y PBG, más que el de productos intermedios en el camino biosintético del hemo, y en condiciones normales, la cantidad de estos compuestos que se acumula o excreta es muy pequeña. Esto indica claramente, que esta biosíntesis se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia, como resultado de la existencia de una serie estrechamente ligada de controles. Sin embargo, si estos controles fallaran o fueran defectuosos, como ocurre en las porfirias, puede tener lugar la síntesis de elevadas cantidades de intermediarios de la cadena del hemo, con serias consecuencias para el organismo todo.

La alta concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando fallan los mecanismos de regulación, demuestran la gran capacidad potencial de trabajo de las enzimas del camino del hemo, cuando pueden funcionar libremente y enfatizan la necesidad de la existencia de sistemas de control en favor de la economía y salud de la célula.

Se han postulado diferentes mecanismos que pueden controlar la biosíntesis de porfirinas:

- i) control a través de cambios en la actividad enzimática,
- ii) control a través de cambios en la cantidad de enzima sintetizada,
- iii) control por localización celular y tisular,
- iv) control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular, oxígeno, luz, estado de óxido-reducción intracelular, y,
- v) control por interconexión con otros caminos metabólicos relacionados.

Los dos primeros mecanismos se encuentran muy vinculados y sólo acerca de ellos nos referiremos.

El mayor logro hacia un mejor entendimiento de la regula -

ción de la biosíntesis del hemo, ha sido el establecimiento de que la síntesis de los tetrapirroles está controlada principalmente por cambios en la actividad de la enzima ALA-S, considerada como la primer enzima de este camino metabólico. Es decir, la cantidad de hemo sintetizada depende de la actividad del ALA-S presente. El ALA-S es así la enzima limitante, y como tal juega el papel fundamental en la regulación de esta secuencia biosintética. En la mayoría de las células estudiadas, las demás enzimas se encuentran presentes en cantidades no limitantes.

Hay dos mecanismos por los cuales puede controlarse la cantidad de hemo formado a través de la enzima ALA-S: uno involucra cambios en su actividad, y el otro cambios en la cantidad de enzima presente.

Existen varios mecanismos que pueden funcionar en la célula para controlar la actividad de una enzima. Entre ellos, se ha encontrado que, en un gran número de procesos enzimáticos, el producto final de una secuencia metabólica ejerce un efecto inhibitorio sobre la primer enzima de este camino. Este tipo de control se conoce como control por "feed-back" o control por retroinhibición o control por producto final. Como resultado del trabajo de muchos investigadores, las evidencias experimentales establecen que este último tipo de control, el de retroinhibición, es el mecanismo de control que opera en la biosíntesis del hemo.

Además de la inhibición por producto final, se ha demostrado que muchos sistemas son sensibles a control por represión. En este caso, un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA, regula el nivel de ALA-S en la célula. El mecanismo que se ha postulado para explicar la síntesis de ALA-S y su control, se basa en la conocida hipótesis de Jacob-Monod (Figura 7).

En este esquema se tiene en cuenta, en particular el hecho experimental de que la síntesis del hemo se encuentra reprimida en la mayoría de los tejidos, por cuanto sus requerimientos son generalmente bajos y, además, que el mismo hemo actúa como represor de su propia síntesis.

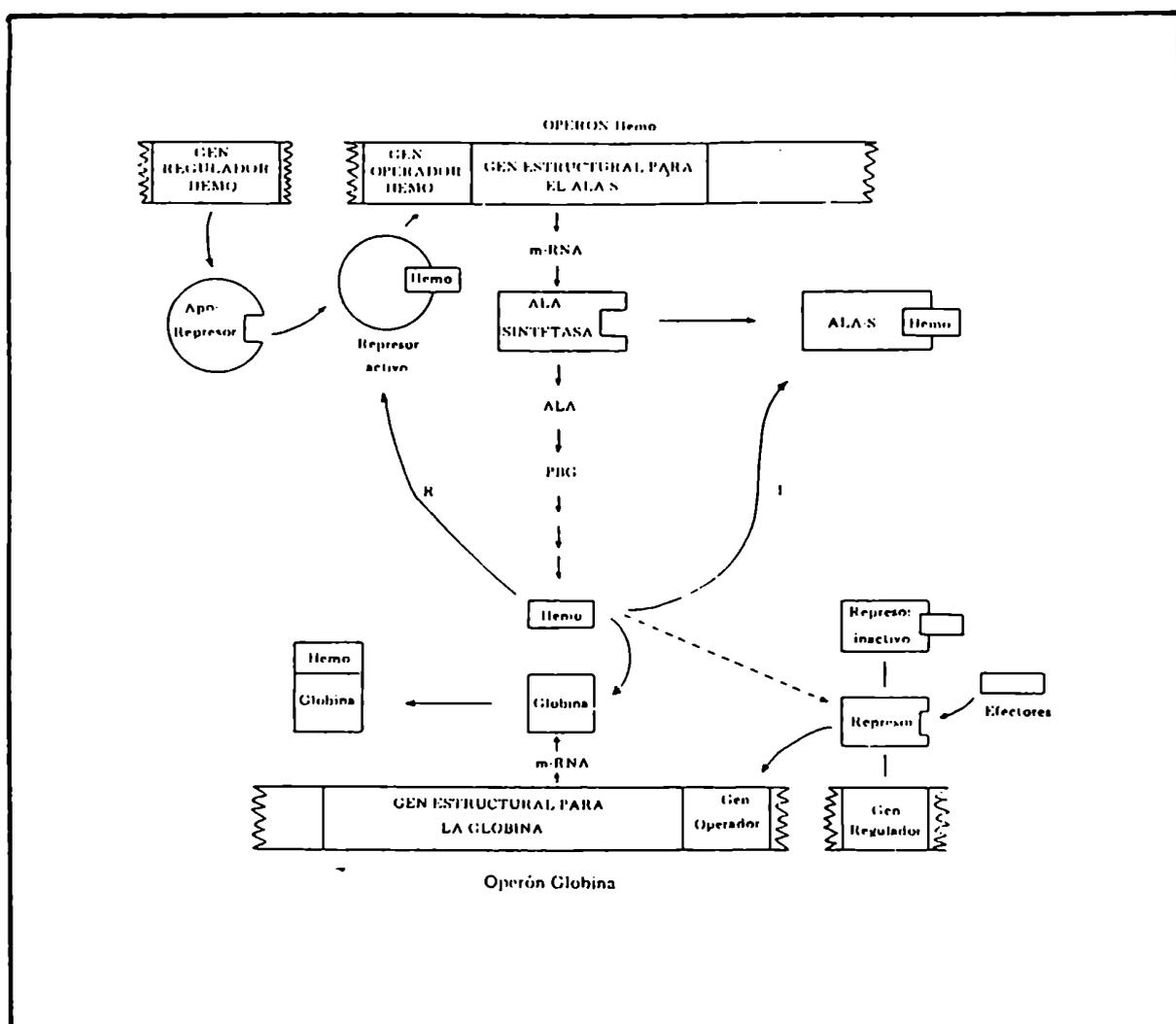


Figura 7: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo.
 I: Por inhibición de producto final del ALA-S.
 R: Por represión de la síntesis proteica del ALA-S.
 Su coordinación con un hipotético esquema de control de la síntesis de globina y hemoglobina.

El gen estructural del operón hemo que lleva la información para la síntesis de ALA-S, se activa por medio de un gen operador, que a su vez responde a la presencia de un represor activo, el cual actúa normalmente, reprimiendo a este gen operador, que detiene entonces la producción del RNA-mensajero por el gen estructural que codifica la enzima y por ende se interrumpe su síntesis. Este mecanismo de represión de síntesis enzimática, constituye un sistema de control lento.

El represor activo se forma por la unión de un apo-represor proteico, producido por el gen estructural del operón hemo y un co-represor, que en este caso se propone que es la molécula del hemo.

De manera que el hemo controla su propia síntesis actuando rápidamente por un mecanismo "feed-back" inhibiendo la actividad del ALA-S y, más lentamente, por un mecanismo de represión deteniendo la síntesis proteica del ALA-S. Cuando no hay exceso de hemo, no tiene lugar la conjugación del mismo con el apo-represor, el sistema represor no es activo, y por lo tanto no actúa sobre el gen operador, de manera que se dispara o recomienza la síntesis de ALA-S que tendrá lugar a máxima velocidad. Este mecanismo de control genético de la biosíntesis del hemo por represión ha sido demostrado en varios tejidos.

II.5 PORFIRIA EXPERIMENTAL

II.5.1 Generalidades

Con la introducción de los barbituratos en la clínica médica, en 1903, surgió la evidencia de que cantidades relativamente pequeñas de estas drogas, podían precipitar ataques agudos, a veces fatales, en individuos con porfiria hereditaria, clínicamente latente y asintomática. Se observó poco después que una gran variedad de otros compuestos actuaban de un modo similar a los barbituratos.

Mientras que pequeñas dosis de estas drogas son capaces de inducir un ataque de porfiria en pacientes portadores de la falla hereditaria, se ha encontrado que dosis mucho mayores de estas mismas drogas producen desórdenes en el metabolismo del hemo en individuos o animales normales. Esta clase de desórdenes del metabolismo del hemo se conoce como porfirias adquiridas en el caso de humanos o más genéricamente como porfirias experimentales, en particular cuando se refieren a organismos no humanos.

Los disturbios del metabolismo de las porfirinas pueden dividirse entonces en dos tipos fundamentales: porfirias y porfirinurias. En el hombre, la distinción entre ambos tipos está definida claramente. Recordemos una vez más, que las porfirias pueden considerarse primaria y usualmente anomalías hereditarias del metabolismo de los tetrapirroles. Las porfirinurias, en contraste, son secundarias a un número de condiciones patológicas y están acompañadas por una excreción urinaria aumentada de coproporfirina y menos frecuentemente uroporfirina y precursores. Tales enfermedades pueden incluir una gama bastante amplia de disfunciones, trastornos hepáticos varios, ciertas enfermedades hematológicas, intoxicaciones con metales pesados. La intoxicación con plomo se ha reconocido como una causa de porfirinuria desde fines del siglo pasado y si bien puede no ser una de las porfirias adquiridas más comunes hoy día, es en muchos aspectos la más importante.

Se ha dicho que la historia de la porfiria experimental en animales ha seguido cursos paralelos con la de la porfiria

humana (Batlle, 1973). Sin embargo, debemos ser más precisos, y si hacemos un crítico análisis del tema, veremos que tanto los primeros estudios de porfiria experimental, como la gran mayoría de los posteriores fueron siempre estimulados por observaciones clínicas previas, en porfirias humanas.

El concepto de inducción química de la porfiria, se originó en las observaciones de Stokvis en 1889, quien describió el caso de un paciente que después de haber ingerido una gran dosis del hipnótico Sulfonal, había excretado orina roja y muerto luego de una disfunción neurológica. El mismo Stokvis, en 1895, produjo el primer caso de porfiria experimental por administración de Sulfonal a conejos y ratas. A posteriori, otros autores administraron este compuesto a conejos y observaron una elevada excreción urinaria de porfirinas insolubles en éter; interesante también fue el hallazgo de que, luego de la autopsia, solamente el hígado y la bilis contenían altas concentraciones de porfirinas.

Se dice que en 1952 comienza la denominada "era moderna de la porfiria experimental", iniciada por los estudios del grupo de Schwartz. Schwartz y colaboradores (Schwartz, Kaprios y Schmid, 1952) produjeron el primer caso de porfiria experimental de tipo eritropoyético, tratando conejos con fenilhidrazina, plomo y luz ultravioleta. Estos animales excretaban cantidades elevadas de uroporfirina I en orina. Uro y coproporfirina I estaban también incrementadas en médula ósea, mientras que sus concentraciones en hígado eran normales. Los conejos excretaban asimismo grandes cantidades de ALA y de PBG, una característica que no se observa en la Porfiria Congénita Eritropoyética humana.

Las porfirias experimentales han provisto excelentes modelos para el estudio de una gran cantidad de problemas relacionados con las porfirias humanas; entre ellos el fundamental del control de la enzima reguladora, mitocondrial, inducible en hígado de mamíferos.

Como ya se ha mencionado, uno de los mayores avances en el campo del metabolismo de las porfirinas provino, precisamente, de estudios con modelos experimentales, y lo constituyó la

demostración por Granick y Urata (1963) de que la producción aumentada de ALA, en cobayos tratados con DDC, era el resultado de un incremento del nivel hepático del ALA-S mitocondrial; demostrando al mismo tiempo que era la enzima limitante y reguladora del camino biosintético del hemo. Más tarde, Tschudy y colaboradores (1964) demostraron que la administración de AIA a ratas producía la inducción de altos niveles de ALA-S hepática. Numerosos trabajos han confirmado luego el hecho de que tanto AIA y DDC, como la griseofulvina, hexaclorobenceno y otros compuestos porfirinogénicos, producen un marcado aumento del ALA-S *in vivo*, causa principal de las anomalías bioquímicas observadas en las porfirias experimentales.

De un estudio de la relación entre la estructura química de los compuestos porfirinogénicos y su capacidad inductora de porfiria han surgido varias teorías, sin embargo aún no se ha llegado a una única hipótesis que permita pensar en un mecanismo químico común por el cual actúen todos estos compuestos, por el contrario, la información disponible sugiere que distintos grupos de compuestos deben operar según diferentes mecanismos. Es casi sorprendente la gran variedad de estructuras moleculares con propiedades porfirinogénicas, por lo cual es imposible visualizar una constitución química o configuración estérica común, como tampoco el tipo de receptor. Lo que podemos esperar es que, si estos compuestos producen porfiria por interacción con el mismo sitio, éste debe ser bastante inespecífico. La única propiedad que parece ser bastante predecible en los compuestos porfirinogénicos, es que deben poseer un alto grado de liposolubilidad. Este hecho podría también sugerir que el sitio receptor es de naturaleza lipofílica y que podrían estar involucradas uniones hidrofóbicas en su interacción con los compuestos activos, que pierden rápidamente esta actividad cuando se hacen solubles en agua.

II.5.2 Mecanismos de acción de los compuestos porfirinogénicos

Se ha postulado un mecanismo de acción por el cual los compuestos porfirinogénicos podrían actuar en base a los principales aspectos regulatorios de la biosíntesis del hemo que ya han sido discutidos, pero centrado en el concepto de control

de la actividad de la enzima ALA-S por retroinhibición y repre si ón, ejercido por el hemo (Figura 8) (De Matteis, 1975). De acuerdo con este esquema, cualquier evento que lleve a una dis min uci ón de la concentración del reservorio de hemo regulato - rio llevará consecuentemente a una estimulación de la activi - dad del ALA-S. Los mecanismos por los cuales los compuestos porfirinogénicos podrían actuar caen dentro de tres grupos:

- i) inhibición directa de la síntesis del hemo a diferentes niveles enzimáticos;
- ii) aumento de la velocidad de utilización del hemo, por ejem pl o por incremento del citocromo P₄₅₀ componente esencial del sistema de detoxificación microsomal;
- iii) aumento en la velocidad de degradación del hemo; se ha demostrado que varias drogas como el AIA, provocan una pérdida del hemo hepático debido a una destrucción aumen tada y conversión en los llamados "pigmentos verdes", que son ciertos productos de degradación no completamente i - dentificados (De Matteis, 1971).

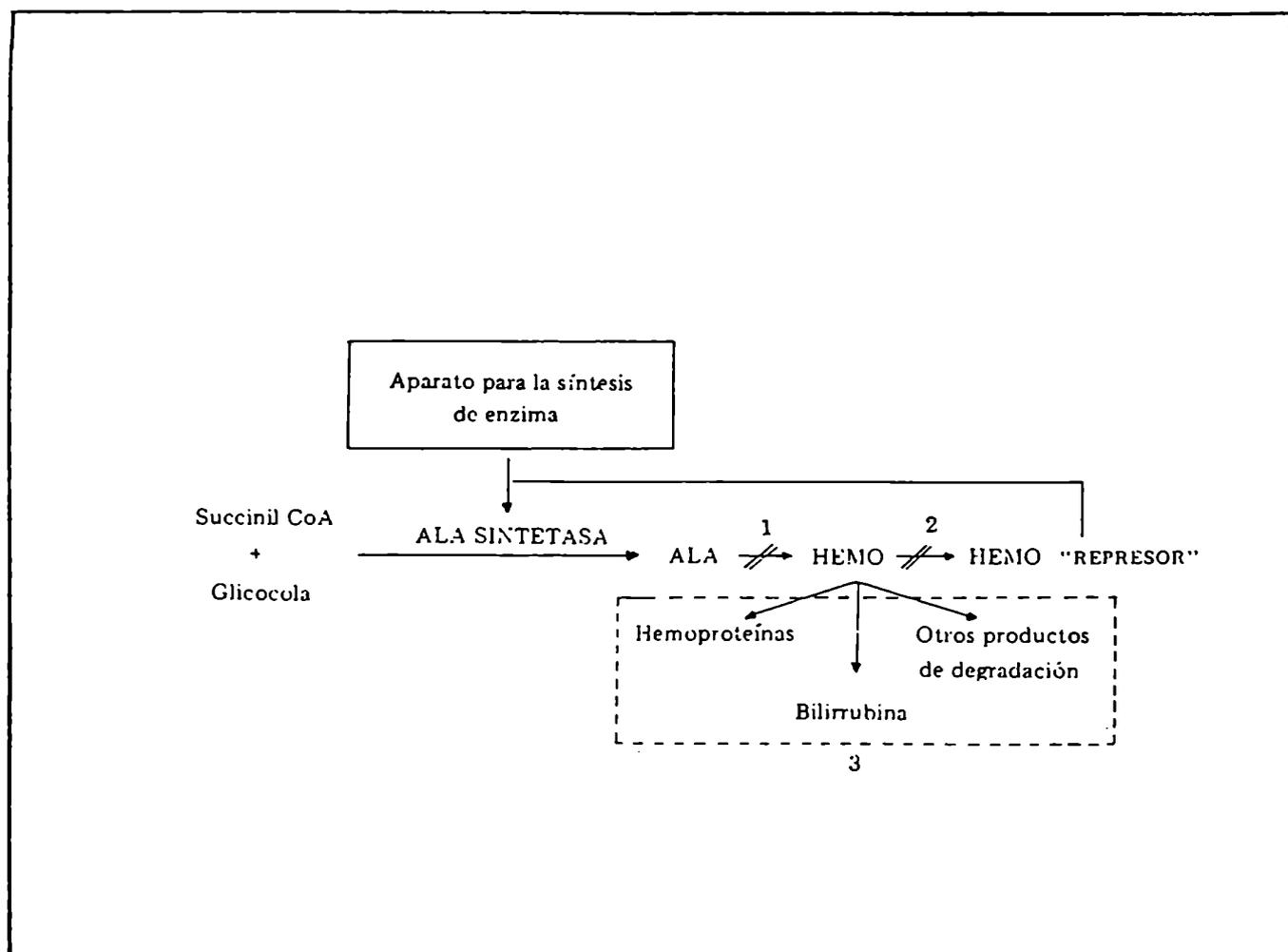


Figura.8: Posibles mecanismos por medio de los cuales una droga puede interferir con el control ejercido por el hemo a nivel del ALA-S.

1: Inhibición de la síntesis del hemo

2: Inhibición de la formación del represor activo

3: Velocidad aumentada de utilización o degradación del hemo

II.6 ESTUDIOS ACERCA DE LOS EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

II.6.1 Efectos *in vitro*

II.6.1.1 Acción del cadmio sobre las primeras enzimas de la biosíntesis

Wider de Xifra y Batlle (1980) estudiaron la influencia de cationes monovalentes y divalentes sobre la Succinil CoA Sintetasa de callos de soya, entre los cuales se encontraba el cadmio que reducía la actividad de la enzima a un 50% a una concentración de 2 mM.

Kench y Gubb (1970) trabajando con hígado y otros tejidos de pollos recién salidos del cascarón, llegaron a la conclusión que el cadmio produce *in vivo* e *in vitro* inhibición del ALA-S.

II.6.1.2 Acción del cadmio sobre el ALA-D

La información existente acerca de la inhibición del ALA-D *in vitro* por iones inorgánicos distintos del plomo, como es el caso del cadmio, ha sido contradictoria.

Thompson, Jones y Beasley (1977) realizaron algunas observaciones interesantes con respecto a las determinaciones de ALA-D eritrocitaria. Dichos autores llegaron a la conclusión que el ALA-D de eritrocitos es un indicador de la concentración total de iones metálicos en la sangre. Influyen en su actividad elementos esenciales como el cobre, que la inhibe, y el zinc, que la activa. Las proteínas plasmáticas protegen a la enzima de la inhibición y de la activación. Dicho efecto depende de la afinidad de los distintos metales estas proteínas, pero también de las concentraciones relativas de los mismos.

Por otro lado los mismos autores hacen notar que los metales, *in vivo*, pueden unirse a la membrana de los eritrocitos, y entonces el efecto del metal en el glóbulo rojo hemolizado puede no ser reflejo del verdadero efecto *in vivo*.

Otras experiencias llevadas a cabo en muestras conservadas a -30°C pueden conducir también a resultados que desorientan. El trabajo de Hampp y Kriebitzch (1975) señala que la conservación de la enzima a -30°C se ve influenciada notoriamente por la presencia o ausencia de cadmio. Dichos autores utilizaron eritrocitos bovinos, conservados durante intervalos variables a la temperatura señalada. Después de 6 semanas, la actividad de glóbulos rojos de terneros alcanzó un valor máximo de 220% para una concentración de CdCl_2 de $100\ \mu\text{M}$ y después de 4 semanas con la misma concentración de cadmio se obtuvo un máximo de 450% de actividad en eritrocitos de animales adultos. Además observaron que cuanto mayor era el tiempo transcurrido luego de la extracción de las muestras, mayor era la concentración de metal necesaria para una dada activación. Con eritrocitos frescos, se produjo un máximo en la actividad con respecto al control con una concentración de cadmio de $20\ \mu\text{M}$. Por otro lado, las muestras almacenadas hasta 2 semanas en ausencia de cadmio, pero incubadas luego en presencia de una concentración adecuada del metal, exhibían una actividad enzimática superior a la del control.

Kench y Gubb (1970) en base a las experiencias antes mencionadas con pollos recién salidos del cascarón observaron que la actividad de ALA-D se estimula, a determinadas concentraciones de cadmio tanto *in vivo* como *in vitro*.

En cambio, según Wada, Jano, Ono y Toyokawa (1972) el ALA-D se inhibe completamente *in vitro* con $0,1\ \text{mM}$ de cadmio.

Wilson, Burger y Dowdle (1972) en base a estudios con hígado bovino llegan a la conclusión que el cadmio puede activar o inhibir el ALA-D dependiendo de la concentración del metal.

Para Abdulla y Haeger Aronsen (1973) el cadmio es un inhibidor del ALA-D.

Davis y Avram (1978) encuentran que en hemolizados de sangre humana entera, el cadmio se comporta como un activador o un inhibidor del ALA-D según la concentración empleada. Así, $4\ \mu\text{M}$ de cadmio se produjo una estimulación máxima de 134% con respecto al control y a mayores concentraciones de cadmio se

observó una inhibición progresiva de la actividad del ALA-D. A $8 \cdot 10^{-5}$ M, la enzima se inhibió un 50% mientras que la concentración necesaria para producir igual grado de inhibición era de sólo $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Estos autores observaron también que el cadmio revierte la inhibición ocasionada por el plomo, siendo la concentración necesaria para producir dicho efecto, menor que la correspondiente de zinc.

II.6.1.3 Interpretaciones acerca del efecto de los metales sobre el ALA-D

El ALA-D es una típica enzima sulfhidrónica (Shetty y Miller, 1969). Wilson et al. (1972) hallaron que el ALA-D de hígado bovino tiene 56 grupos sulfhidrilos por molécula.

Como ya se expresara, el cadmio tiene afinidad por los grupos sulfhidrilos. Según Vallee y Ulmer (1972) las constantes de estabilidad de los complejos del cadmio con grupos sulfhidrilos libres son mayores que las del zinc.

La información existente acerca de los requerimientos metálicos de la enzima es abundante, pero algunas veces contradictoria. Estos dependen, aparentemente, de la fuente de la enzima. Según Cheh y Neilands (1973) el zinc tiene una función esencial en el ALA-D de hígado bovino.

Nandi y Shemin (1968) propusieron un mecanismo para explicar la función del ALA-D en la síntesis del PBG a partir de ALA.

Algunos autores consideran factible que el zinc mantenga adosadas entre sí las subunidades de ALA-D cumpliendo así una función estructural semejante a la descrita por Kägi (1959) para la alcohol deshidrogenasa. Pero Border, Cantrell y Kilroe-Smith (1976) trabajando con glóbulos rojos humanos de individuos sin exposición conocida al plomo, hallan que el EDTA inhibe a la enzima sin alterar el peso molecular de la misma. Por lo tanto, según estos autores, el EDTA actuaría sobre iones metálicos periféricos, a menos que el zinc empleado para mante-

ner la estructura cuaternaria de la enzima no fuera susceptible a la quelación.

Diversos autores han estudiado en detalle el ALA-D de hígado bovino. Wu, Shemin, Richards y Williams (1974) han demostrado que dicha enzima está compuesta por ocho subunidades. Stella (1977) ha investigado el rol de la estructura octamérica de la enzima sobre su conformación y función postulando un mecanismo de acción (Batlle y Stellà, 1978). Las interacciones entre grupos sulfhidrilos y metales divalentes como el zinc (eventualmente hierro, magnesio, manganeso) o también otro tipo de enlaces serían necesarios para mantener la estructura del sitio activo. Barnard, Itoh, Hohberger y Shemin (1977) señalan que se necesitan dos grupos sulfhidrilos para mantener la actividad. Según los estudios de Tsukamoto, Yoshinaga y Sano (1980), el ALA-D de hígado bovino contiene un átomo de zinc y ocho sulfhidrilos por subunidad y el sitio activo estaría constituido por dos residuos de cisteína, dos residuos de histidina y un átomo de zinc. Dichos autores proponen un modelo de sitio activo según el cual el grupo sulfhidrilo de una molécula de cisteína se coordinaría con el zinc. El sulfhidrilo de la otra cisteína quedaría así protegido de la autooxidación y con posibilidad de unirse al sustrato. Sugieren que el plomo inhibe pues tiene un tamaño iónico mayor que el del zinc y se forma un puente entre los dos grupos sulfhidrilos.

En conclusión, el ALA-D es una enzima sulfhidrónica, y algunos metales como el zinc podrían tener una función esencial en el sitio activo, o en el mantenimiento de la estructura.

De acuerdo con el metal agregado, con su tamaño iónico, con sus constantes de estabilidad con los grupos sulfhidrilos, con su concentración y con las condiciones del medio estudiado se pueden producir efectos diversos, ocasionados por variaciones en los enlaces de coordinación en la vecindad inmediata del sitio metálico. El estudio de los mismos no se puede considerar en modo alguno agotado, y es de esperar que nuevas experiencias lleven al esclarecimiento de los interrogantes planteados.

II.6.1.4 Acción del cadmio sobre la Porfobilinogenasa

No existe tampoco demasiada información acerca de los efectos del cadmio sobre la PBGasa, ni sobre sus componentes Deaminasa e Isomerasa. Los únicos datos provienen de estudios *in vitro* con las enzimas purificadas a partir de hígado bovino (Sancovich, Ferramola, Batlle, Kivilevich y Grinstein, 1976), eritrocitos de aves (Llambías y Batlle, 1971) y callos de soya (Llambías y Batlle, resultados no publicados; Llambías, 1972). Se observó que los iones cadmio a concentraciones del orden de 1 mM inhibían significativamente tanto la PBGasa como la Deaminasa; en el caso de la PBGasa de eritrocitos y la Deaminasa de hígado bovino, cuando la actividad se medía en función del producto formado, a esa concentración la inhibición era casi total; de todos modos siempre el efecto era mucho mayor con respecto a la formación de porfirinas que sobre el consumo de PBG. Se ha propuesto, que este fenómeno se debería también a una combinación entre el metal y grupos tioles esenciales sobre la enzima. Además se ha sugerido que ciertos sulfhidrilos o disulfuros estarían involucrados en la etapa de ciclización y formación final del porfirinógeno, y es probable que el metal interfiera más específicamente con estos restos, bloqueando así en mayor grado la etapa última de ciclización de los intermedios.

II.6.1.5 Acción del cadmio sobre la Decarboxilasa

En las condiciones experimentales empleadas por Woods, Kardish y Fowler (1981), el cadmio a concentraciones mayores de 10^{-5} M produjo una inhibición significativa de la enzima.

II.6.1.6 Acción del cadmio sobre la Ferroquelatasa

Según lo citado por Bugany, Flohe y Weser (1971) muchos iones divalentes, entre ellos el cadmio, inhiben a la Ferroquelatasa.

II.6.2 Efectos *in vivo*

Según Webb (1979) es posible una inhibición por el cadmio de la síntesis extramitocondrial de precursores del hemo y de la síntesis intramitocondrial del hemo.

II.6.2.1 Acción del cadmio sobre el ALA-D

Se han estudiado los efectos del cadmio sobre el ALA-D, dado que es una enzima bastante estable y relativamente fácil de medir, que se ve inhibida por metales tóxicos como el plomo.

La administración diaria de cadmio a ratones (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) produce un decrecimiento transitorio de la actividad del ALA-D (Wada, Ono, Maru y Toyokawa, 1972).

Seth, Agarwal, Satija y Hasan (1976) han observado que en ratones a los cuales se aplicaron tres dosis de 2 mg/kg de cadmio a intervalos de dos días no se producen alteraciones de la actividad del ALA-D eritrocitaria medida seis días después de la última inyección; sin embargo, los niveles tisulares de algunos metales esenciales se encuentran alterados.

Johansson-Sjöbeck y Larsson (1978) han efectuado un estudio en peces. Se expusieron lenguados (*Pleuronectes flesus*) a niveles subletales de cadmio (5, 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{litro}$) durante períodos de cuatro y nueve semanas y se midieron las respuestas hematológicas, así como también la actividad del ALA-D en sangre y en tejidos formadores de sangre. En los peces expuestos al cadmio se observaron variaciones significativas de hemoglobina, hematocrito y número de glóbulos rojos. La respuesta anémica fue evidente aún en los lenguados expuestos a la dosis más baja correspondiente a 1:4000 de la concentración letal a la cual muere el 50% de los animales en 96 horas. La anemia estaba acompañada por un aumento significativo de la actividad del ALA-D en tejido renal. Esto indica un estímulo compensatorio de los pasos iniciales de la biosíntesis de la hemoglobina. Sin embargo, no se produce formación de hemoglobina, lo que puede deberse a un metabolismo alterado del hierro. La exposición al cadmio también produjo un aumento significativo del número de linfocitos, indicando una acción en la defensa inmunológica del pez.

Según Lauwerys, Buchet y Roels (1973), el cadmio no altera la actividad del ALA-D en los individuos expuestos.

II.6.2.2 Acción sobre la excreción de porfirinas y ALA

Mahaffey y Fowler (1977) estudiaron la excreción de porfirinas en ratas Sprague-Dawley, macho, a las que se administró 50 ppm de cadmio en la dieta durante diez semanas. El cadmio por si solo no altera marcadamente la excreción urinaria de ALA, coproporfirinas, ni uroporfirinas. En cambio, se observan interacciones de cadmio con plomo y con arsénico que alteran los modelos de excreción de porfirinas. Las interacciones de los metales con respecto a algunos parámetros son aditivas y con respecto a otros son antagónicas.

II.6.2.3 Acción del cadmio sobre la Hemooxigenasa y citocromo P₄₅₀

A pesar de que muchos iones metálicos inhiben la Hemooxigenasa *in vitro*, los estudios *in vivo* han demostrado que varios iones metálicos, entre ellos el cadmio, son capaces de inducir dicha enzima en hígado (Maines y Kappas, 1976). Las experiencias se realizaron con ratas Sprague-Dawley macho, a las cuales se administró una sola vez 2,8 mg/kg de cadmio. Los animales se dejaron en ayunas, sacrificándose 24 horas después de la inyección.

Además del aumento de la actividad de Hemooxigenasa, se observó una disminución en el contenido de citocromo P₄₅₀ y de hemo, a pesar de que la actividad del ALA-S era normal.

El efecto puede deberse a una unión directa de los metales con algún componente celular de naturaleza sulfhidrónica, que interviene en la regulación de la Hemooxigenasa (De Matteis y Unseld, 1976; Maines y Kappas, 1977) o como efecto secundario de la degradación, inducida por los metales, del citocromo P₄₅₀ o del hemo recientemente sintetizado (Guzelian y Bissell, 1976).

Eaton, Stacey, Wong y Klaassen (1980) estudiaron *in vivo* las relaciones dosis - efecto de varios iones metálicos sobre la metalotioneína, glutatión, Hemooxigenasa y citocromo P₄₅₀. Se aplicaron dos inyecciones i.p. de cada metal, una 36 y otra 12 horas antes del sacrificio, usando dosis de 2,2 mg/kg de cadmio, el metal se comportó como un inductor efectivo y poten-

te de la Hemooxigenasa y como depresor del citocromo P₄₅₀. Sin embargo, con dosis de 0,5 mg/kg no se observaron estos efectos. Los autores sugirieron que los metales que inducen la Hemooxigenasa, luego de la administración de dosis agudas, pueden comportarse de manera diferente a lo largo de una exposición crónica, si además son inductores de la síntesis de metalotioneínas.

En conclusión los antecedentes bibliográficos confirman el hecho antes señalado, que por momento no se ha prestado demasiada atención a los efectos del cadmio sobre la biosíntesis del hemo. Sin embargo, dada la significativa implicancia del cadmio como contaminante industrial y ambiental, y dada la importancia del camino biosintético del hemo para la vida misma, se considera fundamental llegar a conocer en forma más detallada los efectos del cadmio sobre el mismo.

MATERIALES

Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 MATERIALES

Acido δ -aminolevúlico: El ALA se obtuvo de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, Missouri, U.S.A.) o Porphyrin Products (Logan, Utah, U.S.A.).

Porfobilinógeno: Obtenido biosintéticamente en el CIPYP.

Resinas de intercambio iónico: Dowex 2-X8 y 50-X8 (mezclas comerciales de 200 a 400 mesh).

Acetato de etilo p.a.: Lavado con carbonato de sodio 10%, luego con agua, secado sobre CaCl_2 y redestilado.

Otros reactivos: Todos los demás reactivos usados fueron de grado p.a., obtenidos de distintas fuentes comerciales. Para la preparación de todas las soluciones se empleó agua bidestilada en destilador de vidrio.

Ratas: Se usaron ratas Sprague-Dawley provistas por el Dr José A. Castro, de CITEFA. La edad de los animales osciló entre los 4 y 14 meses y su peso promedio fue de 270 g. Los animales tenían libre acceso a una dieta comercial (Purina, dieta 1) y a agua destilada o contaminada según el caso.

Inyectables: Se prepararon a partir de sales p.a. ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, Merck; $(\text{AcO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck) disolviéndolas en solución fisiológica estéril. La vitamina C se preparó a partir del medicamento Redoxón Roche 500 mg, inyectable, usando como diluyente agua bidestilada estéril.

Aparatos de absorción atómica: Equipos Varian AA-5 y Varian 5750 (Varian, Palo Alto, California, U.S.A.).

III.2 METODOS

III.2.1 Recolección de la orina y de las heces

La orina de las ratas se recogió cada 24 horas por medio de un sistema, que impide su contaminación con las heces, en frascos de color caramelo, refrigerados.

A iguales intervalos de tiempo se recogieron las heces.

III.2.2 Obtención de los órganos y sangre

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca y fue recogida sobre heparina.

Se separaron el hígado, los riñones y el bazo, y se congelaron de inmediato, hasta el momento de su empleo.

III.2.3 Obtención de las enzimas

III.2.3.1 Glóbulos rojos

Los glóbulos rojos (GR) se separaron del plasma por centrifugación a 2000 g a 4°C durante 10 minutos, y se lavaron dos veces con solución fisiológica, centrifugando cada vez. Luego se los hemolizó mediante tres sucesivos congelamientos, en una mezcla de hielo seco - acetona, y descongelamientos inmediatos colocando el recipiente bajo el chorro de agua corriente.

III.2.3.2 Organos (hígado, riñón y bazo)

Salvo se indique lo contrario, las operaciones se llevaron a cabo a una temperatura entre 4°-6°C.

Una cantidad pesada del órgano se cortó en trozos pequeños. Estos se lavaron tres veces con solución fisiológica y se secaron con papel de filtro. Se preparó un homogenato al 10% (p/v) con sacarosa 0,25 M, en un homogeneizador del tipo Potter-Elvehjem con ayuda de un agitador mecánico. Dicho homogenato se centrifugó a 11.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se

empleó como fracción enzimática.

III.2.4 Determinación de la excreción de intermediarios de la biosíntesis del hemo

III.2.4.1 Determinación de ALA y PBG en orina

III.2.4.1.1 Generalidades

Se realizó según el método de Mauzerall y Granick (1956), que está basado en el uso de resinas de intercambio iónico.

La orina que contiene ALA y PBG se pasa a través de una columna de resina Dowex 2-X8 en la forma acetato. El PBG se retiene, mientras que la urea y el ALA se eluyen con agua de la resina. El PBG se eluye posteriormente de la columna con ácido acético y se determina colorimétricamente usando el reactivo de Ehrlich.

Los lavados de la primer columna se pasan a través de una columna de resina Dowex 50-X8 en la forma ácida. La urea se elimina con agua de la columna. El ALA se eluye luego con acetato de sodio y se lo hace reaccionar con acetilacetona. El pirrol resultante se determina colorimétricamente con reactivo de Ehrlich.

III.2.4.1.2 Determinación colorimétrica del PBG

La determinación del PBG se basa en su reacción con p-dimetilaminobenzaldehído (pDMAB), en medio ácido, para dar un compuesto de color rojizo. Existen varias modificaciones de este reactivo, teniendo en común todas ellas el gran exceso de pDMAB, mientras que difieren en la concentración y presencia de distintos ácidos.

En 1964 Moore y Labbe, describieron un método para la estimación del PBG, cuya ventaja radica en el hecho de que desarrollan una mezcla para este reactivo que es muy estable durante largo tiempo y se conserva en frío y a la oscuridad.

En la composición del reactivo de Ehrlich, entran pDMAB (2 g), ClH concentrado (25 ml) y ácido acético glacial (75 ml).

La técnica empleada para la determinación del PBG consiste en mezclar un volumen de muestra con un volumen igual de reactivo, a temperatura ambiente. Se ha establecido que la relación entre las concentraciones del aldehído y del ácido fuerte, influye en la velocidad de reacción, mientras que la concentración del ácido acético, tiene que ver con el desarrollo de la intensidad de color (Cookson y Rimington, 1954). Luego de la adición del reactivo, el máximo desarrollo de color se alcanza a los ocho minutos, manteniéndose constante hasta los quince minutos, al cabo de este lapso comienza a decaer. El compuesto coloreado presenta una curva de absorción con dos picos, el mayor a 555 nm y uno mucho menor a 525 nm.

El cálculo de PBG se realiza empleando la siguiente fórmula

$$\text{mg PBG} = \frac{A^{555} \times \text{dilución} \times \text{volumen}}{113,6}$$

donde

113,6 = absorción de una solución de PBG en ácido acético, cuya concentración es de 1 mg/ml

es decir

$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 1136$ $E_{1\text{ mM}}^{1\text{ cm}} = 25.600$ (Cookson y Rimington, 1954).

Según este método la mínima cantidad detectable de PBG es 0,1 µg/ml ($A^{555} = 0,0113$).

III.2.4.1.3 Determinación colorimétrica del ALA

En base a la capacidad que tienen todas las aminocetonas de condensarse con acetilacetona o etilacetato a pH 4,6, para formar un pirrol con una posición libre, es que Mauzerall y Grannick en 1956 emplearon por primera vez este método para la cuantificación del ALA.

Para la formación del pirrol a partir del ALA y su posterior determinación cuantitativa, se mezclan 1 ml de solución conteniendo ALA, llevada a pH 4,6 con 1 ml de buffer acetato

1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona; el sistema se calienta diez minutos a 100°C, en un tubo suficientemente largo, como para que no se evapore la acetilacetona.

Luego de enfriar, se mezclan iguales volúmenes de la solución conteniendo el pirrol del ALA y del reactivo de Ehrlich, leyéndose la absorbancia a 555 nm en un espectrofotómetro, ocho minutos después de agregado el reactivo.

En estas condiciones

$$\text{mg ALA} = A^{555} \times \text{volumen} \times 0,00385$$

donde

0,00385 = factor aplicable correspondiente a la absorción de una solución de ALA de 1 mg/ml tratada en las condiciones mencionadas.

III.2.4.1.4 Preparación de las resinas y columnas

Las resinas se colocaron en agua y se decantaron hasta obtener un sobrenadante claro.

La resina Dowex 2-X8 se convirtió en la forma acetato lavando la resina en una columna con acetato de sodio 3 N, hasta ausencia de cloruros en el eluido. Después se lavó con agua para eliminar el exceso de acetato de sodio.

La resina Dowex 50-X8 se transformó primero a la forma sódica dejándola estar una noche en contacto con NaOH 2 N; se la lavó entonces hasta neutralidad y se volvió a convertir a la forma ácida tratándola con un volumen de HCl 4 N, y luego sucesivamente con seis volúmenes de HCl 2 N, 1 N y agua.

Las columnas eran tubos de 0,7 x 30 cm, con un tapón de lana de vidrio, agregándose una cantidad de resina suficiente para obtener una altura de $2,0 \pm 0,1$ cm de material sedimentado. La velocidad de flujo final de las columnas fue de aproximadamente 0,3 ml/min.

III.2.4.1.5 Procedimiento para la determinación de PBG y ALA en orina

\

Un ml de orina a pH 5 se sembró en la columna de Dowex 2-X8 y se descartó el eluido.

Se añadieron dos porciones de 2 ml de agua destilada (T_1). Se eluyó con 2 ml de ácido acético 1 M en un tubo graduado. Se agregaron 6 ml de ácido acético 0,2 M, recogiendo en tres tubos graduados. Se tomaron alícuotas de 1,5 ml de cada tubo y se continuó según III.2.4.1.2.

Se sembró el contenido del tubo T_1 sobre una columna de Dowex 50-X8. Se lavó con 15 ml de agua y se verificó en el eluido final ausencia de urea mediante el reactivo de Ehrlich, con el cual la urea da un color amarillo. Se eluyó con 15 ml de acetato de sodio 0,5 M recogiendo en 5 tubos graduados. Se determinó ALA según lo detallado en III.2.4.1.3, calculando así el ALA total presente.

III.2.4.2 Estimación de porfirinas

Se realizó por los métodos de Battie, Wider de Xifra, Stella, Bustos y With (1979), con pequeñas modificaciones.

Un auxiliar valioso para seguir el correcto desenvolvimiento de los distintos pasos en todos los métodos que se detallarán es la fluorescencia roja que presentan las porfirinas, cuando se las ilumina con luz UV de 366 nm.

Para la cuantificación de las porfirinas se aprovechó otra característica física de las mismas, que es su intensa absorción espectral en la zona de 400 nm, conocida como banda de Soret (Soret, 1883). Dicha banda, es intensa y angosta, teniendo un mayor coeficiente de extinción en solución ácida, diferenciando su posición y magnitud para cada porfirina (Rimington, 1960). Se aplicó en todos los casos la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950), que permite la medición en presencia de ciertas sustancias que absorben luz, empleando factores, determinados empíricamente, para las distintas porfirinas en los diversos medios.

III.2.4.2.1 Estimación de porfirinas esterificadas totales en orina

La orina (10 ml) se llevó a pH 3,5 y se agregó talco. Se agitó el talco varias veces durante un período de dos horas, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se lavó el talco dos veces con 10 ml de agua, centrifugando cada vez. Luego se trató tres veces con 10 ml de metanol, centrifugando cada vez, con lo cual se eliminaron restos de agua y ciertos pigmentos. El paso siguiente fue el agregado de 7 ml de la mezcla esterificante MeOH SO₄H₂ (90:10, v/v), dejándose actuar en oscuridad a temperatura ambiente 24 horas; luego se centrifugó y se guardó el sobrenadante. El talco se lavó con 3 ml de la misma mezcla MeOH SO₄H₂ y se volvió a centrifugar, reuniéndose todos los sobrenadantes.

La solución de las porfirinas esterificadas se pasó a fase cloroformo y se lavó con un exceso de agua hasta acidez negativa y una vez con NaCl 7% para destruir cualquier emulsión que pudiera haberse formado. Se midió el volumen y se filtró.

La concentración de porfirinas se calculó aplicando la fórmula

$$\frac{\mu\text{g porfirinas}}{\text{ml orina}} = (2A^{\text{max}} - A^{380} - A^{430}) \times 2,74 \times \frac{Vt}{10}$$

donde

Vt = volumen total de la solución clorofórmica,

A = absorbancias leídas a las longitudes de onda indicadas por los subíndices,

2,74 = factor de transformación y

10 = volumen de orina empleado en ml.

III.2.4.2.2 Estimación de porfirinas esterificadas totales en heces

Las heces se llevaron a sequedad en vacío y se maceraron en la mezcla esterificante MeOH SO₄H₂ (90:10, v/v), en la relación 1 g 15 ml de mezcla. Se dejó actuar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas; se centrifugó y se separó el sobrenadante. Las heces se lavaron con 5 ml de mezcla esterifi-

cante y se volvió a centrifugar. Todos los sobrenadantes se reunieron para su posterior tratamiento.

La solución de las porfirinas esterificadas se pasó, a través de lana de vidrio, a una ampolla de decantación. Se añadió 1 ml de EDTA sódico al 10% y luego se pasó a fase clorofórmica, procediendo del mismo modo que lo detallado en III.2.4.2.1 para la orina.

Para el cálculo se empleó la expresión

$$\frac{\mu\text{g porfirinas}}{\text{g seco}} = (2A^{\text{max}} - A^{380} - A^{430}) \times Vt \times D \times 2,74$$

donde Vt, A y 2,74 tienen igual significado que en III.2.4.2.1, y

D = dilución del extracto clorofórmico.

III.2.4.2.3 Separación cromatográfica de las porfirinas esterificadas

La solución clorofórmica en la cual se midieron las porfirinas esterificadas totales o bien alícuotas de la misma se llevaron a sequedad en baño maría; el residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo y se sembró en una placa de sílica-gel G de 0,25 cm de espesor. Las placas se secaron 1 hora a 100°-105°C y se mantuvieron en un recipiente cerrado sobre CaCl₂ y SO₄H₂ hasta su uso. Se sembraron además testigos de Proto IX, Copro III, Isocopro, Penta, Hexa, Firia y Uroporfirinas.

Se empleó una cromatografía de tipo ascendente a temperatura ambiente que requiere dos desarrollos en el mismo sentido en dos cubas independientes.

El solvente para saturar las cubas se coloca por lo menos 1 hora antes.

En la primer corrida se emplea como solvente benceno:metiletiletetona (80:6, v/v). Se corre con este solvente hasta un tercio de la placa. La placa se retira de la primer cuba y se seca en corriente de aire tibio.

El solvente de desarrollo de la segunda corrida es benceno : acetato de etilo : metanol : éter de petróleo (rango de ebullición 60°-65°C) en la proporción 50:1:2:6 (v/v/v/v). Se deja correr durante 90 minutos, luego se seca en corriente de aire tibio.

La posición de las manchas se determina por su fluorescencia bajo la luz UV y se las identifica por comparación con los testigos correspondientes.

Con este método se obtiene una buena separación de las distintas porfirinas, pero no de sus isómeros.

Para determinar cuantitativamente la composición de porfirinas se raspan las manchas de la placa y se introducen en un tubo de ensayo pequeño. Se eluye cada banda con 2 ml de MeOH : SO₄H₂ (90:10), repitiéndose el procedimiento de extracción de porfirinas esterificadas con cloroformo detallado anteriormente, determinando espectrofotométricamente la concentración de cada porfirina.

III.2.4.2.4 Estimación de porfirinas libres en orina

III.2.4.2.4.1 Generalidades

El método está basado en la diferente solubilidad de la uro y coproporfirina debido al distinto número de carboxilos.

Ambas porfirinas se extraen de la orina a pH 3 con acetato de etilo que reúne las características detalladas en III.1.

La uroporfirina se separó de la coproporfirina mediante extracción de la fase acetato de etilo con acetato de sodio al 3%.

La coproporfirina se extrajo luego de la fase orgánica mediante HCl 0,36%, determinándose su concentración por medición de la absorbancia en la zona de la banda de Soret.

El acetato de sodio conteniendo la uroporfirina se llevó a la concentración de HCl 1,5 N, determinándose la concentración de dicha porfirina por medición de la absorción de luz

en la zona de la banda de Soret.

III.2.4.2.4.2 Procedimiento

Se partió de 5 ml de orina que se llevaron a pH 3. Se ex trajeron dos veces con 7 ml de acetato de etilo cada vez.

La fase acetato de etilo se extrajo con acetato de sodio al 3% (7 ml) y luego se lavó con agua (7 ml). El lavado se reunió con la fase acetato de sodio, constituyendo la fracción Uro.

En el acetato de etilo así tratado queda la fracción Copro. La coproporfirina se extrajo del acetato de etilo mediante HCl 0,36 % hasta fluorescencia negativa de la fase ácida. Se le yeron las absorbancias a 380 y 430 nm y la absorbancia máxima (aproximadamente a 401 nm), calculándose el contenido de esta porfirina mediante la expresión

$$\mu\text{g Copro} = (2A^{\text{max}} - A^{380} - A^{430}) \times V_t \times \frac{0,725}{5}$$

donde

A = absorbancias a las longitudes de onda indicadas por los subíndices,

V_t = volumen de HCl 0,36%

0,725 = factor correspondiente

5 = volumen de orina empleado (ml)

En la fracción Uro llevada a concentración de HCl 1,5 N, se leyeron las absorbancias a 380, 430 y A^{max} , y el contenido de uroporfirina se calculó mediante la expresión

$$\mu\text{g Uro} = (2A^{\text{max}} - A^{380} - A^{430}) \times V_t \times \frac{0,875}{5}$$

donde

A = absorbancias a las longitudes de onda indicadas por los subíndices,

Vt = volumen de HCl 1,5 N,

0.875 = factor correspondiente

5 = volumen de orina empleado (ml)

III.2.4.2.4.3 Observaciones

En orinas normales este método separa las fracciones Uro y Copro, pero en orinas porfíricas, en las cuales se halla un contenido variable de porfirinas con diferentes números de carboxilos entre 8 y 4, éstas quedan distribuídas en dichas fracciones.

El valor de este método es que confirma los resultados obtenidos luego de la esterificación de las porfirinas.

III.2.5 Determinaciones enzimáticas

III.2.5.1 Determinación de la actividad enzimática de ALA-D

El ALA-D se midió según el método de Batlle, Ferramola y Grinstein (1967). Todas las operaciones previas a la incubación se efectuaron a 4°-6°C.

III.2.5.1.1 Sistema de incubación

A menos que se indique lo contrario, el sistema de incubación fue el siguiente: 0,2 ml de buffer de fosfatos de sodio 0,2 M pH 6,8, 0,5 ml de sobrenadante de 11.000 g de homogenato de órgano ó 0,1 ml de glóbulos rojos hemolizados, 0,1 ml de ALA (0,05 M en buffer de fosfatos de sodio 0,05 M), en un volumen final de 2 ml.

La incubación se realizó a 37°C en aerobiosis y oscuridad, durante 60 minutos con agitación moderada pero constante.

La reacción se detuvo por enfriamiento en baño de hielo y agregado de 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 50%.

La proteína precipitada se separó por centrifugación y se determinó el PBG formado en el sobrenadante.

III.2.6 Determinación del contenido de cadmio y de otros metales

III.2.6.1 Generalidades

La detección y posterior determinación de los distintos metales que entran en la composición de una muestra biológica es de interés desde el punto de vista toxicológico para hallar el agente causal de una determinada sintomatología y también desde el punto de vista de estudios bioquímicos, en los cuales interesan las interacciones entre distintos metales. La toxicidad del cadmio, como ya se ha explicado en la Introducción, depende de la concentración de trazas de distintos elementos esenciales y de la presencia de otros cationes tóxicos. Nuestro elemento en estudio puede a su vez modificar la toxicidad de otros metales pesados ocasionalmente presentes en el organismo. Algo similar sucede con los otros elementos.

Los métodos químicos de separación, identificación y cuantificación de los distintos metales son, la mayoría de las veces, largos, tediosos y requieren mucha muestra, lo cual desalienta al más paciente químico analista.

En los últimos años se han hecho accesibles técnicas instrumentales para el análisis de trazas de metales. Entre ellas las más útiles son: espectrometría de absorción atómica (a.a.s.), activación neutrónica y procedimientos electroquímicos.

Sin embargo, estos procedimientos no han nacido libres de problemas y se debe hacer un balance de ellos para elegir el más conveniente.

Las interferencias parecen ser menores con activación neutrónica que con absorción atómica, mientras que los procedimientos electroquímicos requieren digestiones y control de las matrices más cuidadosos. Cuando entra en discusión el costo de los análisis se invierte el orden de la lista precedente.

En el caso del presente trabajo se optó por el uso de la absorción atómica, para la detección y determinación cuantitativa de metales en medios biológicos.

III.2.6.2 Espectrometría de absorción atómica

III.2.6.2.1 Fundamentos

La muestra se atomiza en una llama u horno a alta temperatura, de modo que los átomos en el estado fundamental pasan a través del camino de la luz emitido por una lámpara con un cátodo de un metal específico a una longitud de onda dada. Si la muestra contiene el mismo metal que la lámpara, los átomos del elemento en cuestión van a absorber luz, y la absorbancia se lee en un espectrofotómetro.

III.2.6.2.2 Evolución de la técnica: dificultades y soluciones

Al presente la absorción atómica es el método más usado para la determinación de cadmio.

En los orígenes de la absorción atómica la muestra se atomizaba en una llama, comúnmente de aire-acetileno. La a.a.s. fue una técnica aceptada generalmente con entusiasmo, pero muchas veces se pasaron por alto interferencias, informándose resultados erróneos.

Pulido, Fuwa y Vallee (1966) han discutido detalladamente la determinación de cadmio en materiales biológicos por a.a.s. Estos autores estudiaron la interferencia de otras sustancias y encontraron que el fosfato en concentraciones superiores a 0,1 M podía hacer bajar la absorbancia y que el NaCl en concentraciones superiores a 0,01 M podía producir un aumento de la misma.

En algunos estudios se ha determinado cadmio en suero y orina, sin tomar en cuenta la presencia de sustancias interferentes. Por ejemplo, se acepta actualmente que la excreción urinaria de cadmio en individuos no expuestos es 1 $\mu\text{g}/\text{día}$; sin embargo, Friberg et al. (1974), han encontrado en la literatura trabajos en los cuales se dan valores de 40 y 100 $\mu\text{g}/\text{día}$.

Pulido et al. (1966) informan que en ausencia de sustancias interferentes la exactitud es muy alta.

Las dificultades se presentan al investigar cadmio en materiales biológicos con bajo contenido del metal, pero no así al

analizar órganos como hígado y riñón, donde se produce la mayor acumulación del metal.

Se ha intentado mejorar el método de la llama usando pequeños crisoles o navecillas, que se insertan en la llama después de un secado y calcinado de la muestra.

Estos procedimientos, que emplean muestras pequeñas, se han desarrollado especialmente para sangre (Delves, 1970; Hauser, Hinners y Kent, 1972; Ediger y Coleman, 1973).

Otros autores reconocieron que puede ser a veces necesario extraer el cadmio en un solvente orgánico antes de realizar el análisis. De esta forma se puede aumentar la concentración y eliminar la interferencia de sales extrañas. El método descrito por Lehnert, Schaller y Haas (1968) consiste en digerir la muestra con ácido, ajustar el pH alrededor de 3, y extraer el metal con un agente quelante como pirrolidín ditiocarbamato de amonio (APDC) en metilisobutilcetona (MIBK).

En un informe de la Asociación Japonesa de Salud Pública (Japanese Association of Public Health, 1970) se observa que la mayoría de los laboratorios realizan primero una extracción, de la muestra digerida, con ditizona, y después vuelven a extraer el cadmio con ácido, antes de realizar la determinación por a.a.s.

Posteriormente se desarrollaron métodos de atomización sin llama, en los cuales la muestra se inyecta en un atomizador de horno de grafito que se calienta eléctricamente. La exactitud del método fue estudiada en 1973 por Linman, Andersson, Nilsson, Lind, Kjellström y Friberg, que encontraron en trigo una buena correlación con los métodos de activación neutrónica para concentraciones de cadmio entre 20 y 200 ng por g de material.

El advenimiento de los atomizadores de horno de grafito permite realizar mediciones de metales con una sensibilidad 100 veces mayor que la lograda en los atomizadores de llama, y además requieren menor cantidad de muestra (Perry, Koirtyohann y Perry, 1975).

Para el cadmio bastan unos pocos μl de una solución de 0,005 $\mu\text{g/ml}$ para informar correctamente un resultado. Los atomi

zadores de grafito tienen una vida limitada, dependiente de la temperatura de trabajo y del tratamiento al cual se los somete. Para evitar su rápida oxidación se trabaja en presencia de una corriente de gas inerte. En estos atomizadores se han presentado problemas de reproducibilidad debido a que la muestra no se introduce siempre de igual manera en el grafito (Welz, 1976). Por ello se recomienda hacer las determinaciones por triplicado. Rowe y Routh (1977) consideran que una limitación del método es que depende de la habilidad del operador de introducir reproduciblemente la muestra.

La mayoría de los instrumentos comerciales incluyen actualmente fuentes de poder, que permiten llevar la muestra a temperaturas adecuadas para un correcto secado y un rápido calcinado, previos a la etapa de atomizado, directamente sobre el atomizador de grafito.

Cuando se intenta destruir una matriz orgánica directamente en el horno de grafito, hay que tener en cuenta la volatilidad del elemento en cuestión. El cadmio tiene un p.eb. de 765°C y se pueden producir con facilidad pérdidas por volatilización del mismo, durante la calcinación.

Se han publicado procedimientos diversos para destruir la matriz orgánica directamente en el horno de grafito. Posma, Balke, Herber y Stulk (1975) determinan cadmio en sangre entera inyectando directamente la muestra ($5\ \mu\text{l}$) en una "taza" de grafito, y agregan HF ($15\ \mu\text{l}$) para ayudar a la destrucción de la matriz durante las etapas de secado y calcinado; este último lo efectúan a 530°C durante 30 segundos, suspendiendo el flujo de nitrógeno, para que se forme CdO que tiene p.eb. de 1599°C y es mucho menos volátil que el cadmio elemental.

Ross y González (1974) afirman obtener buenos resultados en sus condiciones de trabajo para la determinación directa de cadmio en suero (soluciones al 20% en agua) y orina. Inyectan $20\ \mu\text{l}$; secan las muestras 30 segundos a 150°C , el calcinado lo hacen 50 segundos a 450°C y el atomizado 8 segundos a 1300°C . Dichos autores evitan interferencias espectrales y químicas debidas a la formación de humo por calcinado de la matriz orgánica, y a sales inorgánicas como NaCl presentes en la misma,

usando un corrector de arco de deuterio.

Actualmente muchos aparatos vienen provistos con corrector de arco de deuterio. Dicho corrector puede aprovecharse, por supuesto, también en las determinaciones por llama.

Sin embargo, la mayoría de los autores efectúan previamente una destrucción de la materia orgánica por vía húmeda, una destrucción por vía seca, una calcinación, una extracción u otro tratamiento para minimizar interferencias de la matriz, y además para alargar la vida del grafito.

Perry et al. (1975) han llegado a la conclusión que los métodos que usan horno de grafito sufren de problemas más severos de absorción e interferencia de la matriz que los hallados comúnmente en los atomizadores por llama.

Volland, Kölblin, Tschöpel y Tölg (1977) han estudiado algunos errores sistemáticos de la técnica que nos ocupa. Además del programa de temperaturas y la corriente de gas inerte, dichos autores comprobaron que el tipo y estructura del grafito, así como su reactividad tienen una influencia decisiva en la sensibilidad y límites de detección de la técnica. Además se observa depresión de las señales de Fe, Co, Ni, Ag y Cd cuando se emplean soluciones fuertemente ácidas. Volland et al. (1977) intentan explicar este efecto por la reactividad del grafito. El grafito forma con ácidos fuertes uniones relativamente estables por ejemplo con el SO_4H_2 podría producirse $(\text{C}_{24}^+\text{HSO}_4^-.2\text{SO}_4\text{H}_2)$. Algunos restos de las soluciones ácidas, recién se eliminan de la superficie del grafito a muy altas temperaturas. Estos podrían reaccionar con átomos del metal en fase gaseosa. Así disminuiría el número de átomos de metal que absorben luz y se produciría un descenso de la señal.

No sólo la presencia de aniones, sino también la de cationes puede interferir en la determinación de otros elementos metálicos.

Así Wegscheider, Knapp y Spitzky (1977) hallaron que el Co, Cr, Ni, Si, Hg y Zn interfieren en la determinación del plomo.

Por ello, cuando se tiene una matriz demasiado complicada es conveniente utilizar el método de adiciones standard para asegurarse de la exactitud de los resultados.

Más recientemente Pleban y Pearson (1979) han usado la espectroscopía de absorción atómica Zeeman para la determinación directa de cadmio en sangre y orina. Esta técnica utiliza las características de polarización dependientes de un campo magnético de los vapores atómicos para lograr la corrección de fondo. La cubeta de grafito del espectrómetro se coloca en un campo magnético. Además el equipo tiene un polarizador rotatorio que se coloca entre la lámpara del metal y la cubeta de grafito.

Se debe aclarar, que en los equipos modernos de a.a.s. se ha perfeccionado también la técnica de atomización por llama, la cual a pesar de tener, como ya se ha mencionado, una sensibilidad menor y de requerir más muestra que la atomización en horno de grafito, supera a ésta última por la simplicidad de introducción de la muestra en la llama y por la rapidez y confiabilidad de las lecturas individuales.

De modo que dentro de la a.a.s. se puede optar por: atomización por llama o por horno de grafito, pero en ambos casos hay que tener en cuenta posibles interferencias.

III.2.6.3 Procedimiento empleado

III.2.6.3.1 Aspectos generales

Se necesitaba conocer el contenido de cadmio en los órganos y fluídos estudiados.

Dados los antecedentes bibliográficos, se consideró conveniente emplear en principio la técnica de atomización sin llama, que es la más sensible, tomando el mayor número de precauciones.

Más adelante se verificó que en muchas experiencias el hígado, riñón y bazo alcanzaban concentraciones de cadmio suficientes para su atomización en la llama, utilizándose alternativamente esta técnica, con resultados concordantes con los de

atomización sin llama.

En todos los casos las muestras introducidas en el aparato estaban totalmente libres de su matriz orgánica. Ello se logró mediante mineralización por vía húmeda.

Las primeras destrucciones de materia orgánica (DMO) se efectuaron sobre la base del método detallado en la Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Toxicología y Química Legal (1980), que consiste en una destrucción sulfo-nítrica. Se agregó un paso final de evaporación del ácido sulfúrico, para evitar la interferencia de dicho ácido sobre el horno de grafito. Curry (1976) describe un método de DMO basado en el mismo principio. Se ensayó recuperación del cadmio, resultando ésta excelente.

Luego se optó por una DMO con $\text{NO}_3\text{H} - \text{H}_2\text{O}_2$, similar a la informada por Perry et al. (1975) que permitía eliminar con más facilidad el exceso de ácido. Con este método se logra una muy buena recuperación de cadmio, así como también de cobre y zinc.

Las muestras se llevaron a volumen y se realizó la determinación del contenido de metal en el aparato de absorción atómica, comparando con testigos adecuados.

III.2.6.3.2 Fracción en la cual se efectuaron las determinaciones de elementos metálicos

Como las enzimas estudiadas se encuentran en la fracción soluble del citoplasma y las determinaciones enzimáticas se efectuaron en el sobrenadante a 11.000 g, se consideró que el análisis de la concentración de cadmio, zinc y cobre directamente en una alícuota de dicho sobrenadante iba a posibilitar comparaciones más estrictas entre actividad enzimática y contenido metálico, y también entre estudios *in vitro* e *in vivo*, ya que los siguientes antecedentes bibliográficos señalan variaciones de la distribución subcelular del cadmio y del zinc, durante el curso de la intoxicación con cadmio, o de la administración de zinc.

Aunque el cadmio se halla unido en alta proporción a las metalotioneínas (ver I.11), se ha observado que luego de la administración s.c. prolongada del metal, este se une además a

otras fracciones del sobrenadante a 27.000 g (Sato y Nagai, 1980). Por otro lado, Raghavan y Gonick (1980) han encontrado que en la corteza renal de los animales pre-Fanconi y Fanconi (I.11.7.10.3), se producía un aumento significativo del cadmio en el núcleo y en la fracción mitocondrial y microsomal, y un descenso significativo del metal en el citoplasma soluble.

El zinc es un elemento esencial que normalmente se distribuye entre la fracción soluble y la fracción particulada (Chen, Vasey y Whanger, 1977; Sugawara, 1977; Petering, Choudhury y Stemmer, 1979). Chen et al. (1977) han determinado las concentraciones de zinc en las fracciones subcelulares de hígado de ratas a las cuales se administró diversos suplementos de zinc en la dieta. Observaron que concentraciones superiores a 1000 ppm de zinc, se producía una acumulación del metal en el hígado, principalmente en la fracción soluble, y en mucho menor grado en el núcleo, mientras que en las fracciones mitocondrial y microsomal la concentración del elemento esencial aumentaba muy lentamente. Petering et al. (1979) señalan que en ratas no sólo se produce un aumento en la concentración citosólica de zinc en relación con la dosis de cadmio, sino que también se observan variaciones del contenido del metal esencial en las fracciones particuladas.

En sangre, los metales se determinaron generalmente en los GR hemolizados.

III.2.6.3.3 Destrucción de la materia orgánica

Las muestras medidas o pesadas -1 ml de homogenato, 0,5 ml de glóbulos rojos, 0,1 g de tejido (hígado, riñón, bazo), ó 2 ml de orina- se colocaron en tubos micro-Kjeldahl y se trataron con 1 ml de NO_3H concentrado. Los tubos se colocaron en un baño de glicerina sobre una plancha eléctrica y se calentaron durante 3 horas, a temperatura justo inferior a la de ebullición. Luego, se continuó el calentamiento hasta reducir el volumen a aproximadamente un tercio, y se agregaron 0,4 ml de H_2O_2 al 30%. La muestra se evaporó y el residuo se disolvió en NO_3H al 1%, llevando a volumen.

III.2.6.3.4 Condiciones de trabajo para la a.a.s.

La Tabla II resume las condiciones de trabajo empleadas para cadmio, cobre y zinc.

Se usó el método de atomización por llama cuando las concentraciones de los elementos fueron suficientemente altas. De lo contrario se optó por la atomización en horno de grafito.

En el caso de las técnicas de atomización sin llama se emplearon menores temperaturas de calcinado, para los elementos más volátiles, que las recomendadas por distintos autores para destrucción directa sobre el horno de grafito, ya que las muestras habían sido preparadas según el procedimiento detallado en III.2.6.3.3. De esa manera se evitó la pérdida parcial de dichos elementos.

Además se usó el corrector de arco de deuterio para evitar interferencias de sales presentes en la solución.

III.2.6.3.5 Cálculo de las concentraciones

Para el cálculo de las concentraciones de los diversos elementos se usó el método de las "adiciones standard".

En dicho método se diluyen un número de alícuotas iguales de la muestra con el agregado de cantidades crecientes del elemento a analizar, a volúmenes dados. Estos se analizan en el espectrofotómetro de absorción atómica y se representa la curva de calibración absorbancia vs concentración. Extrapolando a absorbancia cero se puede conocer la concentración del elemento analizado en la muestra por la intersección en el eje de concentraciones.

Así se evita el efecto de interferencias debidas a la composición de la solución a medir.

III.2.7 Determinación de vitamina C (ácido L-ascórbico) en drogas e inyectables

III.2.7.1 El problema de la inestabilidad de la vitamina C

TABLA II

	Cd	Zn	Cu
<u>Espectrofotómetro</u>			
longitud de onda nm	228,8	213,9	324,7
corriente de la lámpara mA	3,5	5	5
ancho de banda espectral nm			
para horno de grafito	0,5	0,5	0,5
para llama	0,5	1	0,5
<u>Llama</u>	aire acetileno oxidante	aire acetileno oxidante	aire acetileno oxidante
<u>Atomización sin llama</u>			
<u>Secado</u>			
temperatura °C	98	98	98
tiempo seg	30	30	30
<u>Calcinado</u>			
temperatura °C	280	550	700
tiempo seg	15	30	30
<u>Atomizado</u>			
velocidad °C/seg	800	300	500
temperatura máxima	1300	1400	2000
tiempo a la temperatura máxima	3,5	3	2

Varios autores se ocupan del problema de la inestabilidad del ácido ascórbico. Los cristales de ascórbico secos son estables a la exposición al aire y a la luz del día a temperatura ambiente durante períodos de tiempo prolongados. En solución acuosa se oxida muy fácilmente, especialmente en medio neutro o alcalino, siendo más estable en medio ácido. El cobre y las oxidasas de los tejidos catalizan la oxidación (Freed, 1966; Litter, 1975). El ácido dehidroascórbico es el primer producto de dicha reacción (Figura 9). Debajo de pH 4 el ácido dehidroascórbico es bastante estable y además en tejidos animales y vegetales puede reducirse nuevamente a ascórbico. El ácido dehidroascórbico tiene alrededor del 75-80% de la actividad antiescorbútica del ascórbico. La estructura molecular del ácido dehidroascórbico ha sido objeto de muchos estudios, habiéndose propuesto muchas fórmulas estructurales incluyendo monómeros, dímeros y polímeros (Hvoslef, 1970; Tolbert, Downing, Carlson, Knight y Baker, 1975). Por encima de pH 4 sufre con facilidad un reordenamiento irreversible a un material biológicamente inactivo el ácido 2,3-diceto-gulónico (Sellés Flores y Brunner, 1960; Freed, 1966; Litter, 1975). Este último ácido tiene un poder reductor muy elevado (Sellés Flores y Brunner, 1960).

Las soluciones de ácido ascórbico pueden dar lugar a la formación de CO_2 . A partir del ácido 2,3-diceto-gulónico se forman los ácidos treónico y oxálico. Este último se descompone en ácido fórmico y CO_2 (Sellés Flores y Brunner, 1960).

Fischer Jensen (1955, 1959) estudiando la influencia del oxígeno y del pH en la descomposición de la vitamina C encontró que sometiendo soluciones de ácido ascórbico al 2% durante 20 horas a 100°C , la solución de pH 1,55 se descompone en un 31,1% y la de pH 7,28 (neutralizada con NaOH 0,1 N) en un 16%. En presencia de mayor proporción de aire la descomposición es más rápida a pH 6,3 que a pH 2,55; mientras que en ausencia de oxígeno sucede todo lo contrario, se descompone antes a pH 2,55 que a pH 6,3. Los catalizadores actúan en presencia de oxígeno, más fácilmente a pH bajo (2,55) que a pH alto (6,3). A temperaturas más altas aumenta el grado de descomposición.

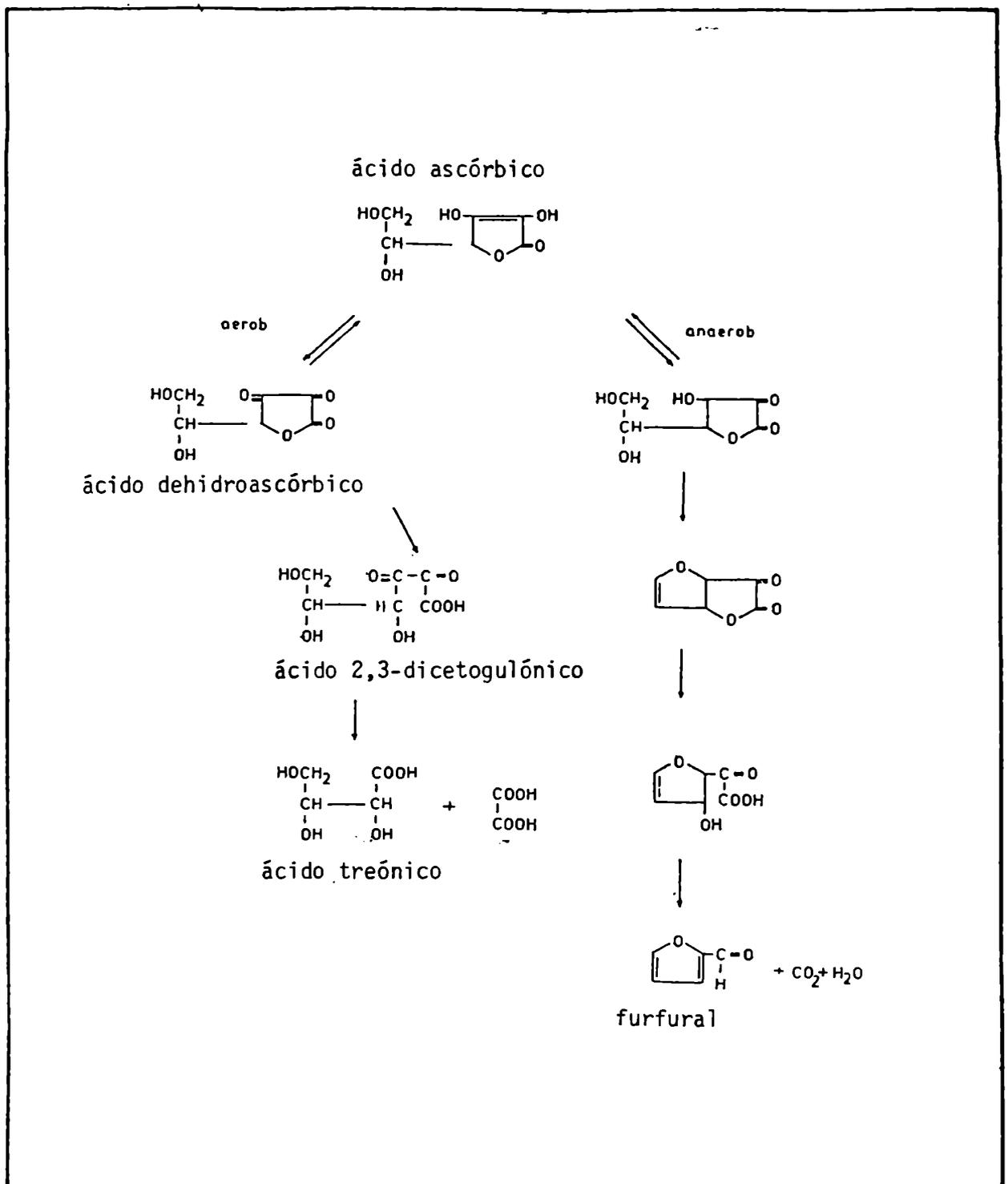


Figura 9: Productos de degradación del ácido ascórbico

Hüttenrauch (1968) detalla la vía de degradación anaeróbica, que puede también observarse en la Figura 9. En preparados líquidos muchas veces se produce una degradación siguiendo esta vía, a menudo con la aparición de un color marrón debido a reacciones de los productos de descomposición.

Los preparados farmacéuticos se pueden estabilizar por enmascaramiento de los metales pesados. Como los polioles forman complejos con los metales pesados, muchas de las sustancias que se usan como disolventes contribuyen a la estabilización.

De todos estos trabajos se deduce que el problema de la estabilidad del ascórbico se presenta no tanto con la droga pura, sino más bien con la conservación de ascórbico disuelto, especialmente luego de haber sido sometido a condiciones extremas de temperatura, como en los inyectables.

III.2.7.2 Espectro ultravioleta (UV) del ácido ascórbico

Diversos autores han estudiado el comportamiento al UV del ácido ascórbico. Lawendel (1957) resume y discute los coeficientes de extinción obtenidos en distintos trabajos. El ácido ascórbico en agua da un máximo a 264 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 579$) y en ácido sulfúrico 0,01 N se obtiene un máximo a 245 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$) (Clarke, 1969).

La sal de sodio del ácido ascórbico presenta un espectro similar al de la solución acuosa (Herbert, Hirst, Percival, Reynolds y Smith, 1933).

La oxidación modifica el espectro UV de la vitamina C (Herbert et al., 1933).

Mohler y Mohr (1936) han observado que al burbujear aire a través de la solución de ascórbico acuoso se produce, en función del tiempo, una disminución de la absorbancia a 264 nm. Por otro lado, por oxidación con soluciones de cobre de concentración superior a $5 \cdot 10^{-5}$ M la intensidad de la banda característica de la vitamina decrece desde un comienzo, y aparecen otras bandas, que indican una modificación de la sustancia original.

III.2.7.3 Espectro UV y estabilidad de las drogas utilizadas

Para los ensayos *in vitro* se partió de vitamina C p.a., usándose para los ensayos *in vivo* vitamina C inyectable Redoxón.

Se estudiaron los espectros UV de ambas drogas, luego de diluirlas a 0,7 mg/100 ml, respondiendo éstos a las características indicadas en III.2.7.2.

Además se comprobó que el Redoxón tenía un 5% de exceso de vitamina con respecto a lo indicado en el rótulo.

En cuanto a la estabilidad, las soluciones de 10 mg/ml obtenidas a partir del Redoxón resultaron totalmente estables durante una hora, mientras que la absorbancia de las soluciones preparadas a partir de la droga p.a. disminuyó 1,8% durante el mismo lapso de tiempo. En cambio las soluciones de 0,7 mg/100 ml obtenidas a partir de ambas drogas decayeron 16% en una hora, verificándose así la mayor labilidad de las soluciones diluidas.

En consecuencia para las experiencias se partió siempre de soluciones preparadas en el momento de su uso, empleándose en el caso de las experiencias *in vivo* una nueva ampolla del medicamento cada vez.

III.2.8 Dosis y forma de administración del cadmio, zinc y vitamina C. Experiencias *in vivo*

III.2.8.1 Generalidades

La absorción de las drogas puede realizarse por ingestión, inyección, inhalación y en algunos casos por otras vías.

En algunas experiencias el cadmio se administró incluyendo en el agua de bebida. Es factible que debido a su dispersión en el ambiente, el metal ingrese de esa manera al organismo. Se trata de una vía lenta, ya que sólo una parte del tóxico ingerido se absorbe.

La inyección i.p. de sucesivas dosis subletales de sales

de cadmio, permite la acumulación de altas concentraciones del metal, en el hígado y los riñones, en un tiempo menor que la vía oral. Aunque no se trata de una vía usual de ingreso del tóxico al organismo, se consideró útil para efectuar una serie de experiencias.

Las concentraciones de cadmio a usar se seleccionaron en base a la información existente de investigaciones previas. Se eligieron aquellas que produjeran una marcada acumulación tisular del metal, pero sin signos obvios de morbilidad.

El zinc y el ácido ascórbico se administraron por vía s.c.

III.2.8.2 Antecedentes sobre dosis de cadmio empleadas en intoxicaciones experimentales

El cadmio es virtualmente tóxico para cada sistema del cuerpo. La distribución del cadmio varía considerablemente, dependiendo de la vía de administración, la dosis, la frecuencia de administración y el tiempo transcurrido después de la misma.

III.2.8.2.1 Intoxicaciones a largo plazo por contaminación del agua de bebida

Existen antecedentes de administración a ratas en el agua de bebida entre 1 y 50 ppm de cadmio durante varios meses, habiéndose estudiado distintos efectos (Perry, Thind y Perry, 1976; Sugawara y Sugawara, 1978; Yuhas, Miya y Schnell, 1979). Recientemente Bernard, Lauwerys y Gengoux (1981) administraron a ratas agua conteniendo 200 ppm de cadmio durante 11 meses.

III.2.8.2.2 Intoxicaciones crónicas obtenidas por inyección i.p. o s.c.

Las ratas toleran la administración repetida de pequeñas cantidades de cadmio (0,3-0,8 mg Cd/kg) a intervalos diarios y durante varias semanas. Ello lo demuestran los trabajos de Faeder, Chaney, King, Hinners, Bruce y Fowler (1977); Raghavan y Gonick (1980); Sato y Nagai (1980). Bonner, King y Parke (1981)

inyectaron s.c. 1,5 mg Cd/kg diariamente durante 28 días. Bernard, Goret, Roels, Buchet y Lauwerys (1978) administraron 1 mg Cd/kg, cinco veces por semana durante dos meses.

III.2.8.3 Antecedentes sobre dosis de zinc empleadas en diversas experiencias

Eaton, Stacey, Wong y Klaassen (1980) informan que la dosis mínima efectiva para inducir la formación de zinc-tioneína es de 3,27 mg/kg día, mientras que la dosis máxima tolerable es de 13,1 mg/kg día.

Abdulla et al. (1979) administran a ratas una sola inyección de 25 mg Zn/kg y observan un aumento progresivo de la actividad de ALA-D, alcanzándose un máximo a los 19 días.

Según Chen et al. (1977) se requieren 500 ppm o más de zinc en el agua de bebida para inducir la biosíntesis de metalotioneínas en ratas.

Bonner, King y Parke (1981) suministran agua conteniendo 2000 ppm de zinc a ratas a las cuales se administra s.c. cadmio en forma crónica.

III.2.8.4 Antecedentes sobre dosis de ácido ascórbico empleadas en terapéutica

La dosis terapéutica usual de vitamina C para individuos adultos es de 500 mg/día. Ello extrapolado a ratas de 250 g significaría algo menos de 2 mg diarios.

III.2.8.5 Antecedentes sobre dosis de ácido fólico empleadas en terapéutica

Es un polvo cristalino amarillo o amarillo anaranjado, inodoro. Muy poco soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol, fácilmente soluble en soluciones de hidróxidos y carbonatos alcalinos (Litter, 1975).

Las dosis usuales en la carencia de esta vitamina son 5 mg dos veces por día.

Wider de Xifra, Batlle, Stella y Malamud (1980), emplean con éxito el ácido fólico en el tratamiento de los ataques tempranos o agudos de la porfiria aguda intermitente. La dosis recomendada por estos autores es 10 mg cada 8 horas por vía oral durante unos pocos días.

III.2.8.6 Dosis de cadmio, zinc y ácido ascórbico empleadas

Las dosis de cadmio, zinc y ácido ascórbico, así como el diseño de cada experiencia se detallan junto con los resultados en la sección IV.3.

III.2.9 Evaluación estadística

Para conocer la significación estadística de las diferencias entre controles y animales tratados con cadmio los datos se analizaron mediante la prueba t de Student. Se establecieron diferencias significativas a un $p < 0,05$.

PARTE

EXPERIMENTAL

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 Estudios preliminares

IV.1.1 Eficiencia de extracción de la fracción enzimática de hígado, riñón y bazo

Se comprobó que luego de la centrifugación de los homogenatos a 11.000 g; podía quedar retenida en el pellet un 10% de la actividad enzimática de ALA-D, PBGasa o Deaminasa, que se recuperaba en los lavados.

Un segundo homogenato, preparado por agregado de nueva solución de sacarosa al pellet remanente de los lavados anteriores, apenas presentaba trazas de actividad de las enzimas en estudio.

IV.1.2 Hemólisis de los glóbulos rojos

Se comprobó que congelando y descongelando tres veces los glóbulos rojos se obtenía máxima actividad enzimática.

IV.1.3 Dilución de los glóbulos rojos

Los hemolizados provenientes de los glóbulos rojos de rata, son particularmente muy densos, lo cual hace difícil una medición volumétrica precisa.

Por ello se consideró conveniente hacer una dilución previa; con ese motivo se usó al principio buffer de fosfatos 0,05 M pH 6,8 (Batlle, Wider de Xifra y Stella, 1978), pero a diferencia del conocido comportamiento de la sangre humana, no se obtuvo una buena suspensión de los GR de rata. Se ensayó entonces sacarosa 0,25 M, lográndose esta vez una buena suspensión y en consecuencia resultados más reproducibles.

IV.1.4 Estudio de la influencia del plasma en las actividades de ALA-D y PBGasa

La sangre se centrifugó a 2000 rpm en tubos graduados. Se midieron los volúmenes de GR.

Cuando se trabajó en presencia de plasma, se dejó este y se agregó la cantidad necesaria de sacarosa para obtener una dilución 1:5 (v:v) con respecto a los glóbulos rojos, o sea que en este caso el diluyente fue una mezcla de plasma y sacarosa 0,25 M.

Para las experiencias realizadas en ausencia de plasma, se separó este, se lavaron los GR tres veces con solución fisiológica y luego se diluyeron los GR 1:5 con sacarosa 0,25 M.

Los resultados se pueden observar en la Figura 10.

En general, en presencia de plasma se obtienen actividades más altas de ALA-D, mientras que tales condiciones no parecen tener influencia sobre la actividad de la PBGasa.

Dado que en los animales intoxicados, la presencia de plasma podría compensar variaciones en la actividad de ALA-D eritrocitaria, se emplearon a lo largo de las diversas experiencias GR lavados en lugar de sangre entera.

IV.1.5 Estabilidad de las enzimas en los órganos y en los homogenatos

IV.1.5.1 ALA-D

a) Hígado

En hígado se verificó que por congelamiento brusco del órgano en un baño de hielo seco y acetona, conservación del mismo durante 18 horas a -20°C y posterior descongelamiento, sólo se registraban descensos de la actividad enzimática de hasta un 11% (Figura 11 A).

Los sobrenadantes de homogenatos de hígado en sacarosa, mantenidos a 0°C tampoco experimentaron un descenso brusco de la actividad enzimática (Figura 11 B).

b) Riñón

En riñón al igual que en hígado, el ALA-D se comportó como una enzima bastante estable, tanto se conservara como órgano

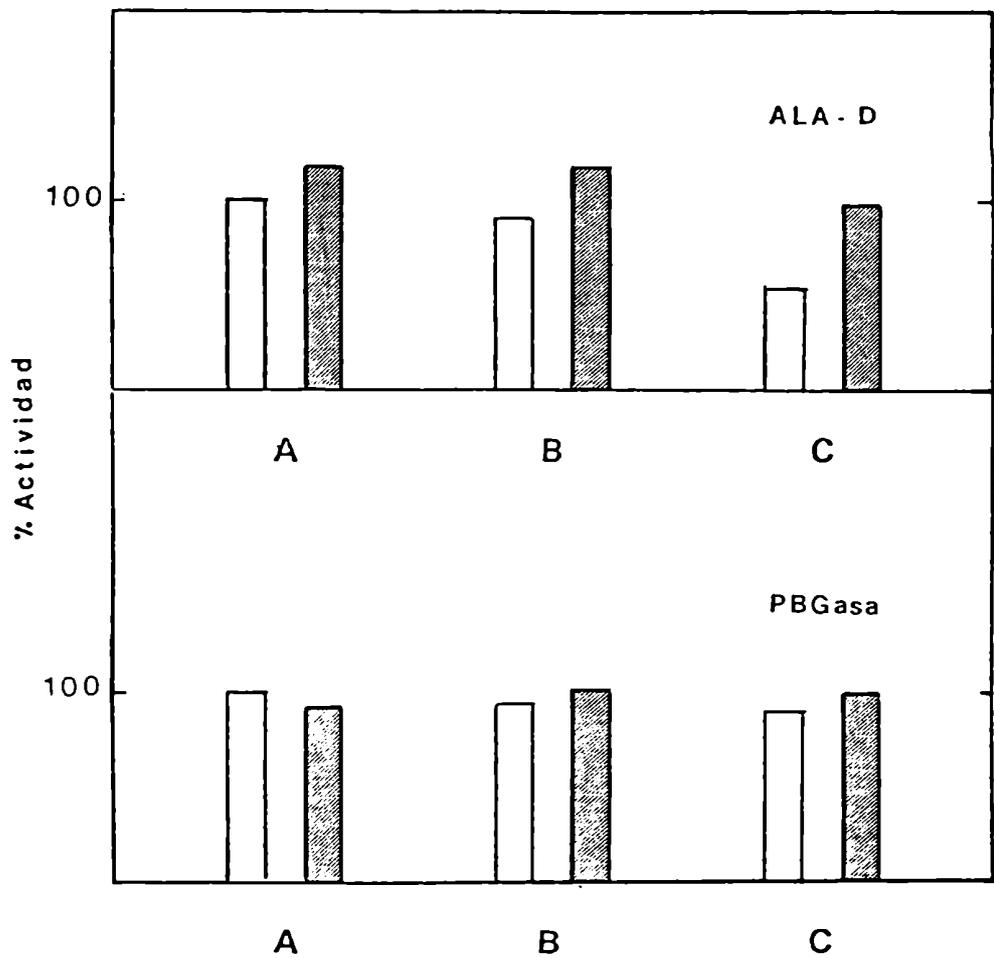


Figura 10: Influencia del plasma en la actividad enzimática de ALA-D y de PBGasa en los animales A (control), B (recibió 14 inyecciones de 0,6 mg Cd/kg de peso, la última 45 días atrás), C (recibió 2 inyecciones de 0,6 mg Cd/kg de peso, 45 días atrás). □ GR lavados, ▨ GR en presencia de plasma. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad con respecto al control. Las actividades se calculan en todos los casos teniendo en cuenta el volumen de GR e independientemente del volumen de plasma.

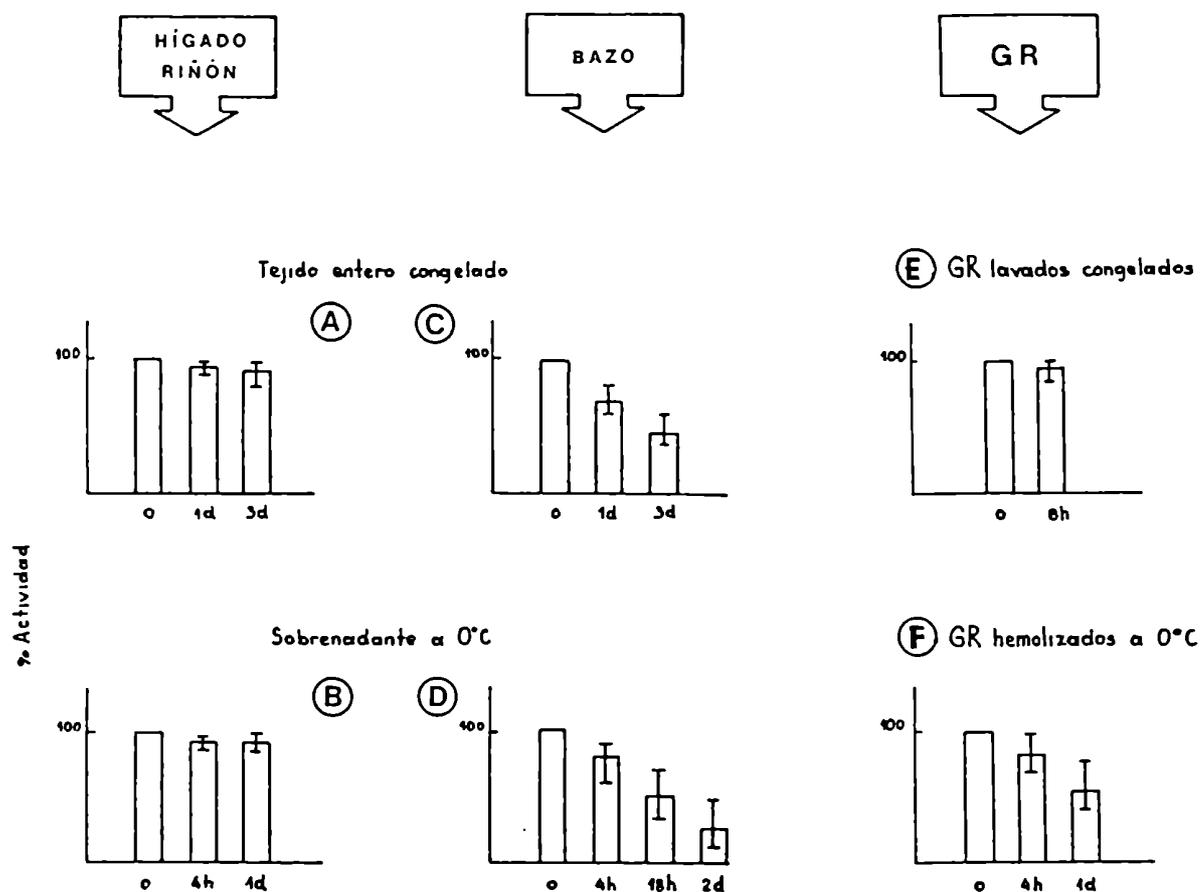


Figura 11: Estabilidad del ALA-D de hígado, riñón, bazo y GR. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad con respecto al valor obtenido a tiempo cero. Se hallan representados los valores promedio de tres determinaciones y el rango de variación.

Las siguientes son las actividades de los controles de ALA-D \pm la desviación típica de la media (s)

Hígado: (1230 ± 71) nmol PBG/h g tejido

Riñón: (261 ± 10) nmol PBG/h g tejido

Bazo: (470 ± 32) nmol PBG/h g tejido

GR: (102 ± 9) nmol PBG/h ml GR

congelado o como un sobrenadante de 11.000 g y a 0°C.

c) Bazo

La enzima de bazo ha sido bastante más inestable, observándose una rápida disminución de su actividad tanto para el órgano entero como en el sobrenadante. Cuando el tejido se mantuvo a -20°C entre 18 y 24 horas y se descongeló, se observó una caída de un 20 a 40% de la actividad (Figura 11 C).

Con el sobrenadante mantenido a 4°C o a -20°C, los descensos de actividad fueron en general todavía más rápidos que para el órgano entero, aunque los efectos fueron algo variables (Figura 11 D).

d) GR

En GR enteros lavados con solución fisiológica y congelados a -20°C la actividad enzimática se mantuvo en general estable durante 18 horas (Figura 11 E).

En cambio en GR hemolizados conservados tanto a 4°C, como a 0°C y también a -20°C el descenso de actividad fue rápido y similar al registrado para bazo (Figura 11 F).

Por lo tanto la fracción enzimática de bazo se preparaba y empleaba para la determinación de la actividad inmediatamente después del sacrificio de los animales.

Los GR se incubaban inmediatamente después de hemolizados.

El hígado y el riñón, en general se procesaron también de inmediato.

Cuando ello no fue posible el órgano, ya pesado, se conservó congelado durante un máximo de 18 horas.

La presencia de cadmio en los homogenatos o en los órganos no modificó los patrones de estabilidad enzimática descritos para similares preparaciones provenientes de los animales controles.

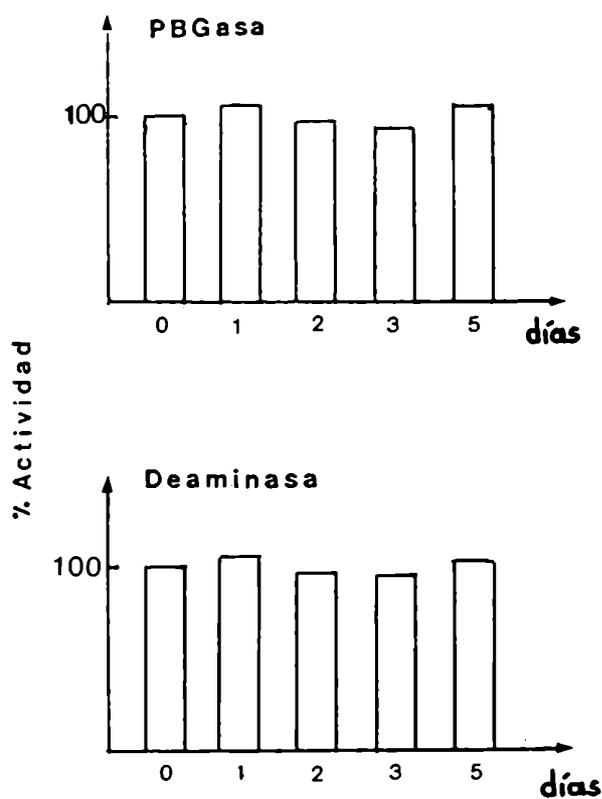


Figura 12: Estabilidad de la PBGasa y Deaminasa de hígado. Para los demás órganos los valores obtenidos fueron similares. Las siguientes son las actividades de los controles \pm la desviación standard de la media.

PBG-asa

Hígado: $(19,9 \pm 0,8)$ nmol URO/ 2 h g tejido

Riñón: $(9,1 \pm 0,2)$ nmol URO/2 h g tejido

Bazo: $(83,4 \pm 8,5)$ nmol URO/2 h g tejido

GR: $(29,6 \pm 1,2)$ nmol URO/2 h ml GR

Deaminasa

Hígado: $(38,2 \pm 2,0)$ nmol URO/2 h g tejido

Riñón: $(19,3 \pm 0,7)$ nmol URO/2 h g tejido

Bazo: (160 ± 22) nmol URO/2 h g tejido

GR: $(52,0 \pm 6,1)$ nmol URO/2h ml GR

IV.1.5.2 PBGasa y Deaminasa

En cuanto a la estabilidad de la PBGasa y Deaminasa fue mayor que la del ALA-D tanto en los órganos, como en los sobrenadantes, no observándose disminución significativa de la actividad en un período de por lo menos 5 días. (Figura 12)

De todas maneras, las determinaciones se efectuaron siempre en el mismo día o a lo sumo dos días después del sacrificio de los animales.

Tampoco en estos casos la presencia de cadmio en los sobrenadantes o en los órganos tuvo influencia alguna sobre la estabilidad.

IV.1.6 Expresión de las actividades enzimáticas en las experiencias *in vivo*

a) Hígado, riñón y bazo

Se comprobó que en los distintos órganos existía una correlación entre el peso húmedo y la concentración de proteínas.

De modo que sería igualmente representativo expresar los resultados de actividad enzimática en función del peso de tejido, o de la cantidad de proteína usada.

No se observó ningún cambio significativo en el peso de los órganos o en la concentración de proteínas, debido a la administración de cadmio, ni tampoco de zinc o de vitamina C.

A los efectos de facilitar la comparación de los efectos del cadmio sobre las distintas enzimas los resultados se presentan como porcentajes de actividad, tomando como 100% la actividad obtenida para el lote de controles.

b) GR

Se comprobó que los resultados se podían expresar en función del volumen de GR, de la concentración de proteínas o de la concentración de hemoglobina, produciéndose pequeñas variaciones en la relación de actividades entre los distintos animales (hasta 10%) debido a factores individuales y a errores inherentes.

rentes a las distintas determinaciones.

La concentración de proteínas o de hemoglobina no se alteraron en el curso de la intoxicación con cadmio, ni tampoco por administración de zinc o de vitamina C.

Al igual que para órganos, también en GR los resultados se presentan como porcentajes de actividad con respecto a los correspondientes controles.

IV.1.7 Valores normales de actividades enzimáticas

A lo largo del tiempo y de los distintos lotes de animales trabajados se observó una buena constancia en cuanto a los valores medios para las actividades enzimáticas de los controles.

IV.2 Estudios *in vitro*

IV.2.1 Efecto del cadmio sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa

Las Figuras 13 y 14 muestran el efecto de concentraciones variables de cadmio sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa en hígado, riñón, bazo y GR. Los resultados se expresan siempre como porcentaje de actividad con respecto al control sin agregados. En general se trata de curvas características.

El ALA-D es siempre la enzima más sensible, requiriéndose una menor concentración de metal para producir un 50% de inhibición (Figuras 13 y 14, y Tabla III). En todos los casos concentraciones superiores a 10^{-5} M inhiben a dicha enzima.

La PBGasa de hígado, riñón y bazo recién comienza a inhibirse a concentraciones del orden de 10^{-4} M, mientras que en GR se requieren concentraciones aún más altas del metal para inhibir esta misma enzima.

Por otro lado, se observó que en hígado, riñón y bazo la Deaminasa es más sensible que la PBGasa a la inhibición por cadmio.

Se aprecia además en estas mismas figuras (13 y 14) que, en algunos casos, a concentraciones del orden de 10^{-6} a 10^{-8} M ocurriría una ligera activación de las enzimas, de hasta un 30%.

La PBGasa y la Deaminasa, como se sabe son enzimas mecánicamente relacionadas entre sí. Normalmente, en las condiciones experimentales usadas, la Deaminasa presenta en todos los órganos aproximadamente el doble de la actividad de la PBGasa. Se observa que en hígado, riñón y bazo, el cadmio actúa más efectivamente sobre la Deaminasa, así la actividad de esta enzima decae antes que la de la PBGasa; vemos que la relación $\frac{\text{Deaminasa}}{\text{PBGasa}}$ disminuye llegando en algunos casos la Deaminasa a valores de actividad inferiores a los de la PBGasa. Esta relación se ilustra claramente en las Figuras 15 y 16, en las cuales se ha tomado la actividad de la Deaminasa como 100% y se ha expre-

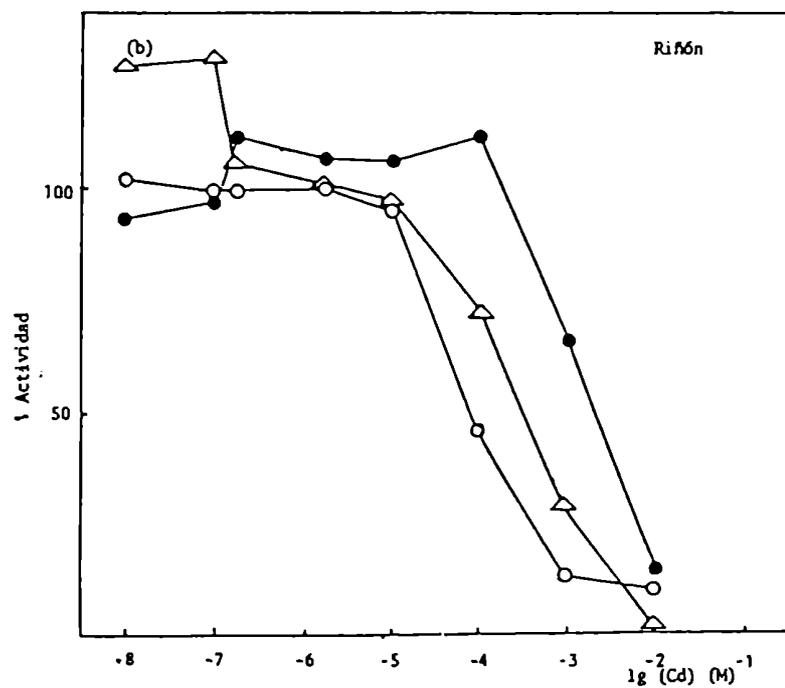
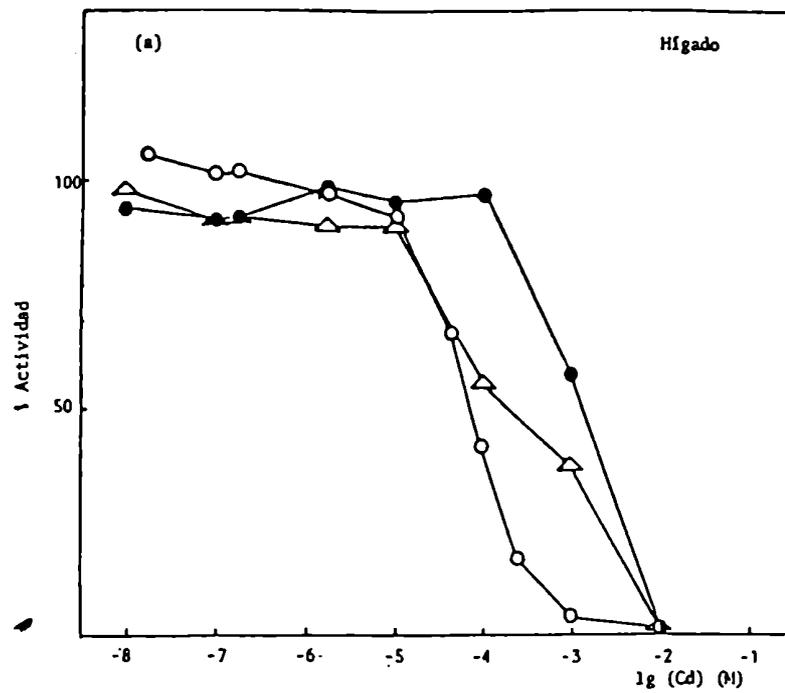


Figura 13: Efecto del cadmio sobre las enzimas ALA-D (○), PBGasa (●) y Deaminasa (△), (a) de hígado y (b) de riñón. Las actividades se expresan en porcentajes relativos, tomando como 100% el valor correspondiente al control obtenido sin agregado alguno. (M) significa moles/l sobrenadante a 11.000 g. Los valores representados son el promedio de tres determinaciones.

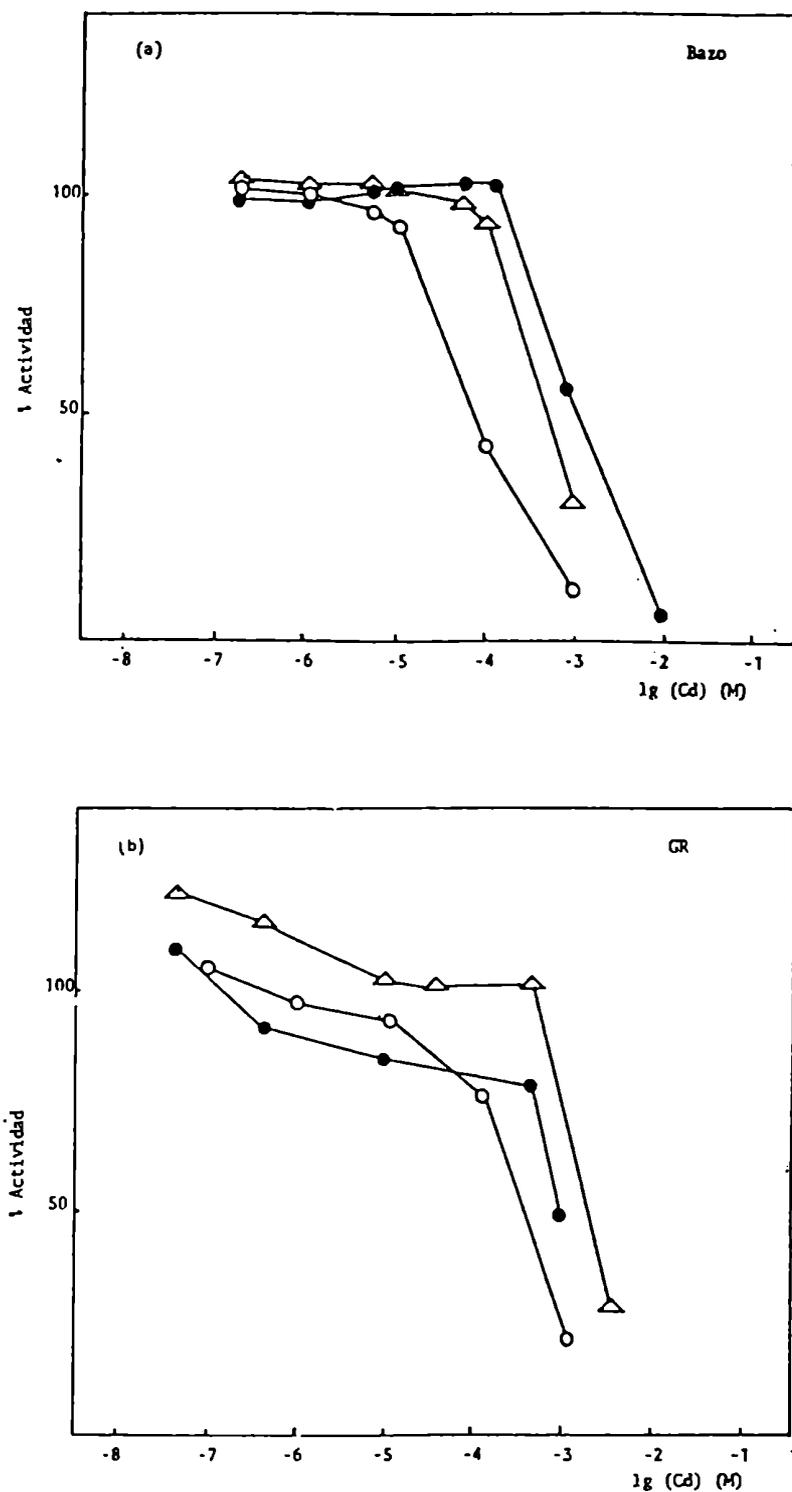


Figura 14: Efecto del cadmio sobre las enzimas ALA-D (\circ), PBGasa (\bullet) y Deaminasa (Δ), (a) de bazo y (b) de GR. Las actividades se expresan de igual modo que en la Figura 13. En bazo (M) significa moles/l sobrenadante a 11.000 g y en GR, moles/l GR. Los valores representados son el promedio de tres determinaciones.

Tabla III

	ALA-D		PBGasa		Deaminasa	
	log (M)	(M)	log (M)	(M)	log (M)	(M)
<u>cadmio</u>						
hígado	-4,15	$7,08 \cdot 10^{-5}$	-3	10^{-3}	-3,6	$2,51 \cdot 10^{-4}$
riñón	-4,3	$5,01 \cdot 10^{-5}$	-3	10^{-3}	-3,6	$2,51 \cdot 10^{-4}$
bazo	-4,25	$5,62 \cdot 10^{-5}$	-3,15	$7,07 \cdot 10^{-4}$	-3,7	$1,99 \cdot 10^{-4}$
GR	-3,5	$3,16 \cdot 10^{-4}$	-3,2	$6,30 \cdot 10^{-4}$	-2,9	$1,26 \cdot 10^{-3}$
<u>zinc</u>						
hígado	-3,6	$2,50 \cdot 10^{-4}$	-3,15	$7,07 \cdot 10^{-4}$	-3,15	$7,07 \cdot 10^{-4}$
riñón	-3,3	$5,00 \cdot 10^{-4}$	-3	10^{-3}	-3,15	$7,07 \cdot 10^{-4}$
bazo	-3,4	$3,98 \cdot 10^{-4}$	-2,5	$3,16 \cdot 10^{-3}$	-2,75	$1,78 \cdot 10^{-3}$
GR	-2,3	$5,01 \cdot 10^{-3}$	-1,7	$1,99 \cdot 10^{-2}$	-1,85	$1,41 \cdot 10^{-2}$

Concentraciones de cadmio y de zinc en moles/l de sobrenadante que inhiben un 50% la actividad de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa (ID 50).

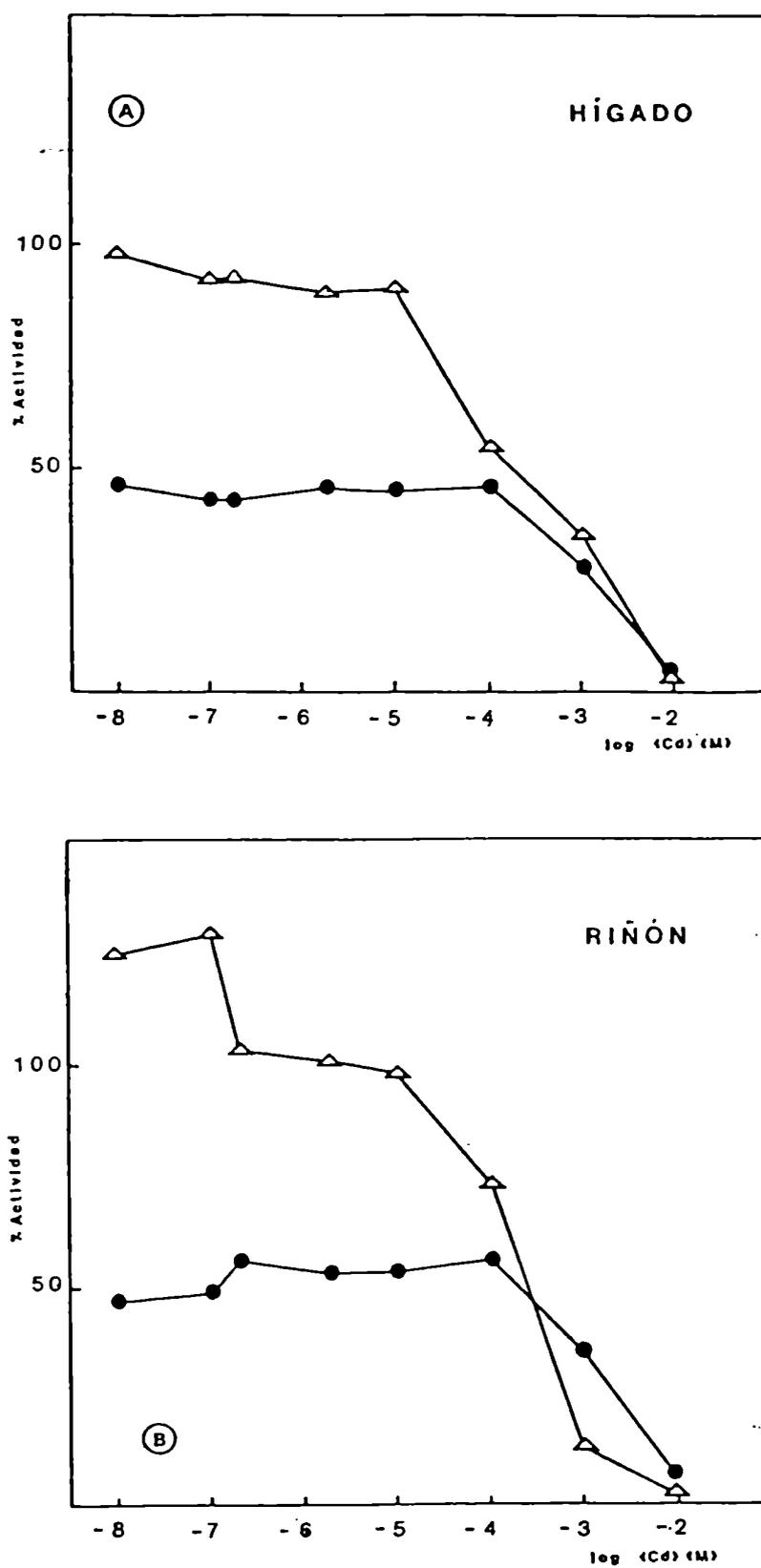


Figura 15: Efecto del cadmio sobre las enzimas PBGasa (●) y Deaminasa (Δ), (A) de hígado y (B) de riñón. Las actividades y concentraciones se expresan igual que en la Figura 13.

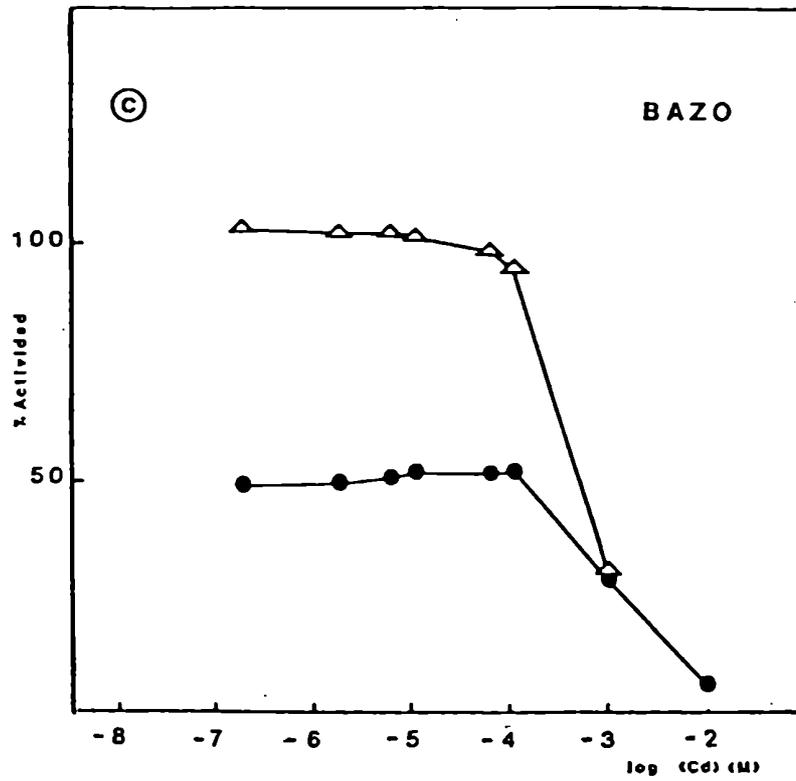


Figura 16: Efecto del cadmio sobre las enzimas PBGasa (●) y Deaminasa (Δ) de bazo. Las actividades se expresan de igual modo que en la Figura 13, y las concentraciones en moles/l de sobrenadante a 11.000 g.

sado la de la PBGasa como un porcentaje de la actividad de la Deaminasa.

Es importante agregar que, por lo menos con los métodos analíticos empleados en este trabajo, no se ha podido detectar cadmio en los fluidos biológicos ni órganos de las ratas normales, de modo que no hay que tener en cuenta efectos del cadmio endógeno.

IV.2.2 Efectos del zinc sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa

El zinc es un metal esencial, que se incorpora con la dieta, y se distribuye por todo el organismo.

Los órganos poseen niveles normales de zinc, que en condiciones standard oscilan dentro de límites estrechos. La Tabla IV presenta los valores normales de zinc hallados en los sobrenadantes a 11.000 g de hígado, riñón y bazo, y en GR.

Dado que en los órganos estudiados existen concentraciones relativamente altas de zinc, se consideró que el agregado de concentraciones muy bajas del metal a los sobrenadantes no daría lugar a un efecto distinto del producido por variaciones fisiológicas normales. Por ello, algunas veces solamente se estudiaron agregados de zinc superiores a 10^{-5} moles/l sobrenadante.

Las Figuras 17 y 18 muestran el efecto del agregado de concentraciones crecientes de zinc sobre las actividades de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa.

En la zona de 10^{-4} y 10^{-3} M el zinc comienza a inhibir las enzimas de hígado, riñón y bazo. Las concentraciones de zinc necesarias para inhibir un 50% dichas enzimas se muestran en la Tabla III.

Se observa que las enzimas son algo menos sensibles al zinc que al cadmio, especialmente el ALA-D de GR.

En las Figuras 19 y 20 representamos nuevamente las actividades de PBGasa y Deaminasa como porcentajes de actividad

Tabla IV

	$\frac{\text{moles}}{\text{l sobrenadante}} \cdot 10^{-5} \pm \text{desviación standard de la media}$
Hígado	3,21 \pm 0,12
Riñón	2,75 \pm 0,11
Bazo	1,84 \pm 0,21

Valores normales de zinc hallados en los sobrenadantes a 11.000 g.

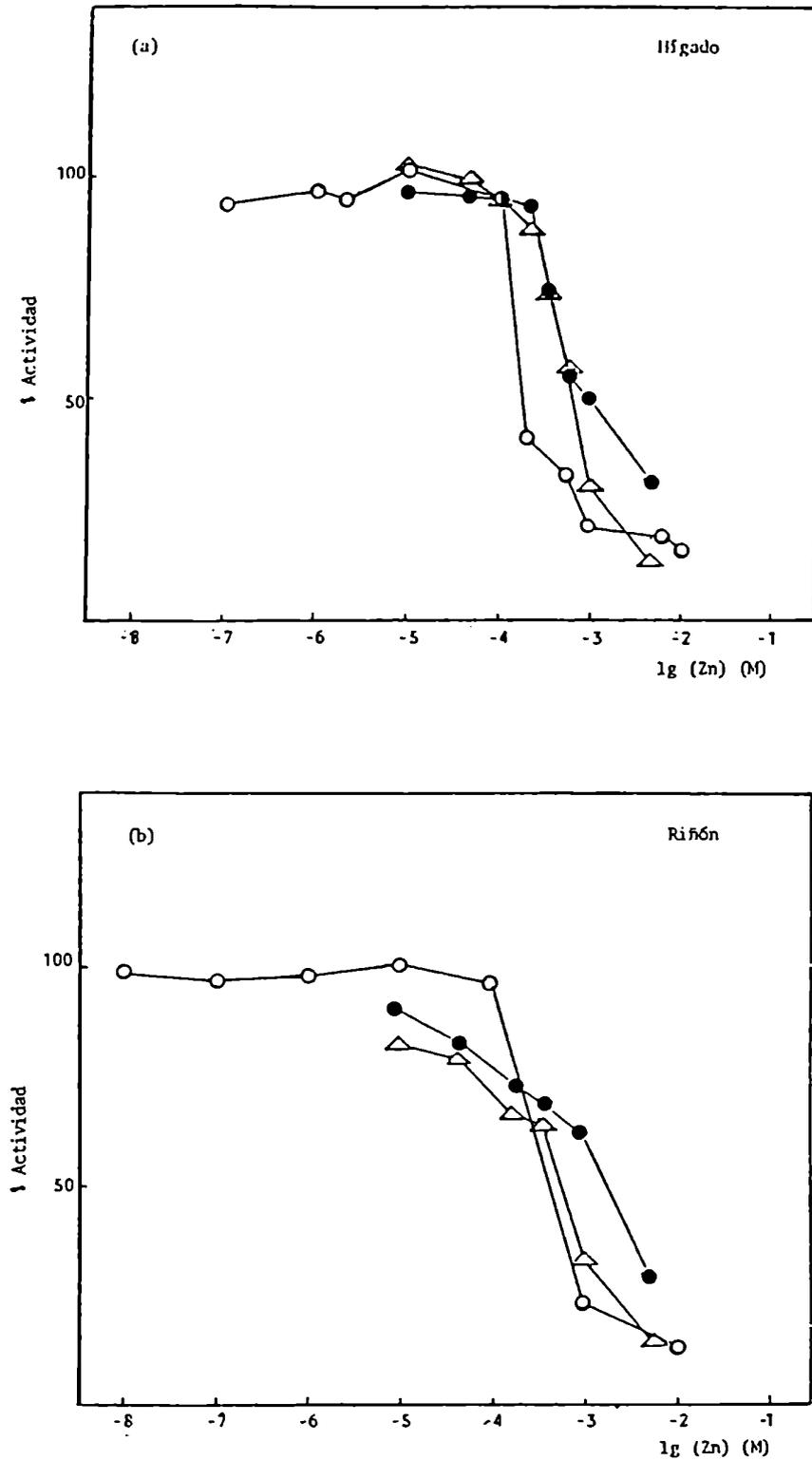


Figura 17: Efecto del zinc agregado sobre las enzimas ALA-D (\circ), PBGasa (\bullet) y Deaminasa (Δ), (a) de hígado y (b) de riñón. Las actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 13. En el eje de las abscisas está representado el zinc agregado a los sobrenadantes. No se tienen en cuenta los valores del elemento esencial endógeno.

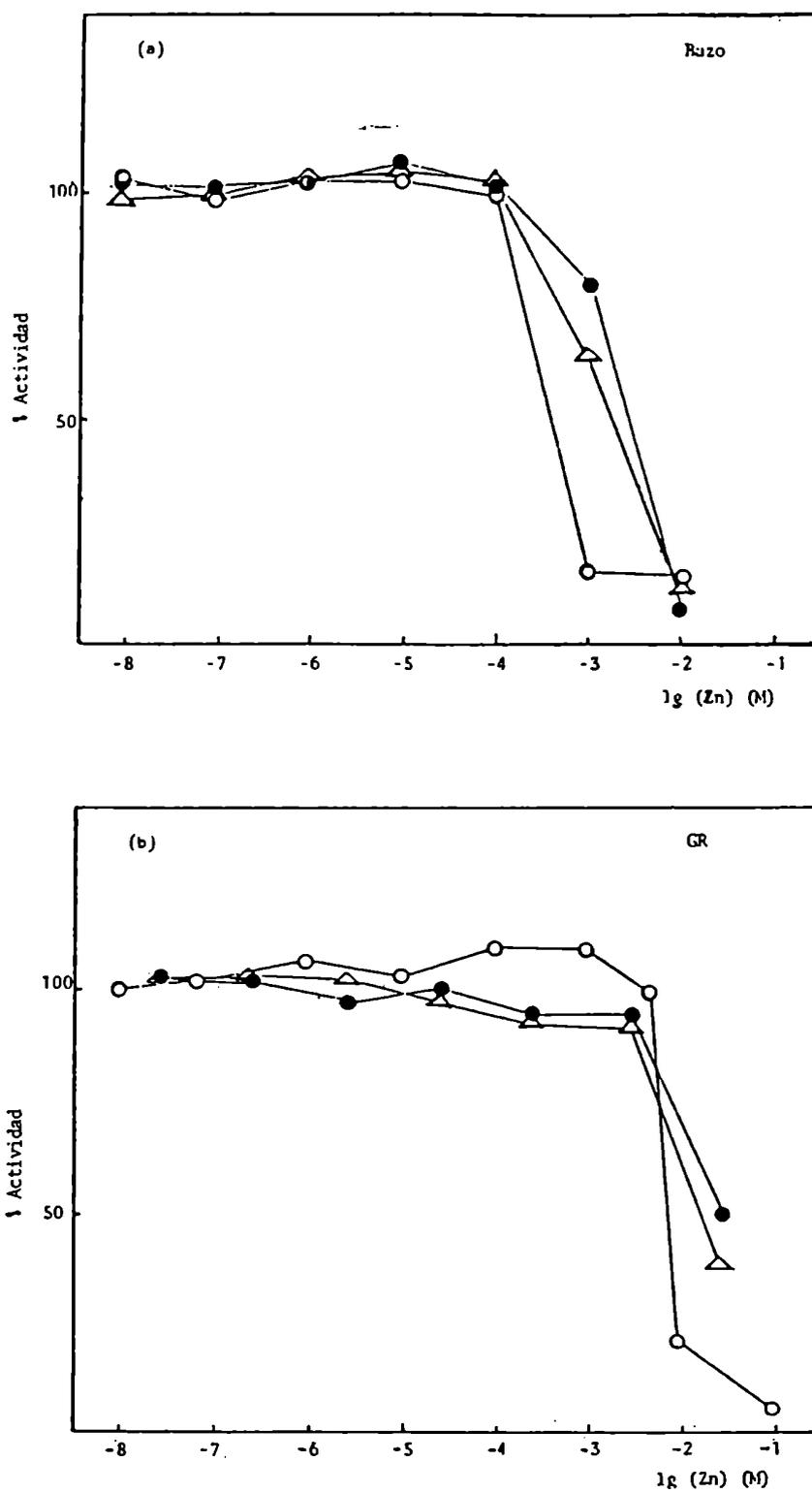


Figura 18: Efecto del zinc agregado sobre las enzimas ALA-D (○), PBGasa (●) y Deaminasa (△), (a) de bazo y (b) de GR. Las actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 14.

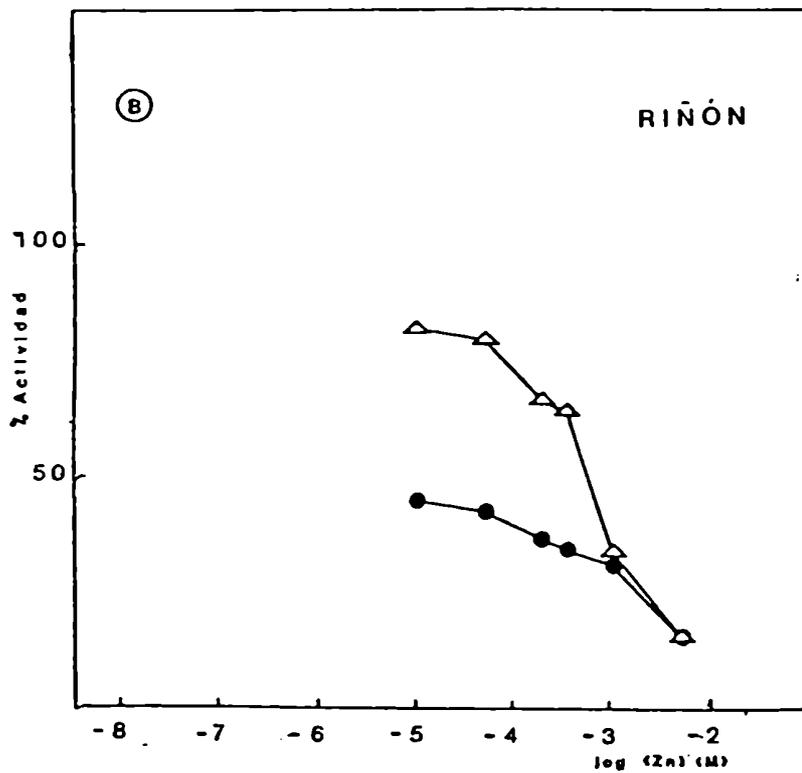
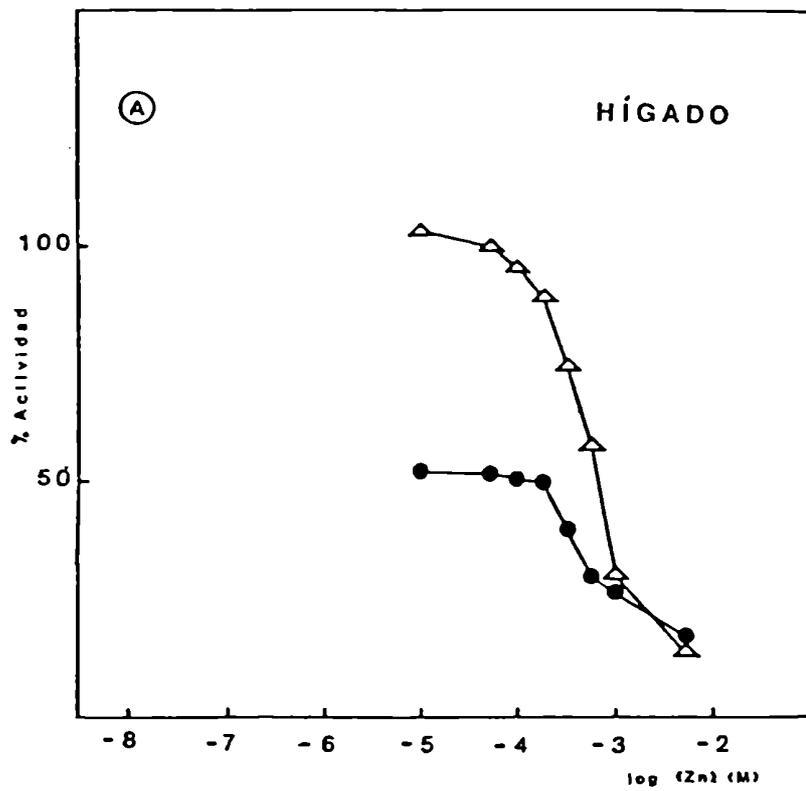


Figura 19: Efecto del zinc sobre las enzimas PBGasa (●) y Deaminasa (Δ), (A) de hígado y (B) de riñón. Las actividades y concentraciones se expresan igual que en la Figura 13.

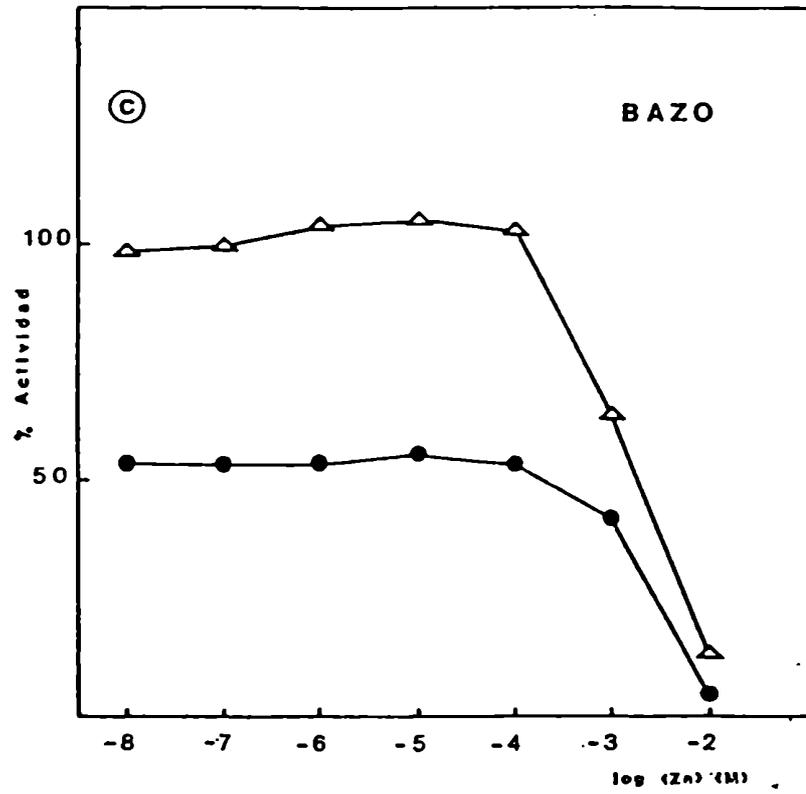


Figura 20: Efecto del agregado de zinc sobre las enzimas PBGasa (●) y Deaminasa (Δ) de bazo. Las actividades y con centraciones se expresan como en la Figura 16.

relativa a la Deaminasa, en función ahora de la concentración de zinc, observándose, en analogía con lo sucedido con cadmio; que ha concentraciones de zinc inhibitorias también se altera la relación $\frac{\text{Deaminasa}}{\text{PBGasa}}$.

Confirmando trabajos previos, se ha encontrado que a concentraciones del orden de 10^{-3} M, ocurre una activación del 87% del ALA-D de eritrocitos humanos. Sin embargo, al trabajar, como en este caso, con GR de rata, se aprecia que sólo hay una activación no superior al 10% a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-5} M y apenas un ligero aumento de la enzima de riñón, a 10^{-5} M.

IV.2.3 Efecto del ácido fólico sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa

Se efectuaron ensayos a concentraciones variables de la vitamina en hígado, riñón y eritrocitos.

Las Figuras 21 y 22 muestran los resultados obtenidos. El fólico en las concentraciones usualmente empleadas en la terapia no modifica la actividad de las enzimas de hígado o riñón, mientras que en GR ocurre un aumento de alrededor del 30% para la PBGasa, a concentraciones entre 10^{-6} y 10^{-5} M; mientras que la activación de la Deaminasa es mucho menor.

IV.2.4 Efecto del ácido L-ascórbico sobre las actividades de ALA-D, PBGasa y Deaminasa

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos. Sólo en hígado el ácido ascórbico aparentemente tendría algún efecto beneficioso sobre el ALA-D y Deaminasa.

IV.2.5 Efecto del glutatión en las determinaciones de ALA-D

Dado que el glutatión se emplea con frecuencia en la determinación de ALA-D, se efectuaron diversos ensayos de medición del ALA-D de hígado, en presencia y ausencia del reductor.

En las distintas experiencias se usó una concentración constante de glutatión reducido de $2 \cdot 10^{-2}$ moles/l de sobrenadante de 11.000 g.

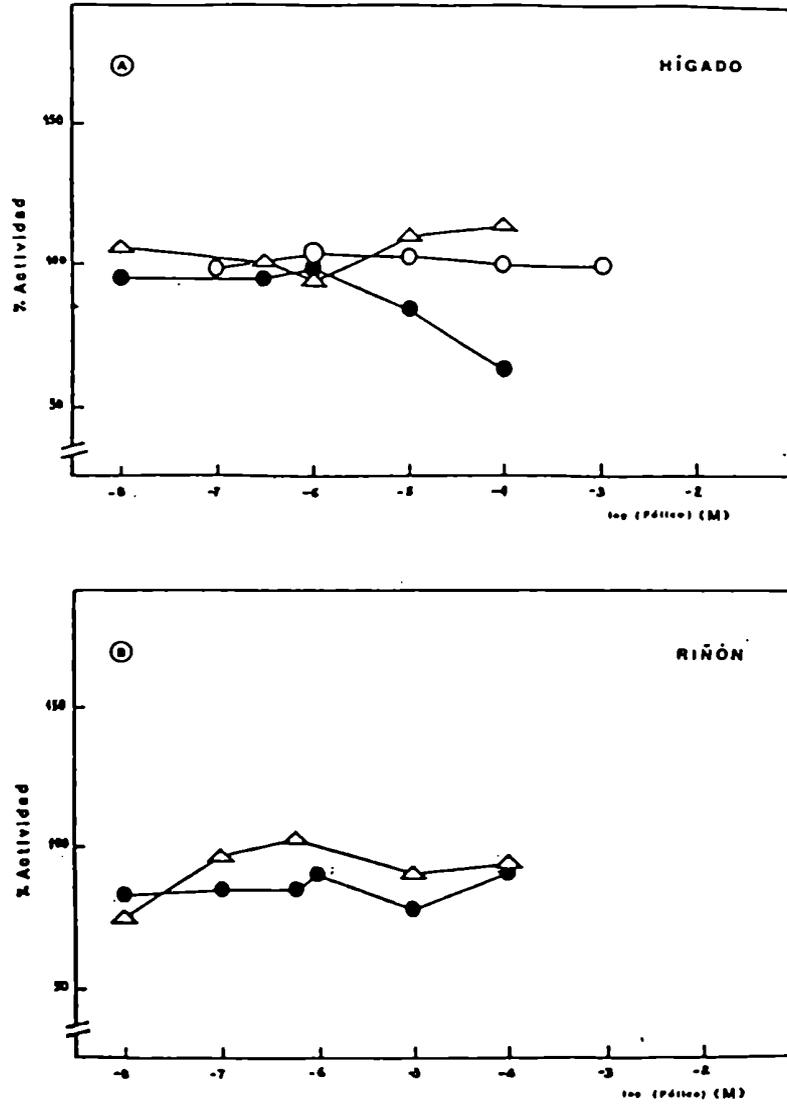


Figura 21: Efecto del ácido fólico sobre las enzimas ALA-D (○), PBGasa (●) y Deaminasa (Δ), (A) de hígado y (B) de riñón. Las actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 13.

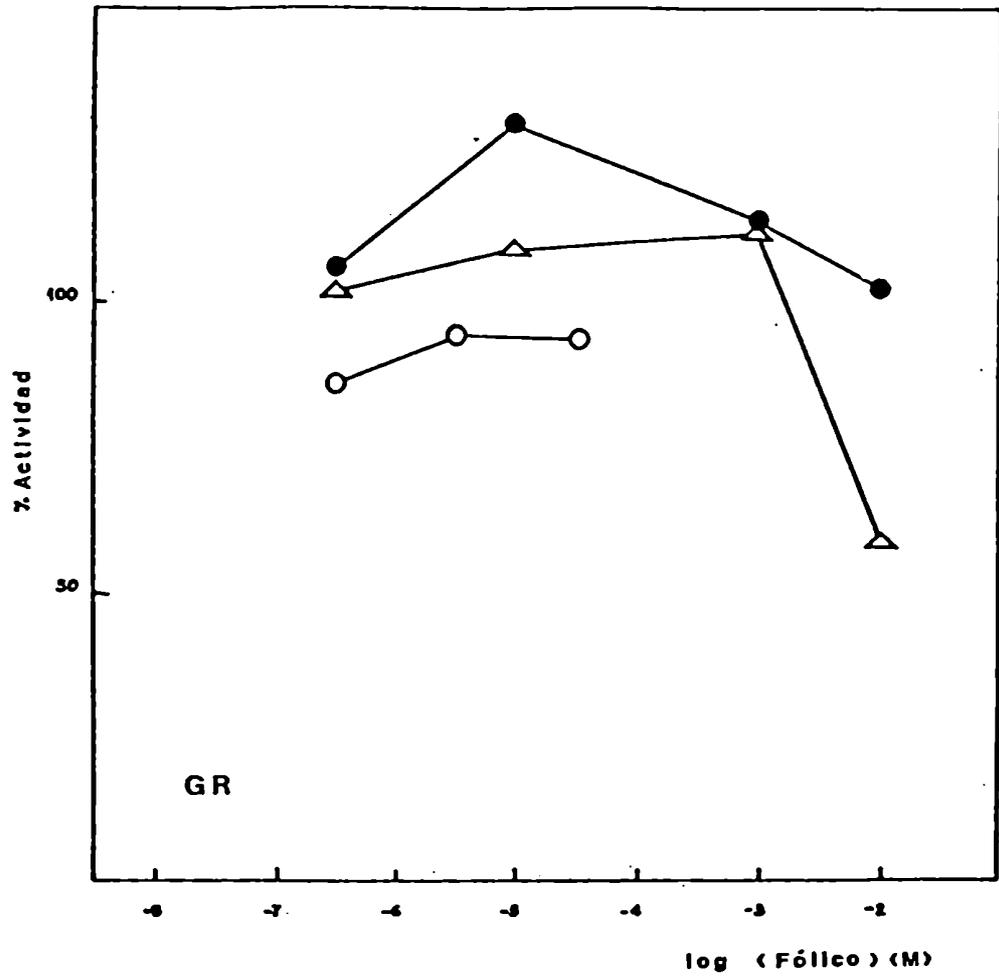


Figura 22: Efecto del ácido fólico sobre las enzimas ALA-D (\circ), PBGasa (\bullet) y Deaminasa (Δ) de GR. Actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 14 b.

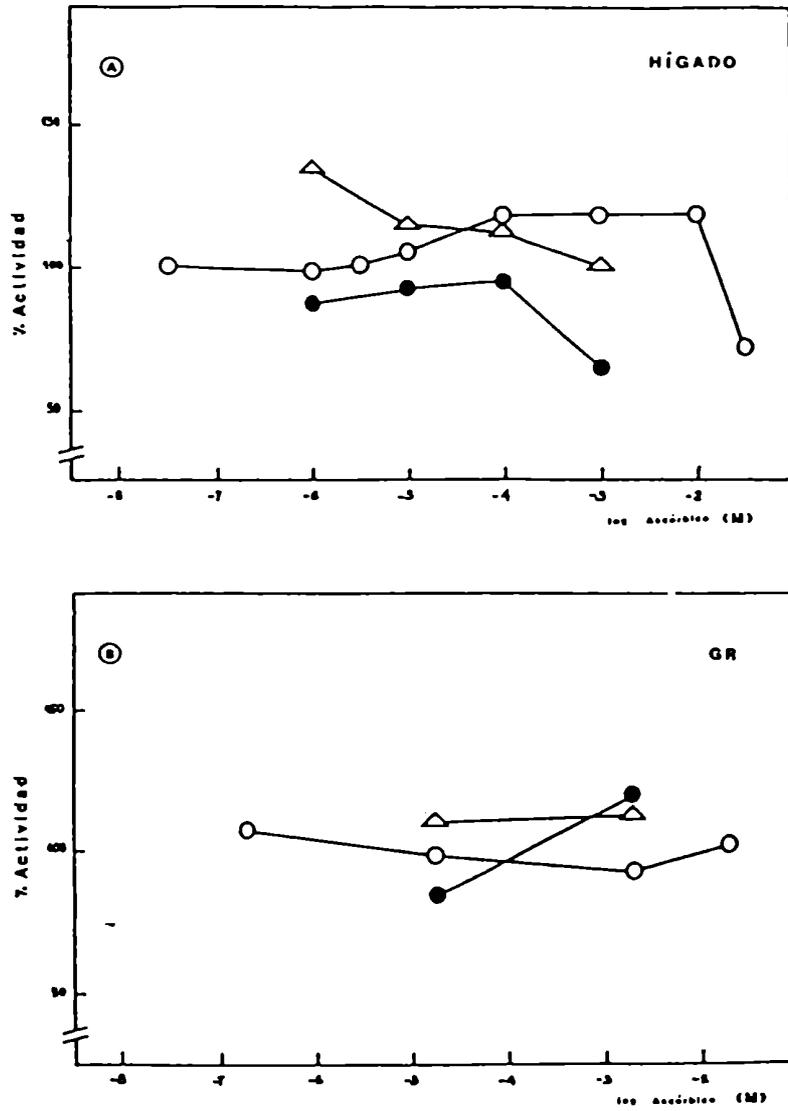


Figura 23: Efecto del ácido L-ascórbico sobre las enzimas ALA-D (○), PBGasa (●) y Deaminasa (△), (A) de hígado y (B) de GR. Las actividades se expresan como en la Figura 13. En hígado (M) significa moles/l homogenato y en GR, moles/l GR.

La Figura 24 A muestra la influencia del glutati3n sobre el efecto del cadmio, en la actividad del ALA-D.

Se observa que la 3nзима es menos sensible a la inhibici3n por cadmio y en muchos puntos se revierte significativamente el efecto del metal. Por ejemplo a $2 \cdot 10^{-4}$ M de cadmio la actividad remanente era de s3lo 17% en ausencia de glutati3n, en tanto que en su presencia se recuper3 hasta alcanzar un 67,5% del control.

En la Figura 24 B se muestra el efecto del reductor sobre la acci3n del zinc. Las conclusiones son muy similares a las discutidas para los datos de la Figura 24 A.

De estos resultados, surge que en general, cuando se trata de estudiar efecto de metales sobre el ALA-D, es conveniente no usar glutati3n, ya que podr3a enmascarse una posible acci3n inhibitoria de aquellos.

En cambio, el glutati3n parecer3a tener, por lo menos te3ricamente, efectos interesantes en cuanto a la recuperaci3n o protecci3n de la actividad enzim3tica durante la intoxicaci3n con cadmio.

En la Figura 25 puede verse la acci3n del glutati3n en presencia de asc3rbico o de f3lico sobre la actividad de la 3nзима. No se aprecia ning3n efecto aditivo como tampoco alguna otra variaci3n de inter3s.

IV.2.6 Efectos del zinc, asc3rbico y f3lico sobre la inhibici3n del ALA-D con cadmio. Influencia del glutati3n

En la Figura 26 se puede observar el efecto del zinc sobre la inhibici3n con cadmio y el papel del glutati3n.

Ha resultado evidente que *in vitro*, en un rango amplio de concentraciones el zinc tiene menor influencia que el glutati3n sobre la actividad enzim3tica, ejerciendo este 3ltimo su habitual efecto protector como ya se observara en la Figura 24 B. Algunos descensos aparentes de actividad se hallan compensados estad3sticamente, ya que la gr3fica se obtuvo como promedio de cuatro series de determinaciones.

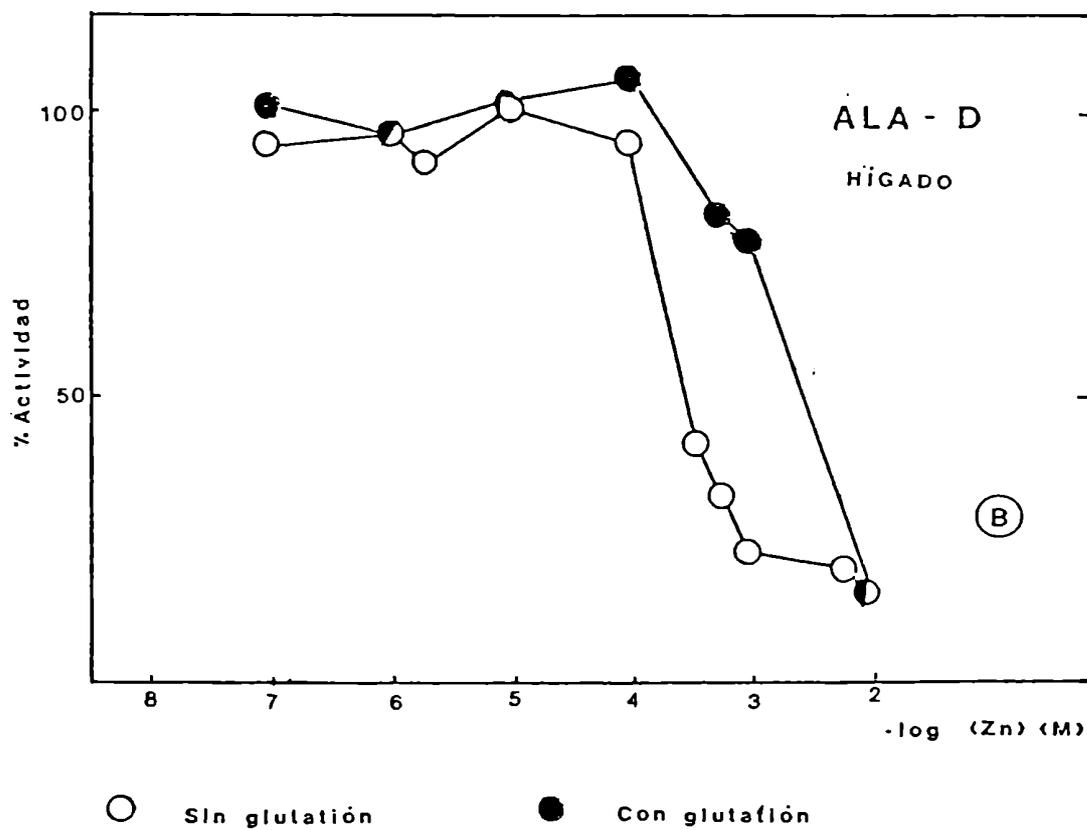
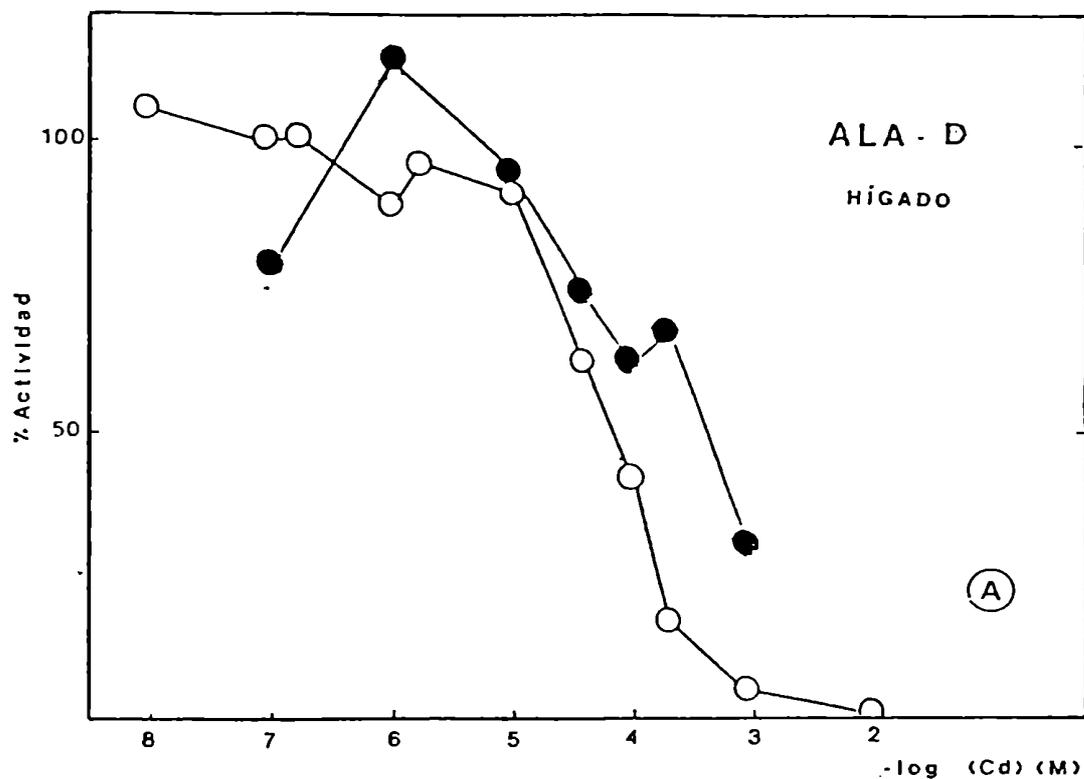


Figura 24: Efecto del cadmio (A) y del zinc (B) sobre el ALA-D de hígado, en ausencia y en presencia de glutatión. Actividades se expresan como en la Figura 13, en ausencia de glutatión, mientras que para la serie con glutatión, se toma como 100% el valor correspondiente al control conteniendo igual concentración de reductor. Las concentraciones se expresan como en la Figura 13.

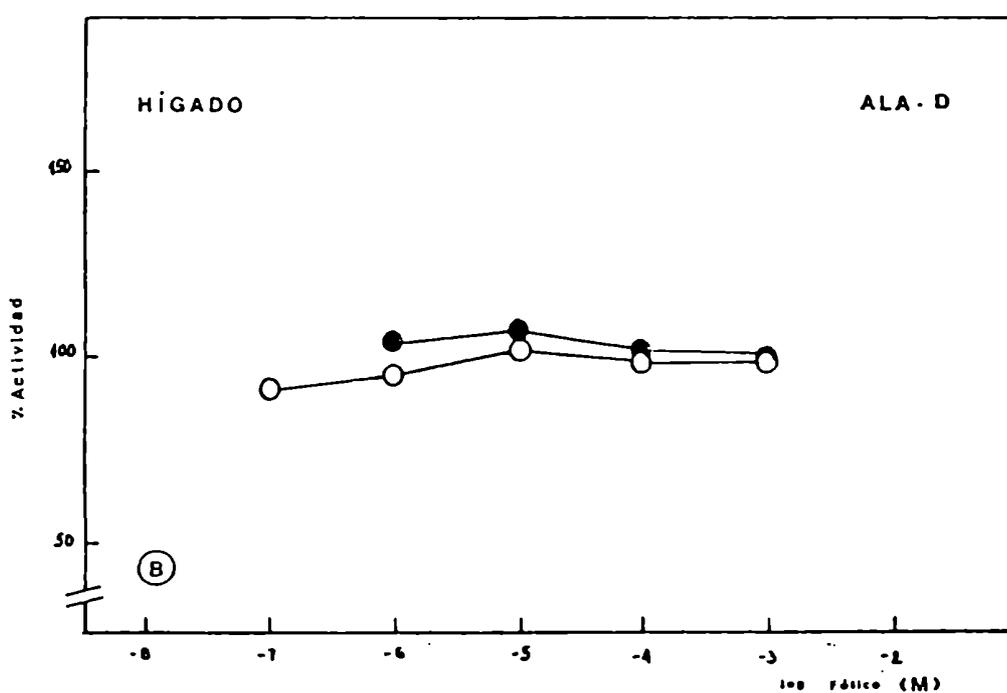
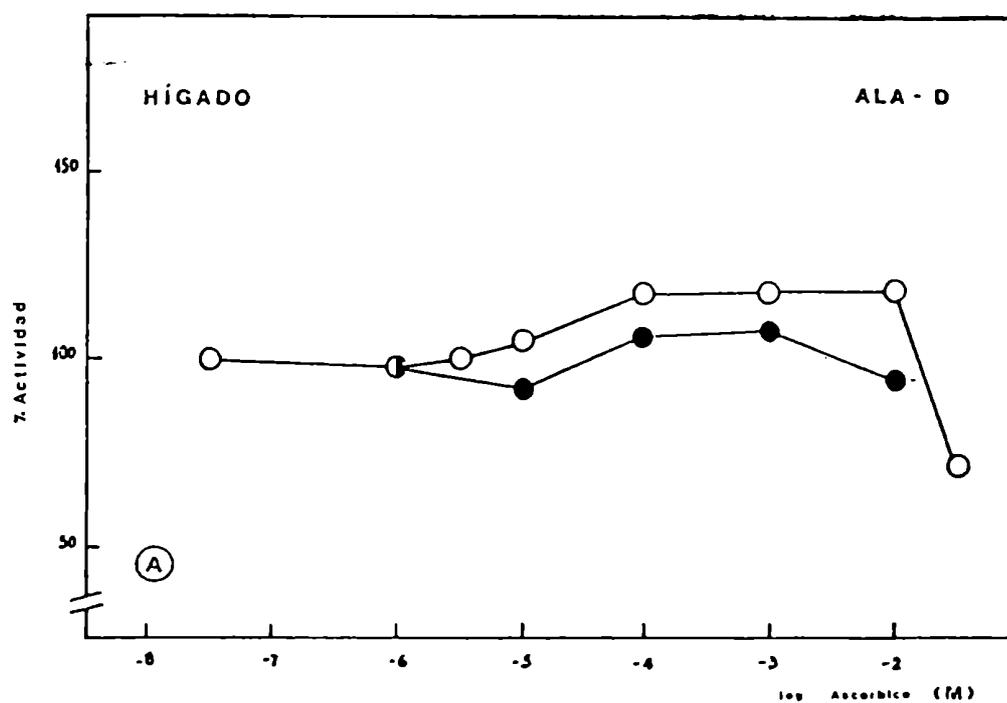


Figura 25: Efecto del ascórbico (A) y del fólico (B) sobre el ALA-D de hígado en ausencia (○) y en presencia (●) de glutatión. Actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 24.

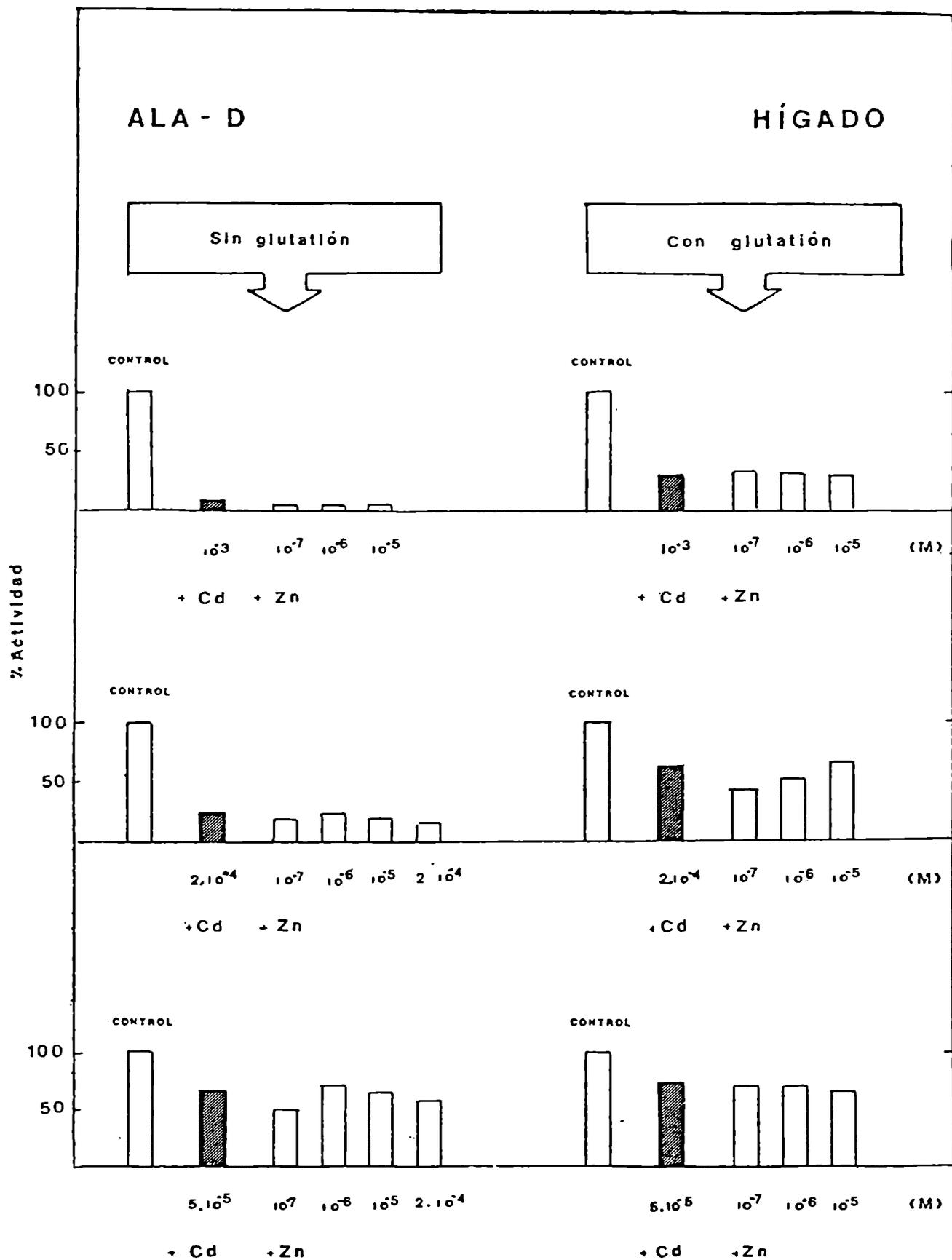


Figura 26: Efecto del zinc sobre la inhibición con cadmio del ALA-D de hígado, en ausencia y en presencia de glutatión. Las concentraciones y actividades se expresan como en la Figura 24.

En la Figura 27 se ilustran los resultados de la acción del ácido ascórbico, en un conjunto de experiencias análogas a las anteriores observándose que a las concentraciones ensayadas el ascórbico no ejerce ninguna acción protectora. Recordemos que el ascórbico-glutati6n no había mostrado efecto significativo alguno sobre la enzima (Figura 25), de manera que era de esperar que no se registrara un efecto aditivo ascórbico-glutati6n sobre la inhibici6n con cadmio.

Según la Figura 28 la mezcla fólico-glutati6n tampoco produce cambios, es decir no se logra reversi6n de la inhibici6n por cadmio en ninguna circunstancia.

IV.2.7 Efecto del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibici6n con cadmio de ALA-D, PBGasa y Deaminasa

Se usaron concentraciones de cadmio que de acuerdo a las experiencias previas (Figuras 13 y 14) produjeran una inhibici6n observable de las enzimas en estudio, y concentraciones variables de los demás compuestos, que fueran ligeramente estimuladoras o no modificaran la actividad enzimática.

La Figura 29 resume los resultados obtenidos para las enzimas del hígado. Se estudió el efecto del zinc, del ácido ascórbico, del ácido fólico y de mezclas zinc-f6lico o zinc-ascórbico. A las concentraciones estudiadas no se logró en ningún caso reversi6n de la inhibici6n por cadmio.

La Figura 30 muestra el efecto del zinc en el sobrenadante de riñ6n para dos concentraciones de cadmio. Los únicos datos destacables lo constituyen un pequeño aumento no mayor del 15% de la actividad de la Deaminasa que se produce ocasionalmente con zinc (10^{-5} - 10^{-6} M); mientras que en la Figura 31 se observa que el ascórbico $5 \cdot 10^{-6}$ M y la combinaci6n fólico ($3 \cdot 10^{-5}$ M)-zinc (10^{-5} M) produce un aumento del 9% de la actividad de la Deaminasa de riñ6n.

Se ensayó también el efecto de diversas concentraciones de zinc, ascórbico y fólico sobre la Deaminasa de eritrocitos inhibida por el cadmio. La Figura 32 ilustra los resultados obtenidos. El único efecto significativo fue una ligera reversi6n

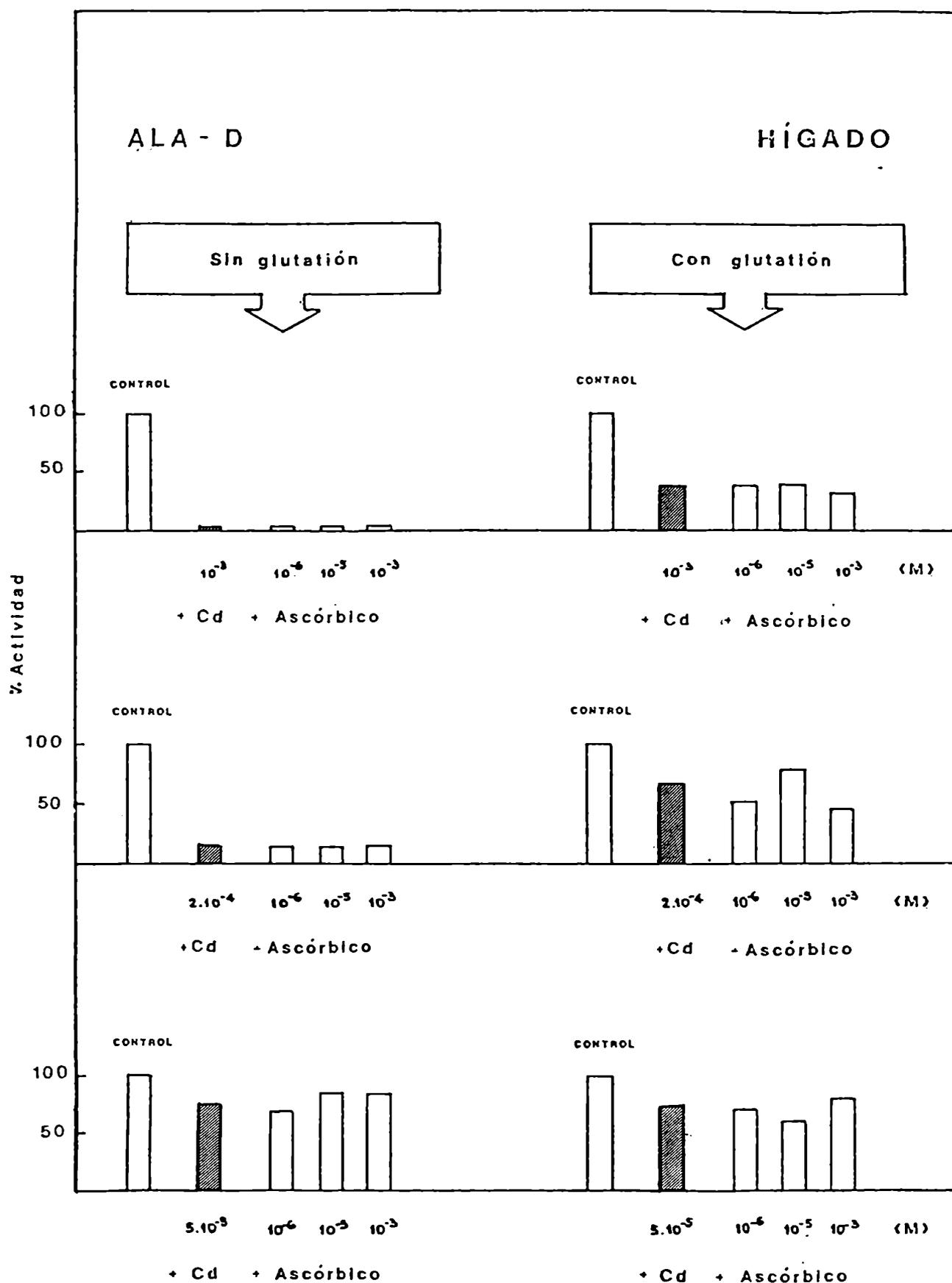


Figura 27: Efecto del ácido L-ascórbico sobre la inhibición con cadmio del ALA-D de hígado, en ausencia y en presencia de glutatión. Las actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 24.

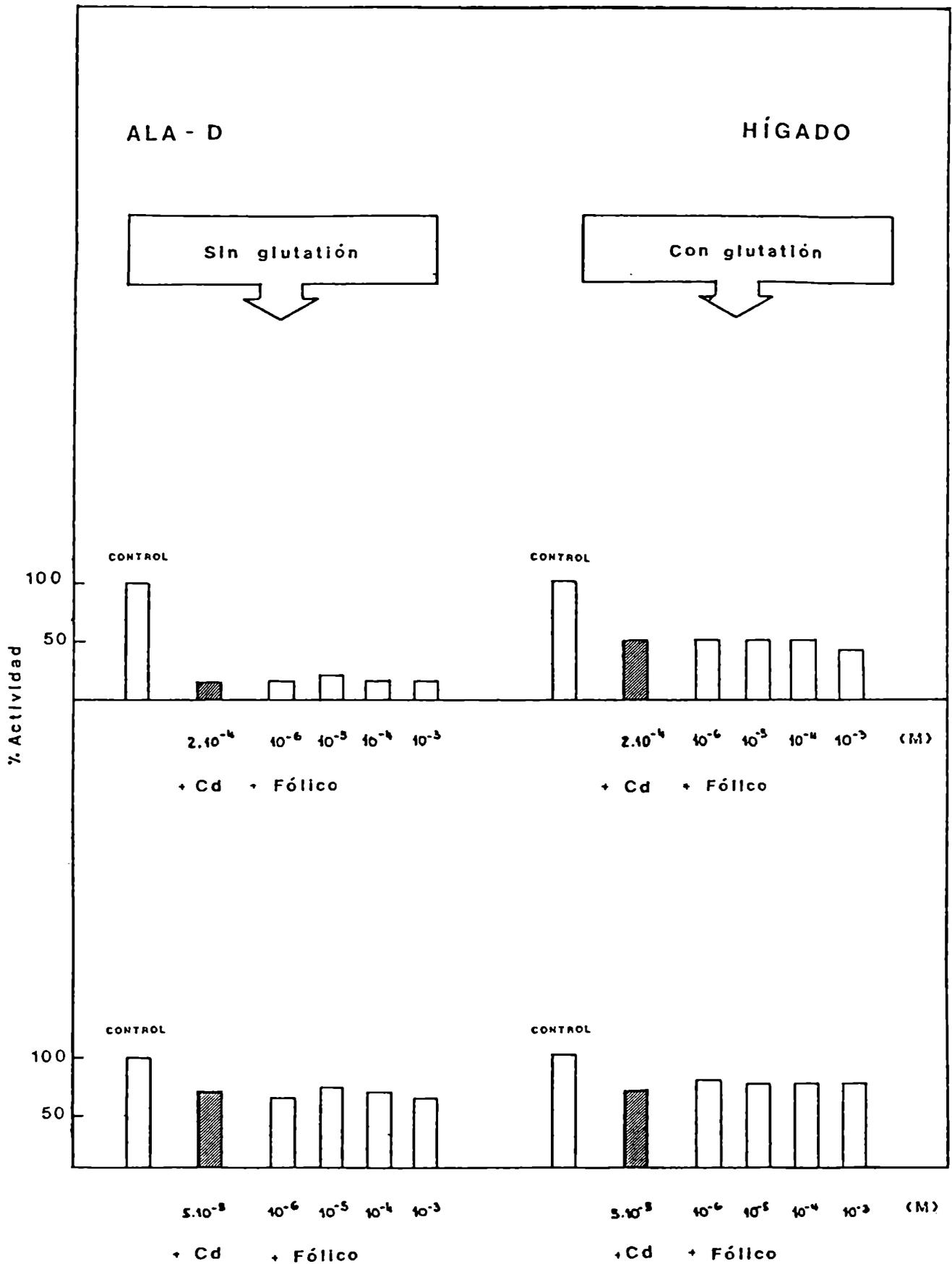


Figura 28: Efecto del 6cido f6lico sobre la inhibici6n con cadmio del ALA-D de h6gado, en ausencia y en presencia de glutati6n. Las actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 24.

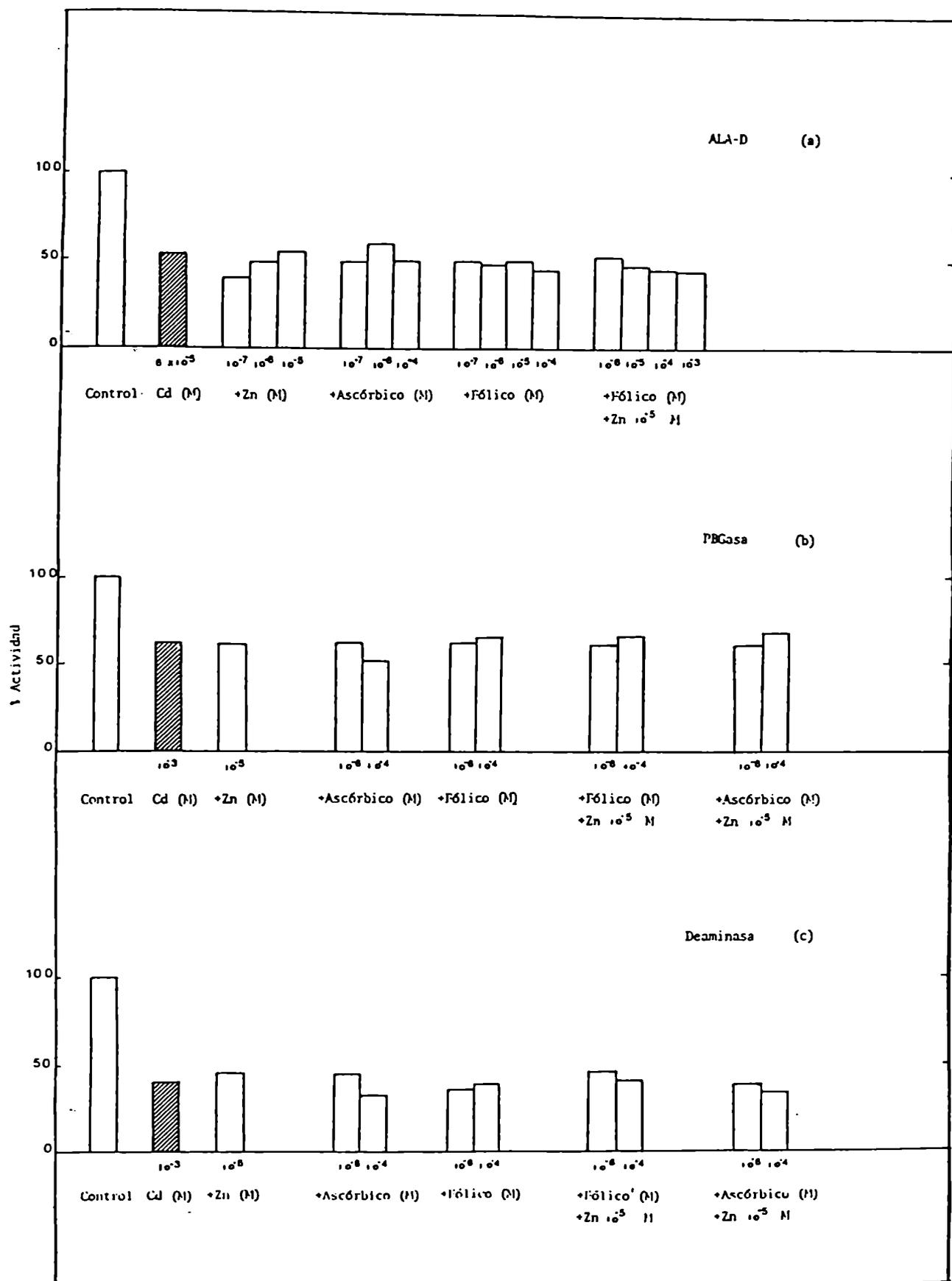


Figura 29: Efecto del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibición con cadmio del ALA-D (a), PBGasa (b) y Deaminasa (c) en hígado. Actividades y concentraciones se expresan como en la Figura 13.

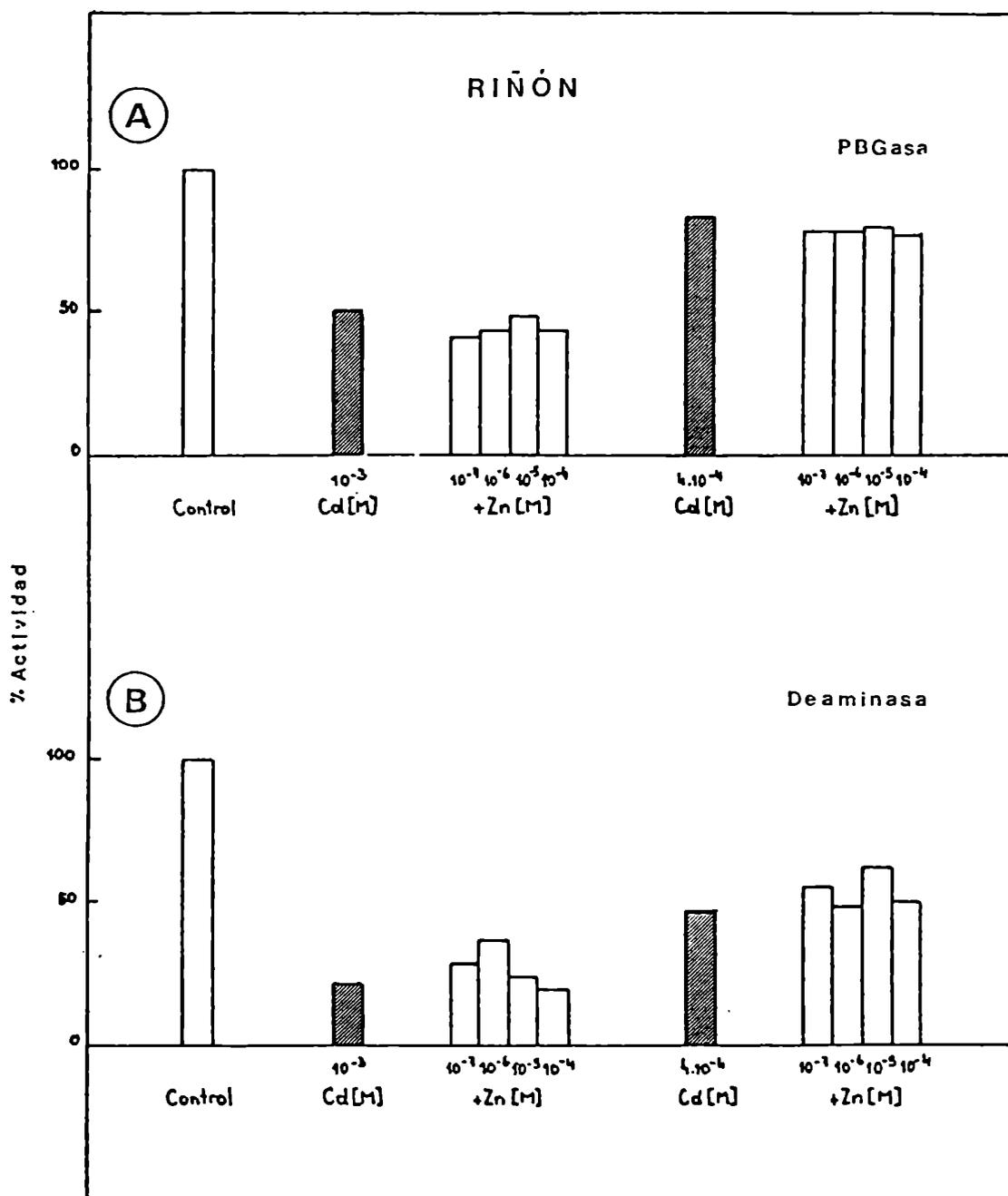


Figura 30: Efecto del zinc sobre la inhibición con cadmio de PBGasa (A) y Deaminasa (B) de riñón, a dos concentraciones de cadmio diferentes. Actividades y concentraciones expresadas como en la Figura 13.

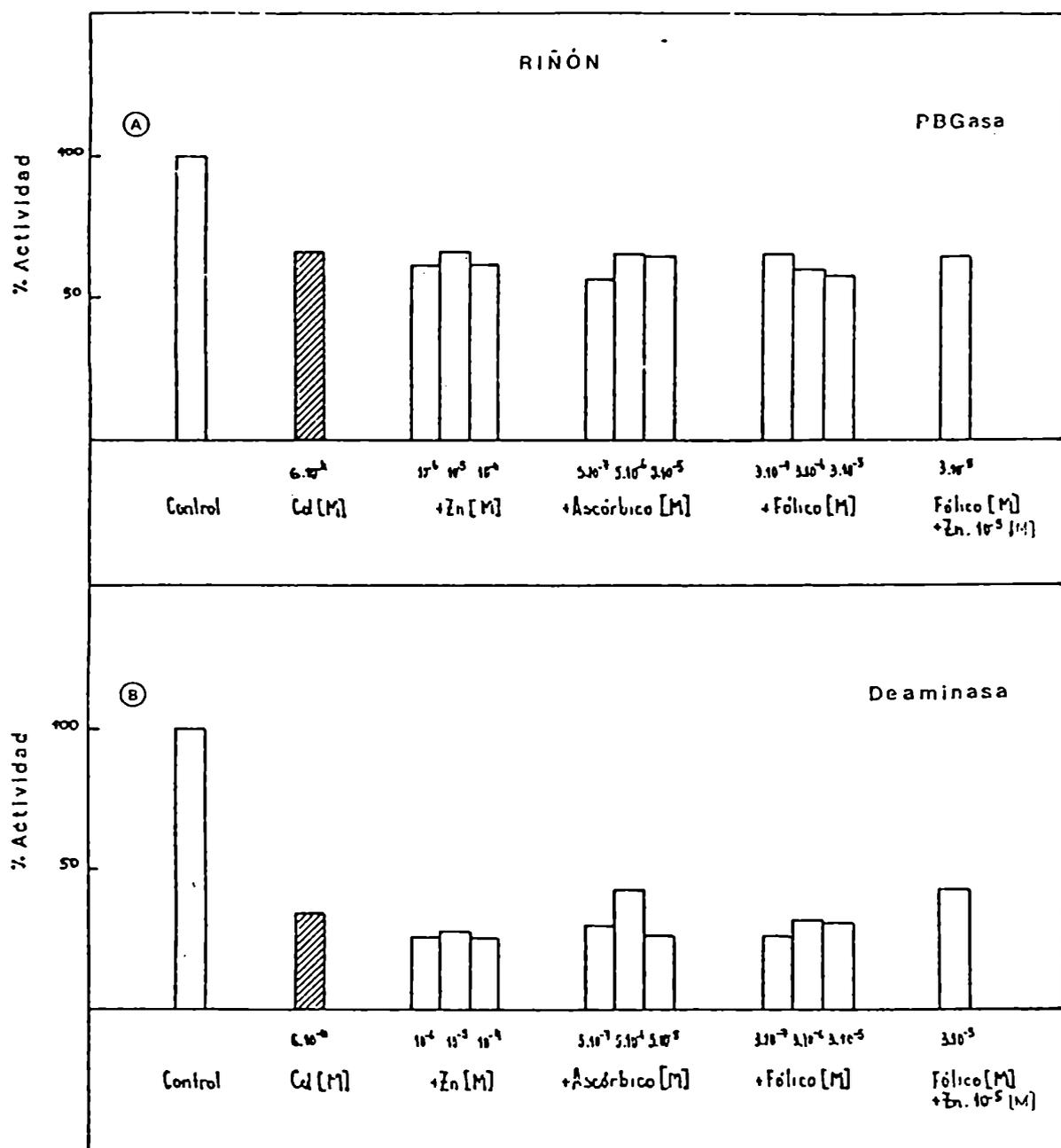


Figura 31: Efecto del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibición con cadmio de PBGasa (A) y Deaminasa (B) de riñón. Actividades y concentraciones expresadas como en la Figura 13.

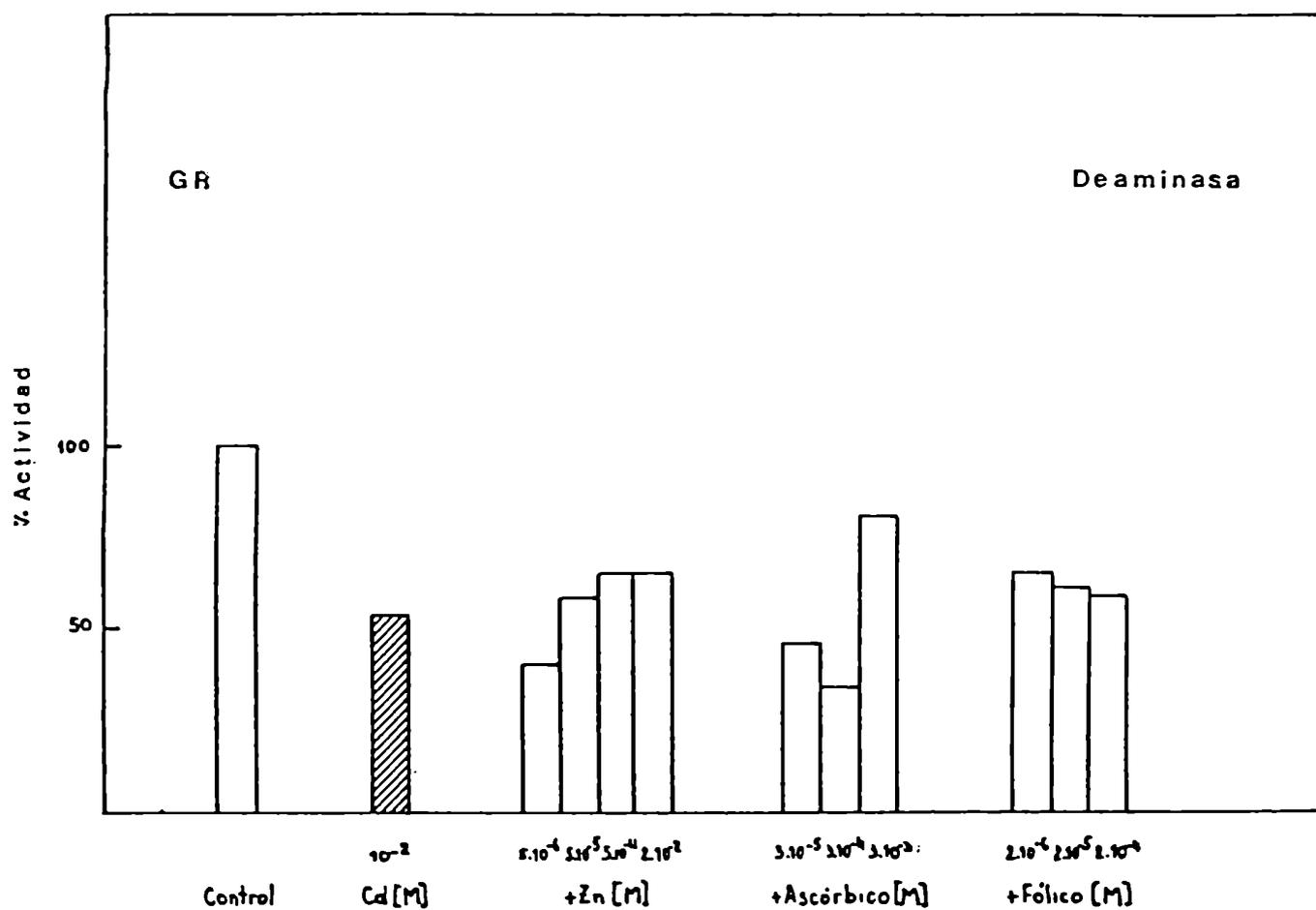


Figura 32: Efecto del zinc, ascórbico y fólico sobre la inhibición con cadmio de la Deaminasa de GR. Actividades y concentraciones expresadas como en la Figura 13.

de la inhibición por cadmio con ascórbico $5 \cdot 10^{-3}$ M.

IV.2.8 Efectos del ascórbico-zinc y fólico-zinc sobre las enzimas

En este conjunto de experiencias se investigó el efecto del ascórbico y del fólico sobre las enzimas de hígado inhibidas por el zinc.

Se emplearon concentraciones inhibitorias de zinc del orden de $6 \cdot 10^{-4}$ M. Se estudió la acción conjunta de zinc ($6 \cdot 10^{-4}$ M)-fólico (distintas concentraciones) y zinc ($6 \cdot 10^{-4}$ M)-ascórbico (distintas concentraciones). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33.

Si bien el fólico no presentó ningún efecto sobre la inhibición con zinc, el ascórbico a concentraciones $4 \cdot 10^{-4}$ - $4 \cdot 10^{-6}$ M se comportó como protector de la PBGasa revirtiendo sólo ligeramente los efectos del zinc sobre la actividad de la Deaminasa.

IV.2.9 Discusión y conclusiones

Se han ensayado los efectos de distintas concentraciones de cadmio, zinc, ácido fólico y ácido ascórbico sobre el ALA-D en ausencia y en presencia de glutatión, y sobre la PBGasa y Deaminasa en los sobrenadantes a 11.000 g de hígado, riñón, bazo y en GR.

Según lo señalado en diferentes recopilaciones (McAuliffe y Murray, 1972; Vallee y Ulmer, 1972; Friberg et al., 1974; Friberg, 1974; Blundell y Jenkins, 1977) el cadmio interacciona fuertemente con un gran grupo de biomoléculas incluyendo proteínas, fosfolípidos, purinas, porfirinas, ácidos nucleicos y enzimas. Se cree que el cadmio se une a estos sistemas por intermedio de grupos tioles en residuos de cisteína, grupos imidazólicos en residuos de histidina y grupos fosfatos. No debe olvidarse que los grupos amino o carboxilo podrían ejercer también un efecto similar en estos sistemas. Los grupos -NH de péptidos, los -OH de cadenas laterales y los grupos alquil-tiol parecen ser menos ávidos de coordinación.

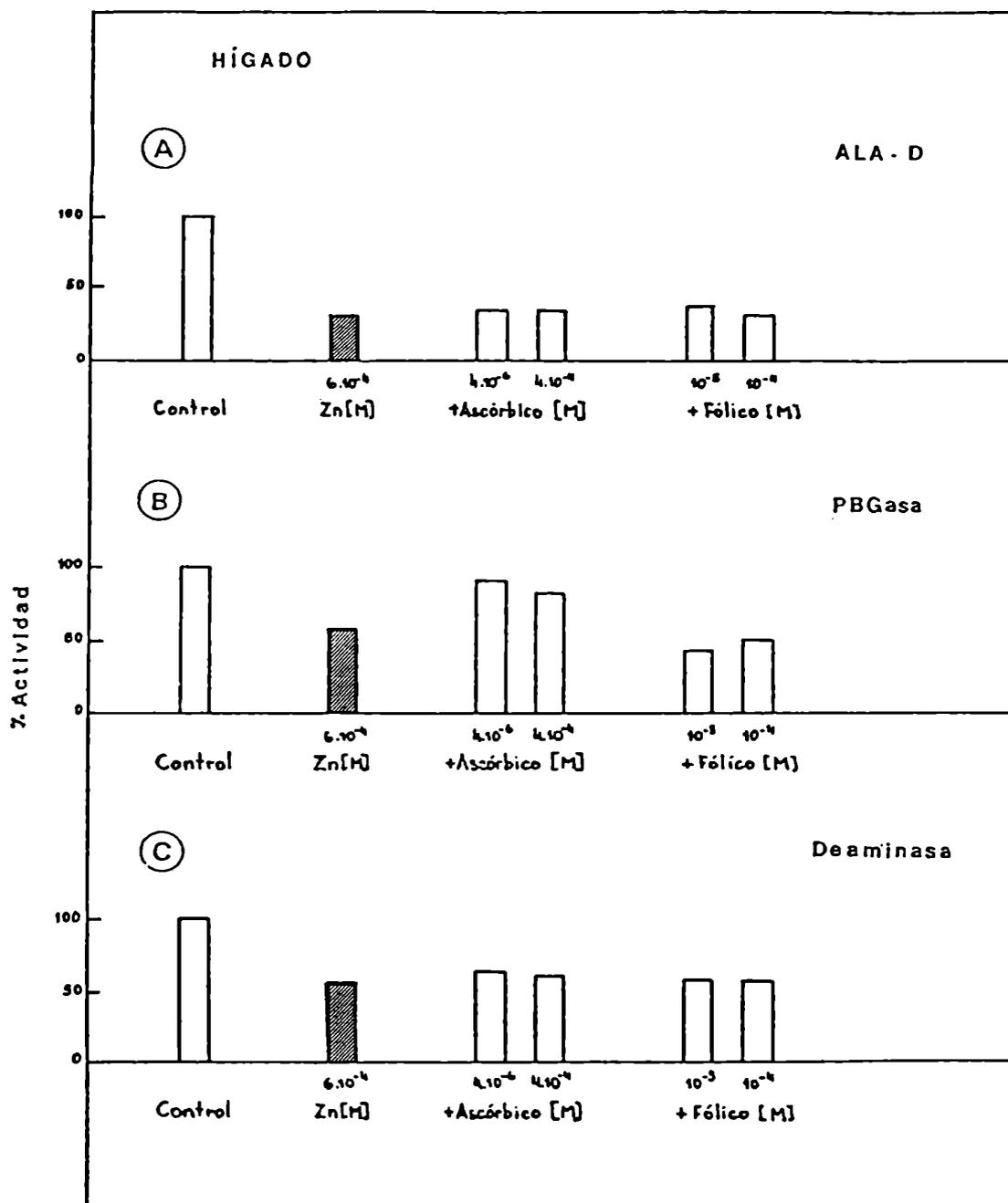


Figura 33: Efecto del ascórbico y fólico sobre la inhibición con zinc de las enzimas ALA-D (A), PBGasa (B) y Deaminasa (C) de hígado. Actividades y concentraciones expresadas como en la Figura 13.

Hay que tener por supuesto en cuenta la composición de la solución. Los buffers pueden interaccionar en diferente grado con los iones metálicos formando complejos. Los equilibrios que se producen en estos sistemas son complicados y generalmente desconocidos (Taqui Khan y Martell, 1967).

De las experiencias con cadmio y zinc se ha observado que ambos metales dan una curva característica de porcentaje de actividad en función de la concentración del elemento, para las enzimas estudiadas. Existe un rango de concentraciones en el cual las enzimas se inhiben por acción de estos metales y aparentemente son algo más resistentes a la inhibición por zinc.

Se han estudiado los efectos de combinaciones de concentraciones parcialmente inhibitorias de cadmio con concentraciones diversas de zinc, fólico y ascórbico. En algunos casos se ha observado que a ciertas concentraciones habría una activación enzimática y por lo tanto reversión del efecto inhibitorio del cadmio; sin embargo, los cambios, aunque apreciables, no son totalmente significativos.

Estos resultados están indicando que los efectos combinados son indudablemente complejos. Así, es probable que las enzimas que normalmente contienen zinc (caso del ALA-D), se puedan transformar fácilmente en las correspondientes enzimas que contienen cadmio, lo cual se ha demostrado por resonancia magnética nuclear con ^{13}C (Armitage, Pajer, Schoot Uiterkamp, Chlebowski y Coleman, 1976; Sudmeier y Bell, 1977; Armitage, Schoot Uiterkamp, Chlebowski y Coleman, 1978). Esto puede originar una actividad enzimática aumentada o disminuída en relación con la forma normal. La sustitución cadmio-zinc induce cambios en el ordenamiento de los enlaces de coordinación en la vecindad inmediata del sitio metálico, y como consecuencia deben esperarse modificaciones en la estructura terciaria de la proteína en cuestión.

Pero no hay que olvidar que el cadmio en los homogenatos no solamente se une a la enzima, sino también a otros componentes celulares. En presencia de un exceso de zinc, el cadmio podría liberarse de su unión a compuestos distintos de la enzima en estudio, y encontrarse así más disponible para interaccionar

con la misma. Esto podría llevar a una disminución en lugar de un aumento de actividad.

Tal como señaláramos antes (I.14) el ascórbico podría actuar en virtud de su poder reductor, o alternativamente asociándose a los metales. Según Taquij Khan y Martell (1967) el metal se uniría al ácido ascórbico en determinadas condiciones, según la forma indicada en la Figura 34 A.

Si bien en algunas experiencias la presencia de ascórbico produjo ligeros aumentos de la actividad enzimática, éstos no fueron ni significativos ni consistentes, lo cual podría deberse a un problema de estabilidad del ascórbico, que ya fuera discutido en III.2.7.

El ácido L-ascórbico cristalino es muy estable, pero en solución acuosa se oxida con gran facilidad, especialmente en medio neutro y alcalino. La descomposición de soluciones acuosas de ascórbico es lenta a temperatura ambiente y en anaerobiosis, pero en presencia de oxígeno y particularmente de ciertos iones como hierro y cobre la oxidación es rápida y autocatalítica.

Por oxidación el ascórbico se convierte en dehidroascórbico, que en tejidos animales puede transformarse nuevamente en la vitamina.

Pero el dehidroascórbico se descompone aproximadamente en una hora en solución acuosa neutra, generando el ácido 2,3-diceto-gulónico, biológicamente inactivo.

En base a estas consideraciones cuando se investigó la acción del ácido ascórbico sobre las enzimas, sus soluciones se prepararon siempre en el momento de usarlas, y se lo agregó inmediatamente antes de iniciar la incubación.

No se apreciaron ventajas entre incubaciones anaeróbicas en tubos de Thunberg con respecto a aquellas realizadas aeróbicamente.

Sin embargo, la inestabilidad de la vitamina puede haber ocasionado variaciones en los resultados.

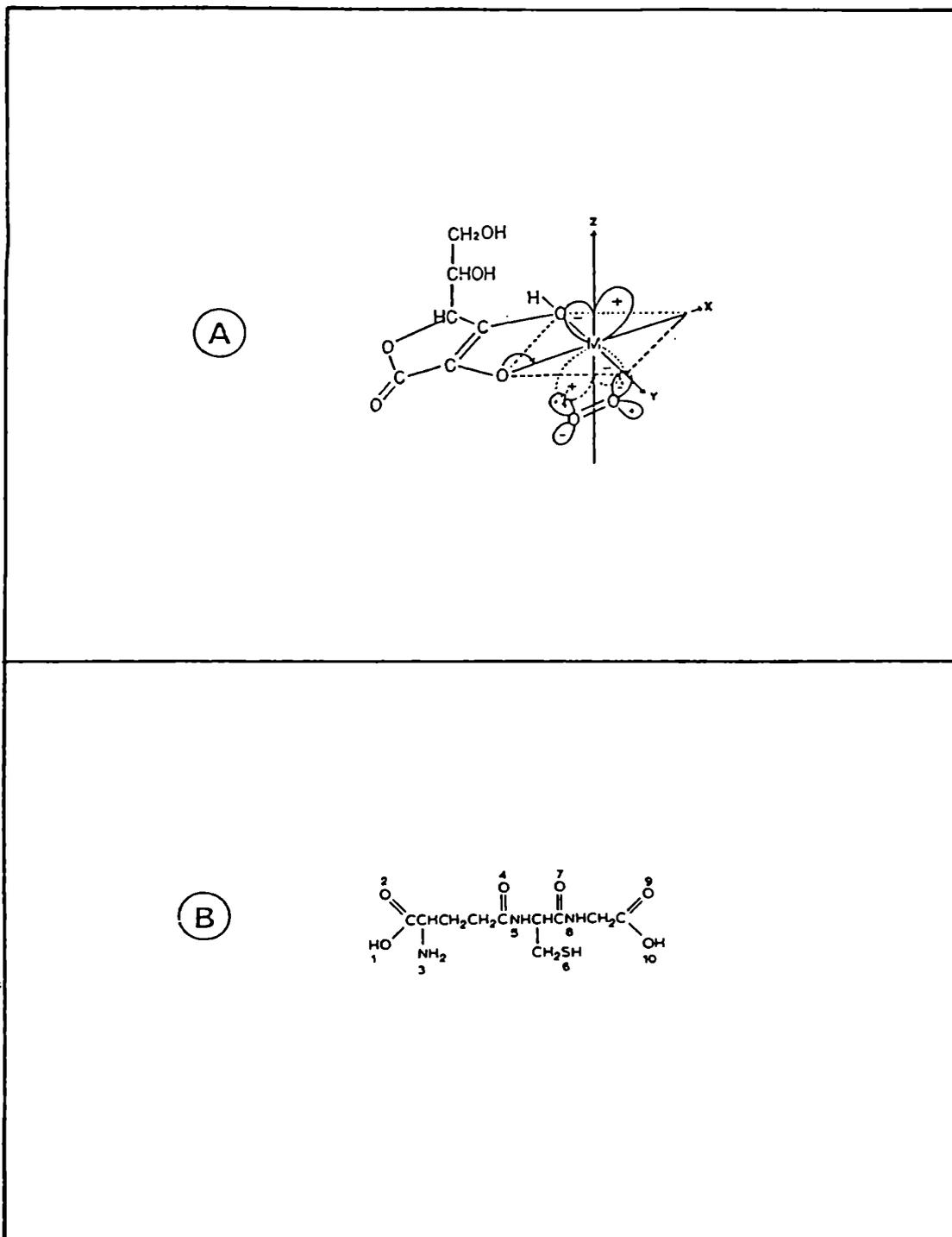


Figura 34: A = complejo metal-ascorbato-oxígeno propuesto por Taqui-Khan y Martell (1967).

B = fórmula del glutati6n (se hallan numeradas de 1 a 10 las posiciones que podrían intervenir en la formaci6n de complejos con el cadmio).

El uso de concentraciones de ascórbico superiores a 10^{-2} M produjo una disminución de la actividad enzimática de ALA-D en hígado (Figura 23 A).

El ácido fólico también mostró efectos variables.

El glutati6n (GSH) (Figura 34 B) se ha comportado siempre como un protector de la actividad del ALA-D en presencia de concentraciones inhibitorias de cadmio y de zinc. Pero a la concentraci6n de GSH usada (0,02 M) el efecto fue dependiente de la concentraci6n de cadmio y en ning6n caso se consigui6 revertir totalmente la inhibici6n por este metal; probablemente podría haberse logrado este efecto con una concentraci6n todavía más alta de GSH, pero hubieran empezado a jugar problemas de solubilidad.

Una de las funciones principales del GSH en hígado es la de proteger a las enzimas dependientes de grupos -SH, para evitar su autooxidaci6n. El GSH es el tiol no proteico más abundante del organismo ($500-10.000 \cdot 10^{-9}$ moles/g de tejido fresco) (Jocelyn, 1972). En las incubaciones aer6bicas de homogenatos o tejidos, su concentraci6n baja, de allí que con frecuencia en los métodos para la determinaci6n de ALA-D se emplea GSH en el medio de incubaci6n.

El grupo -SH es susceptible de muchas reacciones químicas de interés biol6gico: sustituci6n, adici6n, eliminaci6n u oxidaci6n, obteniéndose productos que contienen enlaces S-C, S-metal, S-S y S-O.

Los iones metálicos que forman sulfuros estables en ácidos con el SH₂, forman complejos estables de baja solubilidad con tioles como el GSH, entre ellos el cobre.

Los iones metálicos que forman sulfuros inorgánicos inestables en ácidos también forman complejos ti6licos simples que son menos estables, entre ellos el hierro.

En la quelaci6n participan a veces otros grupos. Estos deben estar disociados, y por lo tanto los tioles que los contienen pueden formar distintos complejos a distintos pH.

Según Li y Manning (1955) el cadmio forma complejos fuertes del tipo L^3- (L = ligante) con el GSH. En estas condiciones (ver Figura 34 B) el GSH se desprotona en las posiciones 1, 6 y 10 y puede usar las posiciones 1, 2, 3, 6, 9 y 10 y quizás 4 y 7 como sitios donores. Parece que la posición 6 se usa ciertamente, mientras que las otras posiciones donantes probables son 3, 1 (y/o 2) y 9 (y/o 10).

Por otro lado, se han realizado estudios de resonancia magnética nuclear con ^{13}C (Fuhr y Rabenstein, 1973) y con ^{113}Cd (Birgersson, Carter y Drakenberg, 1977). Sin embargo en ninguno de ellos fue posible inferir un modelo detallado de coordinación en soluciones, y la interacción S-Cd parece ser siempre importante.

El zinc también forma complejos con el GSH.

Existen varios trabajos (Walker y Williams, 1974; Corrie, Walker y Williams, 1976; Sanderson y Williams, 1977) acerca de la competencia entre el GSH y soluciones de zinc, cadmio y plomo. Los resultados son promisorios en el sentido de que el GSH podría ser un interesante agente quimioterapéutico para la eliminación del cadmio sin privar seriamente al organismo del zinc, que es un elemento esencial.

En conclusión, desafortunadamente *in vitro* a ninguna concentración el zinc, ascórbico y fólico solos o en mezclas han sido capaces de revertir la inhibición enzimática por cadmio. Empero dadas las propiedades de estas sustancias resulta de interés y necesario estudiar sus efectos *in vivo*. El cadmio produce alteraciones en los equilibrios de los metales esenciales del organismo que no son fáciles de reproducir *in vitro*, y además es posible que *in vivo* tenga lugar alguna acción en un paso anterior o posterior del camino metabólico del hemo, que eventualmente podría tener como consecuencia el efecto final esperado.

IV.3 Estudios *in vivo*

IV.3.1 Patología observada en los animales durante la intoxicación crónica con cadmio

IV.3.1.1 Aspectos experimentales

a) Administración de cadmio por vía oral

Las dosis utilizadas (50 ppm de cadmio en el agua de bebida) no produjeron síntomas obvios de morbilidad en los animales, salvo en un caso que se describe a continuación.

Se trataba de una rata Wistar, de 14 meses de edad al comenzar la experiencia (caso A). El animal recibió 50 ppm de cadmio en el agua de bebida durante 37 días. Luego se empleó una concentración de 60 ppm hasta el final de la experiencia.

Desde un principio esta rata emitía un volumen diario de orina aproximadamente 30% menor que las demás ratas intoxicadas y también que las testigos.

A lo largo de la experiencia se notó un aumento progresivo del sedimento de color blanco de la orina, el cual no presentaba fluorescencia rojiza a la luz UV.

A los 90 días se empezó a observar una disminución aún mayor del volumen diario de orina. A los 95 días éste era de sólo 3 ml, del cual, luego de centrifugar a 800 g, se obtenían aproximadamente 0,5 ml de sedimento.

Se produjo además parálisis de los miembros inferiores, en uno de ellos total, e hinchazón notoria del abdomen. La columna vertebral presentaba rigidez. Estos últimos efectos se hicieron evidentes a partir de los 95 días.

Al sacrificar la rata a los 105 días, se extrajeron 80 g de un líquido de color amarillo claro del abdomen.

Si se descuenta este líquido acumulado, la rata experimentó una disminución del 11% de su peso inicial. Colucci, Winge y Krasno (1975) también han hallado que algunos animales desarro-

llan abdomen distendido con acumulación de líquido luego de la inyección de 5 ó 6 dosis de 2 mg/kg de cadmio, o de dosis aún más altas, por vía i.p.

Otras funciones, como la excreción de materia fecal, continuaron siendo normales hasta el momento del sacrificio.

Estos efectos no se lograron reproducir en ningún animal, ni siquiera aumentando el tiempo de exposición al cadmio a 155 días.

b) Administración de cadmio por vía i.p.

Luego de la inyección i.p. de dosis de 0,6 mg/kg, los animales presentan, a veces, flaccidez y tono muscular disminuído en el abdomen y extremidades posteriores. La Figura 35 ilustra el aspecto que suelen presentar los animales. Luego de una hora estos efectos desaparecen.

La mayoría de las ratas mantienen a lo largo de la experiencia un aspecto normal. Sin embargo, al aumentar el número de las dosis, van oponiendo menos resistencia al ser levantadas de sus jaulas, lo que no ocurre con las ratas que reciben igual número de dosis de solución fisiológica.

Al sacrificarlos, se observa que los animales que han recibido siete o más dosis presentan los lóbulos hepáticos más grandes fusionados entre sí. Dichos lóbulos se hallan redondeados y han perdido sus bordes, como puede observarse en las Figuras 36 A y 36 B.

A pesar de ello, animales que han recibido a la edad de ocho meses 17 inyecciones de 0,6 mg Cd/kg presentaron una sobrevida de por lo menos diez meses, momento en el cual fueron sacrificados los últimos animales del lote.

A pesar de que las ratas no mostraban síntomas clínicos de morbilidad, el hígado presentaba siempre el aspecto patolójico característico descrito e ilustrado en las Figuras 36 A y 36 B.

No se observaron variaciones del peso de los hígados en relación con el avance de la intoxicación.

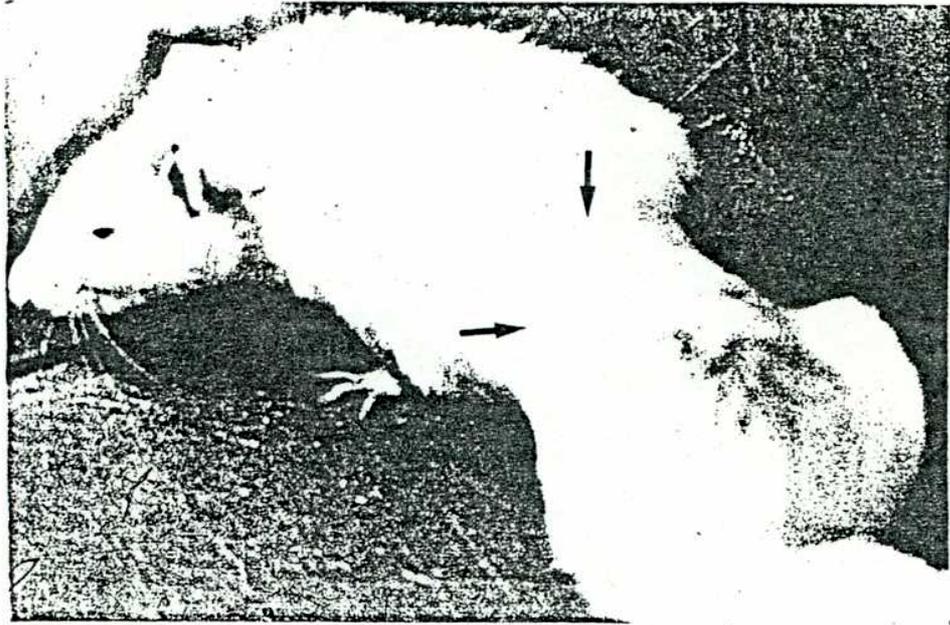


Figura 35: Aspecto de los animales pocos minutos después de la inyección i.p. de cadmio (0,6 mg/kg). Las flechas señalan flaccidez y tono muscular disminuido en el abdomen y extremidades inferiores.

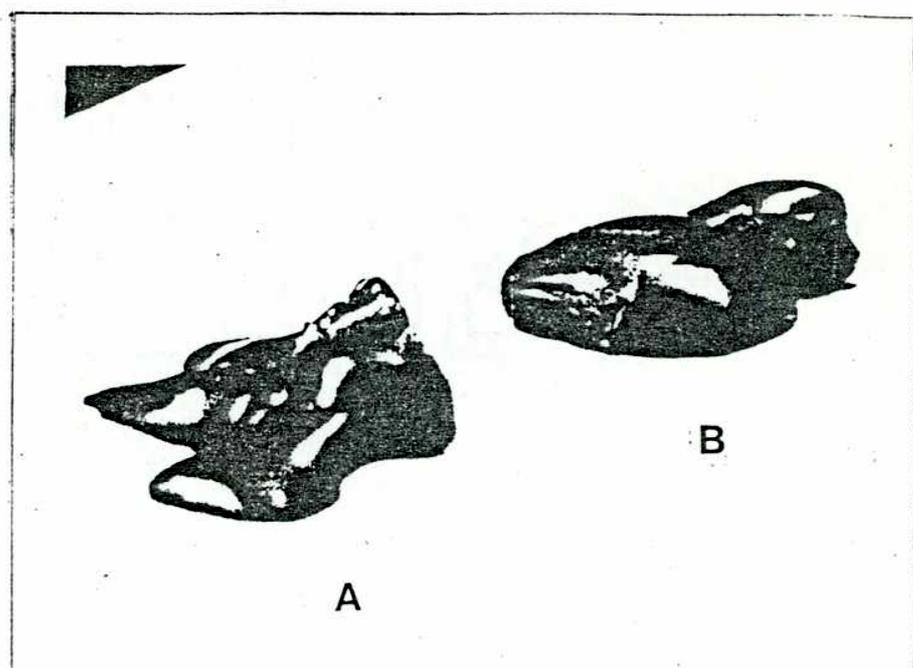
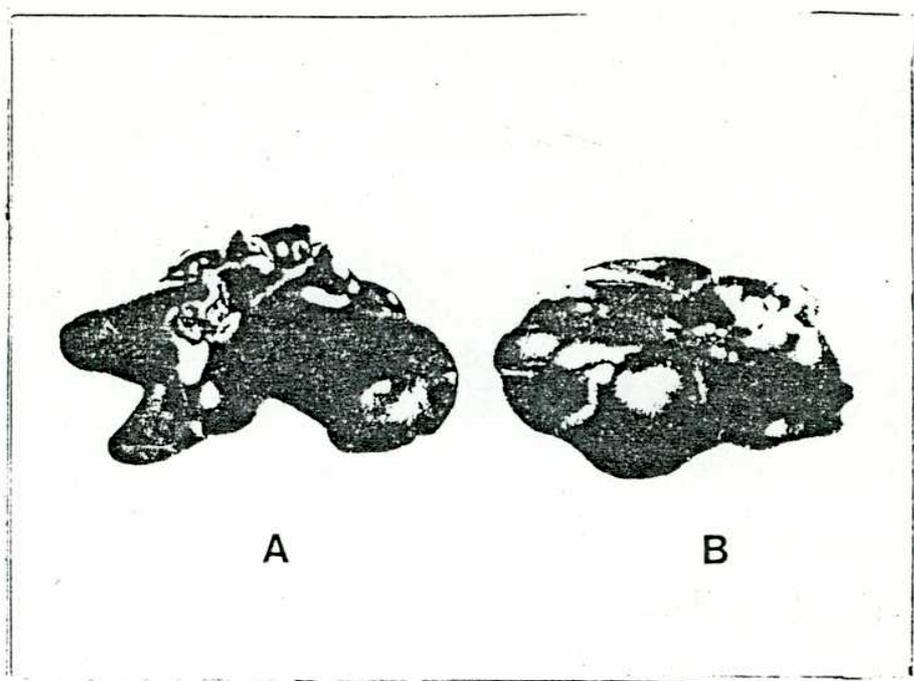


Figura 36: Aspecto del hígado, (A) de un animal control y (B) de una rata que ha recibido siete dosis de 0,6 mg Cd/kg i.p. Los lóbulos hepáticos más grandes se hallan fusionados entre sí. Dichos lóbulos se hallan redondeados y han perdido sus bordes. Las dos fotografías muestran los mismos hígados vistos desde caras distintas.

Ninguno de los animales presentó tampoco alguna anomalía que se pudiera relacionar con las observadas en el caso A, luego de la administración prolongada del cadmio por vía oral.

IV.3.1.2 Discusión y conclusiones

El caso A podría considerarse como una excepción. Sin embargo, en este animal se habría logrado inducir una patología vinculada con las lesiones renales y óseas descriptas para la enfermedad de Itai-Itai.

Varios autores han encontrado excreción aumentada de calcio y fosfatos durante la exposición laboral al cadmio (Adams, Harrison y Scott, 1969; Kazantzis, 1978). De estas observaciones se sugirió que los cambios óseos son consecuencia de la alteración renal, y posiblemente estén relacionados con un disturbio en el metabolismo de la vitamina D. Sin embargo, también se ha propuesto que la lesión renal podría provenir de una acción directa del metal en el tejido óseo (Kawamura, Yoshida y Nishino, 1978).

La patología observada luego de la inyección i.p. repetida de cadmio, aunque ha sido estudiada en detalle por diversos autores (Stowe, Wilson y Goyer, 1972; Friberg et al., 1974), no reproduce ciertos aspectos característicos de la intoxicación humana crónica, en la cual, debido a la distinta vía de ingreso, el cadmio se acumula con una concentración mayor en riñón que en hígado.

IV.3.2 Actividad de las enzimas de la biosíntesis del hemo luego de la administración de cadmio por vía oral durante períodos prolongados

En todas las experiencias se administró 50 ppm de cadmio en el agua de bebida, trabajándose siempre en paralelo con lotes de controles.

Se efectuaron experiencias de distinta duración: 80, 120 y 155 días. Los animales se sacrificaron 48 horas después de suspendida la administración del metal, salvo en casos particulares que se mencionarán oportunamente.

Se determinaron las actividades enzimáticas en hígado, riñón y GR.

La Figura 37 muestra las actividades de ALA-D de GR y órganos de ratas que bebieron durante 120 días agua contaminada con 50 ppm de cadmio. Mientras que en hígado las actividades están aumentadas un 11% respecto a los controles, la actividad en GR ha disminuído entre un 25 y un 50%, con un valor promedio de 29% de inhibición.

La Figura 38 presenta los resultados de la experiencia de 80 días. Mientras que las actividades de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa de hígado y riñón de los animales contaminados no mostraron cambios con respecto a los controles, o tan sólo experimentaron muy ligero aumento, en GR el ALA-D disminuyó un 40% y la Deaminasa un 20%, en tanto que la PBGasa estaba incrementada en un 20%.

La Figura 39 muestra que, aumentando el tiempo de exposición al metal a 155 días, los resultados son muy similares a los de las anteriores experiencias. Mientras que la actividad de las enzimas de GR, en especial el ALA-D, está generalmente disminuída, las enzimas de hígado y riñón se encuentran sólo en algunos casos ligeramente aumentadas con respecto a los controles.

El ALA-D de GR fue la enzima más sensible a la inhibición por cadmio. Sin embargo, a pesar de que consistentemente se observaron descensos de la actividad de dicha enzima, no parecería existir una correlación entre tiempo de administración y disminución de actividad.

Es probable que el aumento de la concentración del metal, con una prolongación en el tiempo de exposición, no haya sido suficiente como para exacerbar los efectos ya observados a tiempos menores.

De acuerdo con lo discutido previamente, la administración i.p. del metal permite una mayor acumulación del mismo en períodos más cortos, sobre todo en hígado. Por ello suponemos que empleando esa vía poco usual de ingreso del tóxico al organismo, podrían obtenerse algunos resultados y conclusiones inte

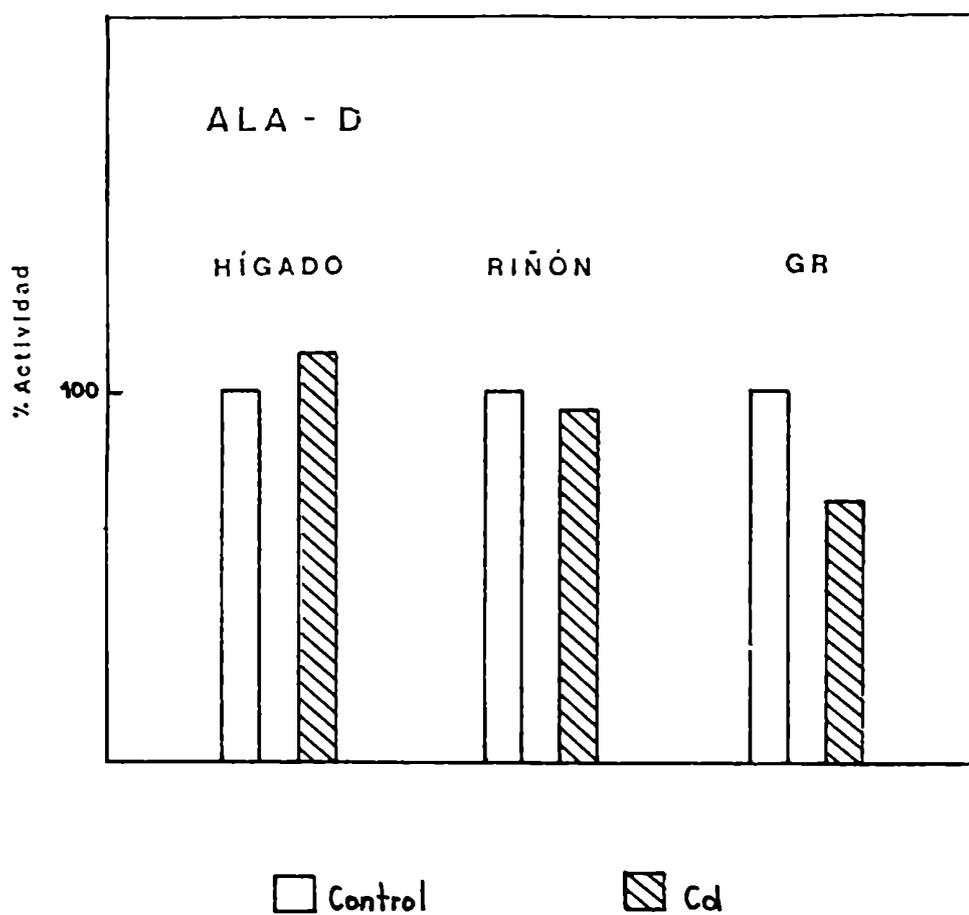


Figura 37: Actividad del ALA-D, luego de la intoxicación con 50 ppm de cadmio en el agua de bebida durante 120 días. Los animales se sacrificaron 48 horas después de suspendido el tratamiento. Los resultados están expresados como porcentajes de actividad con respecto a los controles tomados como 100%. Los valores representados son el promedio de tres determinaciones. Las actividades de los controles son similares a las de la Figura 11.

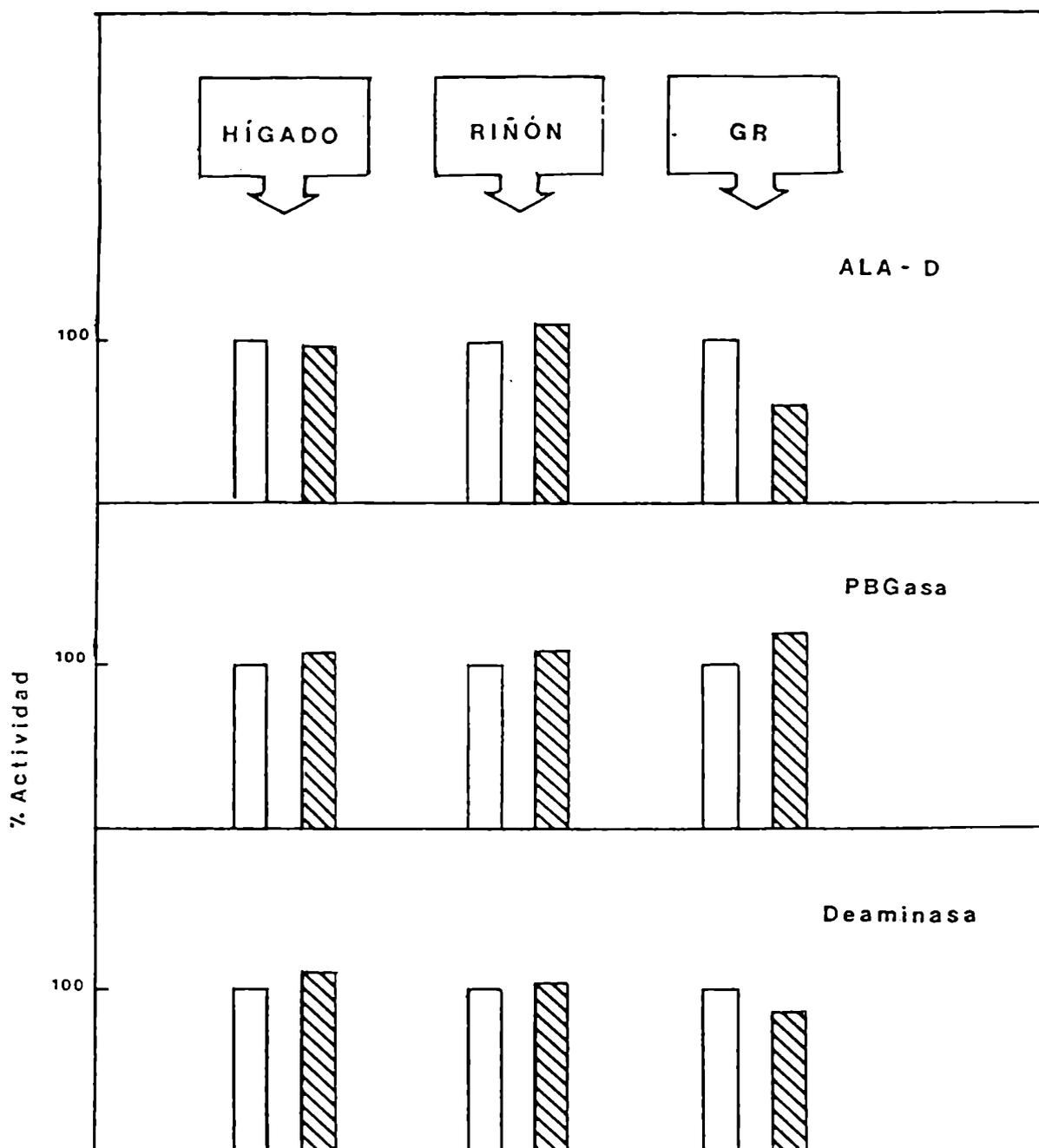


Figura 38: Intoxicación con 50 ppm de cadmio en el agua de bebida durante 80 días. Las actividades de los controles son similares a las de las Figuras 11 y 12.

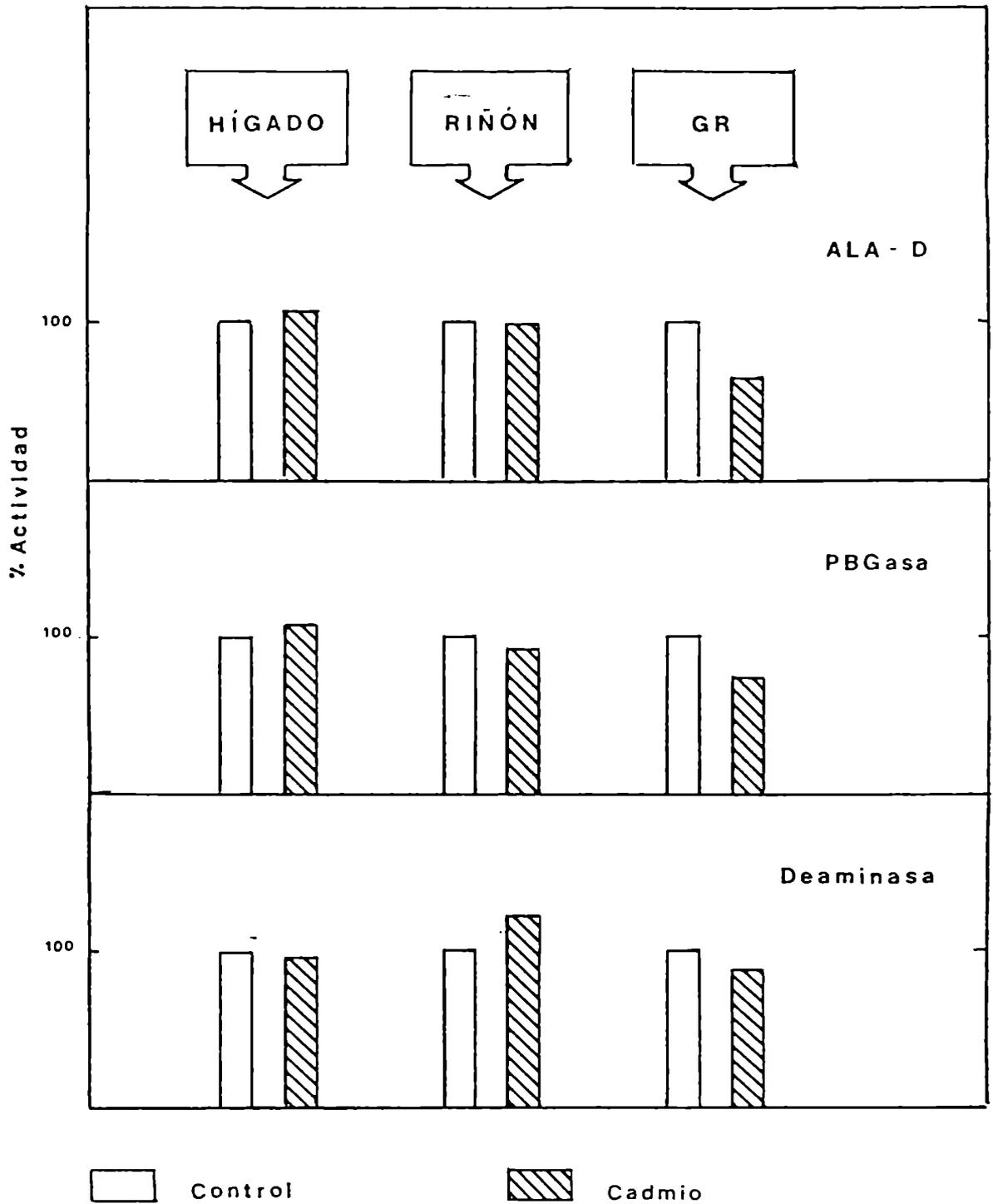


Figura 39: Intoxicación con 50 ppm de cadmio en el agua de bebida durante 155 días. Las actividades están expresadas igual que en la Figura 38.

resantes, de manera que se planearon a continuación una serie de experiencias de intoxicación durante lapsos menores utilizando la administración i.p.

IV.3.3 Actividad de las enzimas de la biosíntesis del hemo luego de la administración de cadmio por vía i.p.

En la Figura 40 se presentan los porcentajes de actividad enzimática con respecto a los controles obtenidos a lo largo de distintas experiencias.

Como se verá en la sección IV.3.5, después de la aplicación de una única dosis de 0,6 mg Cd/kg de peso, la acumulación de cadmio en hígado y en riñón fue mucho menor que luego de la administración prolongada de 50 ppm por vía oral. En este caso sólo se observaron leves descensos de las actividades enzimáticas, en tanto que en hígado dichas actividades se hallaban ligeramente aumentadas. No se observaron diferencias al sacrificar los animales 24, 48 ó 72 horas después de la inyección.

En otras experiencias, se estudiaron grupos de animales a los cuales se administraron inyecciones de 0,6 mg Cd/kg, tres veces por semana. Distintos grupos de animales recibieron diferente número de dosis. Los animales se sacrificaron siempre 48 horas después de la última dosis. Los resultados obtenidos están también representados en la Figura 40.

Se han incluido asimismo en esta figura los valores de actividad enzimática obtenidos en una experiencia durante la cual se aplicaron 12 inyecciones de cadmio de 0,55 mg/kg de peso, ya que la diferencia con la dosis habitual de 0,6 mg/kg de peso no es grande.

De la observación de la Figura 40 pueden sacarse las siguientes conclusiones respecto de las actividades enzimáticas:

a) ALA-D

En hígado y riñón los porcentajes de actividad se mantienen cercanos al 100%. En GR y bazo el ALA-D se encuentra en la mayoría de los casos inhibida, pero no se ha hallado una proporcionalidad entre dosis recibida y grado de inhibición.

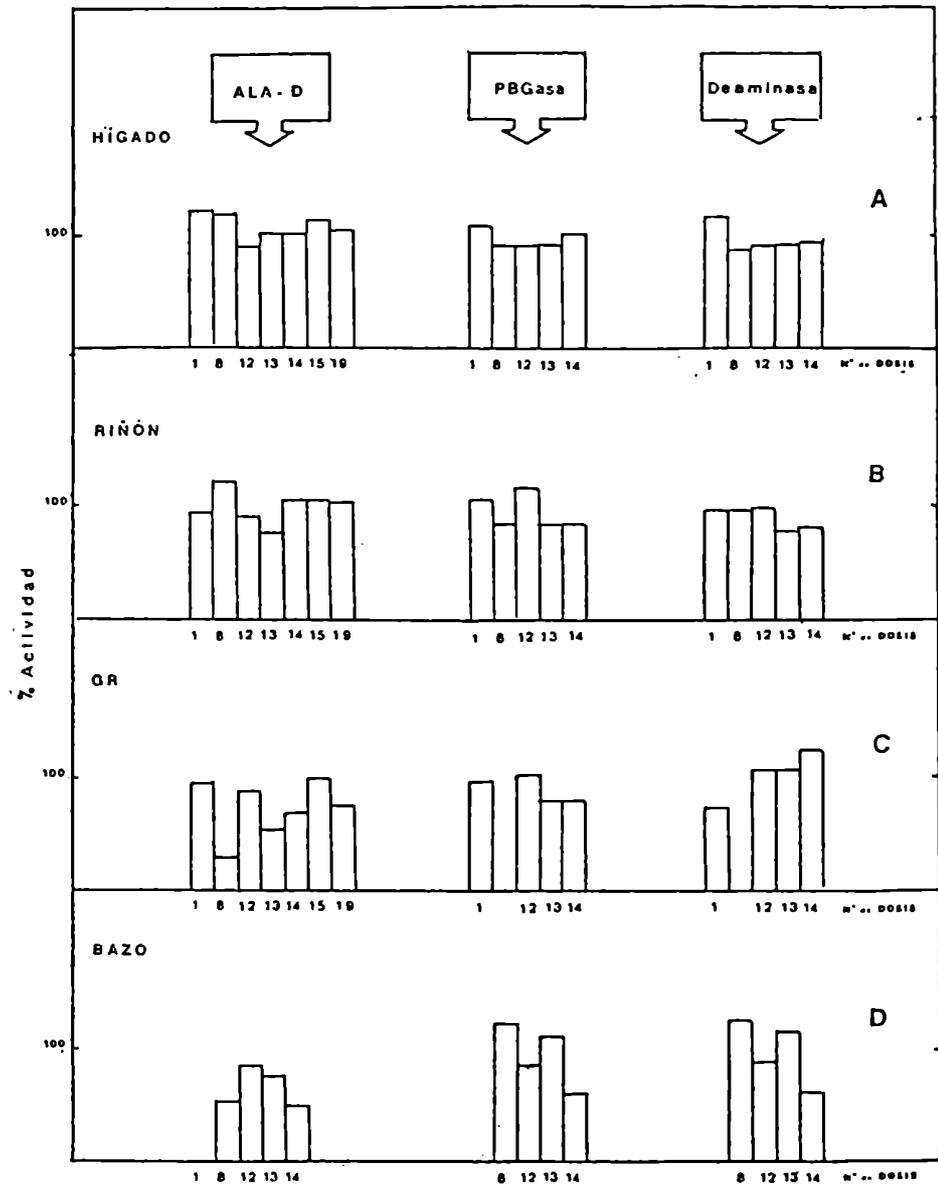


Figura 40: Administración de cadmio por vía i.p. Resumen de los porcentajes de actividad enzimática promedio en relación con los respectivos controles obtenidos luego de diferente número de dosis de cadmio a lo largo de distintas experiencias. Las dosis son de 0,6 mg/kg de peso, salvo para 12 dosis que se aplican de 0,55 mg/kg. Los animales se sacrificaron 48 horas después de suspendido el tratamiento. Para las diferentes dosis la desviación standard (s) en relación con los respectivos valores osciló entre 6 y 14% en hígado y riñón, alcanzando un 32% en bazo y GR. La actividad de los controles es similar a la de las Figuras 11 y 12.

b) PBGasa y Deaminasa

En hígado y riñón los valores promedio de las distintas determinaciones son similares a los de los controles. En algunos casos se registran ligeras inhibiciones, que de acuerdo con la estadística (prueba t) no resultan significativas. En bazo los valores resultaron muy irregulares. En GR la PBGasa presenta valores promedio menores que la Deaminasa, pero la variación de los datos individuales es grande como para asegurar una tendencia definida.

Se efectuaron algunas determinaciones de los niveles enzimáticos en animales que sobrevivieron dos meses después de la última inyección del metal y los resultados se hallan representados en la Figura 41.

Evidentemente existe mucha variación individual, ya que en una rata luego de 14 inyecciones del metal el ALA-D y la PBGasa de GR y bazo se encontraron aumentadas; en cambio en el caso del animal que había recibido 15 inyecciones, la actividad del ALA-D en esas mismas fuentes estaba significativamente disminuída con respecto a los controles, en tanto que en hígado y riñón presentaba valores cercanos al 100% y del mismo orden que los obtenidos para esta enzima en los animales que habían sido sacrificados 48 horas después de la dosis 15 (Figura 40 A y B).

En la Figura 42 se observa que por administración de dosis más altas (6 inyecciones de 1,10 mg Cd/kg de peso) se obtienen en bazo y GR actividades de ALA-D superiores a las de los controles, no habiéndose observado en ningún caso inhibición enzimática, a pesar de que la cantidad total de metal administrada fue la misma que en las experiencias en las cuales se emplearon dosis menores.

IV.3.4 Estudio del efecto de posibles agentes terapéuticos: ácido ascórbico y zinc

El objeto de la administración de estas sustancias fue doble: estudiar la respuesta de los animales a los mismos y tratar de esclarecer mecanismos de acción del cadmio.

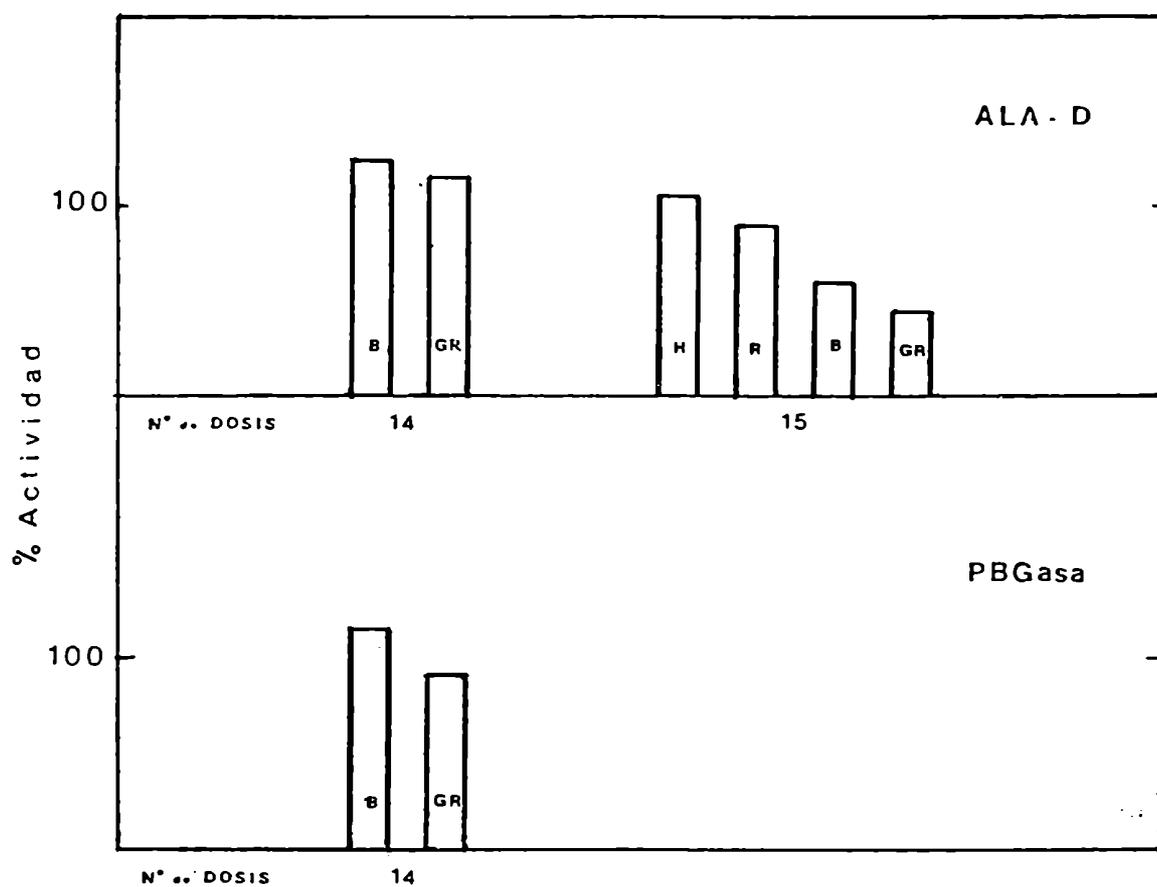


Figura 41: Efecto del cadmio administrado por vía i.p. dos meses atrás (dosis de 0,6 mg/kg). Las actividades en hígado (H), riñón (R), bazo (B) y glóbulos rojos (GR) están expresadas igual que en la Figura 40.

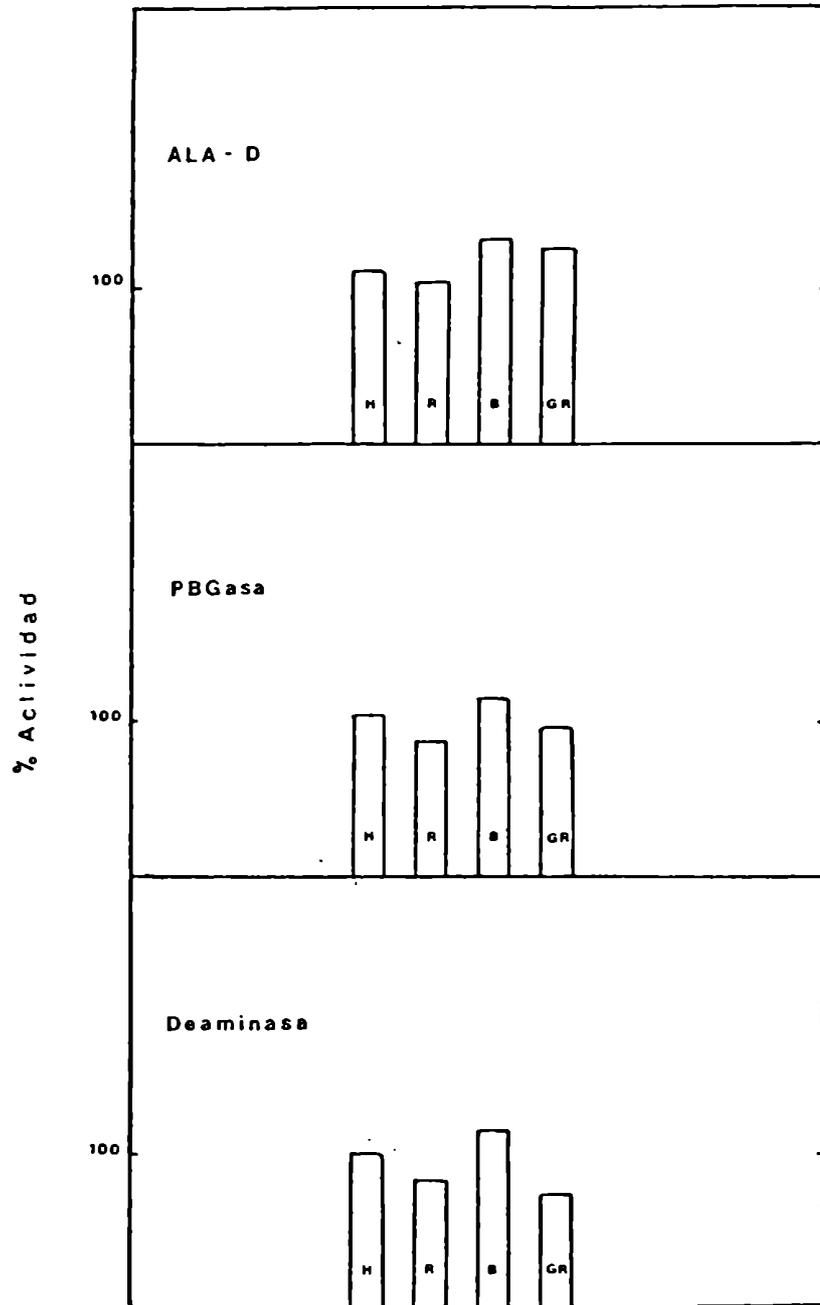


Figura 42: Efecto del cadmio administrado por vía i.p. Los animales recibieron seis dosis de 1,1 mg/kg. Las actividades están expresadas igual que en la Figura 40.

En los casos en que se estudiaron efectos conjuntos se trabajó siempre con un grupo control que sólo recibía inyecciones de solución fisiológica, un grupo que recibía el posible agente terapéutico solo, un grupo que recibía conjuntamente el agente terapéutico y cadmio, y otro grupo que recibía el correspondiente número de dosis de cadmio.

IV.3.4.1 Estudio de los efectos cadmio-zinc

Se usaron dos niveles de intoxicación (bajos y altos).

Las concentraciones de cadmio y zinc, y la frecuencia de administración a cada uno de dichos niveles fueron:

- a) Dosis bajas: i) cadmio, 0,55 mg/kg, 3 veces por semana (vía i.p.)
ii) zinc, 2,4 mg/kg, 5 veces por semana (vía s.c.)

El tiempo de duración del tratamiento con el o los metales fue de dos días en la experiencia corta (una inyección de cadmio y dos de zinc) y de un mes en la experiencia larga.

- b) Dosis altas: i) cadmio, 1,10 mg/kg, 3 veces por semana (vía i.p.)
ii) zinc, 12 mg/kg, 2 veces por semana (vía s.c.)

El tiempo de duración del tratamiento con el o los metales fue de dos días en la experiencia corta (una inyección de cadmio y dos de zinc) y de dos semanas en la experiencia larga. En la experiencia corta se alteró algo el esquema general, ya que el zinc se administró dos días consecutivos.

Los animales se sacrificaron siempre 48 horas después de la última inyección de cadmio y de zinc.

Se debe notar que las dosis totales de cadmio y de zinc administradas durante las experiencias largas con dosis altas y bajas fueron iguales.

IV.3.4.1.1 Efectos del cadmio

Los efectos del cadmio obtenidos al administrar diferentes dosis del metal ya han sido estudiados comparativamente.

De todas maneras, en la Figura 43 se representan los efectos del cadmio sobre las actividades del ALA-D, PBGasa y Deaminasa hallados para este grupo de experiencias en particular. En esta figura se confirman las diferencias señaladas al emplear dosis bajas y dosis altas (Figuras 40 y 42).

IV.3.4.1.2 Efectos del zinc

El zinc es un metal que induce la formación de metalotioneínas cuando las dosis exceden un cierto nivel. Por ello se analizaron los efectos de "dosis altas" inductoras de metalotioneínas (12 mg/kg) y de "dosis bajas" a las cuales no se observó acumulación del metal en órganos (2,4 mg/kg).

Como se puede observar en la Figura 44, empleando dos dosis altas de zinc se produjeron aumentos de la actividad del ALA-D de GR y riñón, mientras que duplicando el número de las mismas dosis se registraron aumentos en la actividad del ALA-D de riñón y bazo.

Empleando dosis bajas de zinc no se observaron modificaciones significativas en el promedio de las actividades del ALA-D de GR (Figura 45). En cambio, la actividad en bazo fue bastante variable, produciéndose tanto aumentos como disminuciones de la misma.

IV.3.4.1.3 Estudio de los efectos cadmio-zinc

Estas experiencias arrojaron resultados interesantes.

La administración conjunta cadmio-zinc produce aumentos de la actividad del ALA-D en bazo y GR, y ocasionalmente en hígado y riñón (Figura 46).

Algunos efectos ya se pueden observar luego de la administración de solamente una inyección de cadmio y dos de zinc (Figura 46) aunque la dispersión de valores en este último ca-

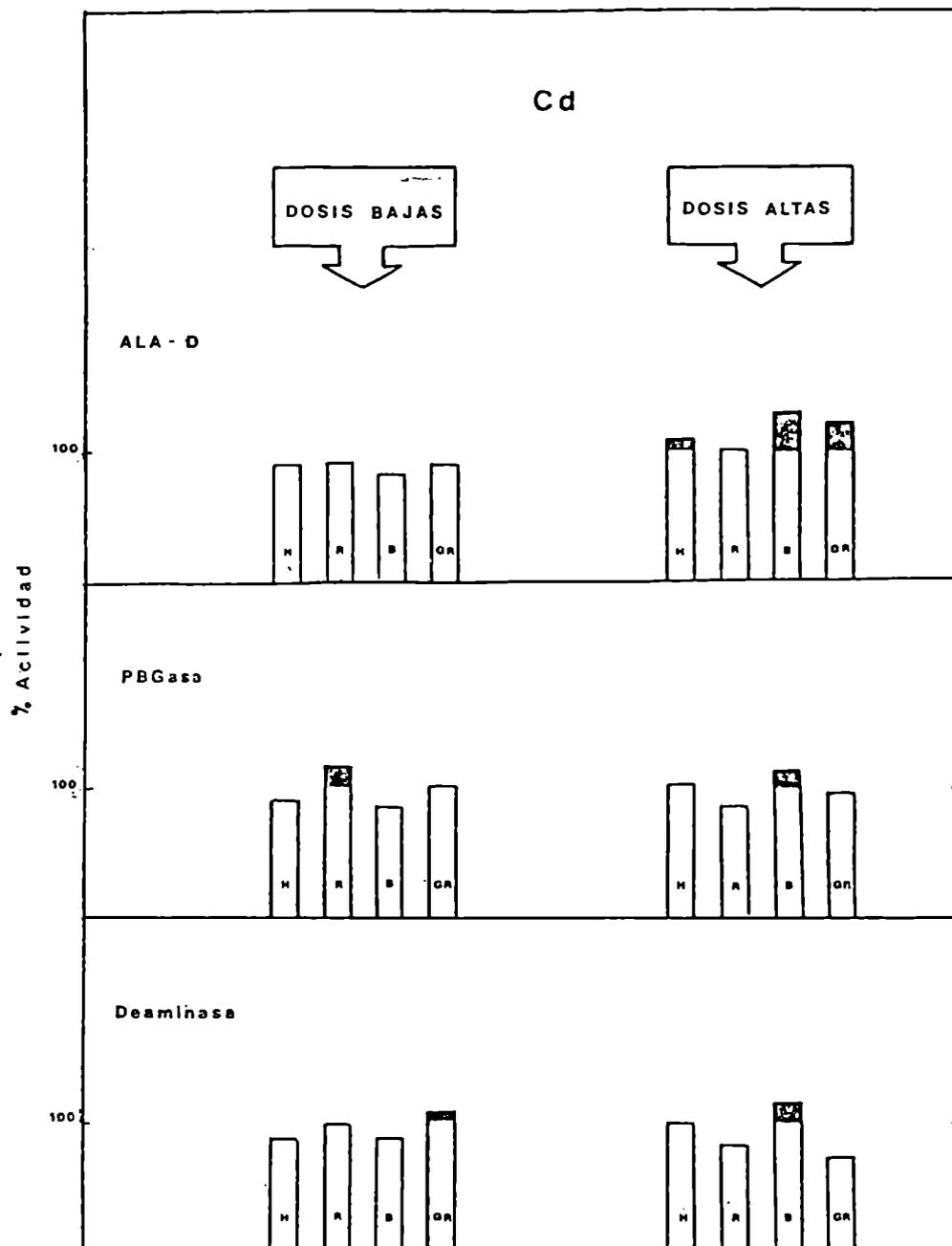


Figura 43: Experiencia cadmio-zinc. Efecto del cadmio inyectado por vía i.p. sobre las actividades enzimáticas. Los animales recibieron tres veces por semana dosis bajas (0,55 mg/kg, total 12 dosis) o bien dosis altas (1,1 mg/kg, total 6 dosis), sacrificándose siempre 48 hs después de la última inyección. Las actividades están expresadas igual que en la Figura 40. Se han sombreado las activaciones enzimáticas con respecto a los controles.

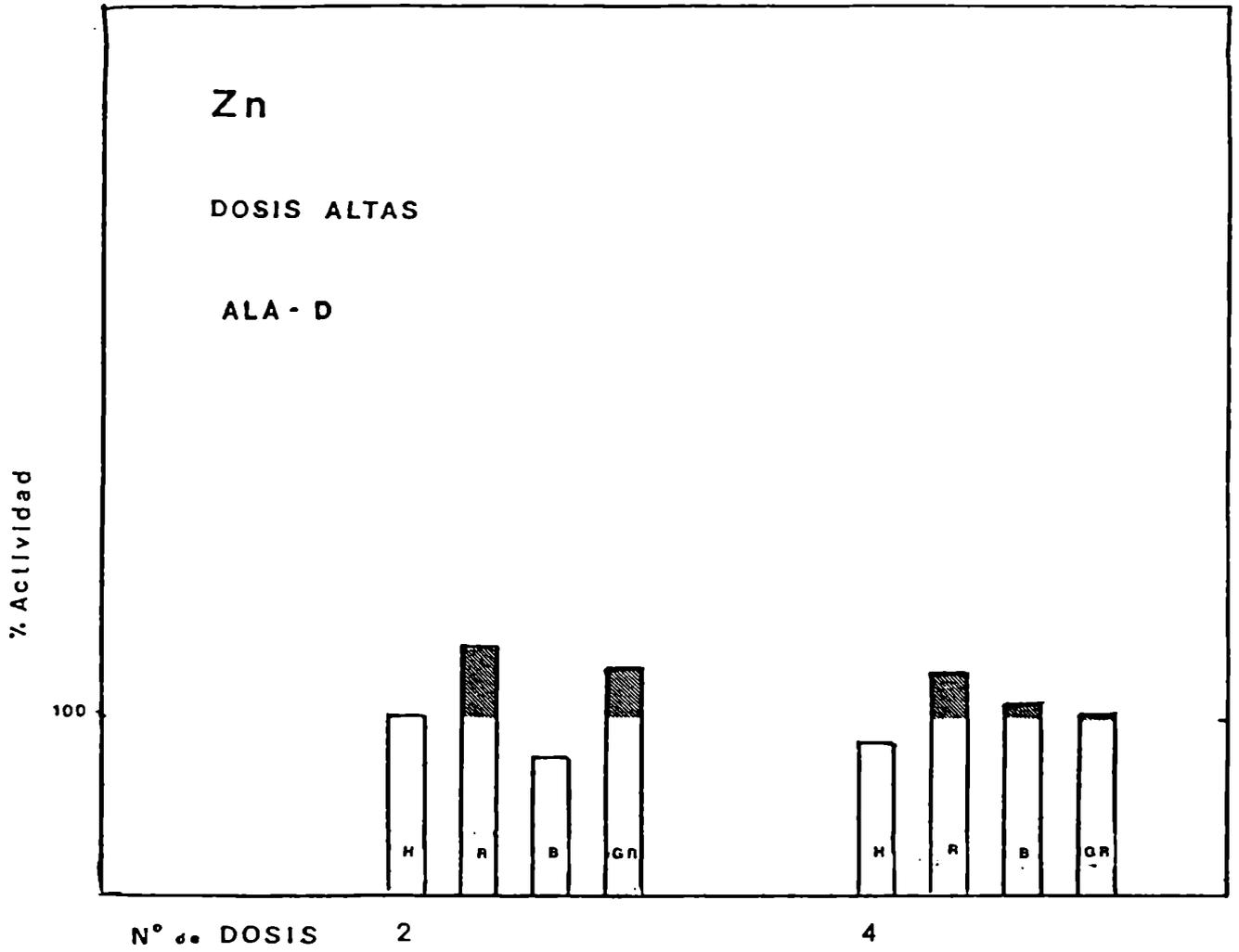


Figura 44: Experiencias cadmio-zinc. Efecto del zinc inyectado por vía s.c. sobre la actividad de ALA-D. Los animales recibieron dos veces por semana dosis de 12 mg/kg de peso. Las actividades están expresadas igual que en la Figura 43.

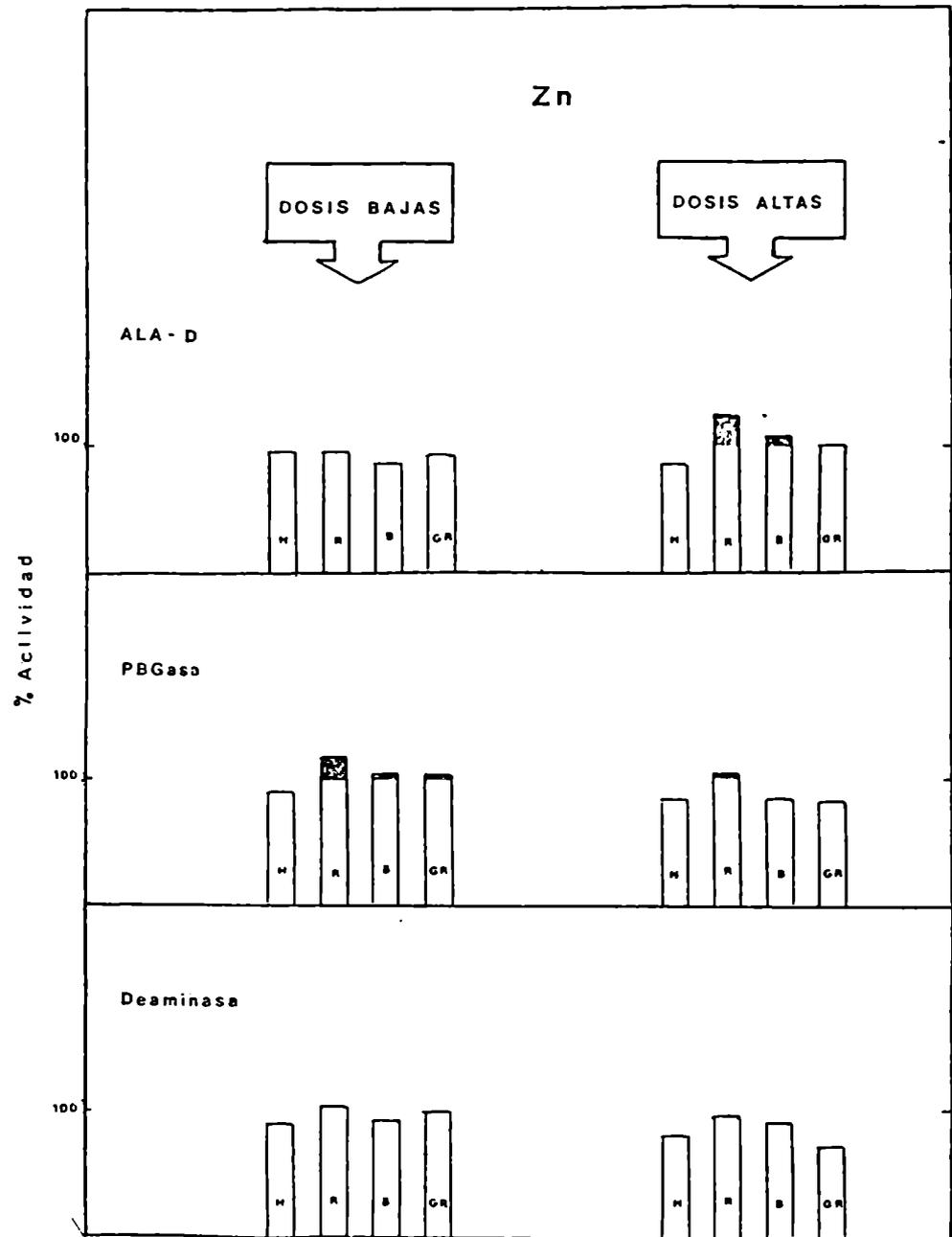


Figura 45: Experiencias cadmio-zinc. Efecto del zinc inyectado por vía s.c. sobre las actividades enzimáticas. Los animales recibieron dosis bajas (2,4 mg/kg, 5 veces por semana, total 20 dosis) o bien dosis altas (12 mg/kg, 2 veces por semana, total 4 dosis). Las actividades están expresadas igual que en la Figura 43. En este caso las s de las determinaciones en GR resultaron bajas, mientras que en bazo fueron del 23% con respecto a los valores de actividad obtenidos.

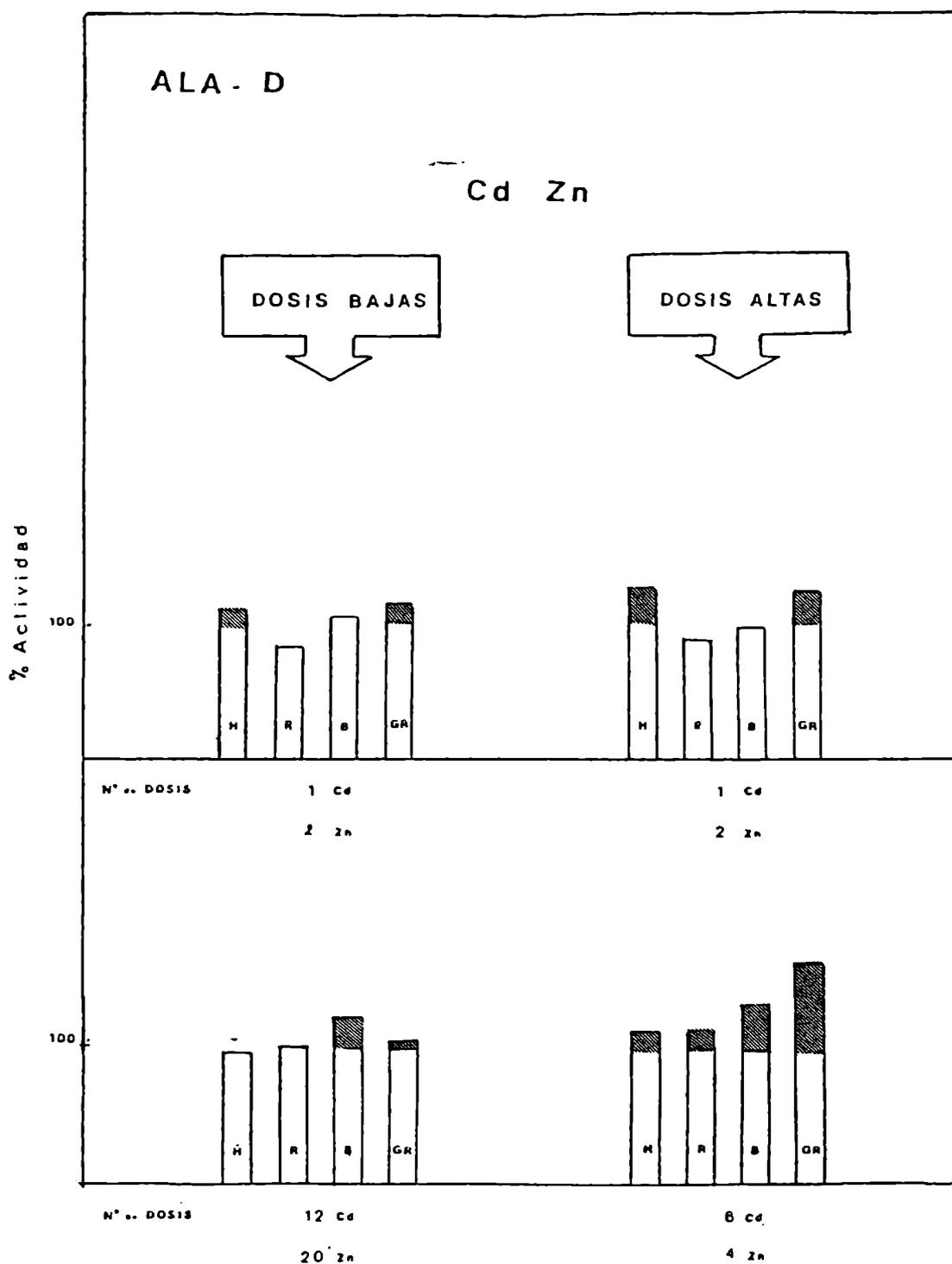


Figura 46: Experiencias cadmio-zinc. Efectos combinados cadmio-zinc sobre la actividad enzimática de ALA-D luego de la aplicación de diferente número de dosis de cadmio y de zinc. El cadmio siempre se aplicó tres veces por semana vía i.p. (dosis bajas: 0,55 mg/kg; dosis altas: 1,1 mg/kg); el zinc (vía s.c.) en dosis bajas (2,4 mg/kg) se aplicó a diario y en dosis altas (12 mg/kg) dos veces por semana. Una excepción es la experiencia de corta duración con dosis altas, en la cual el zinc se aplicó dos días seguidos. Actividades expresadas igual que en la Figura 43.

so es bastante grande.

Los máximos aumentos de actividad se hicieron evidentes luego de la administración de seis inyecciones de cadmio y cuatro de zinc (dosis altas), habiéndose observado en GR una activación máxima del 80% y en bazo del 50% sobre los valores de los controles. La estadística (prueba t) nos indica que el aumento resulta significativo con respecto a los controles ($p < 0,01$). También se hallaron activaciones máximas de 37% en hígado y de 24% en riñón.

En cuanto a las otras enzimas de la biosíntesis del hemo estudiadas, los animales que recibieron dosis altas varias veces presentan también significativamente aumentadas la PBGasa y la Deaminasa de bazo y la PBGasa de GR, hallándose la Deaminasa de GR ligeramente inhibida (Figura 47).

Luego de la administración de la serie de dosis bajas se registraron aumentos de la actividad de la PBGasa y Deaminasa de GR, mientras que los efectos sobre la PBGasa y Deaminasa de bazo resultaron muy variables.

IV.3.4.2 Estudio de los efectos cadmio-ascórbico

El cadmio se administró en dosis de 0,6 mg/kg por vía i.p. tres veces por semana.

El ácido ascórbico se aplicó por vía s.c. en dosis de 20 mg/kg cinco veces por semana, dosis apenas superior a la terapéutica para seres humanos.

IV.3.4.2.1 Efectos del cadmio

Los efectos del cadmio sobre las actividades enzimáticas de ALA-D, PBGasa y Deaminasa fueron similares a los obtenidos en experiencias anteriores. Se representan en las Figuras 48, 49, 50 y 51 para hígado, riñón, bazo y GR respectivamente.

IV.3.4.2.2 Efectos del ácido ascórbico

El ascórbico se presentó como un activador de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa de bazo y GR (Figuras 50 y 51).

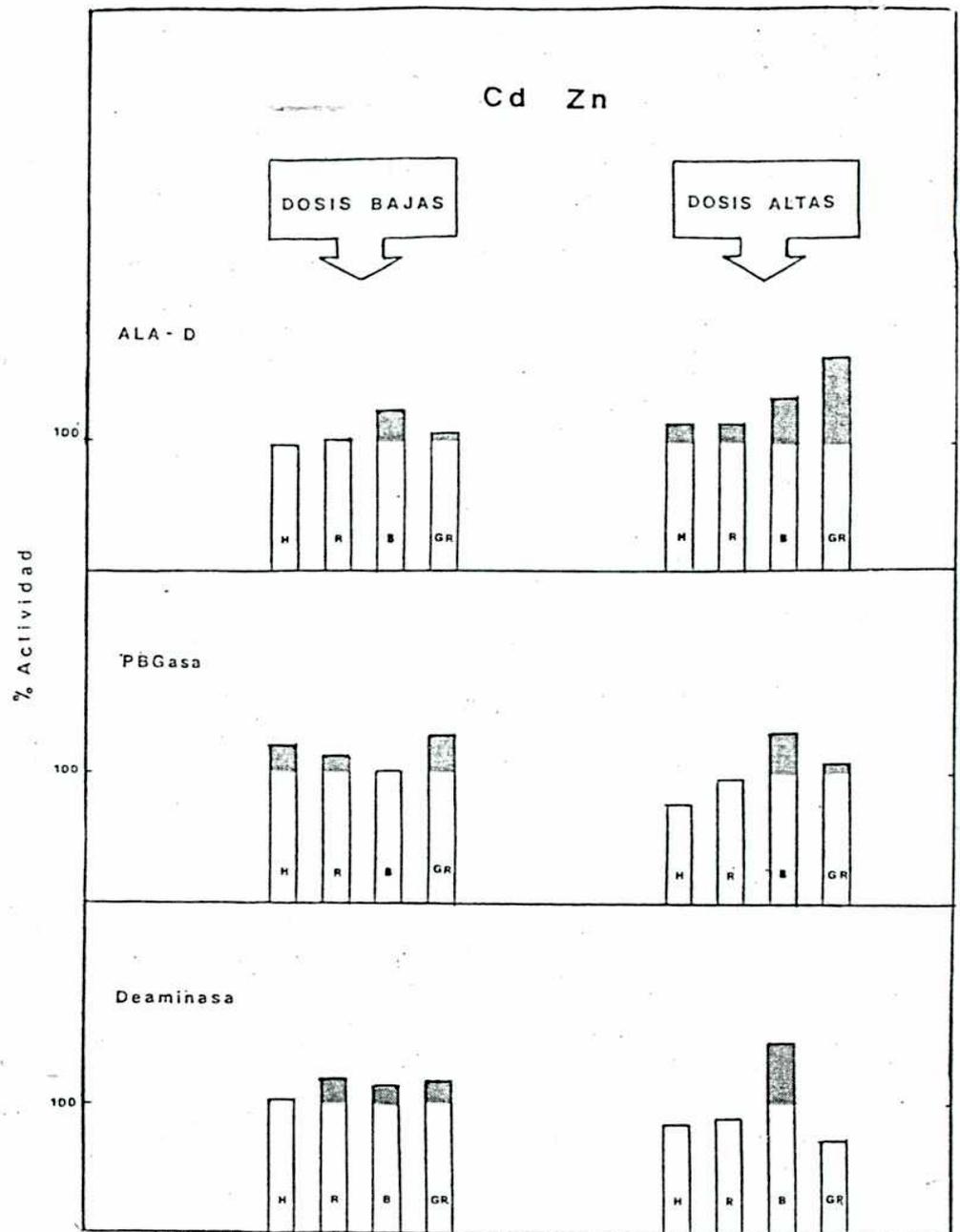


Figura 47: Experiencias cadmio-zinc. Efectos combinados cadmio-zinc sobre las actividades enzimáticas. Las dosis bajas y altas tienen igual significado que en la Figura 46. Cuando se emplearon dosis bajas los animales recibieron 12 inyecciones de cadmio y 20 de zinc. Con dosis altas el número de inyecciones fueron 6 de cadmio y 4 de zinc. De más detalles igual a Figura 46.

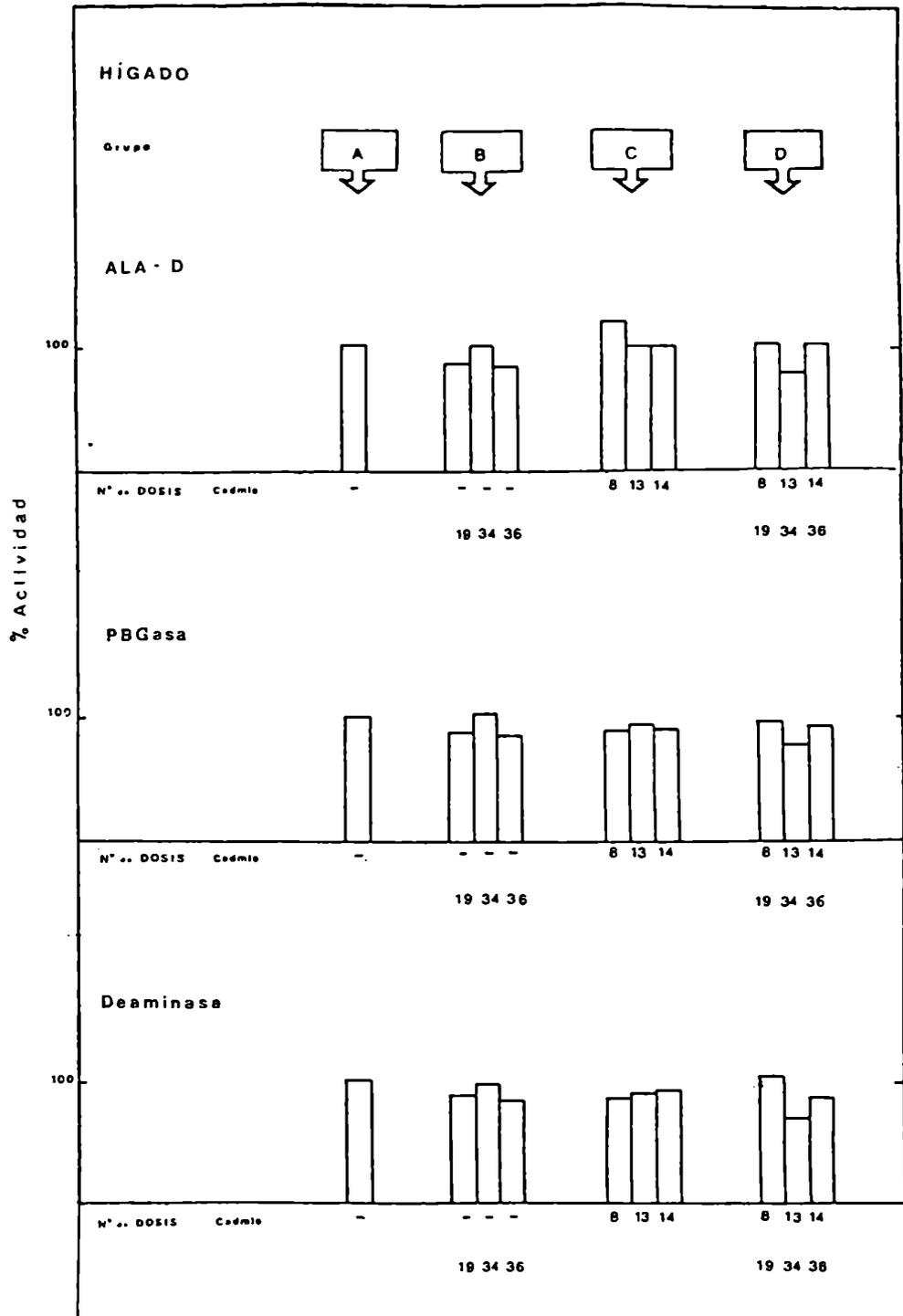


Figura 48: Experiencias cadmio-ascórbico. Efectos sobre las actividades enzimáticas de hígado. Se trabajó con 4 grupos de animales, A: control, B: recibió ascórbico 20 mg/kg de peso a diario, C: recibió cadmio 0,6 mg/kg de peso tres veces semanales, y D: recibió conjuntamente ascórbico y cadmio en dosis iguales que los grupos B y C. Los animales se sacrificaron siempre 48 horas después de la última inyección de cadmio. Las actividades están expresadas en porcentajes de actividad con respecto a los controles tomados como 100%.

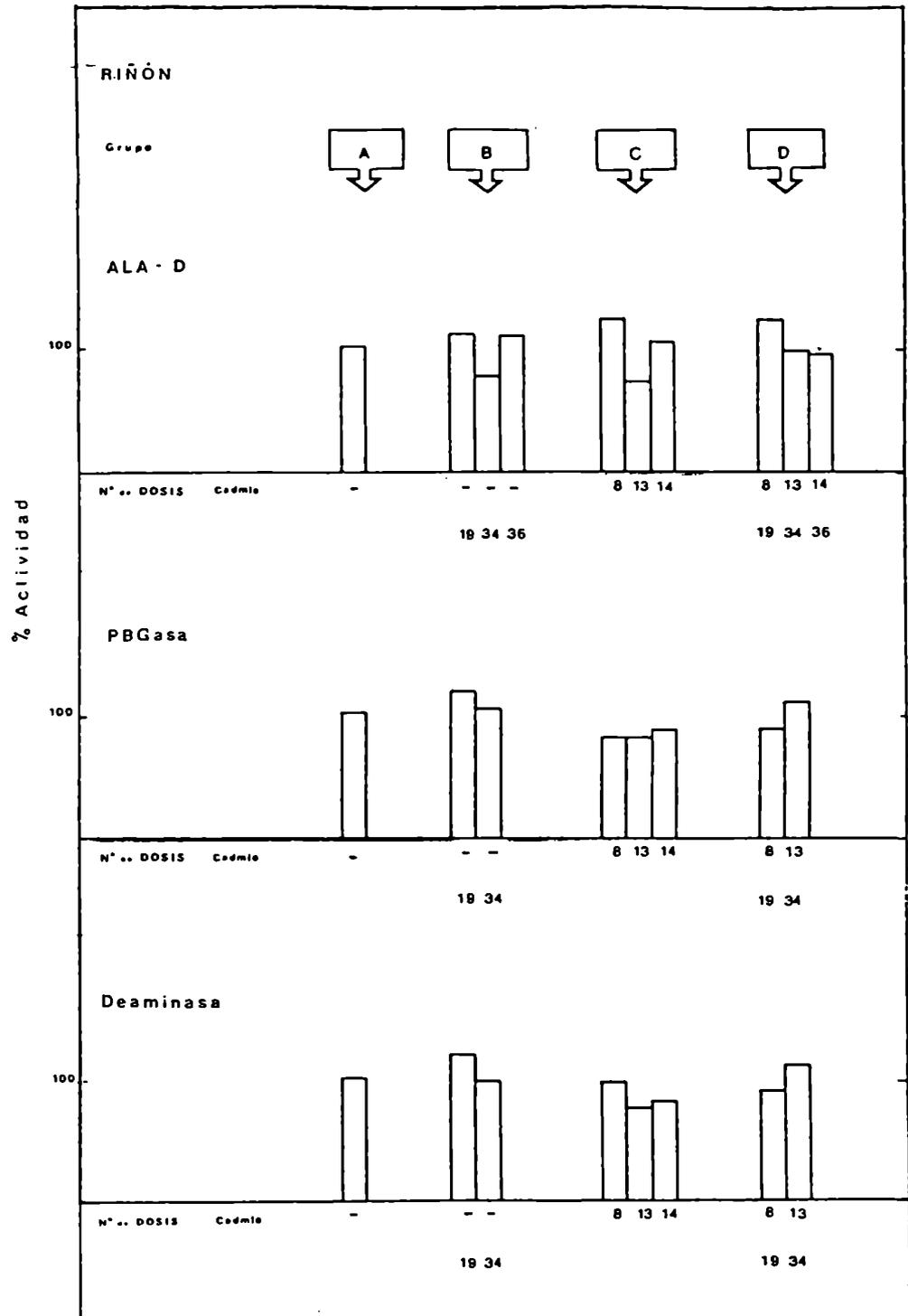


Figura 49: Experiencias cadmio-ascórbico. Efectos sobre las actividades enzimáticas de riñón. Animales de experimentación y expresión de las actividades igual que en la Figura 48.

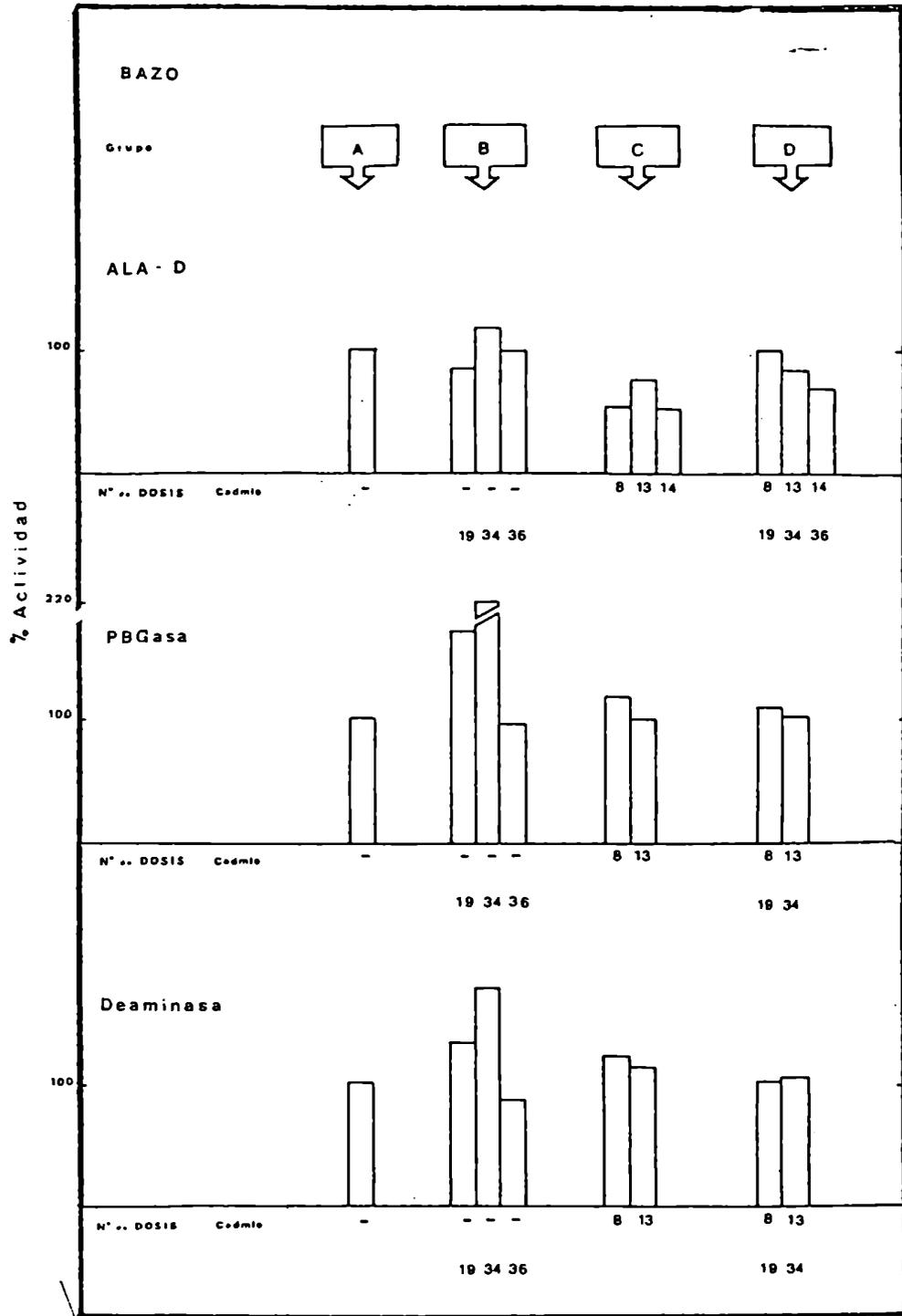


Figura 50: Experiencias cadmio-ascórbico. Efectos sobre las actividades enzimáticas de bazo. Animales de experimentación y expresión de las actividades igual que en la Figura 48.

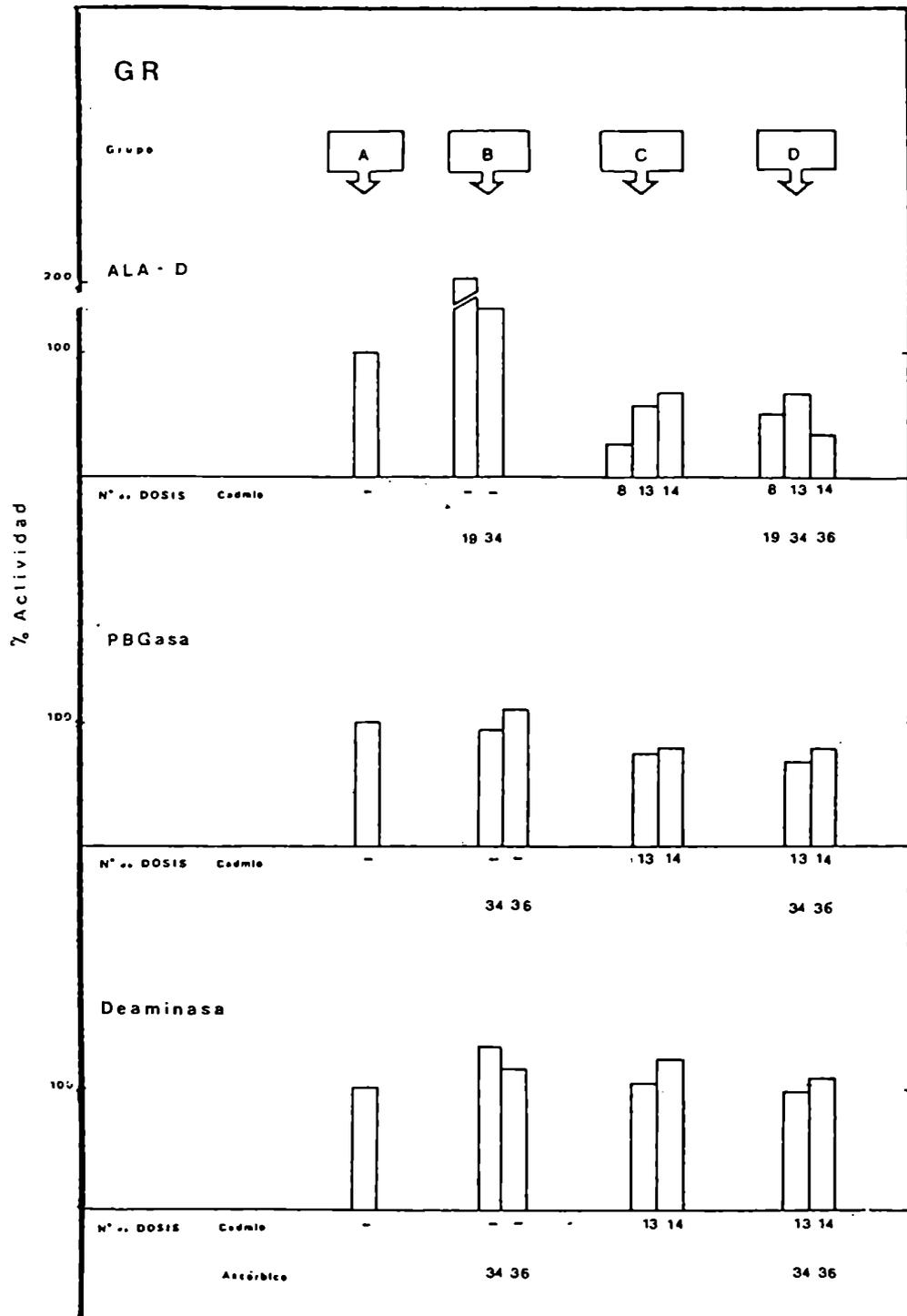


Figura 51: Experiencias cadmio-ascórbico. Efectos sobre las actividades enzimáticas de GR. Animales de experimentación y expresión de las actividades igual que en la Figura 48.

Las activaciones llegaron en algunos casos a un 120% y no se encontró correlación entre el número de dosis administradas y el grado de activación.

IV.3.4.2.3 Efectos cadmio-ascórbico

El ascórbico presentó un efecto beneficioso sobre el ALA-D de bazo (Figura 50), no así sobre la enzima de GR (Figura 51).

No se observaron resultados destacables sobre las demás actividades enzimáticas (Figuras 48 a 51).

IV.3.5 Acumulación de cadmio, zinc y cobre

IV.3.5.1 Administración de cadmio por vía oral - Acumulación del metal en órganos

Se emplearon concentraciones de 50 ppm de cadmio en el agua de bebida durante diversos lapsos de tiempo. En la Figura 52 se observa que la acumulación de cadmio es mayor en riñón que en hígado.

IV.3.5.2 Administración de cadmio por vía i.p.

IV.3.5.2.1 Concentración de cadmio en órganos y GR

Se administraron a ratas Sprague-Dawley hembra de 9 meses de edad dosis sucesivas de 150 μ g de cadmio por vía i.p. Los pesos de los animales variaron entre 228 y 343 g, de modo que las dosis individuales en mg/kg estuvieron comprendidas dentro del rango 0,47-0,66 mg/kg. Las inyecciones se aplicaron tres veces por semana y los animales recibieron entre 0 y 19 dosis. El sacrificio se efectuó siempre 48 horas después de la última inyección del metal. Luego de la DMO, se midieron los valores de cadmio en órganos y GR por a.a.s.

En la Figura 53 se han representado las concentraciones de cadmio en hígado y riñón en función de la dosis total en mg del metal/kg de peso recibida por cada animal. En el gráfico se hallan señalados los animales que recibieron dosis entre

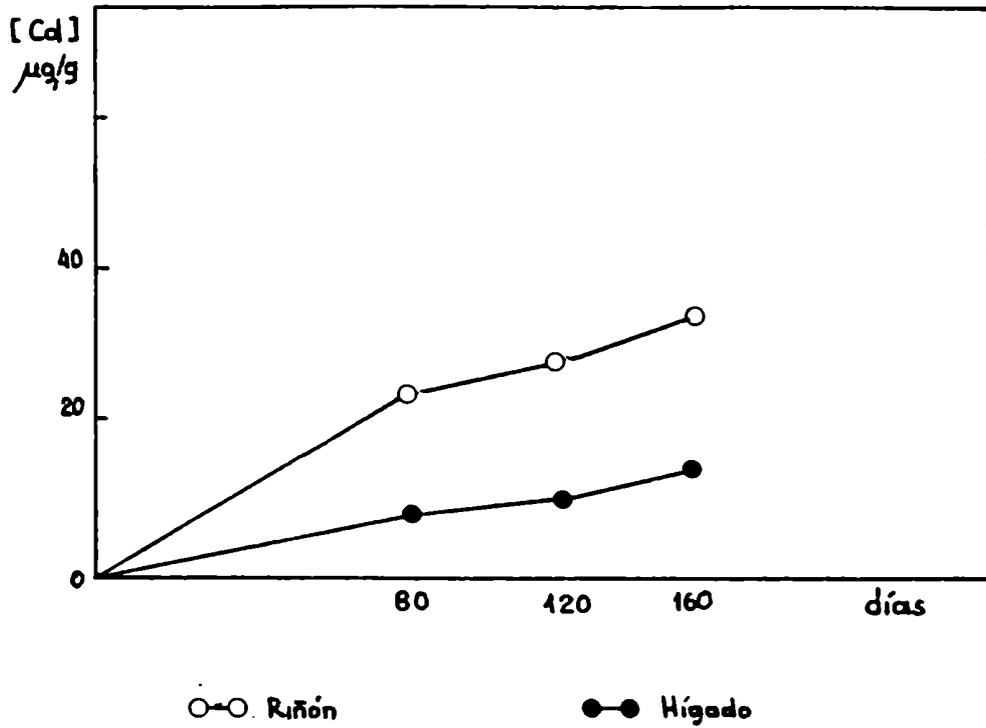


Figura 52: Acumulación de cadmio en hígado (●) y riñón (○) luego de la administración de 50 ppm del metal en el agua de bebida durante diferentes períodos. Los datos representados son promedio de tres determinaciones. La desviación standard s en relación con los respectivos valores no superó el 20%.

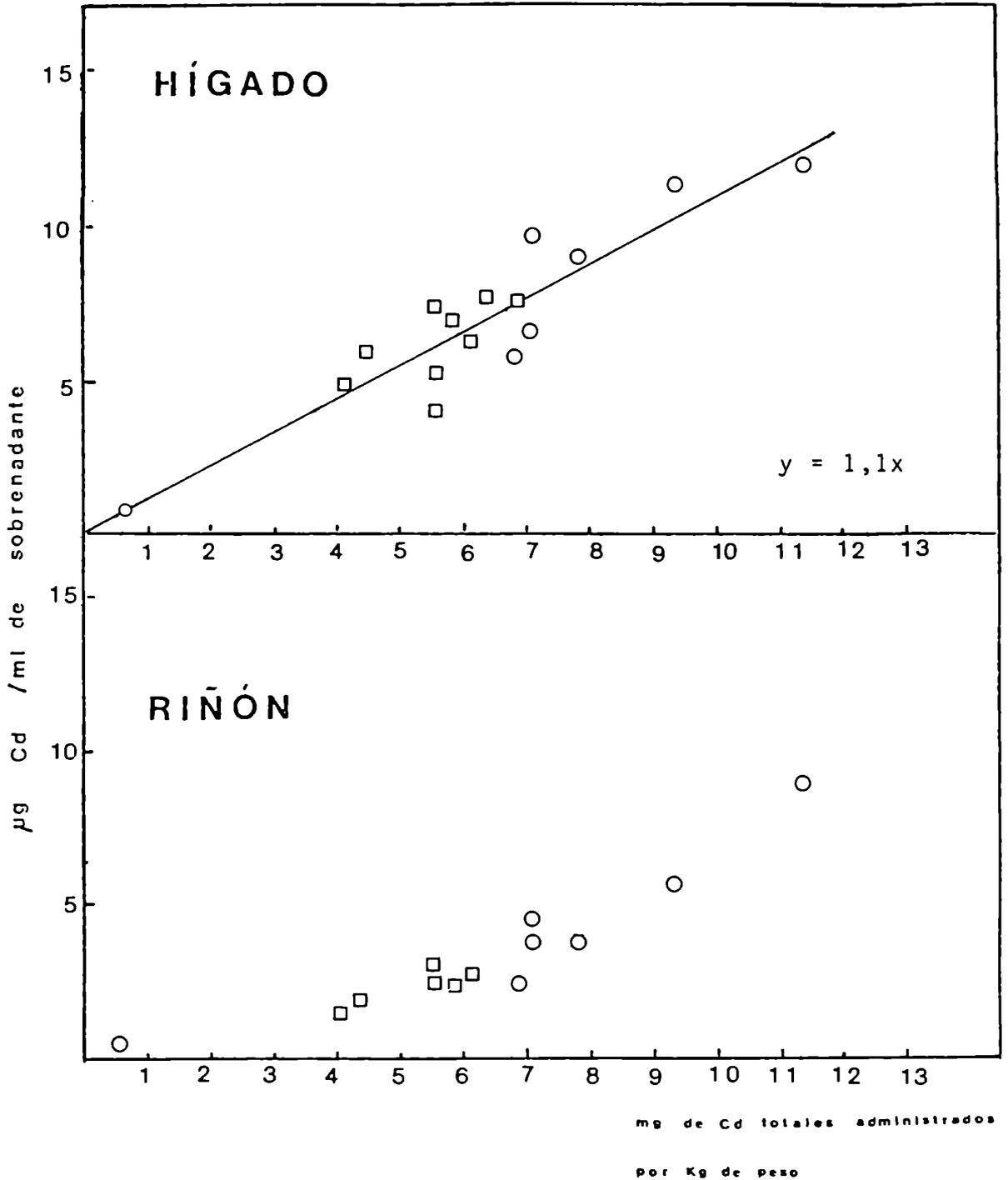


Figura 53: Administración de cadmio por vía i.p. Acumulación de cadmio en hígado y en riñón en función de la dosis total de cadmio inyectada. (O) dosis entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso, (□) dosis entre 0,47 y 0,56 mg/kg de peso. La frecuencia de administración fue siempre de tres veces semanales. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la última inyección. Un ml de sobrenadante contiene la fracción soluble a 11000 g proveniente de 0,1 g de tejido fresco.

0,47 y 0,56 mg/kg y los que recibieron entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso.

Es evidente que la acumulación de cadmio en hígado es mayor que en riñón, lo cual difiere con las experiencias de intoxicación por vía oral, y coincide con los datos de otros autores.

A pesar de que en estas experiencias hubo dos variables: el número de inyecciones y el peso de los animales, los valores en hígado pueden alinearse bastante bien sobre una recta. En cambio, la acumulación de metal en riñón parece responder más a una función hiperbólica, probablemente debido a que con el tiempo se produce una transferencia lenta del metal del hígado a los riñones; pero por arriba de 6-7 mg totales inyectados por kg de peso, los puntos se ubican sobre una recta.

Independientemente del riguroso cumplimiento de la ecuación de la recta, el aumento de la concentración del metal al aumentar la dosis indica que es posible estudiar los efectos del cadmio, a diferentes niveles de acumulación en los órganos al inyectar dosis variables.

En posteriores experiencias se han utilizado animales de igual peso (± 15 g). Los valores promedio obtenidos para distinto número de inyecciones se hallan representados en la Figura 54 (en la cual a efectos de comparación también se han repetido los puntos de la Figura 53).

Se observa que los valores promedio incorporados en la Figura 54 presentan buena concordancia con los de la Figura 53.

En la Figura 54 se representa además el caso de un animal sacrificado dos meses después de recibir una serie de 15 inyecciones de cadmio, de 0,6 mg/kg cada una, tres veces por semana. A pesar de que en hígado la concentración de cadmio estaba ligeramente disminuída con respecto a la obtenida 48 horas después de la última inyección, aún así los valores en este caso particular todavía se ubican bien en las curvas promedio obtenidas.

Por otro lado la relación (cadmio hígado)/(cadmio riñón) disminuye con la acumulación del metal en los órganos como se

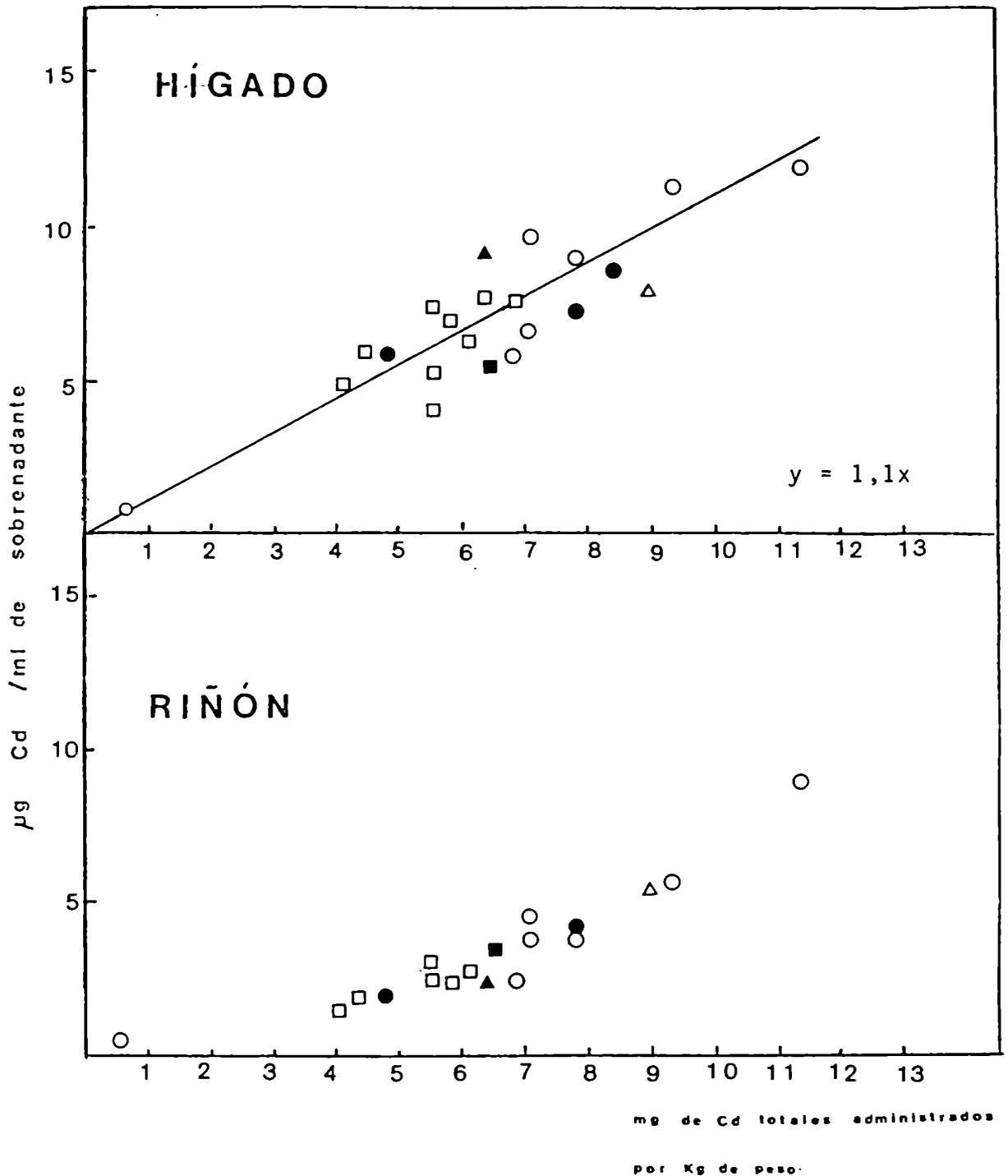


Figura 54: Administración de cadmio por vía i.p. Acumulación de cadmio en hígado y riñón en función de la dosis total de cadmio inyectada. (O) dosis entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso, (□) dosis entre 0,47 y 0,56 mg/kg de peso, (●) dosis de 0,6 mg/kg de peso, (■) dosis de 0,55 mg/kg de peso y (▲) dosis de 1,10 mg/kg de peso. La frecuencia de administración fue siempre de tres veces semanales. (△) animal sacrificado dos meses después de recibir 15 inyecciones de 0,6 mg/kg de peso administrado tres veces por semana.

puede observar en la Tabla V.

La Figura 55 muestra que la concentración de cadmio en bazo aumenta en función de la dosis total administrada, aunque la acumulación es menor que en hígado y riñón. En el rango de valores estudiados existe bastante dispersión de los datos individuales.

En GR no parece existir, a partir de 6 mg totales de cadmio inyectados/kg de peso, una correlación lineal entre dosis administrada y concentración del metal en GR, tal como puede observarse en la Figura 55.

IV.3.5.2.2 Concentración de cadmio en órganos y GR en las experiencias cadmio-ascórbico

Como ya se mencionara al discutir los resultados de las actividades enzimáticas se trabajó siempre con controles como referencias.

Las dosis empleadas durante esta experiencia fueron 0,6 mg de cadmio por kg de peso, aplicadas tres veces por semana por vía i.p. y 20 mg/kg de ácido ascórbico aplicado cinco veces por semana por vía s.c.

La Figura 56 muestra los resultados obtenidos para distinto número de inyecciones de cadmio en los diversos órganos.

La vitamina C no parece ejercer ningún efecto significativo sobre la acumulación de cadmio.

IV.3.5.2.3 Acumulación de cadmio en órganos en las experiencias cadmio-zinc

Las dosis de cadmio y zinc usadas durante las experiencias con dosis altas y bajas y el diagrama de aplicación de las mismas, ya han sido detallados en IV.3.4.1.

En la Figura 57 se representan sólo las concentraciones de cadmio en los sobrenadantes de 11.000 g de hígado y de riñón, correspondientes a las experiencias de larga duración, ya que durante las experiencias cortas, la acumulación del metal

Tabla V

<u>mg Cd inyectados</u> kg peso.	Cd hígado $\mu\text{g/ml}$ sobrenadante	Cd riñón $\mu\text{g/ml}$ sobrenadante	<u>Cd hígado</u> <u>Cd riñón</u>
4,16	4,8	1,66	2,89
5,59	6	2,4	2,5
7,2	8	3,7	2,16
9,37	10,2	5,8	1,75
11,4	12,4	8,94	1,38

Relación $\frac{\text{Cd hígado}}{\text{Cd riñón}}$

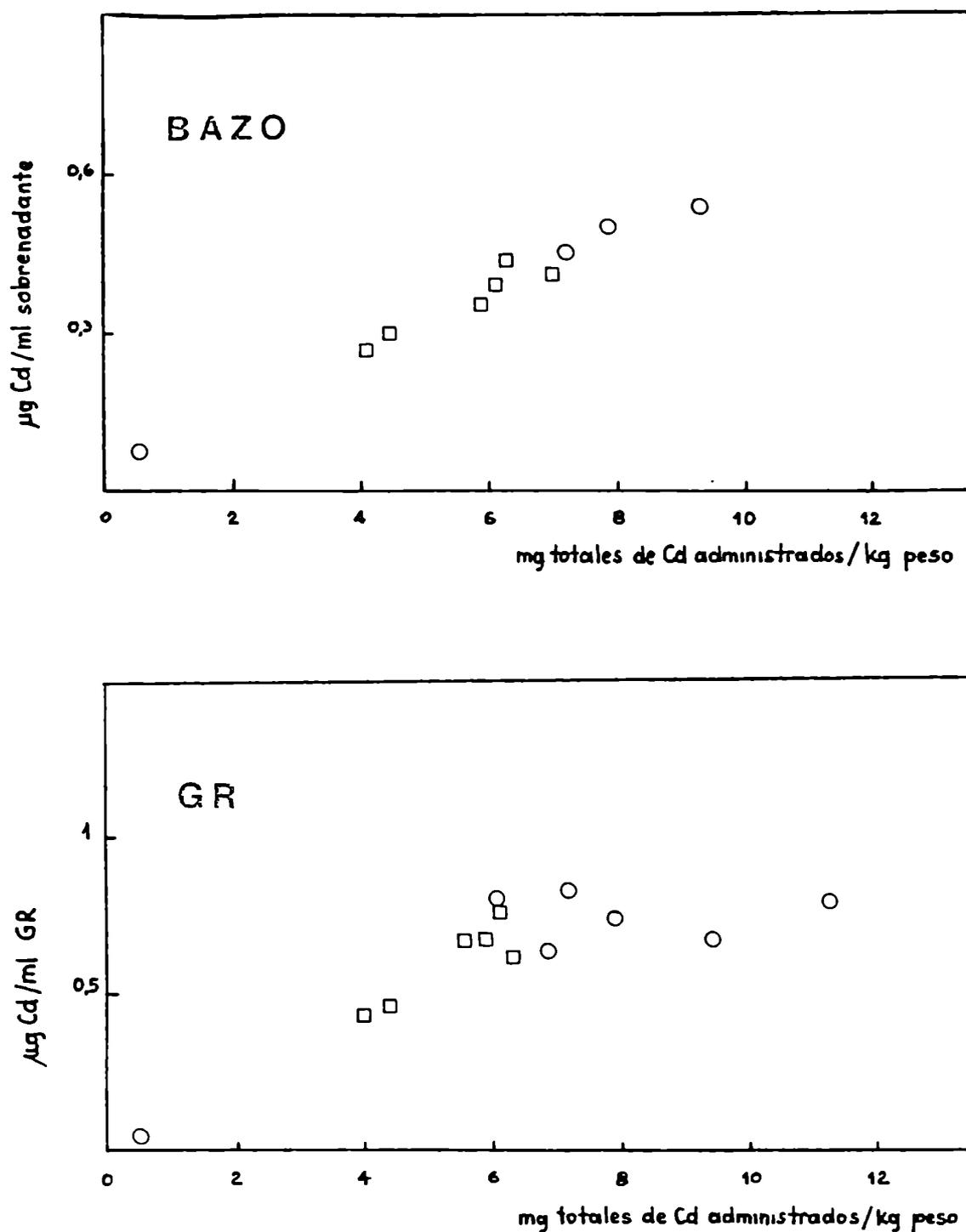


Figura 55: Administración de cadmio por vía i.p. Concentración de cadmio en bazo y en GR en función de la dosis total de cadmio inyectada. (O) dosis entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso, (□) dosis entre 0,47 y 0,56 mg/kg de peso. La frecuencia de administración fue de tres veces semanales.

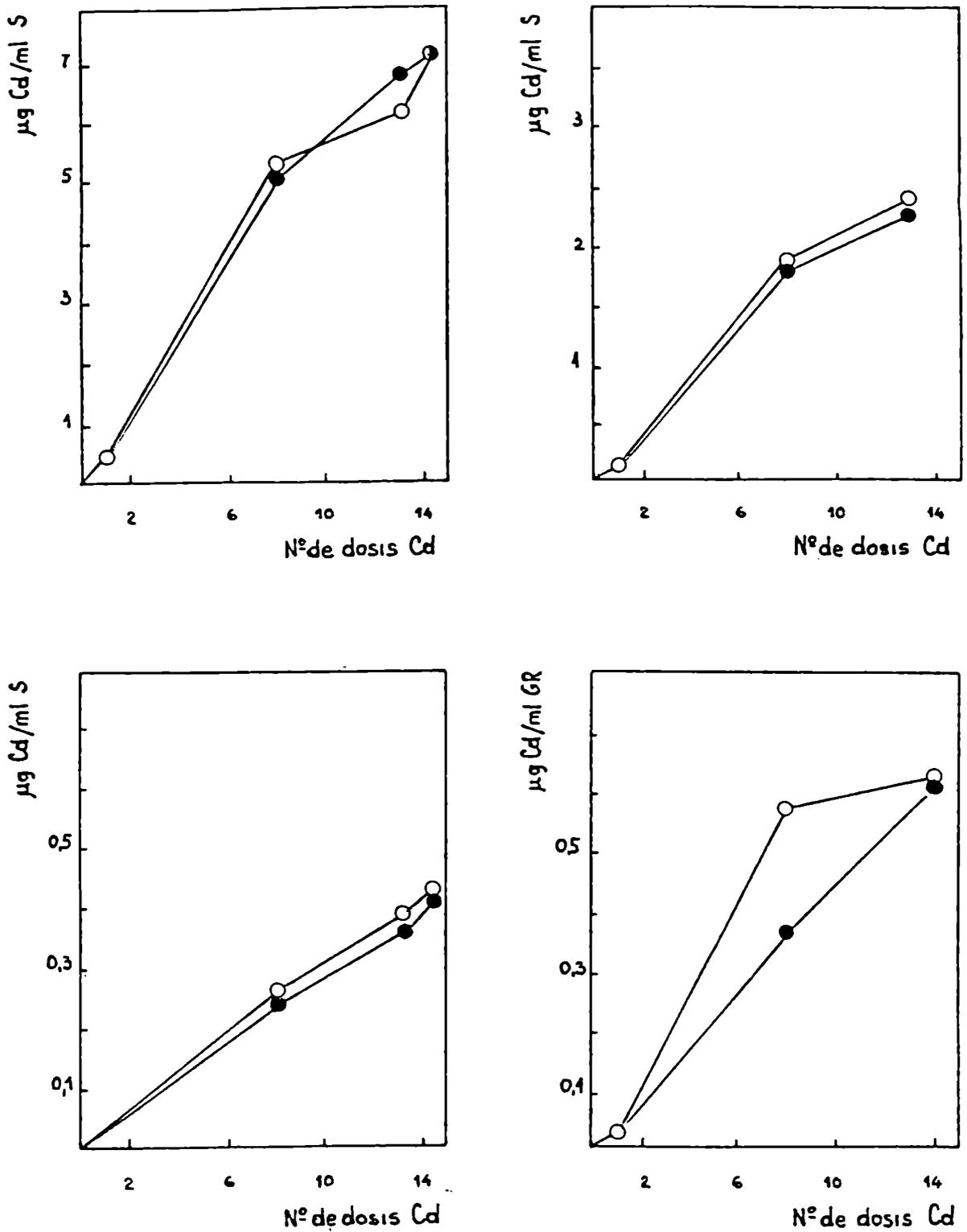


Figura 56: Experiencias cadmio-ascórbico. Acumulación de cadmio en tejidos (O) de animales tratados tres veces por semana con 0,6 mg/kg de peso de cadmio, (●) de animales tratados tres veces por semana con 0,6 mg/kg de peso de cadmio y diariamente con 20 mg/kg de peso de ascórbico. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

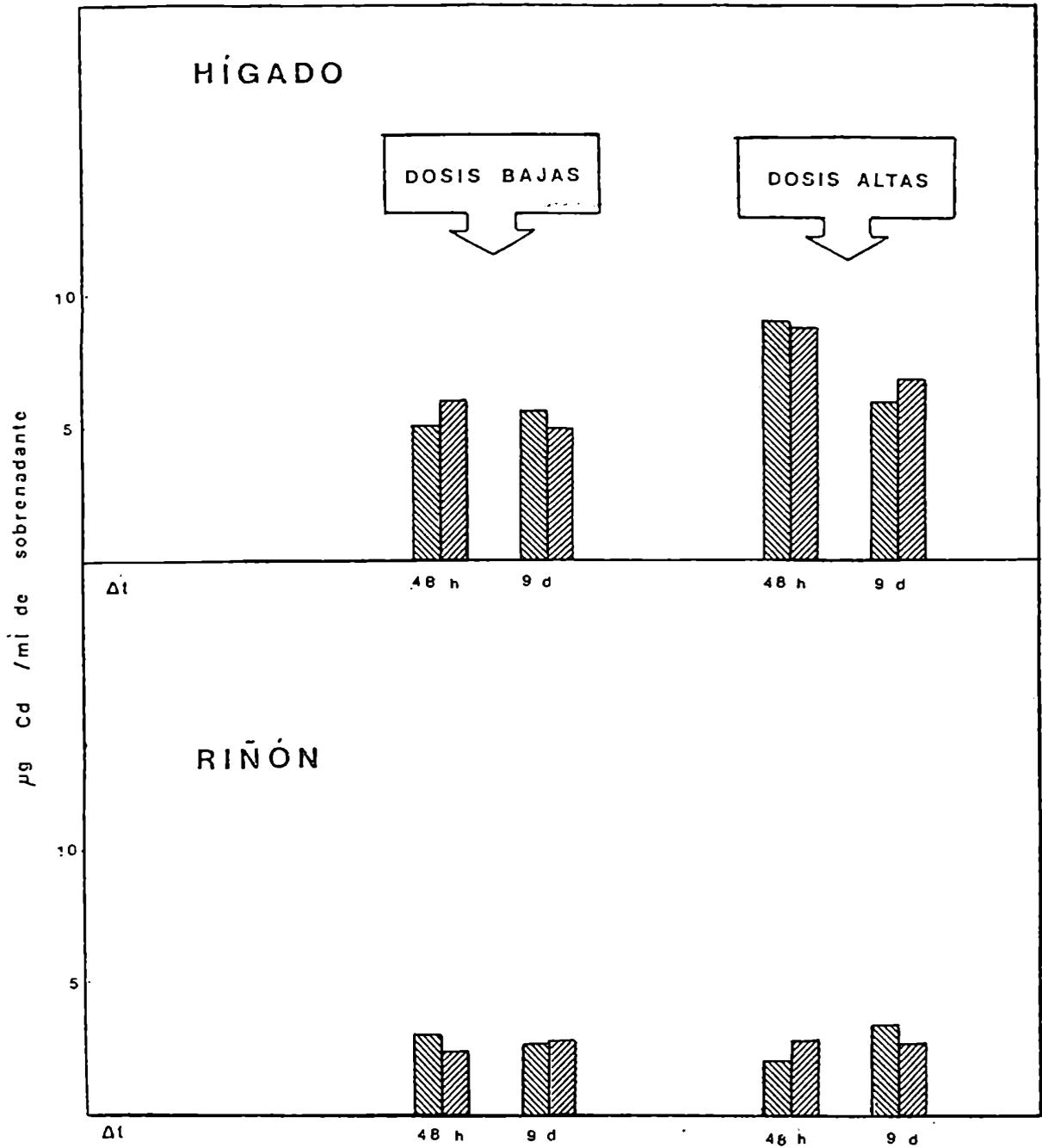


Figura 57: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Acumulación de cadmio en tejidos luego de la administración de cadmio y de cadmio-zinc en ratas sacrificadas 48 horas ($\Delta t = 48 h$) y 9 días ($\Delta t = 9 d$) después de las últimas inyecciones. Se emplearon dosis bajas o dosis altas. Dosis bajas Cd: 0,55 mg/kg 3 veces por semana, N=12 dosis (i.p.) Zn: 2,4 mg/kg 5 veces por semana, N=20 dosis (s.c.) T=4 semanas Dosis altas Cd: 1,10 mg/kg 3 veces por semana, N=6 dosis Zn: 12 mg/kg 2 veces por semana, N=4 dosis T=2 semanas N=número total de dosis, T=tiempo de duración del tratamiento con el o los metales. Las desviaciones standard (s) con relación a los respectivos valores variaron entre 6 y 19%.

fue muy baja.

De todas formas, con ninguno de los dos niveles de intoxicación se observó un efecto del zinc sobre la acumulación de cadmio en hígado o en riñón.

El único efecto destacable fue un aumento de la concentración de cadmio en hígado en los animales tratados con altas dosis, ya sea de cadmio sólo o de cadmio y zinc.

IV.3.5.2.4 Efecto del cadmio sobre la acumulación de zinc en órganos. Influencia de la administración de zinc

La inyección de cadmio tanto en dosis bajas como altas provoca un definido aumento de la concentración de zinc en hígado y bastante menos en riñón con respecto a los valores normales (Figura 58).

Con la administración de cantidades crecientes de cadmio hay un aumento correspondiente del depósito de zinc hepático; pero aparentemente no se observa una correlación similar en riñón, por lo menos dentro del rango de dosis estudiadas.

Acumulación de zinc en órganos en las experiencias cadmio-zinc.

La dosis de cadmio y de zinc usadas, así como la duración de las experiencias ya han sido detalladas en IV.3.4.1.

Recordemos que el zinc es un elemento normal en el organismo de manera que tanto en los sobrenadantes de hígado como de riñón de animales controles se encuentran niveles fisiológicos de este metal.

Cuando se inyectan dosis bajas de zinc (2,4 mg/kg de peso) se observa cierto aumento de la concentración de metal en riñón en las experiencias largas; en hígado la concentración de zinc no se modifica, según se puede deducir de un análisis de las Figuras 59 y 60.

En cambio por inyección de dos dosis altas de zinc (12 mg/kg de peso) se produce un aumento de la concentración de zinc en hígado, probablemente debido a la síntesis de zinc-tio

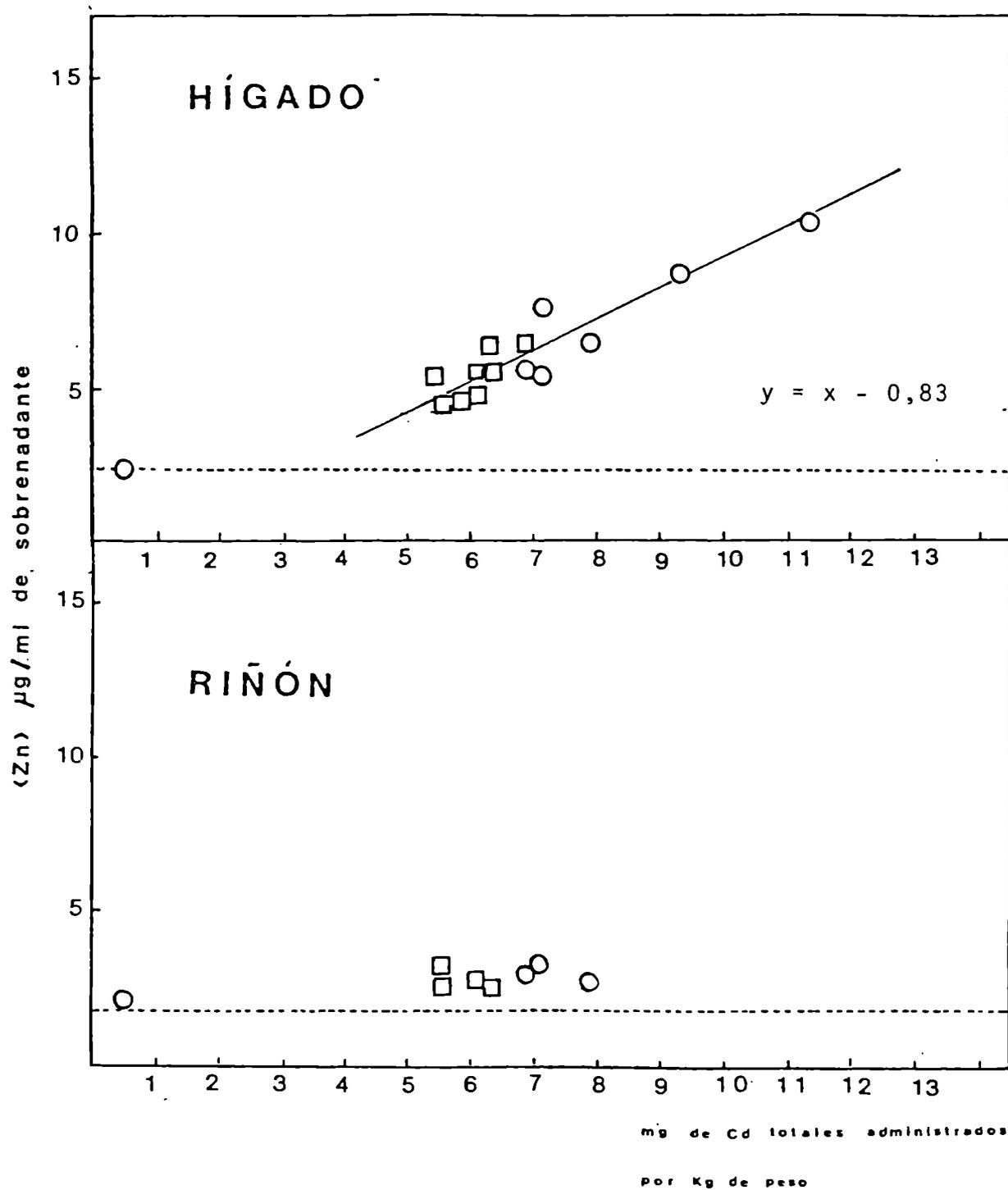


Figura 58: Administración de cadmio por vía i.p. Acumulación de zinc en hígado y en riñón en función de la dosis total de cadmio inyectada. (○) dosis entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso, (□) dosis entre 0,47 y 0,56 mg/kg de peso, ----- valor normal (V.N.). La frecuencia de administración fue de tres veces por semana.

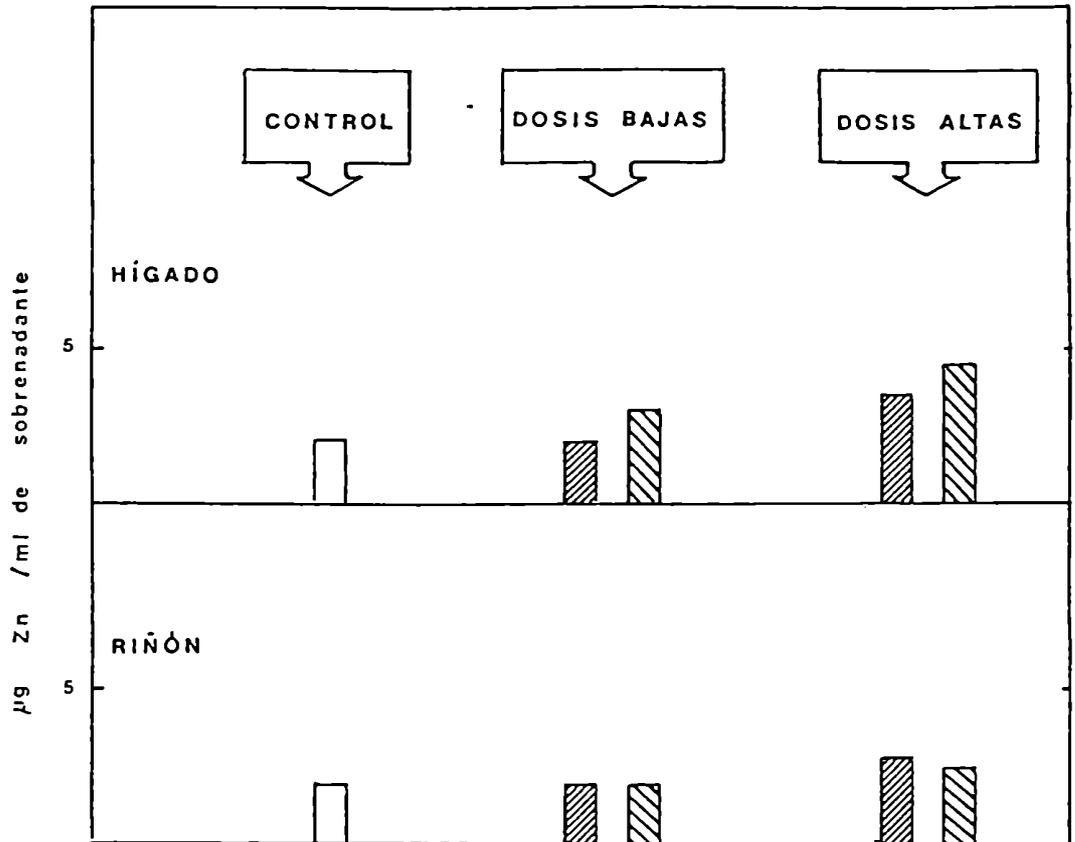


Figura 59: Experiencias cadmio-zinc de corta duración. Acumulación de zinc en tejidos luego de la administración de zinc , o de cadmio-zinc  en comparación con los controles , en ratas sacrificadas 48 horas después de la última inyección. Se emplearon dosis bajas o dosis altas.

Dosis bajas Cd: 0,55 mg/kg de peso, 1 dosis (i.p.)
 Zn: 2,4 mg/kg de peso, 2 dosis (s.c.)
 T=2 días

Dosis altas Cd: 1,1 mg/kg de peso, 1 dosis (i.p.)
 Zn: 12 mg/kg de peso, 2 dosis (s.c.)
 T=2 días

T=tiempo de duración del tratamiento con el o los metales

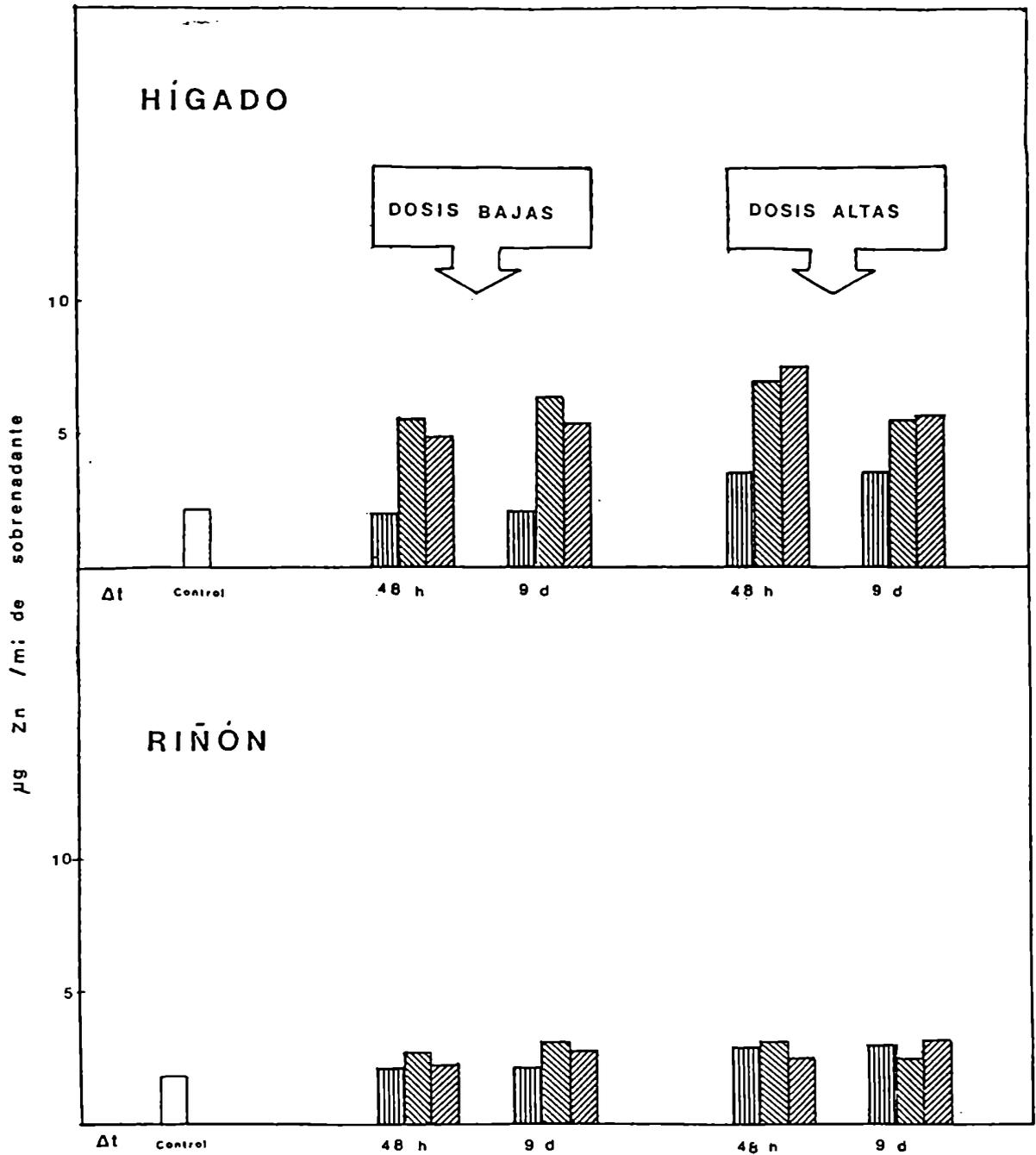


Figura 60: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Acumulación de zinc , de cadmio  y de cadmio-zinc  en comparación con los controles. Los animales fueron sacrificados 48 horas ($\Delta t = 48 \text{ h}$) y 9 días ($\Delta t = 9 \text{ d}$) después de la última inyección. Se administraron dosis bajas o dosis altas, al igual que en la Figura 57.

neína (Figura 59). Aumentando el número de dosis a cuatro no se observa posterior aumento (Figura 60), lo cual se explica pues la zinc-tioneína tiene una vida media corta. Con la inyección de dosis altas de zinc también aumenta la concentración del metal en riñón (Figuras 59 y 60).

La inyección de cadmio tanto en dosis bajas como altas provoca una acumulación de zinc en hígado y riñón. Sin embargo, es en hígado donde se producen aumentos significativos con respecto a los originados por iguales dosis de zinc solo (Figuras 59 y 60).

La inyección simultánea de zinc y cadmio no parece inducir una variación en el contenido de zinc de los sobrenadantes (Figura 60) con respecto a los valores producidos por la sola administración de cadmio.

Por otro lado, es interesante observar que las concentraciones de ambos metales expresadas en $\mu\text{g/ml}$ de sobrenadante son algo variables, pero están dentro del mismo orden, como se ilustra en la Figura 61, de manera que la relación cadmio-zinc es cercana a la unidad.

IV.3.5.2.5 Efecto del cadmio sobre la acumulación de cobre en riñón. Influencia de la administración de zinc y de ascórbico

Se ha analizado dicho efecto en riñón, ya que en este órgano la concentración de cobre es relativamente alta.

En la Figura 62 se observa que las inyecciones de cadmio provocan una acumulación de cobre en el órgano en estudio. Sin embargo, no se manifiesta una correlación entre dosis de cadmio y aumento de la concentración de cobre, aunque para dosis menores de 4 mg de cadmio totales administrados/kg de peso el aumento de la concentración de cobre no parece ser muy significativo.

El ácido ascórbico no produjo ningún efecto sobre la acumulación de cobre (Figura 63).

El zinc administrado solo, en diversas dosis por vía

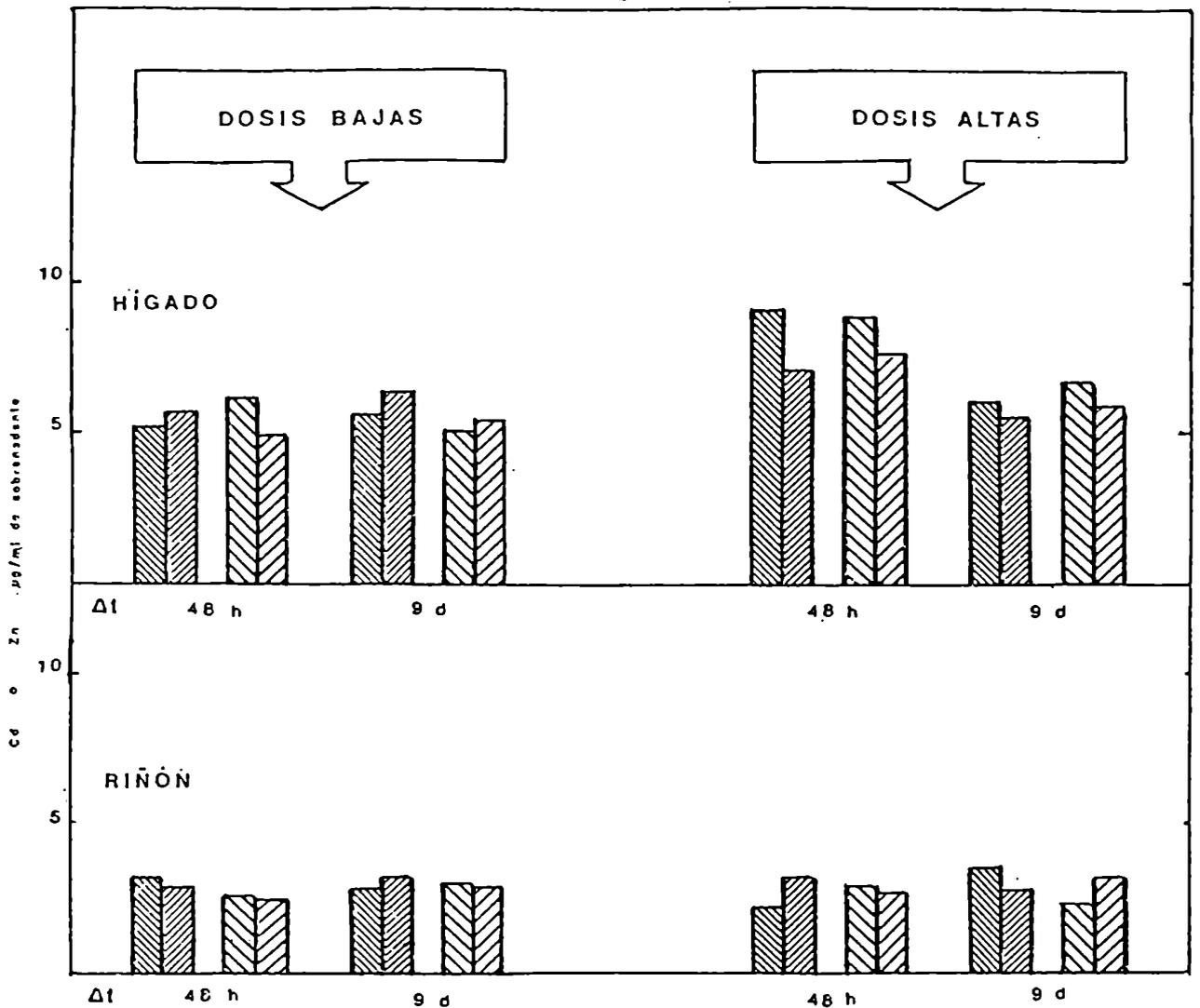


Figura 61: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Comparación de las concentraciones de cadmio  y de zinc  luego de la administración de cadmio  y de cadmio-zinc  en ratas sacrificadas 48 horas ($\Delta t = 48 \text{ h}$) y 9 días ($\Delta t = 9 \text{ d}$) después de la última inyección. Se administraron dosis bajas o dosis altas, al igual que en la Figura 57.

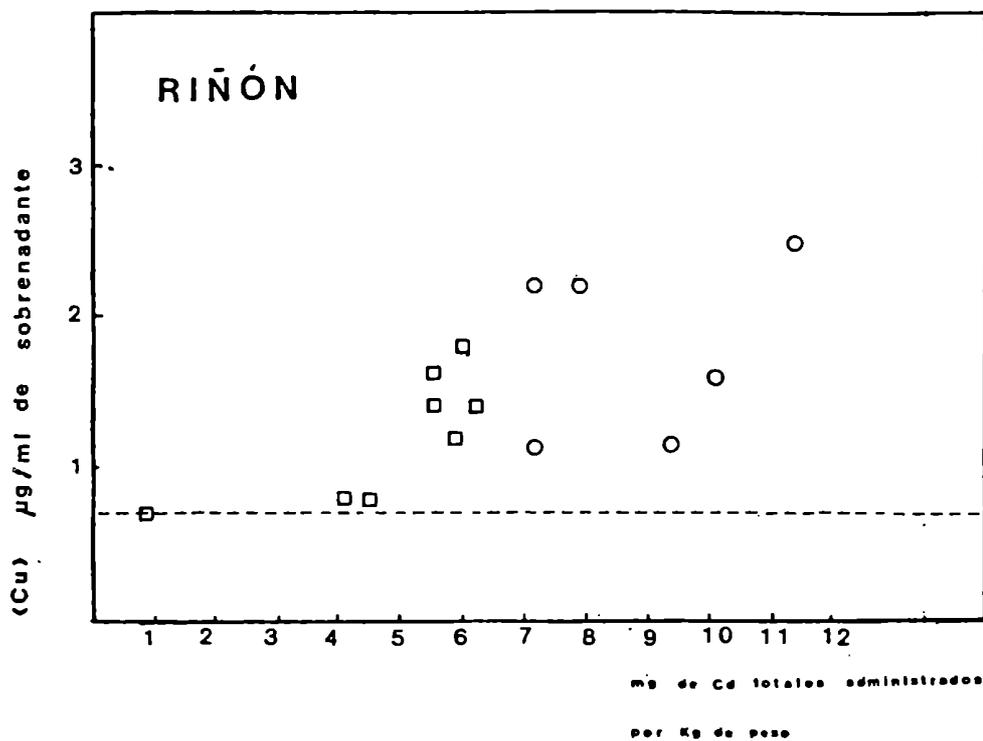


Figura 62: Administración de cadmio por vía i.p. Acumulación de cobre en riñón en función de la dosis total de cadmio inyectada. (○) dosis entre 0,57 y 0,66 mg/kg de peso, (□) dosis entre 0,47 y 0,56 mg/kg de peso. La frecuencia de administración fue de tres veces semanales. Todos los animales se sacrificaron 48 horas después de la última inyección.

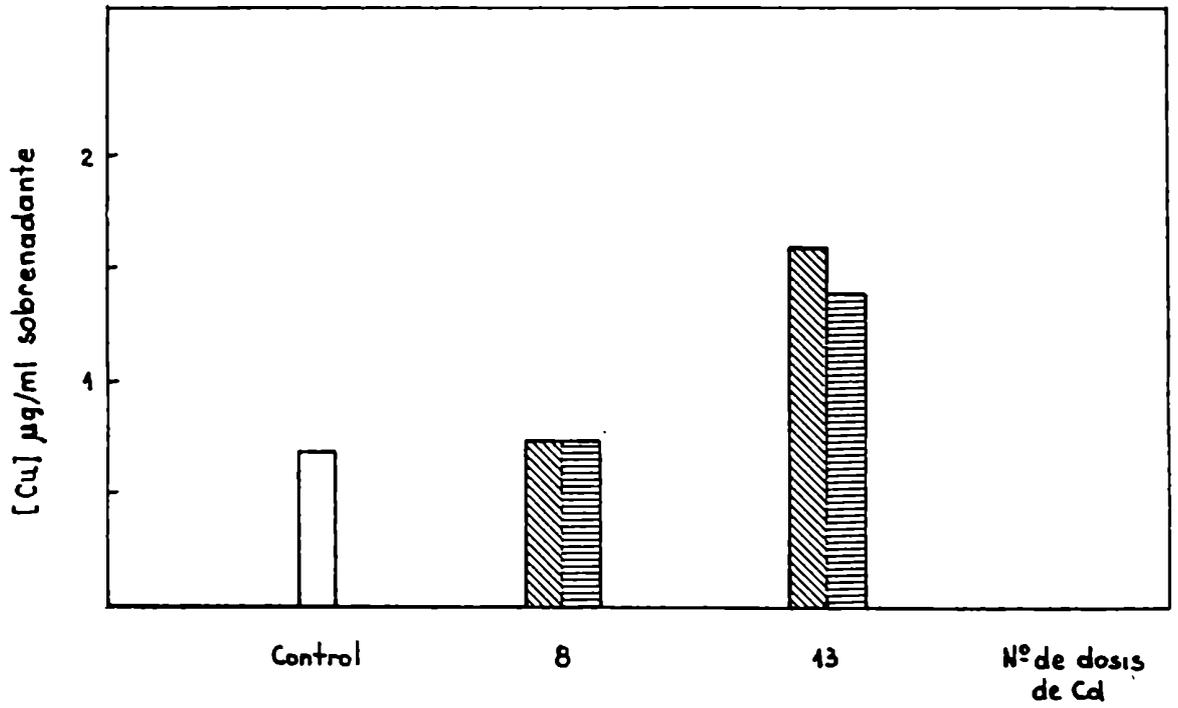


Figura 63: Experiencias cadmio-ascórbico. Acumulación de cobre en riñón en función del número de dosis de cadmio de 0,6 mg/kg de peso aplicada i.p. tres veces por semana. □ controles, ▨ animales tratados con cadmio, ▨ animales tratados con cadmio y ascórbico. El ascórbico en dosis de 20 mg/kg se aplicó 5 veces por semana.

s.c., parecería capaz de elevar la concentración de cobre en el riñón, aunque en casos aislados no se observó este efecto, por lo cual la desviación standard (S) resulta muy alta.

Con repetidas inyecciones de dosis bajas de zinc (2,4 mg/kg de peso, 20 veces) se obtiene en presencia de cadmio una mayor elevación del contenido de cobre en riñón, que inyectando en dosis más altas (12 mg/kg) igual cantidad del metal (Figura 64).

IV.3.6 Correlación entre actividades enzimáticas y concentración de metales

A lo largo de todo el trabajo se trató de establecer una correlación entre el aumento o disminución de alguna actividad enzimática, en particular de ALA-D, y las concentraciones de cadmio, zinc o cobre circulantes; sin embargo, los resultados obtenidos no han permitido formular una correlación simple y directa.

La administración de cadmio por vía oral durante tiempos prolongados no produce cambios significativos en la actividad de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa en hígado o riñón. Solamente se observan inhibiciones superiores al 20% de estas enzimas en GR. El ALA-D es la más sensible de ellas. Sin embargo no parece existir ninguna correlación entre la magnitud de este efecto y el tiempo de administración del metal o la concentración del mismo en tejidos como puede observarse en la Figura 65.

En cuanto a las experiencias de administración de cadmio y zinc por vía i.p., se considera ilustrativo representar las concentraciones de cadmio y de zinc en hígado y la actividad de ALA-D en los distintos órganos, en función de los tratamientos efectuados (Figura 66), lo cual constituye un resumen del resultado de dichas experiencias, y a la vez sugiere la existencia de una probable correlación entre el zinc que ha circulado por el organismo, ya sea por administración del mismo o por movilización hacia o de las metalotioneínas, y el aumento de actividad de ALA-D que se produce en los diversos órganos estudiados. Los mayores incrementos de actividad se pro-

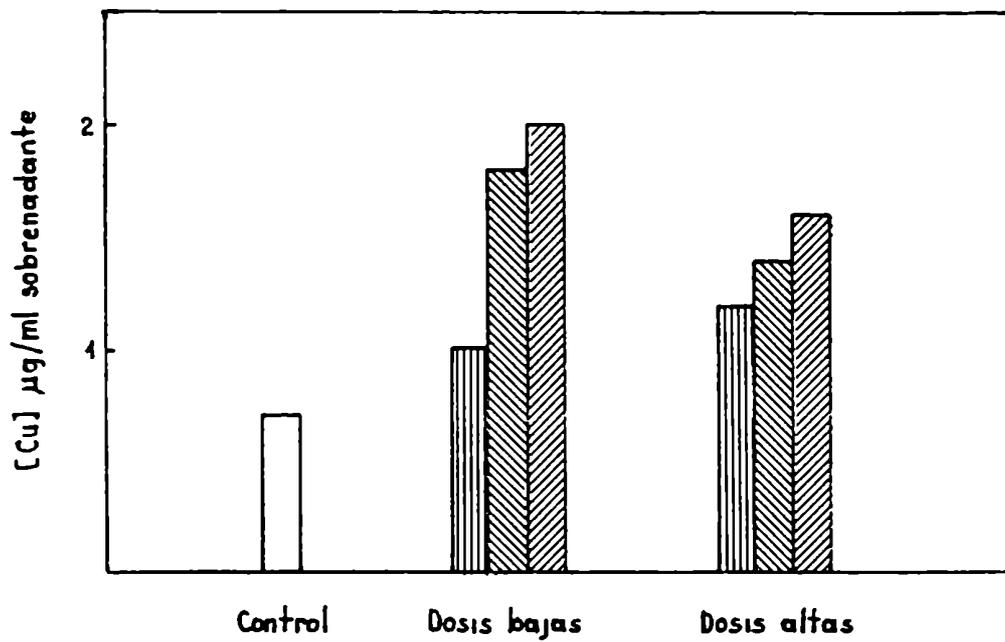


Figura 64: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Acumulación de cobre en riñón. □ controles, ▨ animales tratados con zinc, ▩ animales tratados con cadmio, ▤ animales tratados con cadmio-zinc. Se usaron dosis bajas y altas, al igual que en la Figura 57.

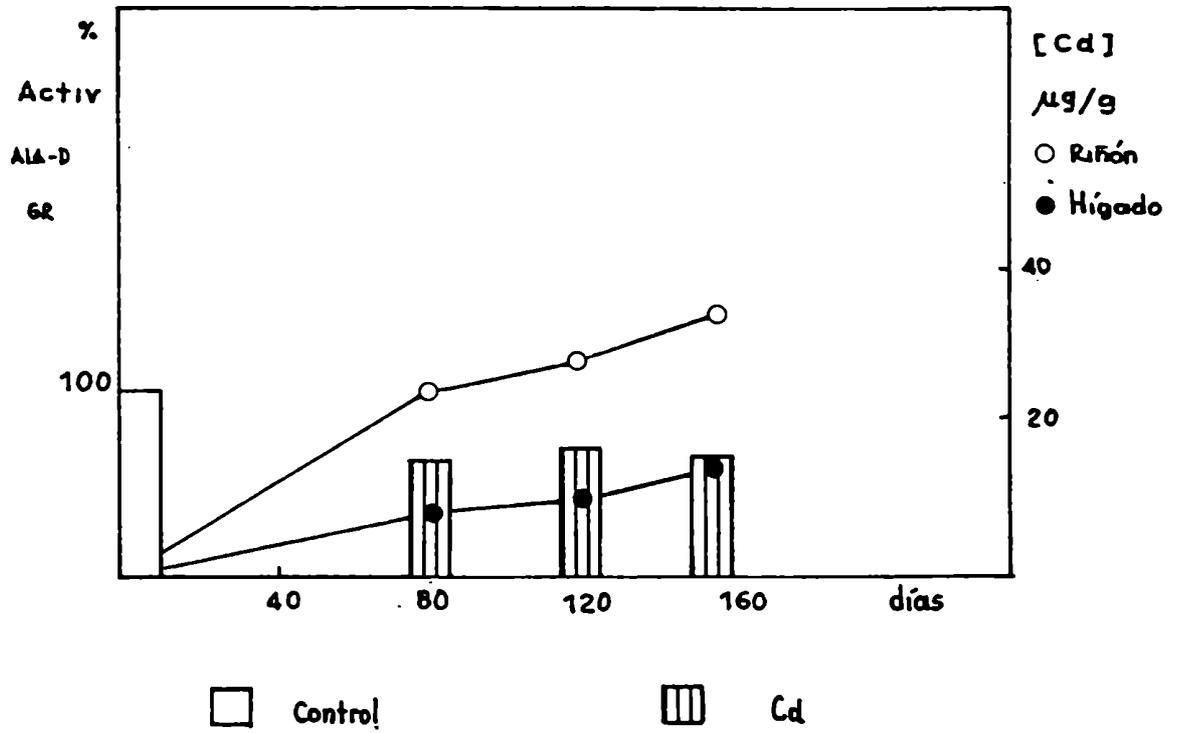


Figura 65: Administración de cadmio por vía oral. Relación entre la concentración de cadmio en órganos y las actividades enzimáticas en GR en función del tiempo.

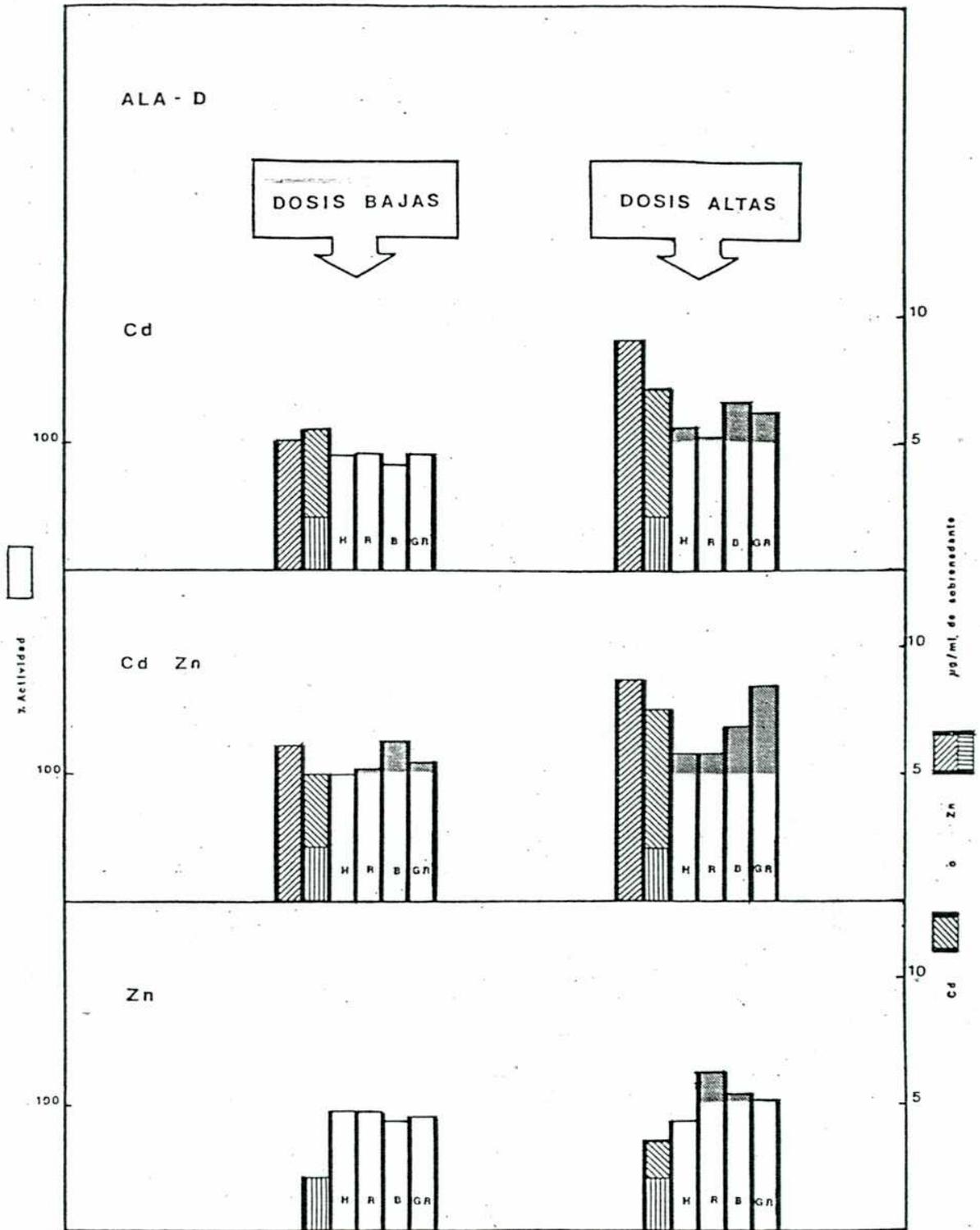


Figura 66: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Actividad de ALA-D en distintos órganos y concentración de cadmio y de zinc en hígado para los animales que recibieron cadmio, cadmio-zinc y zinc. El diseño experimental es igual al de la Figura 57. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la última inyección. Las actividades enzimáticas están expresadas en porcentaje de actividad con respecto a los correspondientes controles. La concentración de cadmio  y de zinc  en $\mu\text{g/ml}$.  representa la concentración de zinc del control y  es el aumento registrado.

dujeron al administrar altas dosis de cadmio y de zinc.

Análogamente se muestran en las Figuras 67 y 68 las actividades de PBGasa y Deaminasa respectivamente, en los distintos órganos y las concentraciones de cadmio y de zinc en hígado, en función de los tratamientos efectuados; se aprecian aumentos de la actividad enzimática en bazo con dosis altas de cadmio-zinc, aunque en este caso también se observan aumentos de las actividades enzimáticas con dosis bajas de dichos metales.

IV.3.7 Discusión y conclusiones sobre actividad enzimática y terapia

Administración *in vivo* del cadmio y actividad enzimática

Observamos en este estudio que a lo largo de todas las experiencias realizadas, el cadmio no tuvo una influencia uniforme, sobre la actividad de las enzimas en estudio.

En las experiencias de intoxicación por vía oral a largo plazo con 50 ppm del metal, se registraron inhibiciones del ALA-D de GR del orden del 30-40%. También hubo inhibición de la Deaminasa.

En cambio, cuando la contaminación de los animales con el metal se efectuó por vía i.p., los efectos fueron más variables. Algunas veces el cadmio se comportó como inhibidor del ALA-D de GR y bazo, aunque no se observó una correspondencia entre dosis administrada y grado de inhibición enzimática, mientras que en otros casos se produjeron ligeros aumentos de la actividad del ALA-D de dichas fuentes, y finalmente en otras experiencias los efectos fueron aleatorios produciéndose en algunos animales inhibiciones y en otros activaciones de dicha enzima.

A pesar de que el ALA-D es un parámetro bioquímico sensible y precoz para indicar una absorción excesiva de plomo, de estas experiencias no ha surgido su utilidad como indicadora de una intoxicación con cadmio.

La PBGasa y la Deaminasa tampoco sirven a dicho propósito.

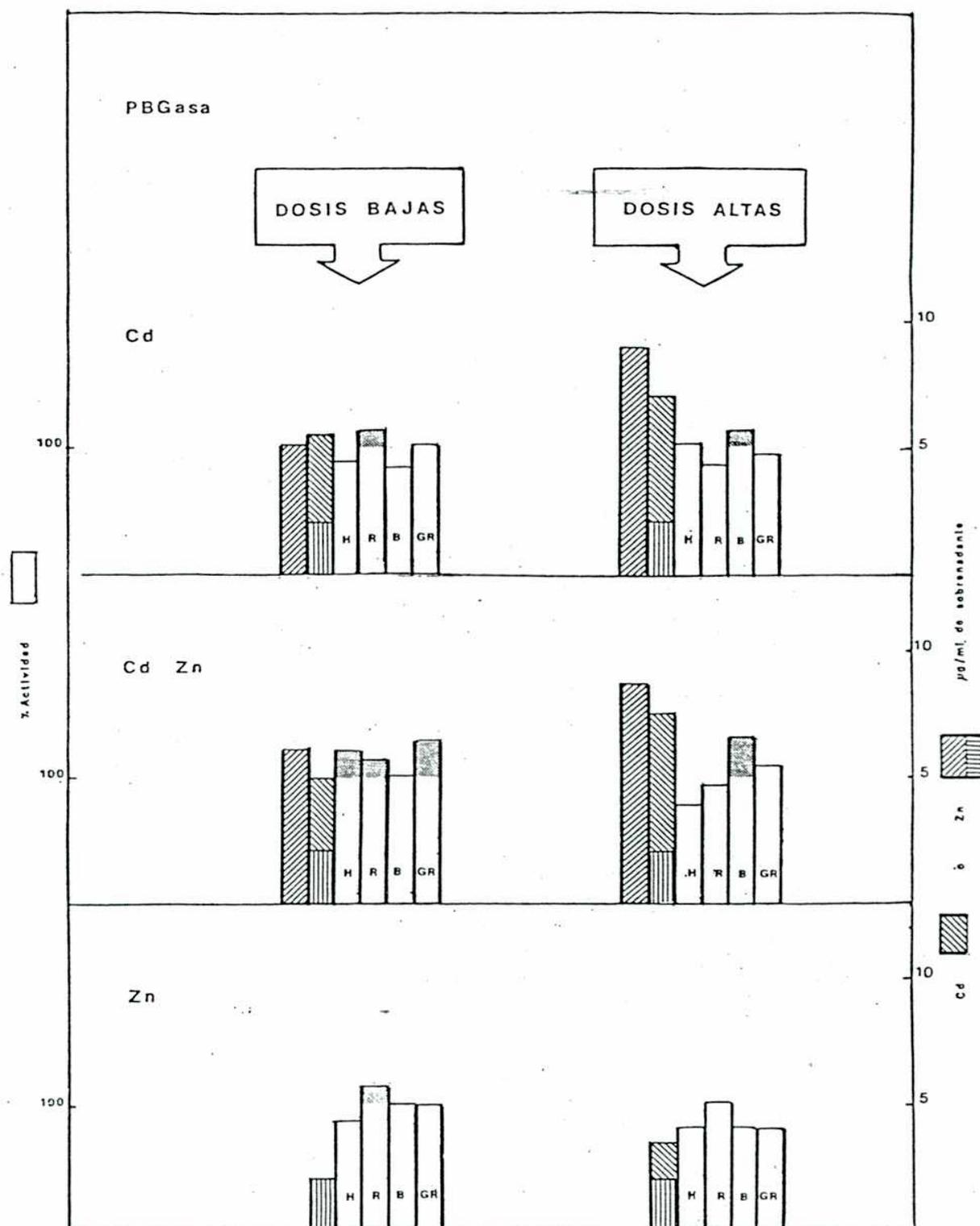


Figura 67: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Actividad de PBGasa en distintos órganos y concentración de cadmio y de zinc en hígado para los animales que recibieron cadmio, cadmio-zinc y zinc. El diseño experimental y la expresión de los resultados es igual que en la Figura 66.

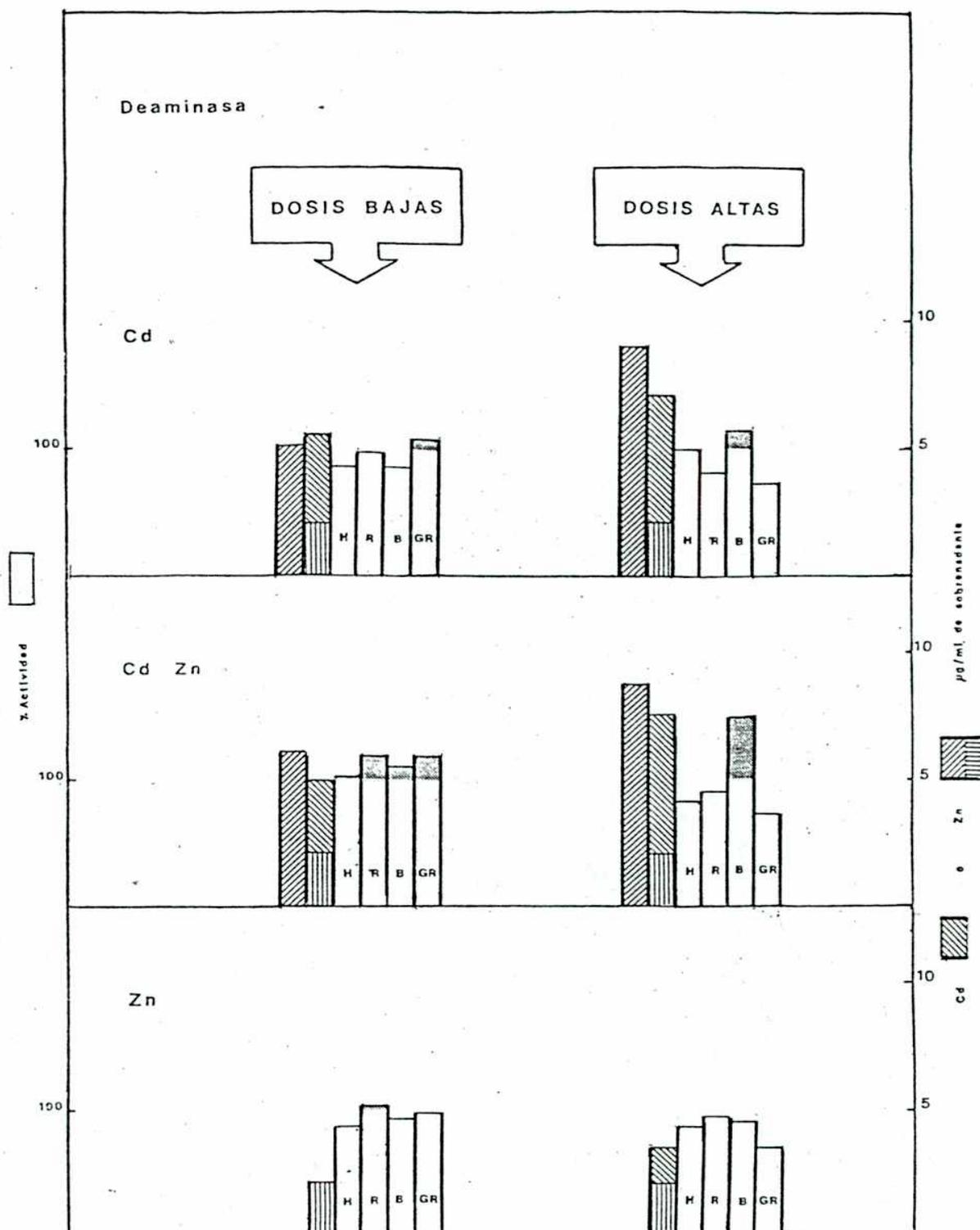


Figura 68: Experiencias cadmio-zinc de larga duración. Actividad de Deaminasa en distintos órganos y concentración de cadmio y de zinc en hígado para los animales que recibieron cadmio, cadmio-zinc y zinc. El diseño experimental y la expresión de los resultados es igual que en la Figura 66.

A continuación se harán diversos tipos de consideraciones para tratar de aclarar el motivo de la dispersión de valores obtenidos *in vivo*.

Comparación de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*

Como se había detallado en IV.2.1 el cadmio *in vitro* a partir de determinada concentración es un inhibidor de las enzimas ALA-D, PBGasa y Deaminasa en los sobrenadantes de hígado, riñón, bazo y GR (Figuras 13 y 14).

En los estudios *in vivo* se ha verificado que el cadmio es un tóxico acumulativo, obteniéndose los mayores depósitos del metal en tejido hepático, luego de la aplicación de una serie de dosis subletales del metal por vía i.p.

Teniendo en cuenta las formas más usuales y convenientes para expresar los valores de concentración de cadmio en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, las concentraciones de cadmio en los gráficos de concentración vs dosis inyectada para hígado y riñón están expresadas en $\mu\text{g/ml}$ de sobrenadante de órgano a 11.000 g, mientras que en los ensayos *in vitro* para los mismos órganos están dadas en moles/l de homogenato (M).

Se ha efectuado la transformación para algunos valores extremos de concentración en hígado (Tabla VI) con el objeto de facilitar la comparación entre los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

Con 4,8 mg totales de cadmio inyectados/ kg de peso que equivale a 8 inyecciones de 0,6 mg/kg de peso, se ha alcanzado en hígado una concentración suficiente como para inhibir *in vitro* cerca del 42% del ALA-D y apenas algo menos la Deaminasa.

Con 11,4 mg totales de cadmio inyectados/ kg de peso que equivale a 19 inyecciones de 0,6 mg/kg de peso, el ALA-D de hígado debería hallarse un 70% inhibida. En cambio dicha concentración sigue siendo insuficiente para afectar a la PBGasa siempre de acuerdo con los resultados de los ensayos *in vitro*.

Análogamente en la Tabla VII se presenta la transformación a (M) de las concentraciones alcanzadas en riñón.

Tabla VI

mg totales de Cd inyectados	$\mu\text{g/ml S}$	moles/l S (M)	log (M)	% Actividad <i>in vitro</i>		
				ALA-D	Deaminasa	PBGasa
11,7	12,7	$1,13 \cdot 10^{-4}$	-3,94	34%	54%	93%
10,2	11,1	$9,87 \cdot 10^{-5}$	-4	38%	56%	98%
8,8	9,6	$8,54 \cdot 10^{-5}$	-4,06	42%	56%	98%
4,8	5,3	$4,71 \cdot 10^{-5}$	-4,32	58%	66%	96%
3,5	3,87	$3,44 \cdot 10^{-5}$	-4,46	70%	72%	96%
0,49	0,51	$4,53 \cdot 10^{-6}$	-5,34	95%	90%	97%

Transformación $\mu\text{g/ml}$ a moles/l S (M) para las concentraciones de cadmio halladas en los sobrenadantes de hígado, luego de la administración i.p. de cadmio y porcentajes de actividad con respecto a los controles obtenidos *in vitro* para dichas concentraciones.

Tabla VII

mg totales de Cd inyectados	$\mu\text{g/ml S}$	moles/l S (M)	log (M)	% Actividad <i>in vitro</i>		
				ALA-D	Deaminasa	PBGasa
11,3	8,9	$7,92 \cdot 10^{-5}$	-4,1	48%	72%	108%
9,5	5,5	$4,89 \cdot 10^{-5}$	-4,31	57%	77%	107%
7,3	3,74	$3,32 \cdot 10^{-5}$	-4,47	69%	80%	106%
5,2	2,3	$2,05 \cdot 10^{-5}$	-4,68	80%	86%	105%
3,7	1,2	$1,06 \cdot 10^{-5}$	-4,97	93%	95%	103%
0,6	0,3	$1,66 \cdot 10^{-6}$	-5,57	95%	96%	103%

Transformación $\mu\text{g/ml}$ a moles/l S (M) para las concentraciones de cadmio halladas en los sobrenadantes de riñón, luego de la administración i.p. de cadmio y porcentajes de actividad con respecto a los controles obtenidos *in vitro* para dichas concentraciones.

Debido a que la acumulación de cadmio en riñón se produjo más lentamente que en hígado, las concentraciones de cadmio necesarias para inhibir las actividades enzimáticas son algo más difíciles de alcanzar. Sin embargo, los niveles de cadmio acumulado luego de 12 ó 13 inyecciones de 0,6 mg Cd/kg de peso son suficientes para inhibir un 40% el ALA-D y producir una inhibición ligera de la Deaminasa.

Luego de 19 inyecciones de cadmio, se llega en riñón a concentraciones del metal suficientes como para inhibir 60% la actividad del ALA-D y 30% la de la Deaminasa.

Si ahora nos remitimos a los valores de actividad enzimática obtenidos *in vivo* en hígado y riñón, veremos que en ningún caso se obtiene una inhibición significativa de dicha actividad.

Sin embargo, creemos que estos resultados tienen una justificación pues, recordemos que en las intoxicaciones crónicas con cadmio, se induce la síntesis de una metalotioneína, proteína de bajo peso molecular, que al igual que las enzimas en estudio se encuentra en la fracción soluble del citoplasma. Como el cadmio tiene muy alta afinidad por dicha proteína se une a la misma, quedando sólo 10-20% del metal libre para actuar sobre otras moléculas biológicas, entre ellas las enzimas en estudio. En consecuencia, las concentraciones de cadmio no son suficientes para producir una inhibición medible y reproducible de la actividad.

Las mayores inhibiciones enzimáticas se observaron en GR, en los cuales, la concentración de cadmio era muy baja, y que paradójicamente requerían una mayor concentración del metal para llegar a una inhibición del 50%, según se observa en la Tabla III (IV.2).

Por lo tanto, en este caso la inhibición del ALA-D no puede atribuirse a una acción directa del cadmio presente en los hemolizados sobre la enzima.

No se descarta un efecto del cadmio sobre algún paso anterior o posterior al de las enzimas estudiadas en la biosíntesis del hemo.

Hemos observado además, en concordancia con datos de otros autores, que en las intoxicaciones con cadmio se produce una significativa acumulación de zinc en hígado y en riñón (Figura 57).

Como también se ha estudiado (IV.2.2) el efecto *in vitro* de concentraciones crecientes de zinc sobre las actividades enzimáticas, resulta de interés comparar la influencia de las concentraciones de zinc halladas *in vivo* con los resultados *in vitro*.

En IV.2 las curvas para zinc, se obtuvieron en función del zinc agregado, sin considerar el zinc endógeno. Por ello, a efectos comparativos, habrá que tener en cuenta sólo el aumento de concentración del zinc con respecto a los valores normales, y no a la concentración del zinc total hallada en los sobrenadantes. La Tabla VIII suministra la transformación de $\mu\text{g/ml}$ a mol/l (M) para los aumentos de concentración de zinc hallados en los sobrenadantes de hígado en las experiencias *in vivo* y los porcentajes de actividad de ALA-D obtenidos *in vitro* para dichas concentraciones.

Se deduce que para aumentos de concentración de zinc en el rango 2,2-5,4 $\mu\text{g/ml}$ de sobrenadante, no se producirá inhibición de ninguna de las tres enzimas en estudio por efecto del zinc ($<10^{-4}\text{M}$).

Estos aumentos de concentración de zinc se obtienen con 9 a 13 dosis de 0,6 mg Cd/kg de peso. Justamente en este rango de concentraciones el zinc podría ejercer un efecto ligeramente activante.

Para mayor número de dosis se llega a una zona vecina a los niveles inhibitorios de ALA-D pero sin alcanzarlos. Sin embargo, se considera que no es probable que la inhibición ocurra, pues se sabe que el aumento de concentración del zinc se debe a que la metalotioneína inducida por el cadmio lo captura, esto ocasiona también un aumento del contenido de zinc en los distintos niveles de la estructura subcelular, pero por la misma razón sólo una parte reducida del zinc estaría disponible para ejercer algún efecto sobre otras fracciones proteicas.

Tabla VIII

mg totales de Cd inyectados/ kg de peso	Zn $\mu\text{g/ml S}$	ΔZn $\mu\text{g/ml S}$	ΔZn mol/l S (M)	+log ΔZn +log (M)	ALA-D <i>in vitro</i>
11	10,1	8	$1,34 \cdot 10^{-4}$	-3,87	73%
9,6	8,7	6,6	$1,01 \cdot 10^{-4}$	-3,99	93%
8,4	7,5	5,4	$8,25 \cdot 10^{-5}$	-4,08	95%
7,2	6,3	4,2	$6,42 \cdot 10^{-5}$	-4,19	97%
6,2	5,3	3,2	$4,89 \cdot 10^{-5}$	-4,31	98,5%
5,2	4,3	2,2	$3,36 \cdot 10^{-5}$	-4,47	99,9%
3,1	2,2	0,1	$1,52 \cdot 10^{-6}$	-5,80	97%

Transformación de $\mu\text{g/ml}$ a moles/l (M) para los aumentos de concentración de zinc hallados en los sobrenadantes de hígado, luego de la administración i.p. de cadmio y porcentaje de actividad de ALA-D con respecto a los controles obtenidos *in vitro* para dichas concentraciones.

La Tabla IX es similar a la Tabla VIII, pero corresponde a riñón.

Como la acumulación de zinc en riñón es mucho menor que en hígado, no se alcanzan concentraciones de zinc que *in vitro* modifiquen significativamente la actividad enzimática en dicho órgano.

Tampoco en bazo y en GR se llega a aumentos de concentración suficientes como para que el zinc ejerza un efecto inhibitorio.

También en el caso del zinc, tratándose de un elemento metálico bivalente, podría ejercer alguna otra acción sobre un paso anterior o posterior en la biosíntesis del hemo.

Administración *in vivo* de cadmio-zinc y modificaciones de la actividad del ALA-D

Se insiste en un efecto activador del zinc, pues algunas evidencias experimentales lo apoyarían.

En ensayos en los cuales se administraron paralelamente dosis de zinc de 12 mg/kg de peso (que inducen la síntesis de metalotioneínas) y dosis de cadmio altas (1,1 mg/kg de peso), se observaron luego de seis dosis de cadmio y cuatro de zinc aplicadas a intervalos regulares en un lapso de 15 días, aumentos significativos de la actividad de ALA-D no sólo de bazo y GR, sino también de hígado y riñón.

Estos efectos fueron de mayor magnitud que los observados administrando únicamente cadmio en igual dosis, hallándose una concentración de zinc en hígado algo superior en los animales que recibieron los dos metales.

En otras experiencias se administraron dosis de zinc de 2,4 mg/kg de peso (no inductoras de la síntesis de metalotioneínas) y de cadmio de 0,55 mg/kg de peso, registrándose, luego de inyectar 12 dosis de cadmio y 20 de zinc en un lapso de un mes, aumentos de menor magnitud de las actividades enzimáticas que en las experiencias anteriores. En estos casos, si bien las concentraciones totales de cadmio y zinc administradas fueron las

Tabla IX

mg totales de Cd inyectados/ kg de peso	Zn $\mu\text{g/ml S}$	ΔZn $\mu\text{g/ml S}$	ΔZn mol/l S (M)	+log ΔZn +log (M)	ALA-D <i>in vitro</i>
entre 5,4 y 8	3,2	1,4	$2,14 \cdot 10^{-}$	-4,66	98%
	2,9	1,1	$1,68 \cdot 10^{-}$	-4,77	99,5%
	2,5	0,7	$1,07 \cdot 10^{-}$	-4,97	100%

Transformación de $\mu\text{g/ml}$ a moles/l (M) para los aumentos de concentración de zinc hallados en los sobrenadantes de riñón, luego de la administración i.p. de cadmio y porcentaje de actividad de ALA-D con respecto a los controles obtenidos *in vitro* para dichas concentraciones.

mismas que en las experiencias con dosis más altas, la acumulación de zinc y de cadmio en el organismo fue algo menor.

Finalmente, en el grupo de animales que se usaron como testigos de cadmio en estas experiencias y que recibieron únicamente 12 dosis de 0,55 mg Cd/kg de peso, se observaron en algunos casos inhibiciones de la actividad del ALA-D en bazo y/o en GR, no registrándose en otros efecto alguno.

Recordemos que la concentración de cadmio y de zinc en el hígado tuvo aparentemente una dependencia mayor con la dosis de cadmio que con la administración simultánea de zinc.

O sea que en estas experiencias el zinc parecería actuar como activador enzimático.

. Mecanismos que podrían producir a la variabilidad de resultados

i) Se sabe que a nivel de enzimas y componentes celulares, el zinc cumple importantes funciones, ya que:

Es un componente de las biomembranas y puede estabilizar la membrana celular e impedir la entrada de sustancias tóxicas en la célula (Chvapil, Ryan, Elias y Peng, 1973).

Es necesario para estabilizar o aún aumentar la actividad de enzimas como la alcohol deshidrogenasa (Reinhold, Pascoe, Arslanian y Bitar, 1970) o la fosfatasa alcalina (citado por Abdulla, Svensson y Haeger-Aronsen, 1979).

. Muchas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los ácidos nucleicos o proteínas son zinc metaloproteínas (Prasad y Oberleas, 1973; Valenzuela, Morris, Faras, Levinson y Rutter, 1973; Duncan y Hurley, 1978). La deficiencia de zinc ocasionaría un bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Golden y Golden, 1981).

Por lo tanto, se puede esperar que una falta de zinc disponible podría conducir a alteraciones de las membranas, que tendrían como consecuencia pérdidas de enzimas de los órganos.

Alternativamente podría ocurrir una quelación del zinc

de ciertas enzimas por efecto de la metalotioneína.

Se desconoce hasta el momento la influencia del zinc movilizado por el organismo para unirse a la cadmio-metalotioneína o del zinc proveniente de la degradación de dicha proteína en los diversos procesos bioquímicos en los cuales interviene el metal.

Winge, Premakumar y Ragajopalan (1978) encontraron que la alcohol deshidrogenasa, una enzima cuya actividad está relacionada con el contenido de zinc hepático, se halla reducida en un 25% en animales que reciben una dieta deficiente en zinc, pero cuando estos animales se tratan con cadmio la actividad de la enzima aumenta significativamente, o sea que el zinc movilizado podría satisfacer demandas tisulares del metal aparte de incorporarse a la tioneína.

De modo que, a consecuencia de la formación de metalotioneínas y de la incorporación de zinc a las mismas podría producirse una activación de las enzimas en estudio, pero no debemos descartar tampoco una inhibición de las mismas por alteración de membranas o captura del zinc; es probable entonces que ambos procesos jueguen un papel en determinados momentos, luego del ingreso del cadmio al organismo.

ii) Diversas experiencias con animales han demostrado que se suelen producir interacciones entre elementos con características químicas similares (Hill y Matrone, 1970), las cuales pueden ser antagónicas o sinérgicas.

Sandstead (1981) ha representado esquemáticamente algunas de las interacciones que se pueden producir entre elementos esenciales y tóxicos, que se muestran en la Figura 69.

Frecuentemente existe una relación indirecta entre el contenido de un metal en los tejidos y las lesiones metabólicas o patológicas que origina.

La detección de cambios secundarios en la concentración tisular de otros elementos cuya distribución o función se modifica por alteración del balance de los mismos, provee una indicación útil de que la retención tisular del metal tóxico ha

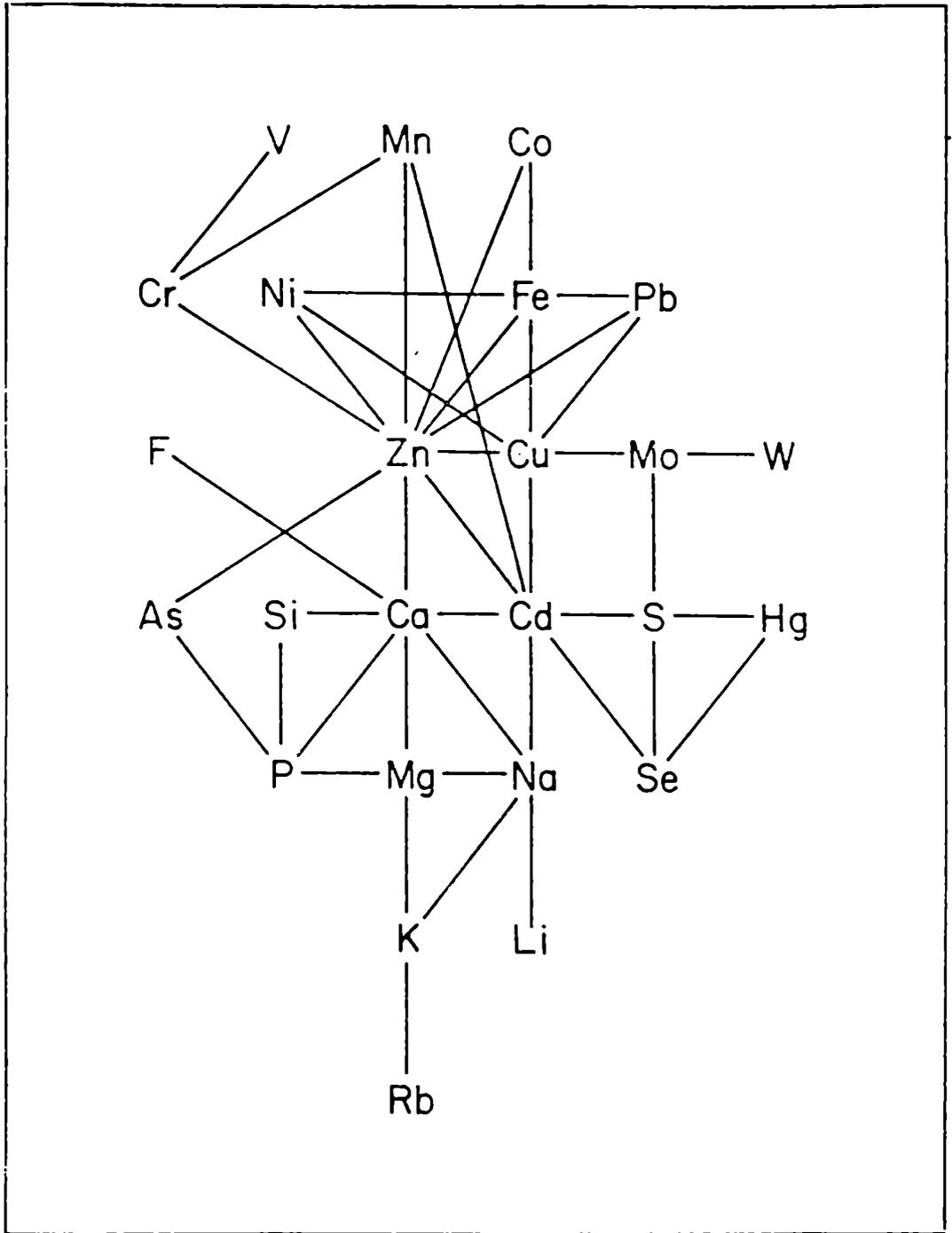


Figura 69: Esquema de la interacción entre el cadmio y otros metales

excedido las concentraciones tolerables.

Así, en las intoxicaciones crónicas con cadmio, no es la acumulación de zinc junto con el cadmio la única modificación de los elementos esenciales que se produce en el organismo.

Se ha comprobado también que tiene lugar una acumulación de cobre, que ha sido estudiada en riñón, observándose que no existe una proporcionalidad entre la cantidad de cadmio administrado y la concentración de cobre en riñón, o que por lo menos la dispersión de datos entre distintos animales es grande.

Según Irons y Smith (1976) el cobre tiene mayor afinidad por la metalotioneína que el cadmio. Suzuki (1979) atribuye la toxicidad renal del cadmio a que dicho metal es reemplazado por el cobre en la metalotioneína y así se libera cadmio tóxico al riñón.

A su vez el cobre es un inhibidor del ALA-D de GR humanos. Nelson et al. (1980) han hallado, en seres humanos, que la actividad de ALA-D en sangre aumenta con la concentración de zinc y disminuye con la concentración de cobre existente en plasma. Una variación de los niveles de cobre podría ocasionar entonces modificaciones enzimáticas.

Por otro lado en bazo y GR las concentraciones de zinc y de cadmio resultaron bastante variables, y justamente estas diferencias de concentración de los distintos elementos metálicos son las que pueden dar lugar a valores de actividad enzimática distintos.

Alternativamente, dichas variaciones pueden causar alteraciones en el organismo, que indirectamente afecten a las enzimas en estudio.

iii) Es necesario tener en cuenta además que alguna diferencia en la alimentación, temperatura o la susceptibilidad individual pueden también actuar modificando los efectos del cadmio.

. Efectos del ácido ascórbico

En cuanto al ascórbico sabemos que revierte algunos de

los efectos tóxicos del cadmio. Sin embargo, ello se ha atribuido, en general, a una acción a nivel de la absorción intestinal, debido a un mejoramiento de la absorción de hierro.

En nuestro caso, se ha estudiado la influencia de la administración de ascórbico por vía s.c., en dosis apenas superiores a las empleadas en la terapéutica humana.

En dichas experiencias se observó que el ascórbico solo, aumenta la actividad de ALA-D de GR, aunque no en presencia de cadmio.

En bazo se produjo en algunos casos cierta reversión de la inhibición del ALA-D.

Conclusiones respecto al uso del zinc en la terapia

El zinc podría prevenir o reparar daños ocasionados por el cadmio sobre diversos sistemas del organismo, ya que luego de la movilización inicial del metal esencial se pueden manifestar deficiencias del mismo debido a su unión a las metalotioneínas.

El zinc se diferencia de otros elementos traza, en que no parece existir un depósito funcional del mismo. Casi todo el zinc se halla atrapado en los huesos o en las proteínas, por lo cual se desarrollan síntomas de carencia, inmediatamente después de administrar una dieta deficiente en zinc (Golden y Golden, 1981).

Según Petering, Johnson y Stemmer (1971) el cadmio puede alterar varias respuestas biológicas al zinc como velocidad de crecimiento, parámetros hematológicos, etc.

Pero tampoco se puede hacer uso indiscriminado del zinc. Muchas veces el requerimiento de un nutriente en la dieta depende parcialmente de la concentración de los otros nutrientes.

Existe bastante información acerca de una determinada interacción entre el zinc y el cobre, originada en las observaciones de Smith y Larson (1946) quienes descubrieron que la anemia producida en ratas por un exceso de zinc en la dieta se podía

aliviar administrando cobre. Según Underwood (1977) una concentración alta de zinc en la dieta puede aumentar el requerimiento de cobre, y por otro lado, disminuir la toxicidad de este mismo metal. Una concentración alta de cobre en la dieta puede asimismo aumentar el requerimiento de zinc y disminuir la toxicidad de este último metal.

Actualmente tiene mucha relevancia la hipótesis de que una alta relación zinc/cobre en la dieta es un factor importante en la etiología de la enfermedad isquémica (coronaria) del corazón, que es una de las principales causas de muerte en gran parte del mundo civilizado (Klevay, 1980). Esta hipótesis se basó originalmente en la hipercolesterolemia producida en ratas que ingerían una relación alta de zinc a cobre (Klevay, 1975) que se vió luego apoyada por muchos otros estudios.

Por otra parte, la administración de dosis elevadas de cobre también puede originar efectos tóxicos. En el plasma existe una proteína, la ceruloplasmina, que capta el metal. Pero si se excede su capacidad se pueden producir efectos tóxicos especialmente en hígado, riñón y sistema nervioso central, probablemente debido a su acción sobre las membranas celulares (Hochstein, Sree Kumar y Forman, 1980).

La incorporación de cobre hepático en la ceruloplasmina se inhibe en ratas que reciben alimento conteniendo 100 mg Cd/kg (Whanger y Weswig, 1970). Se sugirió que dicha respuesta puede estar relacionada con la concentración aumentada de cobre en la metalotioneína (Klaassen, 1978).

Sin embargo, en las intoxicaciones con altas dosis de cadmio, no conviene inyectar cobre, ya que este último metal podría desplazar al cadmio de la metalotioneína, liberando así el metal tóxico (Hochstein et al., 1980).

Aún no se ha estudiado los efectos secundarios de la administración de zinc durante la intoxicación crónica con cadmio, por ejemplo sobre la colesterolemia. El zinc puede actuar tanto como protector de la intoxicación, cuanto como antagonista del cobre, y hay que conocer mejor las interacciones entre distintos elementos traza, para poder seleccionar las dosis correctas a usar con el objetivo de revertir o enmascarar los

efectos del cadmio.

.La ceruloplasmina cumpliría además una función en la liberación de hierro de la ferritina y la incorporación a la transferrina, con el subsiguiente pasaje de hierro ferroso al hemo y la formación de hemoglobina (Hsieh y Frieden, 1975).

Si el cobre no se incorporara a la ceruloplasmina debido a la intoxicación con cadmio, podría alterarse la biosíntesis del hemo a través de un mecanismo indirecto.

Conclusiones respecto del uso del ascórbico en la terapia de la intoxicación con cadmio

El ascórbico sólo en algunos casos produjo un aumento de la actividad enzimática en bazo.

Las dosis empleadas (algo mayores que la dosis terapéutica) pueden haber sido insuficientes.

Según Pauling (1970, 1971) pueden administrarse a seres humanos dosis muy altas de ácido ascórbico obteniéndose una serie de efectos beneficiosos para la salud.

Para otros autores, sin embargo, dosis excesivas de dicha vitamina pueden ocasionar efectos perjudiciales. El ácido ascórbico dificulta la absorción de cobre del tracto intestinal de varias especies (Evans, 1973). El ácido ascórbico produce hipercolesterolemia en ratas (Klevay, 1976). Extrapolando al hombre las dosis estarían en el rango de las empleadas con fines terapéuticos.

IV.3.8 Diuresis durante las experiencias de administración oral de cadmio

En todas las experiencias se administró 50 ppm de cadmio en el agua de bebida, con una sola excepción en la cual luego de 37 días se pasó a una concentración de 60 ppm.

En la Figura 70 puede observarse la diuresis a lo largo del tiempo, en tres de las experiencias. El volumen de orina depende de la época del año, siendo mucho mayor en invierno que en

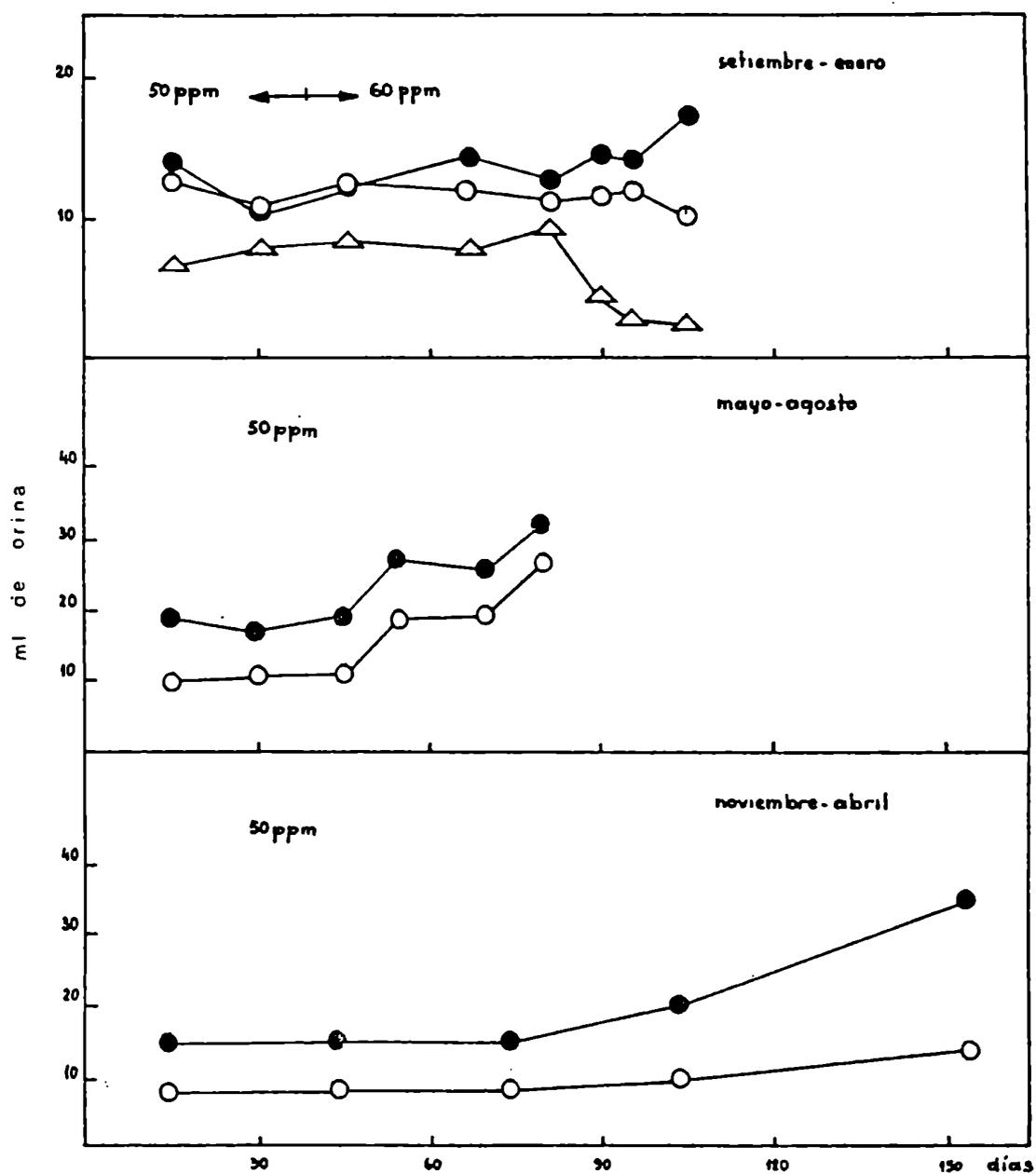


Figura 70: Excreción de orina a lo largo de tres experiencias de intoxicación con cadmio en el agua de bebida. (O) controles, (●) animales tratados con cadmio. (Δ) caso A (ver IV.3.1).

verano, tanto para los controles como para los animales tratados con cadmio.

Sin embargo, en promedio excretan siempre más orina las ratas contaminadas que los controles. También puede apreciarse que la diferencia se hace mayor al aumentar el tiempo de intoxicación.

Por separado se muestra la excreción de orina para el caso A, discutido en IV.3.1 (Figura 70).

De estos patrones surge que es más significativo expresar los resultados de los productos eliminados por orina en función de la excreción diaria y no del volumen de orina.

IV.3.9 Excreción urinaria de cadmio durante las experiencias *in vivo*

IV.3.9.1 Administración de cadmio por vía oral

A lo largo de las distintas experiencias de administración de 50 ppm de cadmio en el agua de bebida, la excreción diaria de cadmio fue aumentando progresiva aunque irregularmente, con respecto a los controles (Figura 71).

Ensayos semicuantitativos de excreción de proteínas confirmaron que en los animales estudiados no se había llegado al estadio nefrotóxico, en el cual se produce marcada proteinuria y aumento muy brusco de la concentración de cadmio en orina. Según Bernard, Lauwerys y Gengoux (1981) esta etapa se alcanza en ratas Sprague Dawley recién luego de ocho meses de administración de 200 ppm de cadmio en el agua de bebida.

IV.3.9.2 Administración de cadmio por vía i.p.

Utilizando esta vía de administración, tampoco se ha llegado a la etapa nefrotóxica. Luego de 19 inyecciones de 0,6 mg/kg se obtienen en orina valores diarios de excreción de cadmio de $0,25 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{día}$, mientras que Raghavan y Gonick (1980), han encontrado en orina concentraciones de cadmio del orden de $3,36 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{día}$, luego de la aparición del síndrome de Fanconi, discutido en I.11.7.10.3. Por otro lado, Bonner et al. (1981)

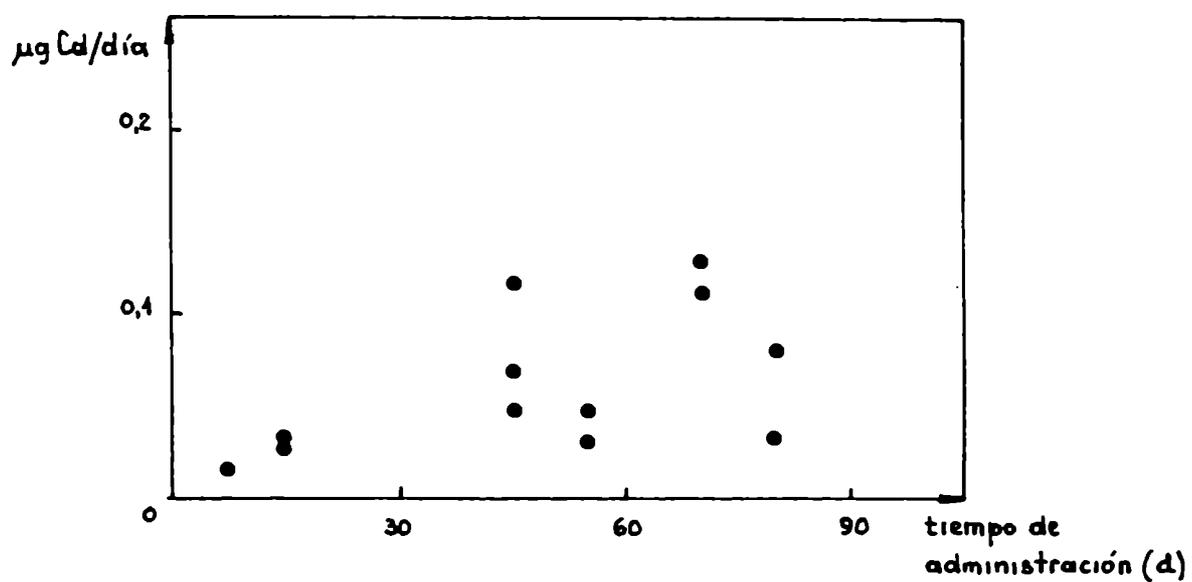


Figura 71: Excreción de cadmio a lo largo de las experiencias de administración del metal por vía oral.

observan un marcado aumento de la concentración urinaria de cadmio recién luego de la inyección s.c. de 1,5 mg Cd/kg de peso diarios, durante 15 días.

IV.3.10 Excreción de productos intermedios de la biosíntesis del hemo

IV.3.10.1 Excreción de productos intermedios de la biosíntesis del hemo en las experiencias de administración oral de cadmio

En todas las experiencias se administró 50 ppm de cadmio en el agua de bebida, salvo en una de ellas en la cual se pasó luego de 37 días a 60 ppm.

Otros aspectos de algunas de estas experiencias fueron estudiados en IV.3.1 y IV.3.2.

IV.3.10.1.1 Excreción de ALA y PBG

Los valores de excreción diaria de ALA y PBG no presentaron aparentemente modificaciones debido a la administración de cadmio, como puede observarse en la Figura 72 que se ha seleccionado como ejemplo de lo acontecido a lo largo de las diversas experiencias.

Los valores de excreción de ALA y PBG fueron relativamente variables tanto en las ratas controles, como en las tratadas con cadmio.

Es interesante mencionar que los valores medios de ALA aquí obtenidos ($32,09 \pm 5,65$ $\mu\text{g}/\text{día}$, promedio \pm S.D.) coinciden con los encontrados por Mahaffey, Goyer y Haseman (1973).

IV.3.10.1.2 Excreción de porfirinas en orina

En cuanto a la excreción de porfirinas en orina, los animales tratados con cadmio presentaron valores de excreción total de porfirinas normales aunque ligeramente menores que los de los controles. La Figura 73 ejemplifica lo sucedido a lo largo de las distintas experiencias.

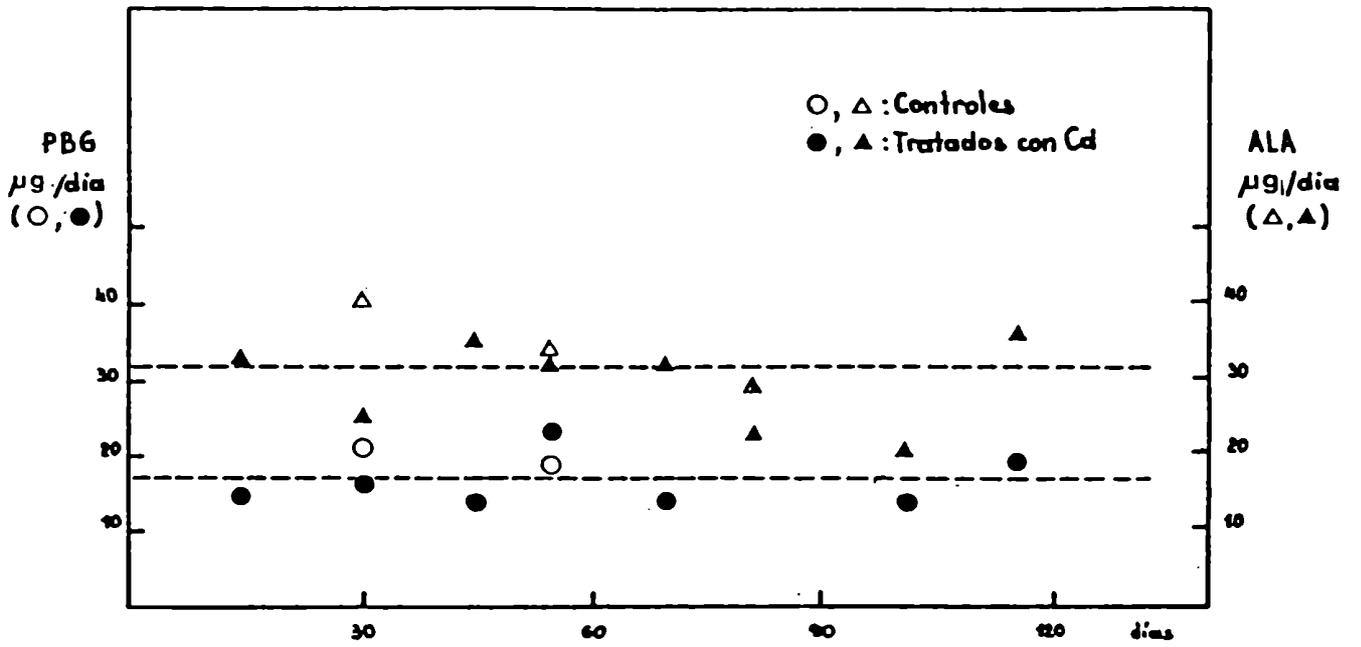


Figura 72: Excreción de PBG y ALA durante una típica experiencia de intoxicación con 50 ppm de cadmio en el agua de bebida.

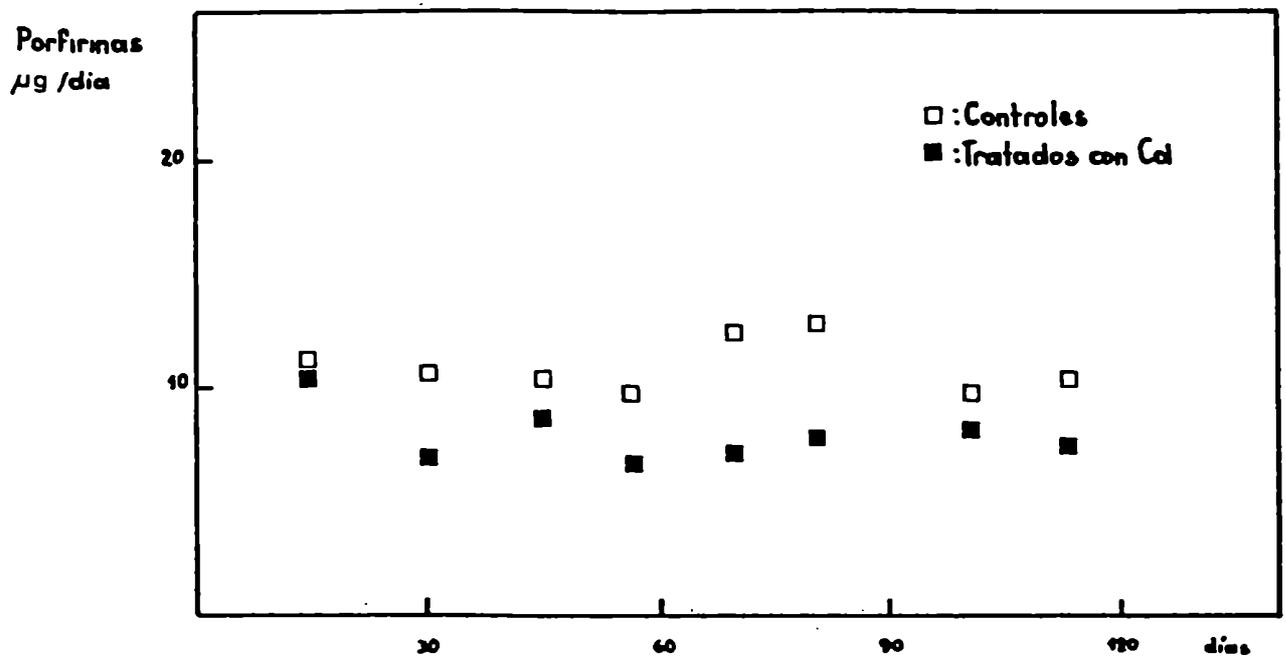


Figura 73: Excreción de porfirinas en orina en controles y en animales tratados con 50 ppm de cadmio en el agua de bebida.

En cuanto al patrón de excreción, no se observaron diferencias entre controles y animales tratados con cadmio (Copro: 90%, Hepta: 4%, Uro: 5%, Suburos: 1%). En la Figura 74 puede observarse el patrón de separación de las distintas porfirinas, empleando los eluyentes detallados en III.2.4.2.3.

IV.3.10.1.3 Excreción de porfirinas en heces

El rango de variación de los valores normales de porfirinas esterificadas en heces expresadas en $\mu\text{g/g}$ es amplio (76-178), con un promedio de 127 $\mu\text{g/g}$. Por ello, pequeñas variaciones en los valores de excreción pueden pasar desapercibidos. Sin embargo, las ratas contaminadas excretan en general entre un 10 y un 27% de porfirinas en exceso con respecto a los controles.

La cromatografía en capa delgada de sílica gel G cuantitativa mostró para los normales Proto: 64%, Isocopro: 5-8%, Copro: 20,7%, Penta: 3,5%, Hexa: 2%, Uro: 2% y Suburos: 2%. En la Figura 74 se ilustra el patrón de elución.

En lo que respecta a los animales intoxicados, mientras que la proporción de los componentes menores prácticamente no varió, se observó un aumento constante de coproporfirina y una correspondiente disminución de protoporfirina a lo largo de las experiencias, lo cual resultó evidente a partir de los 10 días de iniciada cada experiencia (Figura 75).

IV.3.10.2 Excreción de precursores y porfirinas en orina y en heces, luego de la administración de cadmio por vía i.p.

Las dosis empleadas fueron 0,6 mg Cd/kg de peso, tres veces por semana.

Al igual que durante las experiencias de intoxicación por vía oral no se observaron variaciones en cuanto a los patrones de excreción de precursores ni de porfirinas en orina.

Se observó también la disminución de la relación Proto/Copro en heces, pero este fenómeno ocurrió más tardíamente y fue de menor magnitud que la variación observada durante las ex

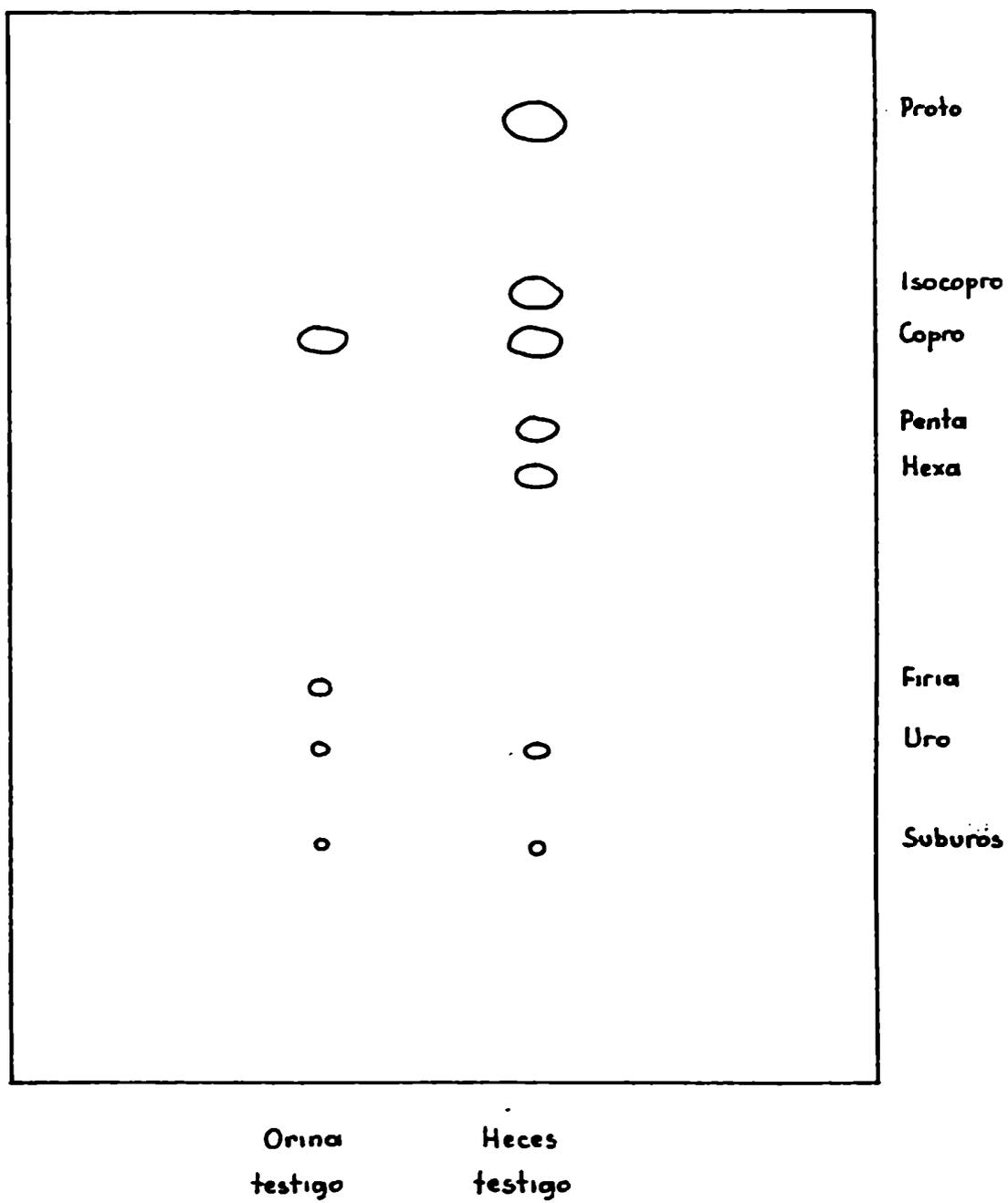


Figura 74: Separación cromatográfica de las distintas porfirinas en orina y en heces.

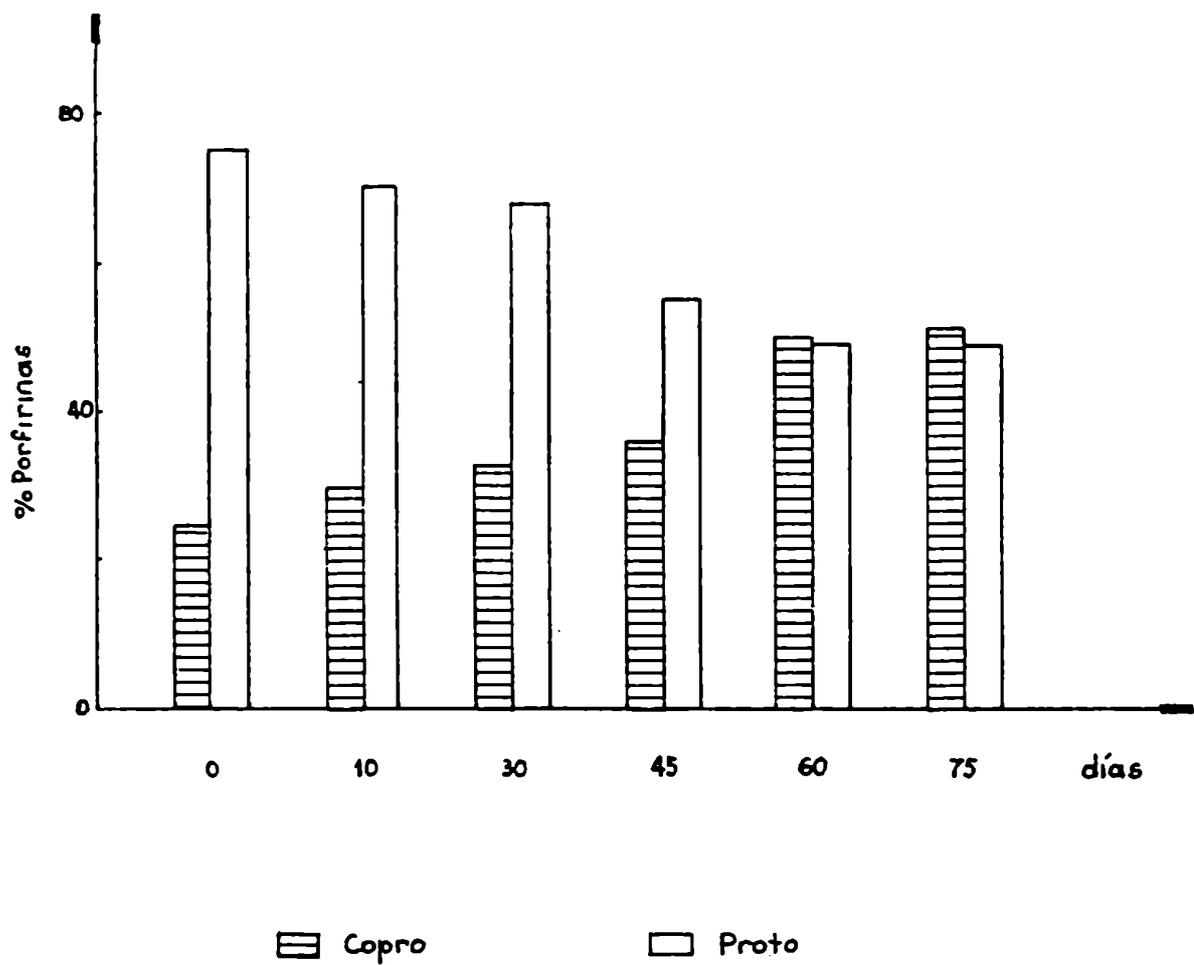


Figura 75: Excreción relativa de copro y protoporfirina a lo largo de una experiencia de intoxicación con cadmio por vía oral.

periencias de intoxicación oral a largo plazo.

IV.3.10.3 Efecto del agregado de cadmio a la solución de esterificación de las porfirinas en heces

Se agregaron concentraciones de cadmio equivalentes a 100 μg de metal por g de heces a la solución de esterificación de heces normales, y se encontró que el cadmio no producía ninguna alteración en este proceso.

IV.3.10.4 Discusión y conclusiones

En condiciones normales, se excretan pequeñas cantidades de intermediarios de la biosíntesis del hemo en orina y en heces.

La vía de excreción de las diversas porfirinas depende de el número de carboxilos libres en las cadenas laterales sustituyentes de los anillos pirrólicos, lo cual condiciona su distinta hidrosolubilidad y también del estado redox del organismo, del funcionamiento del hígado y del riñón, y de la integridad de los mecanismos de transporte.

Durante las experiencias realizadas se observó una pequeña disminución de la coproporfirina en orina, y un aumento de la proporción de esta misma porfirina en heces a expensas de la protoporfirina.

La coproporfirina, se excreta por vía biliar, mientras que el coproporfirinógeno, puede eliminarse tanto por orina como por heces (Enríquez de Salamanca, Arnalich Fernández, Romero García - Alix y Jiménez Sánchez, 1979).

Sano y Rimington (1963) han demostrado que *in vivo* se puede producir oxidación del porfirinógeno a la porfirina y la magnitud de dicha oxidación se puede encontrar influenciada por factores fisiológicos tales como el estado del animal con respecto al ácido ascórbico o glutatión. De manera que la falta de reductor en el organismo producida por la intoxicación con cadmio podría llevar a la oxidación del coproporfirinógeno a coproporfirina, que se excretaría así en mayor proporción por heces, disminuyendo entonces su excreción por orina.

El hígado humano normal contiene ambos isómeros de la coproporfirina con predominio del III. (Aziz y Watson, 1969) siendo la relación Copro I/Copro III aproximadamente 0,6 mientras que en la bilis dicha relación es 2,5 (Kaplowitz, Javitt y Kappas, 1972). En orina normal el isómero III de la coproporfirina representa alrededor del 75% del total (Koskelo, Toivonen y Adlercreutz, 1967; Ben-Ezzer, Rimington, Shani, Seligson, Sheba y Szeinberg, 1971; Doss y Schermuly, 1975), es decir que parece evidente que la coproporfirina I se excreta principalmente por bilis, mientras que la coproporfirina III lo hace por riñón. Durante el curso de diversas enfermedades se altera la relación Copro I/Copro III y también la cantidad total de porfirinas excretadas.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) permite separar los isómeros I y III. De esta manera se podrían detectar alteraciones de los mecanismos de excreción o bien de producción de los distintos isómeros que quizás explicarían las anomalías observadas en cuanto a la excreción de coproporfirina.

Hay que tener en cuenta además, que durante las intoxicaciones crónicas con cadmio se producen alteraciones renales y podría suceder que estas modificaran la permeabilidad de las membranas y por ende el pasaje de las porfirinas a través de las mismas.

Por otro lado el pH urinario puede influir sobre la cantidad de porfirinas eliminadas por orina (Bourke, Copeman, Milne y Stokes, 1966). La coproporfirina, ácido orgánico débil, se encuentra no ionizada a pH ácido, en estas condiciones resulta liposoluble y puede atravesar las membranas lipídicas celulares. Por encima de pH 7,2, la porfirina se ioniza en más del 50%, siendo más hidrosoluble que liposoluble, por lo cual no se reabsorbe bien a través de la pared del túbulo renal distal, siendo excretada por la orina. En los animales contaminados con cadmio se observó a veces una orina más ácida que en los controles, lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

ABDULLA, M. y HAEGER-ARONSEN, B. (1971) *Enzyme* 12, 708.

ABDULLA, M. y HAEGER-ARONSEN, B. (1973) *IRCS Int. Res. Commun. Syst.* 73, 8.

ABDULLA, M.; SVENSSON, S. y HAEGER-ARONSEN, B. (1979) *Arch. Environ. Health* 34, 464.

ADAMS, R.G.; HARRISON, J.F. y SCOTT, P. (1969) *Q. J. Med.* 38, 425.

AMACHER, D.E. y EWING, K.L. (1975) *Arch. Environ. Health* 30, 510.

ANDO, M.; SAYATO, Y.; TONOMURA, M. y OSAWA, T. (1977) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 321.

ARMITAGE, I.M.; SCHOOT UITERKAMP, A.J.M.; CHLEBOWSKI, J.F. y COLEMAN, J.E. (1978) *J. Mag. Res.* 29, 375.

ARMITAGE, I.M.; PAJER, R.T.; SCHOOT UITERKAMP, A.J.M.; CHLEBOWSKI, J.F. y COLEMAN, J.E. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5710.

AZIZ, M.A. y WATSON, C.J. (1969) *Clin. Chim. Acta.* 26, 525.

BAR, A. y WASSERMAN, R.H. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 191.

BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H. y SHEMIN, D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8965.

BATLLE, A.M. del C. (1973) *Bioq. Clin.* 7, 307.

BATLLE, A.M. del C. y ROSSETTI, M.V. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 251.

BATLLE, A.M. del C. y STELLA, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 861.

BATLLE, A.M. del C.; BENSON, A. y RIMINGTON, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731.

BATLLE, A.M. del C.; FERRAMOLA, A.M. y GRINSTEIN, M. (1967)

Biochem. J. 104, 244.

BATLLE, A.M. del C.; WIDER de XIFRA, E.A. y STELLA, A.M. (1978) Int. J. Biochem. 9, 871.

BATLLE, A.M. del C.; LLAMBIAS, E.B.C.; WIDER de XIFRA, E.A. y TIGIER, H.A. (1975) Int. J. Biochem. 6, 591.

BATLLE, A.M. del C.; WIDER de XIFRA, E.A.; STELLA, A.M.; BUSTOS, N. y WITH, T.K. (1979) Clin. Sci. Mol. Med. 57, 63.

BELILES, R.P. (1975) Metals, en Toxicology - The basic science of poisons (Ed. L.J. Casarett y J. Doull), pág. 454-502, MacMillan New York.

BEN-EZZER, J.; RIMINGTON, C.; SHANI, M.; SELIGSOHN, U.; SHEBA, Ch. y SZEINBERG, A. (1971) Clin. Sci. 40, 17.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. y GENGOUX, P. (1981) Toxicology 20, 345.

BERNARD, A.; GORET, A.; ROELS, H.; BUCHET, J.P. y LAUWERYS, R. (1978) Toxicology 10, 369.

BIRGERSSON, B.; CARTER, R.E. y DRAGONBERG, T. (1977) J. Mag. Res. 28, 299.

BLOOMER, L.C. y SOURKES, T.L. (1973) Biochem. Soc. Trans. 1, 982.

BLUNDELL, T.L. y JENKINS, J.A. (1977) Chem. Soc. Rev. 6, 139.

BONNER, F.W.; KING, L.J. y PARKE, D.V. (1981) Toxicology 19, 247.

BORDER, E.A.; CANTRELL, A.C. y KILROE-SMITH, T.A. (1976) Environ. Res. 11, 319.

BOURKE, E.; CAPEMAN, P.N.; MILNE, M.D. y STOKES, G.S. (1966) Lancet 1, 1394.

BREDDERMAN, P.J. y WASSERMAN, R.H. (1974) Biochemistry 13, 1687.

- BREMNER, I. (1974) Q. Rev. Biophys. 7, 75.
- BREMNER, I. (1978) World Rev. Nutr. Dietetics 32, 165.
- BREMNER, I. y DAVIES, N.T. (1973) Rep. Rowett Inst. 29, 126.
- BREMNER, I. y DAVIES, N.T. (1974) Biochem. Soc. Trans. 2, 425.
- BREMNER, I. y DAVIES, N.T. (1975) Biochem. J. 149, 735.
- BREMNER, I. y DAVIES, N.T. (1976) Br. J. Nutr. 36, 101.
- BREMNER, I. y MARSHALL, R.B. (1974) Br. J. Nutr. 32, 283.
- BREMNER, I. y YOUNG, B.W. (1976) Biochem. J. 155, 631.
- BREMNER, I.; DAVIES, N.T. y MILLS, C.F. (1973) Biochem. Soc. Trans. 1, 982.
- BREMNER, I.; HOEKSTRA, W.G.; DAVIES, N.T. y YOUNG, B.W. (1978) Biochem. J. 174, 883.
- BRYAN, S.E.; HIDALGO, H.A.; KAPPA, V. y SMITH, H.A. (1979) Environ. Health Perspect. 28, 281.
- BUGANY, H.; FLOHE, L. y WESER, U. (1971) FEBS Lett. 13, 92.
- BÜHLER, R.H.O. y KÄGI, J.H.R. (1974) FEBS Lett. 39, 229.
- BUNN, C.R. y MATRONE, G. (1966) J. Nutr. 90, 395.
- BURCH, G.E. y WALSH, J.J. (1959) J. Lab. Clin. Med. 54, 66.
- BURGEN, J.; MARTZ, R.; FORNEY, R.; STEINRAUF, L. y BLICKENSTAFF, (1976) Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 157.
- CAIN, K. y HOLT, D.E. (1979) Chem. Biol. Interact. 28, 91.
- CAMARA DE LA INDUSTRIA QUIMICA (1978) Perfiles de la Industria Química, pág. 23, Buenos Aires, Argentina.
- CAMPBELL, J.K. y MILLS, C.F. (1974) Proc. Nutr. Soc. 33, 15 A.
- CAMPBELL, J.K.; DAVIES, N.T. y MILLS, C.F. (1978) Trace Element Metabolism in Man and Animals, 3, Proceedings of the 3rd International Symposium, M. Kirchgessner Ed., Arbeitsgemeinschaft

- für Tiereinahrungsforschung Freising, Weihestephan, Alemania Occ.
- CARLEVARI, I.J.F. (1980) La Argentina: Geografía humana y económica, 6ta Ed., Editorial Argón, Buenos Aires, Argentina.
- CEMPEL, M. y WEBB, M. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 2067.
- CLARKE, E.G.C. (1969) Isolation and identification of drugs, The Pharmaceutical Press, London.
- COLUCCI, A.B.; WINGE, D. y KRASNO, J. (1975) Arch. Environ. Health 30, 153.
- COOKSON, G. y RIMINGTON, C. (1954) Biochem. J. 57, 476.
- CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES (1966) Serie: Evaluación de los recursos naturales de la Argentina, Tomo VI, Recursos minerales, Sección 16, pág. 68.
- CORRIE, A.M.; WALKER, M.D. y WILLIAMS, D.R. (1976)
- COUSINS, R.J. (1979) Environ. Health Perspect. 28, 131.
- COUSINS, R.J.; BARBER, A.K. y TROUT, J.R. (1973) J. Nutr. 103, 964.
- CURRY, A. (1976) Poison Detection in Human Organs, p. 133, Ed. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A.
- CHATTERJEE, G.C.; BANERJEE, S.K. y RUDRAPAL, D. (1973) Int. J. Vit. Nutr. Res. 43, 370.
- CHATTERJEE, G.C.; MAJUMDER, P.K.; BANERJEE, S.K.; ROY, R.K.; RAY, B. y RUDRAPAL, D. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci. 258, 382.
- CHEH, A. y NEILANDS, J.B. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1060.
- CHEN, R.W.; EAKIN, D.J. y WHANGER, P.D. (1974) Nutr. Rep. Int. 10, 195.
- CHEN, R.W.; VASEY, E.J. y WHANGER, P.D. (1977) J. Nutr. 107, 805.
- CHEN, R.W.; WHANGER, P.D. y WESWIG, P.H. (1975 a) Bioinorg. Chem.

4, 125.

CHEN, R.W.; WHANGER, P.D. y WESWIG, P.H. (1975 b) Fed. Proc. 34, 927.

CHEN, R.W.; WHANGER, P.D. y WESWIG, P.H. (1975 c) Biochem. Med. 12, 95.

CHERIAN, M.G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 920.

CHERIAN, M.G. (1977 a) J. Nutr. 197, 965.

CHERIAN, M.G. (1977 b) J. Toxicol. Environ. Health 2, 955.

CHERIAN, M.G. y CLARKSON, T.W. (1976) Chem. Biol. Interact. 12, 109.

CHERIAN, M.G. y GOYER, R.A. (1978) Life Sci. 23, 1.

CHERIAN, M.G. y SHAIKH, Z.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 863.

CHERIAN, M.G. y VOSTAL, J.J. (1974) Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, 141.

CHERIAN, M.G. y VOSTAL, J.J. (1977) J. Toxicol. Environ. Health 2, 946.

CHERIAN, M.G.; GOYER, R.A. y RICHARDSON, L.D. (1976 a) Toxicol. Appl. Pharmacol. 38, 399.

CHERIAN, M.G.; GOYER, R.A. y RICHARDSON, L.D. (1977) Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 145.

CHERIAN, M.G.; KIRBY, T.J. y GOYER, R.A. (1976 b) Fed. Proc. 35, 503.

CHISHOLM, J.J. (1964) J. Pediatr. 64, 159.

CHISHOLM, J.J. (1968) J. Pediatr. 73, 1.

CHVAPIL, M.; RYAN, J.N.; ELIAS, S.L. y PENG, Y.M. (1973) Exp. Mol. Pathol. 19, 186.

DALHAMM, T. y FRIBERG, L. (1955) Acta Pharmacol. Toxicol. 11, 68.

- DAVIES, N.T. y CAMPBELL, J.K. (1977) *Life Sci.* 20, 955.
- DAVIES, N.T.; BREMNER, I. y MILLS, C.F. (1973) *Biochem. Soc. Trans.* 1, 985.
- DAVIS, J.R. y AVRAM, M.J. (1978) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 181.
- DAVIS, J.R. y AVRAM, M.J. (1980) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 281.
- DECKER, C.F.; BYERRUM, R.U. y HOPPERT, C.A. (1957) *Arch. Biochem.* 66, 140.
- DECKER, L.E.; BYERRUM, R.U.; DECKER, C.F.; HOPPERT, C.A. y LANGHAM, R.F. (1958) *Arch. Ind. Health* 18, 228.
- DEGWITZ, E.; WALSCH, S.; DUBBERSTEIN, M. y WINTER, J. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258, 201.
- DELVES, H.T. (1970) *Analyst.* 95, 431.
- DE MATTEIS, F. (1971) *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 17, 126.
- DE MATTEIS, F. (1975) The effect of drugs on 5-aminolaevulinate synthetase and other enzymes in the pathway of liver haem synthesis, en *Enzyme Induction*, p. 185, Ed. Parke, D.V., Plenum Press, London y New York.
- DE MATTEIS, F. y UNSELD, A. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4, 205.
- DOSS, M. y SCHERMULY, E. (1975) *International Porphyrin Meeting Porphyrins in Human Diseases*, Freiburg, Alemania Occ.
- DOYLE, J.J.; PFANDER, W.H.; GREBING, S.E. y PIERCE, J.O. (1974) *J. Nutr.* 104, 160.
- DUNCAN, J.R. y HURLEY, L.S. (1978) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159, 39.
- EATON, D.L.; STACEY, N.H.; WONG, K.L. y KLAASSEN, C.D. (1980) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 393.
- EDIGER, R.D. y COLEMAN, R.L. (1973) *Atomic Absorp. Newsl.* 12, 3.

- EL- GAZZAR, R.; BOYLE, J.; CORNICELLI, J. y PETERING, H.G. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 2001.
- ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; ARNALICH FERNANDEZ, F.; ROMERO GARCIA-ALIX, F. y JIMENEZ SANCHEZ, J. (1979) *Revista Clínica Española* 155, 7.
- ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (*Environ. Sci. Technol.*) (1977) 11, 336.
- EVANS, G.W. (1973) *Physiol. Rev.* 53, 535.
- EVANS, G.W. y CORNATZER, W.E. (1970) *Fed. Proc.* 29, 695.
- EVANS, G.W. y HAHN, C.J. (1974) *Adv. Exp. Med. Biol.* 48, 285.
- EVANS, G.W. y WINTER, T.W. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1218.
- EVANS, G.W.; DUBOIS, R.S. y HAMBRIDGE, K.M. (1973 a) *Science* 131, 1175.
- EVANS, G.W.; GRACE, C.I. y HAHN, C.J. (1973 b) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 723.
- EVANS, G.W.; GRACE, C.I. y HAHN, C.J. (1974) *Bioinorg. Chem.* 3, 115.
- EVANS, G.W.; MAJORS, P.F. y CORNATZER, W.E. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1142.
- EVANS, G.W.; WOLENETZ, M.L. y GRACE, C.I. (1975) *Nutr. Rep. Int.* 12, 261.
- FAEDER, E.J.; CHANEY, S.Q.; KING, L.C.; HINNERS, T.A.; BRUCE, R. y FOWLER, B.A. (1977) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 473.
- FELDMAN, S.L. y COUSINS, R.J. (1976) *Biochem. J.* 160, 583.
- FERM, V.H. y CARPENTER, S.J. (1967) *Nature* 216, 1123.
- FERM, V.H. y CARPENTER, S.J. (1968) *Lab. Invest.* 18, 429.
- FINELLI, V.N.; KLAUDER, D.S.; KARAFFA, M.A. y PETERING, H.G. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 303.

- FINELLI, V.N.; MURTHY, L.; PEIRANO, W.B. y PETERING, H.G. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1418.
- FISCHER JENSEN, E. (1955) *Dansk. Tidsskr. Farm.* 29, 155.
- FISCHER JENSEN, E. (1959) *Arch. Pharm. Chem.*
- FLEISCHER, M.; SAROFIM, A.; FASSETT, D.; HAMMOND, P.; SHACKLETTE, H.T.; NISBET, C.T. y EPSTEIN, S. (1974) *Environ. Health Perspect., Experimental Issue* 7, 253.
- FOX, M.R. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258, 144.
- FOX, M.R.; FRY, B.E.; HARLAND, B.F.; SCHERTEL, M.E. y WEEKS, C.E. (1971) *J. Nutr.* 101, 1295.
- FREED, M. (1966) *Methods of vitamin assay*, 3rd edition, Interscience Publishers (John Wiley & Sons), New York - London - Sidney.
- FREELAND, J.H. y COUSINS, R.J. (1973) *Nutr. Rep. Int.* 8, 337.
- FRIBERG, L.; PISCATOR, M.; NORDBERG, G.F. y KJELLSTRÖM, I. (1974) *Cadmium in the environment*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 2nd edition.
- FRIEDBERG, F. (1974) *Q. Rev. Biophys.* 7, 1.
- FUHR, B.J. y RABENSTEIN, D.L. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 6944.
- FUKUSHIMA, M. (1973) *New methods in environmental chemistry and toxicology*, F. Korte, F. Coulston y M. Goto, Eds., Tatsuka Int. Acad. Printing Co., p. 231.
- GARTY, M.; WONG, K.L. y KLAASSEN, C.D. (1981) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 548.
- GARVEY, J.S. y CHANG, C.C. (1981) *Science* 214, 805.
- GASIEWICZ, T.A. y SMITH, J.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 428, 113.
- GILMAN, A.; PHILLIPS, F.S.; ALLEN, R.P. y KOELLE, E.S. (1946) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 87, 85.

- GOLDEN, M.H.N. y GOLDEN, B.E. (1981) Br. Med. Bull. 37, 31.
- GONICK, H.C.; INDRAPRASIT, S.; ROSEN, V.J.; NEUSTEIN, H.; VAN DE VELDE, R. y RAGHAVAN, S.R.V. (1980) Min. Electr. Metab. 3, 21.
- GOYER, R.A. y CHERIAN, M.G. (1977) Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals, p. 89, Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- GRANICK, S. y URATA, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 821.
- GUNN, S.A.; GOULD, T.C. y ANDERSON, W.A.D. (1961) Arch. Pathol. 71, 274.
- GUNN, S.A.; GOULD, T.C. y ANDERSON, W.A.D. (1963) Am. J. Pathol. 42, 685.
- GUNN, S.A.; GOULD, T.C. y ANDERSON, W.A.D. (1966) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1036.
- GUNN, S.A.; GOULD, T.C. y ANDERSON, W.A.D. (1968) J. Pathol. Bacteriol. 96, 89.
- GUZELIAN, . y BISSELL, (1976) J. Biol. Chem. 251, 4421.
- HADLEY, W.M.; MIYA, T.S. y BOUSQUET, W.F. (1974) Toxicol. Appl. Pharmacol. 28, 284.
- HAHN, C.J. y EVANS, G.W. (1975) Am. J. Physiol. 228, 1020.
- HAMILTON, D.L. y SMITH, M.W. (1977) J. Physiol. 265, 54.
- HAMILTON, D.L. y VALBERG, L.S. (1974) Am. J. Physiol. 227, 1033.
- HAMPP, R. y KRIEBITZSCH, C. (1975) Z. Naturforsch. 30, 434.
- HAUSER, T.R.; HINNERS, T.A. y KENT, J.L. (1972) Anal. Chem. 44, 1813.
- HERBERT, R.W.; HIRST, E.L.; PERCIVAL, E.G.V.; REYNOLDS, R.J.W. y SMITH, F. (1933) J. Chem. Soc.
- HILDEBRAND, C.E. y CRAM, L.S. (1979) Proc. Soc. Exp. Biol. Med.

161, 438.

HILL, C.H. y MATRONE, G. (1970) Fed. Proc. 29, 1474.

HILL, C.H.; MATRONE, G.; PAYNE, W.L. y BARBER, C.W. (1963) J. Nutr. 80, 227.

HOCHSTEIN, P.; SREE KUMAR, K. y FORMAN, S.J. (1980) Ann. N. Y. Acad. Sci. 355, 240.

HSIEH, H.S. y FRIEDEN, E. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1326.

HÜTTENRAUCH, R. (1968) Pharmazie 23, 182.

HVOSLEF, J. (1970) Acta Chem. Scand. 24, 2238.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1973) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 2, 74 (WHO, World Health Organization).

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1976) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 11, 39 (WHO, World Health Organization).

IRONS, R.D. y SMITH, J.C. (1976) Chem. Biol. Interact. 15, 289.

ITOKAWA, Y.; ABE, T.; TABEI, R. y TANAKA, S. (1974) Arch. Environ. Health 28, 149.

JACOBS, R.M.; JONES, A.O.L.; FOX, M.R.S. y FRY, B.E. (1978) J. Nutr. 108, 22.

JAPANESE ASSOCIATION OF PUBLIC HEALTH (1970) Studies of standardization of analytical methods for chronic cadmium poisoning, Japanese Assoc. of Public Health, Tokyo, Japón.

JARDIEU, P.D. y FRAKER, P.J. (1979) J. Nutr. 109, 1847.

JOCELYN, P.C. (1972) Biochemistry of the SH group, Academic Press, London - New York.

JOHANSSON-SJÖBECK, M.L. y LARSSON, A. (1978) Environ. Res. 17, 191.

- JOHNS, C.O.; FINKS, A.J. y ALSBERG, C.L. (1923) J. Pharmacol. Exp. Ther. 21, 59.
- JOHNSON, A.D. y MILLER, W.J. (1970) J. Reprod. Fert. 21, 395.
- JUKNAT de GERALNIK, A.A.; ROSSETTI, M.V. y BATLLE, A.M. del C. (1981) Int. J. Biochem. 13, 343.
- KÄGI, J.H.R. (1959) Fed. Proc. 18, 484.
- KÄGI, J.H.R. y NORDBERG, M. (1979) Metallothionein, Birkhauser Verlag, Basel.
- KÄGI, J.H.R. y VALLEE, B.L. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3460.
- KÄGI, J.H.R. y VALLEE, B.L. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2435.
- KÄGI, J.H.R.; HIMMELHOCH, S.R.; WHANGER, P.D.; BETHUNE, J.L. y VALLEE, B.L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3537.
- KALLNER, A.; HARTMANN, D. y HORNIG, D. (1979) Am. J. Clin. Nutr. 32, 530.
- KAPLOWITZ, N.; JAVITT, N. y KAPPAS, A. (1972) J. Clin. Invest. 51, 2895.
- KAUFMAN, S. (1951) en Phosphorus metabolism, 1, 370, Ed. Mc Elvery, W. Glass, Baltimore, U.S.A.
- KAWAMURA, J.; YOSHIDA, O.; NOSHINO, K. e ITOKAWA, Y. (1978) Nephron 20, 101.
- KAZANTZIO, G. (1978) Proceedings of the First International Cadmium Conference, London, Metal Bulletin Ltd., p. 194.
- KELLO, D. y KOSTIAL, K. (1977 a) Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 277.
- KELLO, D. y KOSTIAL, K. (1977 b) Environ. Res. 14, 92.
- KENCH, J.E. y GUBB, P.J.D. (1970) Biochem. J. 120, 27.
- KENNEDY, A. (1968) Br. J. Exp. Pathol. 49, 360.
- KJELLSTRÖM, T.; SHIROISHI, K. y EVRIN, P.E. (1977) Environ. Res. 13, 318.

- KLAASSEN, C.D. (1978) Am. J. Physiol. 234, E 47.
- KLEVAY, L.M. (1975) Am. J. Clin. Nutr. 28, 764.
- KLEVAY, L.M. (1976) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 579.
- KLEVAY, L.M. (1980) Ann. N. Y. Acad. Sci. 355, 140.
- KOBAYASHA, J.; NAKAHARA, H. y HASEGAWA, T. (1971) Nippon Eiseigaku Zasshi 26, 401.
- KOJIMA, I.; BERGER, C.; VALLEE, B.L. y KÄGI, J.H.R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3413.
- KOSKELO, P.; TOIVONEN, I. y ADLERCREUTZ, H. (1967) Clin. Chem. 13, 1006.
- KOTSONIS, F.N. y KLAASSEN, C.D. (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol. 51, 19.
- LARSSON, S.E. y PISCATOR, M. (1971) Israel J. Med. Sci. 7, 495.
- LAUWERYS, R.R.; BUCHET, J.D. y ROELS, H.A. (1973) Br. J. Ind. Med. 30, 359.
- LAWENDEL, J.S. (1957) Nature 180, 434.
- LEBER, A.P. y MIYA, T.S. (1976) Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 403.
- LEHNERT, G.; SCHALLER, K.H. y HAAS, T. (1968) Z. Klin. Chem. 6, 174.
- LI, N.C. y MANNING, R.A. (1955) J. Am. Chem. Soc. 77, 5225.
- LINNMAN, L.; ANDERSSON, A.; NILSSON, K.O.; LIND, B.; KJELLSTRÖM, T. y FRIBERG, L. (1973) Arch. Environ. Health 27, 45.
- LITTER, M. (1975) Farmacología experimental y clínica, 5ta ed., Editorial Librería El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- LOCKWOOD, W. y RIMINGTON, C. (1957) Biochem. J. 75, 372.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, L. y RANDALL, R. (1951) J. Biol. Chem. 211, 435.

- LUCIS, O.J.; LUCIS, R. y ATERMAN, K. (1971) Fed. Proc. 30, 238.
- LLAMBIAS, E.B.C. (1971) Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- LLAMBIAS, E.B.C. y BATLLE, A.M. del C. (1971) Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- MAC FARLAND, H.N. (1960) Arch. Environ. Health 1, 487.
- MAGOS, L. y WEBB, M. (1976) Arch. Toxicol. 36, 63.
- MAHAFFEY, K.R. y FOWLER, B.A. (1977) Environ. Health Perspect. 19, 165.
- MAHAFFEY, K.R.; GOYER, R. y HASEMAN, J.K. (1973) J. Lab. Clin. Med. 82, 92.
- MAINES, M.D. y KAPPAS, A. (1976) Biochem. J. 154, 125.
- MAINES, M.D. y KAPPAS, A. (1977) Science 198, 1215.
- MAJI, T. y YOSHIDA, A. (1974) Nutr. Rep. Int. 10, 134.
- MARGOSHES, M. y VALLEE, B.L. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 4813.
- MATSUBARA-KHAN, Y. (1974) Environ. Res. 7, 54.
- MAUZERALL, D. y GRANICK, S. (1956) J. Biol. Chem. 193, 265.
- MAY, P.M. y WILLIAMS, D.R. (1977) FEBS Lett. 78, 134.
- McAULIFFE, C.A. y MURRAY, S.G. (1972) Inorg. Chim. Acta Res. 6, 103.
- MERALI, Z. y SINGHAL, R.L. (1976) Br. J. Pharmacol. 52, 573.
- MOHLER, M. y MOHR, H. (1938) Helv. Chim. Acta 21, 485.
- MOORE, D.J. y LABBE, R.F. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- MOORE, W.; STARA, J.F. y CROCKER, W.C. (1973) Environ. Res. 6, 159.
- MORGAN, W.D. (1979) Nature 282, 673.

- MUTO, Y. y OMORI, M. (1977) J. Nutr. Sci. Vit. 23, 349.
- NANDI, D.L. y SHEMIN, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1236.
- NELSON, H.M.; HUGHES, M.A. y MEREDITH, P.A. (1981) Toxicology 21, 261.
- NIEMEIER, B. (1967) Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehygiene 24, 160.
- NISHIMURA, J.S. y GRINNEL, F. (1972) Mechanism of action and other properties of succinyl CoA Synthetase, en Advances in Enzymology, Ed. Meister, 36, 183.
- NOGAWA, K. (1978) Proceedings of the First International Cadmium Conference, London, Metal Bulletin Ltd., p.213.
- MOMIYAMA, K. (1978) Shokuhin Eisei Kenkyu 28, 865.
- NORDBERG, G.F. (1971) Environ. Physiol. Biochem. 1, 171.
- NORDBERG, G.F. (1972) Environ. Physiol. Biochem. 2, 7.
- NORDBERG, G.F.; GOYER, R.A. y NORDBERG, M. (1975) Arch. Pathol. 99, 192.
- NORDBERG, G.F.; PISCATOR, M. y LIND, B. (1971 a) Acta Pharmacol. Toxicol. 29, 456.
- NORDBERG, G.F.; PISCATOR, M. y NORDBERG, M. (1971 b) Acta Pharmacol. Toxicol. 30, 289.
- NORDBERG, G.F.; NORDBERG, M.; PISCATOR, M. y VESTERBERG, T. (1972) Biochem. J. 126, 491.
- NORDBERG, M. (1977) Studies on metallothionein and cadmium, Stockholm, Karolinska Institute.
- NORDBERG, M. y NORDBERG, G.F. (1975) Environ. Health Perspect. 12, 103.
- O'CARRA, P. (1975) Heme cleavage, biological systems and chemical analogs, en Porphyrins and Metalloporphyrins, Ed. K.M. Smith, Elsevier, Amsterdam, p. 123.

- OGAWA, E.; SUZUKI, S. y TSUZUKI, H. (1972) Japan J. Pharmacol. 22, 275.
- OH, S.J.; DEAGEN, J.T.; WHANGER, P.D. y WESWIG, P.H. (1978) Am. J. Physiol. 234, E 282.
- PANEMANGALORE, M. y BRADY, F.O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7898.
- PAPAIIOANNOU, R.; SOHLER, A. y PFEIFFER, C.C. (1978) J. Orthomed. Psychiatry 7, 94.
- PARIZEK, J. (1957) J. Endocr. 15, 56.
- PARIZEK, J. (1960) J. Reprod. Fert. 1, 294.
- PARIZEK, J. (1964) J. Reprod. Fert. 7, 263.
- PARIZEK, J.; OSTADALOVA, I.; BENES, I. y BABICKY, A. (1968) J. Reprod. Fert. 16, 507.
- PAULING, L. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 1643.
- PAULING, L. (1971) Vitamin C and the common cold, W.H. Freeman & Co., San Francisco, U.S.A.
- PERRY, E.F.; KOIRTYOHANN, S.R. y PERRY, H.M. (1975) Clin. Chem. 21, 626.
- PERRY, H.M. y ERLANGER, M.W. (1971) Am. J. Physiol. 220, 808.
- PERRY, H.M.; ERLANGER, M.W. y PERRY, E.F. (1977) Am. J. Physiol. 232, H 114.
- PERRY, H.M.; THIND, G.S. y PERRY, E.F. (1976) Med. Clin. North Am. 60, 759.
- PETERING, H.G.; CHOUDHURY, H. y STEMMER, K.L. (1979) Environ. Health Perspect. 28, 97.
- PETERING, H.G.; JOHNSON, M.A. y STEMMER, K.J. (1971) Arch. Environ. Health 23, 93.
- PIOTROWSKI, J.K.; BOLANOWSKA, W. y SAPOTA, A. (1973) Acta Biochim. Polon. 20, 207.

- PIOTROWSKI, J.K.; TROJANOWSKA, B.; WISNIEWSKA-KNYPL, J.M. y BOLANOWSKA, W. (1974) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 27, 11.
- PISCATOR, M. (1964) *Nord. Hyg. Tidskr.* 48, 76.
- PLEBAN, P.A. y PEARSON, K.H. (1979) *Clin. Chim. Acta.* 99, 267.
- POND, W.G. y WALKER, E.F. (1972) *Nutr. Rep. Int.* 5, 365.
- POND, W.G. y WALKER, E.F. (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 665.
- PORTER, H. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 56, 661.
- POSMA, F.D.; BALKE, J.; HERBER, R.F.M. y STULK, E.J. (1975) *Anal. Chem.* 47, 834.
- PRASAD, A.S. y OBERLEAS, D. (1973) *J. Lab. Clin. Med.* 82, 461.
- PRINZ, R. y WESER, U. (1975 a) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 767.
- PRINZ, R. y WESER, U. (1975 b) *FEBS Lett.* 54, 224.
- PROBST, G.S.; BOUSQUET, W.F. y MIYA, T.S. (1977 a) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 51.
- PROBST, G.S.; BOUSQUET, W.F. y MIYA, T.S. (1977 b) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 61.
- PULIDO, P.; FUWA, K. y VALLEE, B.L. (1966) *Analyt. Biochem.* 14, 393.
- PULIDO, P.; KÄGI, J.H.R. y VALLEE, B.L. (1966) *Biochemistry* 5, 1768.
- RAGAN, H.A. (1977) *J. Lab. Clin. Med.* 90, 700.
- RAGHAVAN, S.R.V. y GONICK, H.C. (1980) *Mineral Electrolyte Metab.* 3, 36.
- RAHMAN, V.E.; ROSENTHAL, M.W.; CERNY, E.A. y MORETTI, E.B. (1974) *J. Lab. Clin. Med.* 83, 640.
- REINHOLD, J.G.; PASCOE, E.; ARSLANIAN, M. y BITAR, K. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 215, 430.

- RICHARDS, M.P. y COUSINS, R.J. (1975 a) *Bioinorg. Chem.* 4, 215.
- RICHARDS, M.P. y COUSINS, R.J. (1975 b) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64, 1215.
- RICHARDS, M.P. y COUSINS, R.J. (1976) *J. Nutr.* 106, 1591.
- RICHARDS, M.P.; BLUESTONE, J.A.; NEWKIRK, M.D. y COUSINS, R.J. (1974) *Fed. Proc.* 33, 2763.
- RIMINGTON, C. (1958) *Royal Australian Chem. Inv.* 8, 129.
- RIMINGTON, C. (1960) *Biochem. J.* 75, 620.
- RIMINGTON, C. y SVEINSSON, S.L. (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
- ROSS, R.T. y GONZALEZ, J.G. (1974) *Anal. Chim. Acta* 70, 443.
- ROWE, C.J. y ROUTH, M.W. (1977) *Research Development* 28, 11.
- RUDRAPAL, D.; CHATERJEE, J. y CHATERJEE, G.C. (1974) *Proc. Ann. Symp. Soc. Biol. Chem. (India)* 43, 14.
- RUPP, H. y WESER, U. (1974) *FEBS Lett.* 44, 293.
- RUPP, H.; VOELTER, W. y WESER, U. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 755.
- SABBIONI, E. y MARAFANTE, E. (1975 a) *Environ. Physiol. Biochem.* 5, 132.
- SABBIONI, E. y MARAFANTE, E. (1975 b) *Environ. Physiol. Biochem.* 5, 465.
- SABBIONI, E.; MARAFANTE, E.; AMANTINI, L.; UBERTALLI, L. y PIETRA, R. (1978) *Sci. Total Environ.* 10, 135.
- SABBIONI, E.; MARAFANTE, E.; PIETRA, R.; AMANTINI, L. y UBERTALLI, L. (1978) *Proc. Cadmium Symposium, Jena DDR, Ago 77*.
- SANCOVICH, H.A.; FERRAMOLA, A.M.; BATLLE, A.M. del C.; KIVILEVICH, A. y GRINSTEIN, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 379.
- SANDERSON, M.D. y WILLIAMS, D.R. (1977) *J. Inorg. Nuclear Chem.* 39, 641.

- SANDSTEAD, H.H. (1981) *J. Lab. Clin. Med.* 98, 457.
- SANO, S. y RIMINGTON, C. (1963) *Biochem. J.* 86, 203.
- SASSER, L.B. y JARBOE, G.E. (1977) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41, 421.
- SATO, M. y NAGAI, Y. (1980) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54, 90.
- SCHROEDER, H.A. y BUCKMAN, J. (1967) *Arch. Environ. Health* 14, 693.
- SCHUBERT, J. (1955) *Ann. Rev. Nucl. Sci.* 5, 369.
- SCHWARTZ, S.; KAPRIOS, M. y SCHMID, R. (1952) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 79, 463.
- SELL, J.L. (1975) *Poultry Sci.* 54, 1674.
- SELLES FLORES, E. y BRUNNER, C. (1960) *Galenica Acta (Madrid)* 13, 319.
- SEMBA, R.; OHTA, K. y YANAMURA, H. (1974) *Teratology* 10, 96.
- SETH, T.D.; AGARWAL, L.N.; SATIJA, N.K. y HASAN, M.Z. (1976) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 190.
- SHAIKH, Z.A. y LUCIS, O.J. (1970) *Fed. Proc.* 29, 298.
- SHAIKH, Z.A. y LUCIS, O.J. (1971) *Experientia* 27, 1024.
- SHAIKH, Z.A. y LUCIS, O.J. (1972) *Arch. Environ. Health* 24, 410.
- SHAIKH, Z.A. y SMITH, J.C. (1975) *Fed. Proc.* 34, 266.
- SHAIKH, Z.A. y SMITH, J.C. (1976) *Chem. Biol. Interact.* 15, 327.
- SHAIKH, Z.A. y SMITH, J.C. (1977) *Chem. Biol. Interact.* 19, 161.
- SHANK, K.E. y VETTER, R.J. (1974) *Environ. Lett.* 6, 13.
- SHEMIN, D. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. London B* 273, 109.
- SHETTY, A.S. y MILLER, G.W. (1969) *Biochem. J.* 114, 331.
- SIVJAKOV, K.I. y BRAUN, H.A. (1969) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1, 602.

- SMITH, S.E. y LARSON, E.J. (1946) J. Biol. Chem. 163, 29.
- SOBOCINSKI, P.Z.; CANTERBURY, W.J.; HAUER, E.C. y BEALL, F.A. (1979) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 175.
- SOBOCINSKI, P.Z.; CANTERBURY, W.J.; MAPES, C.A. y DINTERMAN, R.E. (1978) Am. J. Physiol. 234, E 399.
- SOKOLOWSKI, G. y WESER, U. (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1715.
- SOLOMONS, N.W.; JACOB, R.A.; PIÑEDA, O. y VITERI, F.E. (1979) Am. J. Clin. Nutr. 32, 2495.
- SORET, J.L. (1883) Arch. des Sciences Phys. et Natur. 10, 430.
- SQUIBB, K.S. y COUSINS, R.J. (1974) Environ. Physiol. Biochem. 4, 24.
- SQUIBB, K.S.; COUSINS, R.J. y FELDMAN, S.L. (1977) Biochem. J. 164, 223.
- SQUIBB, K.S.; COUSINS, R.J.; SILBON, B.L. y LEVIN, S. (1976) Exp. Mol. Pathol. 25, 163.
- STARCHER, B.C. (1969) J. Nutr. 97, 321.
- STELLA de ROSELLINI, A.M.C. (1977) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- STOKVIS, B.J. (1889) Med. Tydschr. Geneesk 2R 25, 409.
- STOKVIS, B.J. (1895) Z. Klin. Med. 28, 1.
- STONARD, M. y WEBB, M. (1976) Chem. Biol. Interact. 15, 349.
- STOWE, H.D.; WILSON, M. y GOYER, R.A. (1972) Arch. Path. 94, 389.
- STOWE, H.D.; GOYER, R.A.; MEDLEY, P. y CATES, M. (1974) Arch. Environ. Health 28, 209.
- SUDMEIER, J.L. y BELL, S.J. (1977) J. Am. Chem. Soc. 99, 4499.
- SUGAWARA, C. y SUGAWARA, N. (1978) Toxicol. Appl. Pharmacol.

46, 19.

SUGAWARA, N. (1977) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42, 377.

SUGAWARA, N. y SUGAWARA, C. (1975) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 653.

SUMINO, K.; HAYAKAWA, K. y SHIBATA, S. (1975) *Arch. Environ. Health* 30, 487.

SUPPLEE, W.C. (1963) *Science* 139, 119.

SUSO, F.A. y EDWARDS, H.M. (1971) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 306.

SUZUKI, K.T. (1979) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 225.

SUZUKI, K.T. (1980) *Analyt. Biochem.* 102, 31.

SUZUKI, K.T. y LU, C.C. (1976) *Ind. Health* 14, 53.

SUZUKI, K.T. y YAMAMURA, M. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 3643.

SUZUKI, K.T. y YAMAMURA, M. (1980) *Biochem. Pharmacol.* 29, 2407.

SUZUKI, K.T. y YOSHIDA, A. (1978) *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 1491.

SUZUKI, K.T. y YOSHIKAWA, T. (1974) *Ind. Health* 12, 141.

SUZUKI, K.T.; KUBOTA, K. y TAKENAKA, S. (1977) *Chem. Pharmacol. Bull.* 25, 2792.

SUZUKI, K.T.; YAMADA, Y.K. y SHIMIZU, F. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1217.

SUZUKI, K.T.; MOTOMURA, T.; TSUCHIYA, Y. y YAMAMURA, M. (1980) *Analyt. Biochem.* 107, 75.

SZYMANSKA, J.A.; MOGILNICKA, E.M. y KASZPER, B.W. (1977) *Biochem. Pharmacol.* 26, 257.

TANAKA, K.; SUEDA, K. y OKAHARA, K. (1974) *J. Hyg. Chem.* 20, 98.

TANAKA, K.; NOMURA, H.N.; ONOSAKA, S. y MIN, K. (1981) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 535.

- TANAKA, K.; SUEDA, K.; ONOSAKA, S. y OKAHARA, K. (1975) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33, 258.
- TAQUI-KHAN, M.M. y MARTELL, A.E. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4176.
- TEPHLY, T. (1975) *Porphyrins in Human Diseases - Report of the Discussions* (Ed. Doss, M. y Nawrocki, P.), p. 128.
- TEPPERMAN, H.M. (1947) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 89, 343.
- TERAO, T. y OWENS, C.A. (1973) *Am. J. Physiol.* 224, 682.
- TERHAAR, C.J.; RIS, E.; ROUDABUSH, R.L. y FASSETT, D.W. (1965) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 500.
- THOMPSON, J.; JONES, D.D. y BEASLEY, W.H. (1977) *Br. J. Ind. Med.* 34, 32.
- TOLBERT, B.M.; DOWNING, M.; CARLSON, R.W.; KNIGHT, M.K. y BAKER, E.M. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258, 48.
- TSCHUDY, D.P.; WELLAND, F.H.; COLLINS, A. y HUNTER, G.W. Jr (1964) *Metabolism* 13, 396.
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T. y SAN0, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 751.
- TURKALL, R.M.; BIANCHINE, J.R. y LEBER, A.P. (1977) *Fed. Proc.* 36, 356.
- UNDERWOOD, E.J. (1977) *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4ta Ed., Academic Press Inc., New York, U.S.A.
- VALBERG, L.S.; SORBIE, J. y HAMILTON, D.L. (1976) *Am. J. Physiol.* 231, 462.
- VALENZUELA, P.; MORRIS, R.W.; FARAS, A.; LEVINSON, W. y RUTTER, W.J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53, 1036.
- VALLEE, B.L. y ULMER, D.D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91.
- VOLLAND, G.; KÖLBLIN, G.; TSCHÖPEL, P. y TÖLG, G. (1977) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 284, 1.

- WADA, O.; ONO, I.; MARU, R. y TOYOKAWA, K. (1972) *Ind. Health* 10, 11.
- WADA, O.; YANO, Y.; ONO, I. y TOYOKAWA, K. (1972) *Ind. Health*. 59, 61.
- WALKER, M.D. y WILLIAMS, D.R. (1974) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1186.
- WASHKO, P.W. y COUSINS, R.J. (1975) *Nutr. Rep. Int.* 11, 113.
- WASHKO, P.W. y COUSINS, R.J. (1976) *J. Toxicol. Environ. Health* 1, 1055.
- WASHKO, P.W. y COUSINS, R.J. (1977) *J. Nutr.* 107, 920.
- WEBB, M. (1972 a) *Biochem. Pharmacol.* 21, 2751.
- WEBB, M. (1972 b) *Biochem. Pharmacol.* 21, 2767.
- WEBB, M. (1975) *Biochem. Soc. Trans.* 50, 632.
- WEBB, M. (1977) *En Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals*, S. Brown. Ed., Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomed Press, p. 51.
- WEBB, M. (1979) *Interaction of cadmium with cellular components*, en *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*, M. Webb. Ed., Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 309.
- WEBB, M. y DANIEL, M. (1975) *Chem. Biol. Interact.* 10, 269.
- WEBB, M. y ETIENNE, A.T. (1977) *Biochem. Pharmacol.* 26, 25.
- WEBB, M. y MAGOS, L. (1976) *Chem. Biol. Interact.* 14, 357.
- WEBB, M. y VERSCHOYLE, R.D. (1976) *Biochem. Pharmacol.* 25, 673.
- WEGSCHEIDER, W.; KNAPP, G. y SPITZY, H. (1977) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 283, 183.
- WELZ, B. (1976) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 279, 104.
- WESER, U.; RUPP, H.; DONAY, F.; LINNEMANN, F.; VOELTER, W.; VOLTSCH, W. y JUNG, G. (1973) *Eur. J. Biochem.* 39, 127.

- WHANGER, P.D. y WESWIG, P.H. (1970) J. Nutr. 100, 341.
- WHANGER, P.D.; RIDLINGTON, J.W. y HOLCOMB, C.L. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. 355, 333.
- WIDER de XIFRA, E.A. y BATLLE, A.M. del C. (1973) Enzyme 16, 128.
- WIDER de XIFRA, E.A. y BATLLE, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 717.
- WIDER de XIFRA, E.A. y TIGIER, H.A. (1971) Enzymologia 41, 217.
- WIDER de XIFRA, E.A.; BATLLE, A.M. del C. y TIGIER, H.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- WIDER de XIFRA, E.A.; BATLLE, A.M. del C.; STELLA, A.M. y MALAMUD, S. (1980) Int. J. Biochem. 12, 819.
- WILSON, E.L.; BURGER, P.E. y DOWDLE, E.B. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 563.
- WINGE, D.R. y RAJAGOPALAN, K.V. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 755.
- WINGE, D.R.; PREMAKUMAR, R. y RAJAGOPALAN, K.V. (1975 a) Arch. Biochem. Biophys. 170, 242.
- WINGE, D.R.; PREMAKUMAR, R. y RAJAGOPALAN, K.V. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 466.
- WINGE, D.R.; PREMAKUMAR, R.; WILEY, R.D. y RAJAGOPALAN, K.V. (1975 b) Arch. Biochem. Biophys. 170, 253.
- WOODS, J.S.; KARDISH, R. y FOWLER, B.A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 103, 264.
- WORKER, N.A. y MIGICOVSKY, B.B. (1961) J. Nutr. 75, 222.
- WU, W.H.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K.E. y WILLIAMS, R.C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1767.
- YAMAGATA, N. e IWASHIMA, K. (1975) Bull. Inst. Public. Health 24, 1.
- YAU, E.T. y MENNEAR, J.H. (1977) Toxicol. Appl. Pharmacol. 39, 515.

YOSHIKAWA, H. (1973) *Ind. Health* 11, 113.

YUHAS, E.M.; MIYA, T.S. y SCHNELL, R.C. (1979) *Toxicology* 12, 19.

RESUMEN

Con el objeto de encontrar algún parámetro bioquímico útil para la detección precoz de una intoxicación con cadmio, se ha realizado un estudio detallado *in vivo* e *in vitro* de los efectos del cadmio sobre el camino biosintético del hemo.

A lo largo de todo el trabajo se trató de establecer una correlación entre el aumento o disminución de alguna actividad enzimática, en particular de ALA-D *in vivo*, y las concentraciones de cadmio, zinc o cobre circulantes; sin embargo, los resultados obtenidos no han permitido formular una vinculación simple y directa.

Si bien *in vitro* el cadmio es un inhibidor del ALA-D, *in vivo* estos efectos no se ponen claramente de manifiesto debido a que el metal es captado por las metalotioneínas, proteínas de bajo peso molecular, cuya síntesis es inducida por el cadmio, y que luego capturan al metal tóxico.

En hígado y riñón, órganos con las más altas concentraciones de metalotioneínas, la actividad del ALA-D se modifica muy poco a lo largo de las experiencias de intoxicación con cadmio, a pesar de que en muchas de ellas, se alcanzan en dichos órganos concentraciones del metal que *in vitro* son netamente inhibitorias.

En bazo y glóbulos rojos, en algunos casos se producen descensos significativos de la actividad, pero no se observa una correlación entre dosis administrada y grado de inhibición; otras veces, el cadmio tampoco inhibe las enzimas de estos tejidos.

Se han tratado de encontrar las causas del comportamiento irregular del metal.

La metalotioneína inducida por el cadmio también une zinc. Se trata así de una cadmio, zinc-metalotioneína.

El zinc es un elemento esencial que entra en la composición de las membranas celulares y también es necesario para estabilizar o aumentar la actividad de enzimas, entre ellas el

ALA-D.

De modo que pueden entrar en juego efectos complejos.

Por un lado, el zinc de ciertas enzimas podría ser capturado por la metalotioneína; por el otro, la falta de zinc disponible podría conducir a alteraciones de las membranas celulares que tendrían como consecuencia pérdidas de enzimas de los órganos.

Se desconoce hasta el momento la influencia del zinc movilizado por el organismo para unirse a la cadmio metalotioneína o del zinc proveniente de la degradación de dicha proteína en los procesos bioquímicos en los cuales interviene el metal.

Algunas experiencias de administración conjunta cadmio-zinc apoyarían un efecto activador del metal sobre el ALA-D, ya que al administrar conjuntamente cadmio en dosis más altas que las habituales de 0,6 mg/kg peso, y zinc en dosis suficientemente elevadas como para inducir la formación de metalotioneínas, se registraron aumentos significativos de la actividad del ALA-D no sólo de bazo y glóbulos rojos, sino también de hígado y riñón.

La representación de las concentraciones de cadmio y zinc en hígado, y la actividad de ALA-D en los distintos órganos en función de los tratamientos efectuados, sugiere la existencia de una probable correlación entre el zinc que ha circulado por el organismo, ya sea por administración directa del mismo, o por movilización hacia o de las metalotioneínas, y el aumento de actividad de ALA-D, que se produce en los diversos órganos estudiados.

En las intoxicaciones crónicas con cadmio se ha producido también una acumulación de cobre, y se sabe que este metal es un inhibidor del ALA-D eritrocítica humana. Esta acumulación de cobre podría originar también modificaciones enzimáticas.

El cobre tiene asimismo una alta afinidad por la metalotioneína. Según algunos autores, el cobre reemplazaría al cadmio en la metalotioneína y se liberaría cadmio tóxico al riñón.

De modo que la acumulación de metales esenciales en las metalotioneínas, su movilización hacia o de ellas y su consecuente falta o exceso podrían causar modificaciones de las actividades enzimáticas a lo largo de las intoxicaciones crónicas.

Paralelamente al ALA-D se han estudiado la PBGasa y la Deaminasa, y estas enzimas tampoco presentaron una correlación directa con el grado de acumulación de cadmio, aunque en este caso en bazo y en glóbulos rojos no se produjeron disminuciones como las observadas algunas veces para el ALA-D.

La administración conjunta cadmio-ascórbico, no ha demostrado ningún efecto especialmente beneficioso de dicha vitamina, por lo menos dentro del rango de concentraciones estudiado.

También se ha realizado un estudio detallado y exhaustivo de la excreción de productos intermedios de la biosíntesis del hemo: ALA, PBG y porfirinas en orinas, y porfirinas en heces. Se ha observado que a lo largo de las intoxicaciones se produce una disminución de la concentración de porfirinas en orina y un aumento de la relación copro/proto en heces, que se comienza a detectar tempranamente; sin embargo la excreción total continúa oscilando dentro de los valores normales.

Se ha tratado de encontrar una explicación para este comportamiento, pero de todas maneras se considera que la variación es demasiado pequeña, como para ser usada como parámetro para medir absorción del metal en intoxicaciones no experimentales, ya que los valores normales de excreción de porfirinas oscilan dentro de un rango amplio.

De estos estudios, así como también de diversos antecedentes bibliográficos surge que el cadmio es un metal con un mecanismo de acción complicado que produce alteraciones variables en los diversos sistemas del organismo, y que intenta desafiar a los encargados del control de la salud de los individuos expuestos al mismo.

Sin embargo, aún dentro del mismo camino biosintético

del hemo queda mucho por investigar, y algún efecto directo o indirecto del cadmio sobre otros pasos de dicha vía podrían llevar al objetivo deseado.

Por el momento, el control de las concentraciones de cadmio ambientales, la consideración de algunos síntomas no específicos y la medición de las concentraciones no sólo de cadmio, sino también de otros elementos metálicos en el organismo, pueden ser indicios de una exposición excesiva.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized, somewhat abstract shape.A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. M. Hostein" with a large, sweeping flourish at the end.