

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL ARSÉNICO EN CONEJOS”

POR

JOSÉ ANGEL CASTRO GANDARILLA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“ DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL ARSÉNICO EN CONEJOS ”

POR

JOSÉ ANGEL CASTRO GANDARILLA

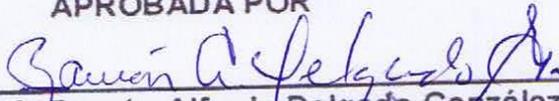
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

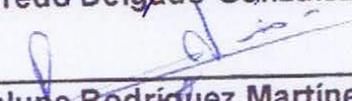
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

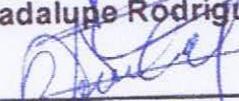
PRESIDENTE:


M.C. Ramón Alfredo Delgado González

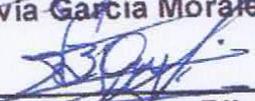
VOCAL:

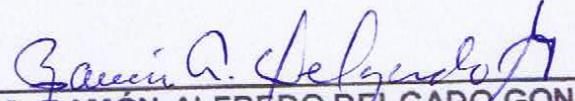

M.V.Z. J. Guadalupe Rodríguez Martínez

VOCAL:


M.V.Z. Olivia García Morales

VOCAL SUPLENTE:


Dr. Alberto Barbabosa Pliego


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL ARSÉNICO EN CONEJOS”

POR

JOSÉ ANGEL CASTRO GANDARILLA

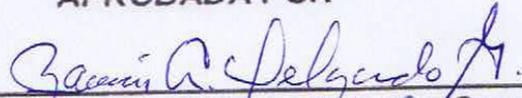
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

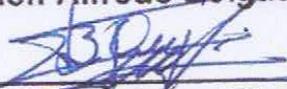
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

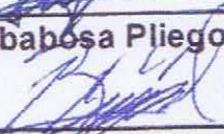
ASESOR PRINCIPAL:


M.C. Ramón Alfredo Delgado González

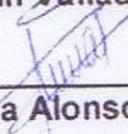
ASESOR:

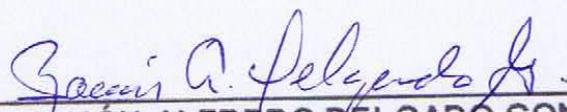

Dr. Alberto Barbabosa Pliego

ASESOR:


M.S.A. Benjamín Valladares Carranza

ASESOR:


Dra. María Uxua Alonso Fresán


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios todopoderoso

A mis padres y hermanos
De quienes conté su apoyo en todo momento
Para estudiar ésta carrera

A todos mis familiares que fueron
Parte importante en mi desarrollo profesional

A mi Alma Terra Mater
Que fue mi hogar durante todos estos años en que
Me brindo grandes experiencias

A mis asesores:

M. C. V. Ramón Alfredo Delgado González
Dr. en C. Alberto Barbabosa Pliego
M. en S.A. Benjamín Valladares Carranza
Dra. en C. María Uxúa Alonso Fresán

Al Servicio Geológico Mexicano en especial a:
Dra. Rosa María Tremari Trueba y Dr. José Luis Lee Moreno
Por permitirme la oportunidad de participar en un proyecto
de investigación de Geomedicina

Al CIESA de la Universidad Autónoma del Estado de México
Por permitirme colaborar en este trabajo
Y a las personas con quienes trabajé
Ya que gracias a ellos logré cumplir muchos objetivos

DEDICATORIAS

Dedico de manera especial a mi padre, madre y mi madrina Rodrigo Castro de la Sancha, María de los Ángeles Gandarilla Araujo y Edith Castro de la Sancha respectivamente pues fueron ellos el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentaron en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ellos tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a admirarlos cada día más.

Gracias Dios por concederme los mejores padres.

A mis hermanos y familia que son personas que me han ofrecido el amor y la calidez de la ascendencia de la cual procedo y respeto.

A mis amigos que sin ellos la vida no sería la misma.

RESUMEN

Determinación de la cinética del arsénico en conejos

En América Latina la presencia del arsénico en el ambiente y en las fuentes de agua para consumo humano, se debe a factores naturales de origen geológico como a actividades antropogénicas. El arsénico en las aguas naturales se encuentra principalmente como trivalente (arsenito) o pentavalente (arsenato). Se realizó un modelo biológico en conejos domésticos con exposición a As en dosis media (DL 50) y media letal (DL 75), con la finalidad de determinar las alteraciones funcionales en hígado y riñón, a través de la valoración periódica (muestreo basal, 15, 30, 45 y 60 días) de las reacciones enzimáticas (suero sanguíneo) de: ALT (alaninoamino transferasa), AST (aspartatoamino transferasa) y GGT (gamaglutamil transpeptidasa); los parámetros (en sangre completa): hematocrito y proteínas totales. Al final de cada uno de los periodos determinados los conejos se sacrificaron y se realizó el estudio anatomopatológico, recolectando muestras para estudio histológico y determinación del grado de bioacumulación (en: pelo, orina, heces, sangre completa, hígado, riñón, encéfalo y músculo) a través de espectrometría de masas, expresando los resultados en ppm. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba de Fisher ($p < 0.05$), y adicionalmente estadística no paramétrica (cuadros y figuras), comparando los datos con los valores de referencia. Se encontró que los niveles de As con una exposición de DL50 provocan una mayor alteración hepática así como un incremento de los valores enzimáticos de ALT, AST y GGT, además de una acumulación significativa en comparación de la DL75, identificando al hígado como el mejor indicador de acumulación de este metal. Se produjo daño significativo a nivel renal, identificado a través de la orina en los conejos de acuerdo con la exposición al metal, y cambios en la morfología celular con daños irreversibles.

Palabras clave: bioacumulación, As, toxicidad, AST, ALT, GGT, conejos.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------|-----|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| DEDICATORIAS | v |
| RESUMEN | III |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 6 |
| 4. HIPÓTESIS | 7 |
| 5. OBJETIVOS | 7 |
| 6. MATERIAL | 8 |
| 7. MÉTODO..... | 10 |
| 8. LÍMITE DE ESPACIO..... | 20 |
| 9. LÍMITE DE TIEMPO | 21 |
| 10.RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| 11.CONCLUSIONES..... | 41 |
| 12.SUGERENCIAS | 42 |
| 13.LITERATURA CITADA..... | 43 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|--|
| TABLA 1. Clasificación zoológica del conejo..... | 6 |
| TABLA 2. Dosificación de los grupos de tratamiento; ¡Error! Marcador no definido. | |
| TABLA 3. Excreción promedio de arsénico en heces y orina..... | 23 |
| TABLA 4. Concentraciones de arsénico ($P < 0.05$) en sangre, pelo, heces, orina en conejos expuestos a DL50 y DL75..... | ¡Error! Marcador no definido. 4 |
| TABLA 5. Valoración del funcionamiento hepático en conejos expuestos a DL50 y DL75 con arsénico ANOVA ($P < 0.05$), método LSD de Fisher..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| TABLA 6. Valoración del funcionamiento renal de conejos expuestos a DL 50 y DL75 con arsénico ANOVA ($P < 0.05$) | ¡Error! Marcador no definido. |
| TABLA 7. Concentración de proteínas totales y hematocrito de conejos expuestos a DL 50 y DL75 con arsénico..... | ¡Error! Marcador no definido. 8 |
| TABLA 8. Concentración de arsénico de biopsias de conejos expuestos a arsénico DL50 y DL75..... | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| 1. FIGURA 1 Conejos raza nueva Zelanda..... | 6 |
| 2. FIGURA 2 Punción auricular para toma de muestra sanguínea..... | 12 |
| 3. FIGURA 3 Centrifuga para capilares | 15 |
| 4. FIGURA 4 Refractómetro veterinario Reichert. Fotografía original..... | 16 |
| 5. FIGURA 5. Histopatología en hígado 10X; congestión moderada y degeneración hidrópica en organismos expuestos a arsénico (fotografía original)..... | 30 |
| 6. FIGURA 6. Histopatología en riñón 10x; congestión moderada, degeneración y necrosis de células del epitelio tubular (fotografía original)..... | 31 |
| 7. FIGURA 7 Histopatología en riñón 10x DL50..... | 33 |
| 8. FIGURA 8 Histopatología en pulmón 10x DL50..... | 33 |
| 9. FIGURA 9 Histopatología en hígado 10x DL50..... | 34 |
| 10. FIGURA 10 Histopatología en corazón 10x DL50..... | 34 |
| 11. FIGURA 11 Histopatología en bazo 10x DL50..... | 34 |
| 12. FIGURA 12 Histopatología en intestino 10X DL50..... | 35 |
| 13. FIGURA 13 Histopatología en cerebro 10x DL75..... | 35 |
| 14. FIGURA 14 Histopatología en riñón 10x DL75..... | 36 |
| 15. FIGURA 15 Histopatología en pulmón 10x DL75..... | 36 |
| 16. FIGURA 16 Histopatología en hígado 10x DL75..... | 37 |
| 17. FIGURA 17 Histopatología en corazón 10x DL75..... | 37 |
| 18. FIGURA 18 Histopatología en bazo 10x DL75..... | 38 |
| 19. FIGURA 19 Histopatología en intestino10x DL75..... | 38 |

I. INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento industrial y la explosión demográfica mundial en las últimas décadas ha dado origen a grandes concentraciones urbano-industriales lo que en conjunto ha provocado la presencia de contaminantes tóxicos en el agua y el suelo alterando el equilibrio natural del ecosistema (Alvarado, 1991, Baker *et al.*, 1977; Milhaud, 1988).

Muchos de estos productos químicos son peligrosos y es importante evaluar los riesgos directos o indirectos para la salud (Salas y Muños, 1987). La emisión de sustancias contaminantes al medio ambiente es inevitable, tanto como resultado de procesos industriales como la utilización de productos manufacturados en el tratamiento y eliminación de residuos. Al ser liberados al medio ambiente, los contaminantes circulan y sufren alteraciones dependiendo de varios factores naturales y artificiales, interrelacionados. Su desplazamiento puede ser percibido por los seres vivos como rápido o lento en su forma original o alterada. Su trayectoria puede ser directa o compleja, según sean los traslados producidos en los entornos atmosféricos, subterráneos y acuáticos. Los residuos de los contaminantes pueden encontrarse o no bajo control, siendo supuestamente controlados una parte intrínseca de las prácticas habituales de la gestión de residuos tóxicos, consistiendo en gestionar (y por tanto, controlar) la emisión de sustancias contaminantes para disminuir de este modo los daños ocasionados al medio ambiente (Capó, 2007).

En el país existe escasez de estudios acerca de la contaminación del agua, suelo, vegetales y del aire, los pocos que existen se han hecho de una manera aislada, en relación con la gran complejidad que reviste y a los enormes costos que tienen para dar una solución al problema de la contaminación, especialmente por parte del sector industrial (Alvarado, 1991).

En el caso particular de la contaminación de los suelos, las investigaciones existentes se basan prácticamente en contaminantes por fertilizantes y plaguicidas, sin tomar en cuenta que existen otros tipos de contaminaciones mucho más tóxicos, como los metales pesados, que aparte de ser insolubles,

se mueven con facilidad a través de los suelos, contaminando vastas áreas de suelos agrícolas (Kopito, 1969).

Distintos elementos han sido detectados en concentraciones pequeñas en la atmósfera. Los más abundantes son: calcio, aluminio, plomo y hierro. En proporciones más pequeñas se encuentran: sodio, potasio, vanadio, magnesio, cobre, cromo y manganeso. De origen artificial encontramos al calcio, aluminio y magnesio (en la porción inorgánica de cenizas) así como el plomo, cuyo origen provenía de los gases de escape de los vehículos que utilizan gasolina, debido al aditivo antidetonante tetraetilo de plomo y que aparece como residuo del fueloil (Capó, 2007).

La importancia de los metales pesados es muy amplia; muchos se usan en la industria de países con tecnología avanzada, algunos son fisiológicamente esenciales para plantas y animales, y tienen un efecto directo sobre la productividad agrícola y la salud humana; otros contaminantes significativos de ecosistemas en el mundo entero. Los metales pesados en suelos han recibido una atención especial de los últimos años por la preocupación científica sobre el medio ambiente (Holgate, 1979).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del área de estudio

Después de la Revolución Industrial, el uso de los metales, especialmente metales pesados, aumentó dramáticamente y se han acumulado gradualmente en la biósfera. Los metales pesados son ampliamente utilizados en la elaboración de productos metálicos, y también se utilizan como suministros médicos y catalizadores, esto aunado al desarrollo de la tecnología informática ha causado una nueva contaminación por metales, ya que se necesitan elementos raros para la manufactura de chips para IC (integración de circuitos). La contaminación de los alimentos, así como las aguas subterráneas se debe a nuestra gran variedad de usos de los metales. Además, se ha observado que la contaminación del aire no sólo se sitúa en un país. Los contaminantes atmosféricos, incluyendo metales pesados, por ejemplo, los que se encuentran en Japón, se originaron en China, donde las grandes industrias son ahora comunes, por lo cual es importante saber cómo la contaminación de metales pesados está invadiendo a las zonas urbanas y rurales, se sabe que la toxicidad crónica y las malformaciones es inducida por los contaminantes, pero el efecto de la exposición a largo plazo a estos contaminantes aún no está claro (Takeshi *et al.*, 2008).

2.2 Generalidades de los metales pesados

Los metales se inhalan principalmente en forma de polvos y humos (estos últimos se definen como partículas pequeñas generadas por combustión). También puede haber intoxicación por metales como resultado del contacto con vapores, cuando los metales se ingieren en alimentos, su absorción digestiva varía según la forma química del metal y el estado nutricional del hospedador. Una vez que un metal se absorbe, su principal medio de transporte es la sangre, pero su cinética depende de su potencial de difusión, fijación por proteínas, velocidad de biotransformación, disponibilidad de enlazadores intracelulares y otros factores. Algunos órganos (p. ej., hueso, hígado y riñón) retienen relativamente grandes concentraciones de metales durante varios años. La

mayor parte de los metales se excreta por vía renal y digestiva; una parte también se excreta a través de la saliva, sudor, exhalación, lactancia, exfoliación cutánea y caída de pelo y uñas. La estabilidad intrínseca de los metales facilita el rastreo y la medición en el material biológico, aunque no siempre se conoce la importancia clínica de la concentración que se obtiene (Harrison, 2006).

2.3 Generalidades del arsénico

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en nuestro entorno, de manera que la exposición humana al arsénico es inevitable. La exposición de la población en general a varias especies de arsénico (inorgánico y orgánico) varía según la geoquímica local y el nivel de actividad antropogénica. Generalmente, el arsénico se presenta en cantidades muy pequeñas, encontrándose en las rocas, el suelo, el agua e incluso en suspensión. Estudios recientes revelan un efecto adverso importante en la salud de las personas que han sufrido una exposición prolongada, e incluso a concentraciones bajas de arsénico (Alfaro-Burgos, 2013).

2.4 Generalidades del conejo Nueva Zelanda

2.4.1 Clasificación taxonómica

El conejo es un animal muy característico cuyas variedades proceden, del primitivo conejo silvestre europeo, en un principio, los conejos se incluyeron en el primitivo orden de los Roedores, pero cuando el mismo se separó en dos grupos: Los Roedores (Orden *Rodentia*) que poseen 2 incisivos superiores y 2 inferiores y los Lagomorfos (Orden *Lagomorpha*) que poseen 4 incisivos superiores y 2 inferiores, pasaron a incluirse en este último orden, con lo cual la posición del conejo en la Sistemática Zoológica queda de la siguiente forma: (tabla 1). La familia de los leporidos comprende básicamente los conejos y las liebres Género *Lepus*-. Dentro del grupo de los llamados "conejos" destaca el conejo común *Oryctolagus cuniculus* que es motivo de explotación por parte del hombre en sus múltiples razas y variedades, (UABCS, 2004).

TABLA 1 Clasificación Zoológica del Conejo.

| Reino | Animal |
|-------------|--------------------|
| Sub-Reino | Metazoos |
| Tipo | Cordados |
| Sub-tipo | Craneados |
| Clase | Mamíferos |
| Sub-clase | Vivíparos |
| Orden | Lagomorfos |
| Familia | Leporidae |
| Sub-familia | Leporinae |
| Género | <i>Oryctolagus</i> |
| Especie | <i>Cunícolus</i> |

Fuente: Leonart *et al*, 1980.

2.4.2 Características de la raza Nueva Zelanda

Es llamado también neozelandés. Animal de origen Estadounidense y se creó en 1912; especializada en la producción de carne. Existe en tres variedades, el blanco, el negro y el rojo (leonado), en 1925 se obtuvo la variedad blanca a través de cruzamientos con Blanco Americano y Angora. Por último, en los años 60 se creó la variedad negra, utilizando la raza Chinchilla.

Su peso ideal (adulto) es de 4.5 Kg en el macho y 5.0 Kg en la hembra, siendo la raza que, hoy en día, se cría con más intensidad en varias partes del mundo; aunque las tres variedades son excelentes animales para la producción de carne. Además, la piel del Nueva Zelanda Blanco es la que tiene mayor demanda por los peleteros, ya que admite una gran diversidad de teñidos sucesivos. Por otra parte, la Nueva Zelanda hembra es muy fértil y produce abundante leche. Generalmente destetan camadas numerosas y presentan un promedio de 8.2 gazapos nacidos vivos. Además son de una excelente habilidad materna, asociada con un crecimiento y rendimiento en canal notable; pesan en promedio de 1.6 a 1.8 Kg al sacrificio, pese a una transformación alimenticia y una textura cárnica mediana. Figura 1, (UABCS, 2004).



FIGURA 1 FOTOGRAFÍA ORIGINAL

III. JUSTIFICACIÓN

En las actividades diarias del mismo hombre se ha generado la sobreexplotación de minas y cuerpos de agua que han propiciado el desbalance y la presencia de materiales diversos que pueden ser tóxicos, y dentro de estos diversos metales pesados, de los que se ha documentado representan riesgos a la salud. Actualmente la salud ambiental, salud animal y la salud pública deben reconsiderarse dado el deterioro ambiental que existe en todo el continente, por lo que es importante evaluar las alteraciones que producen los metales pesados que hoy en día se encuentran suspendidos en los diferentes elementos: aire, suelo, vegetales y el agua, los cuales al estar contaminados pueden ser un potencial riesgo a la salud de los organismos expuestos.

En todos los ecosistemas que se conocen actualmente se utiliza una gran cantidad de sustancias químicas con la finalidad de producción y elaboración de materiales que habitualmente se usan con fines agropecuarias e incluso a nivel doméstico; asimismo, se encuentran de manera natural en suelos, rocas y en los mismos vegetales, lo que ha provocado cierto grado de intoxicación para diferentes especies animales.

En el área de las ciencias biológicas, como el caso de la medicina veterinaria es imprescindible en la mayoría de los casos la utilización de modelos biológicos con la finalidad de poder despejar algunas incógnitas que aún siguen o están en duda, por lo que se seleccionó el modelo conejo con la finalidad de poder obtener muestras para análisis de laboratorio y realizar determinaciones fisiológicas que contribuyan con la explicación de lo que ocurre actualmente en los diferentes sistemas de producción y hábitats de los organismos; así como correlacionarlo con lo que pueda estar sucediendo a la fecha con la vida del propio hombre, y en su caso dar recomendaciones para evitar problemas en salud pública.

Debido a la importancia que representa la contaminación por arsénico, el objetivo del presente trabajo es evaluar el tiempo y efecto del Arsenito de Sodio sobre la funcionalidad hepática y renal, considerando la bioacumulación-concentración (en pelo y faneras), así como las alteraciones fisiopatológicas en los organismos expuestos.

IV. HIPÓTESIS

La exposición continua de arsenito de sodio en hígado y riñón produce alteraciones histológicas e incremento de las concentraciones enzimáticas sanguíneas en modelo conejo.

V. OBJETIVOS

- Determinar los niveles de Arsénico en muestras sanguíneas, pelo, heces y orina en conejos expuestos a dosis 50% y 75%.
 - Evaluar el funcionamiento hepático (AST, ALT, GGT) y funcionamiento renal (Urea y creatinina) de conejos expuestos a dosis baja y media de Arsénico en diferentes periodos.
 - Evaluar la concentración de proteínas totales y hematocrito de conejos expuestos a dosis media y alta de arsénico en diferentes periodos.
 - Evaluar los cambios anatomopatológicos e histológicos producidos por la exposición de Arsénico en el modelo conejo y en diferentes periodos.
 - Monitorear la concentración acumulada en hígado, riñón, cerebro y músculo.
-

VI. MATERIAL

6.1 Material biológico:

- 14 Conejos Nueva Zelanda; tanto hembras como machos, con un peso promedio de 1.5 Kg.

6.2 Sustancias y reactivos:

- Arsenito de sodio
- Agua destilada
- Kits de reactivos enzimáticos ALT, AST, GGT, Urea, Creatinina, (Clinical chemistry) Marca: Instrumentation laboratory
- Formaldehído 10%

6.3 Equipo y material de laboratorio

- Balanza analítica Marca Ohaus; Adventurer
- Balanza granataria Ohaus
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga eppendorf
- Espátula
- Espectrofotómetro bioquímica
- Micropipetas graduadas de 10, 100 y 1000 μ L
- Microtubos (viales) 2mL
- Probeta graduada de 1L
- Puntas desechables para micropipeta
- Tubos de ensayo con capacidad de 5mL
- Tubos eppendorf 15mL y 50 mL
- Vaso de precipitado de 50mL

6.4 Equipo de campo

- Agujas de 23 G
 - Bebederos con capacidad de 1L graduados
 - Bitácora diaria
-

- Bolsas de polietileno de 10 x 15 cm
- Cámara fotográfica
- Cápsulas para tejidos
- Cuchillos
- Estilete
- Frascos de plástico con cierre hermético de 200 mL
- Guantes de nitrilo
- Hojas de papel
- Jeringas de 3mL
- Jeringas de 5 mL
- Mango de bisturí y hoja para bisturí No.10
- Pinzas de disección estándar
- Rasuradora
- Tabla para cortes
- Tijeras de disección Mayo rectas
- Toallas absorbentes
- Torundas con alcohol del 96°
- Torundas secas
- Tubos vacutainer amarillos con Gel de trombina
- Tubos vacutainer con anticoagulante EDTA

6.5 Equipo de protección personal:

- Lentes de seguridad
- Mascarilla contra polvos
- Bata de laboratorio
- Botas de hule

VII. MÉTODO

Se realizó en un modelo biológico usando como material de experimentación 7 conejos de raza Nueva Zelanda (hembras y machos) de 8 semanas de edad y de un peso aproximado de 1.5 kg.

Los animales se obtuvieron de la granja cunicola de la FMVZ de la UAEM. Se identificaron, sexaron, pesaron y se alojaron en jaulas comerciales de 40 x 90 x 40 cm, distribuidos al azar en dos grupos DL 50 y DL 75; de 3 animales cada uno, y se tuvo un conejo control.

Cabe mencionar que todos los animales recibieron agua y alimento a libre acceso durante todo el experimento.

Los conejos se mantuvieron con agua destilada y alimento comercial marca purina® (con 16 % de proteína, 3% de grasa, 17 % de fibra, 10 % de cenizas, 12% de humedad, 42.5 % de E.L.N., 1 % de calcio y 0.55 % de fósforo) a libre acceso (NOM-062-Z00-1999; National Research Council Guide for the Care and Use of Animals, 1996), Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del CNI (1996).

7.1 Dosificación

Se dividieron en 2 grupos correspondientes DL50 (dosis media) y DL75 (dosis intermedia letal), todos los grupos compuestos de tres individuos dando un total de 2 grupos y un grupo control de 1 conejo.

Se les administró As, por vía oral utilizando el agua destilada como medio de administración, aprovechando la solubilidad de las sales, la cual se obtuvo de la destiladora del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la FMVZ- UAEM.

La dilución de las sales se realizó en 800mL de agua total por grupo calculando un consumo voluntario de 200mL de agua por conejo, respecto al grupo control al que se le administró solo agua destilada, el tratamiento se llevo a cabo

diariamente, por un periodo de 60 días en los grupos de dosis media y 30 días en los grupos de dosis media letal.

7.2 Cálculo de dosis

El cálculo de la dosis se estableció con base en la sal utilizada y los pesos promedios de cada grupo a tratamiento, de la siguiente manera:

TABLA 2 Dosificación de grupos

| Dosis SALES | DL 50 Mg/kg | DL 75 Mg/kg |
|-------------------|-------------|-------------|
| Arsenito de sodio | 12 mg/kg | 18 mg/kg |
| Control | 1000 | 1000 |

El cálculo de la dosis se basó en la Hoja Técnica de Seguridad del Material de cada una de las sales a utilizar (SIGMA-ALDRICH, 2014a, b), con base a su información toxicológica en roedores.

7.3 Toma de muestra sanguínea

A los 0, 15, 30, 45 y 60 días de iniciado el tratamiento se recolectaron 4 mL de sangre de la vena marginal auricular con una jeringa de 3 mL y aguja calibre 23 G x 2.0 pulgadas de longitud (Thrall *et al.*, 2006), de cada uno de los animales en experimentación. Inmediatamente después de la toma de muestra de cada animal, se vació la sangre lentamente en tubos con separador de suero tapón amarillo (trombina) y a tubos lila (EDTA).



FIGURA 2 fuente: www.lafebervet.com

7.4 Perfil enzimático

Al obtener la muestra sanguínea se colocó en el tubo con tapón amarillo, y se dejó reposar 12 horas para la formación del coágulo, se remitieron al área de Hematología en donde se procesaron.

Proceso:

Se colocaron los tubos nivelados por el contenido de manera equidistante para centrifugarse a 3500 rpm, en una centrifuga de 16 tubos marca Solbat, durante un tiempo de 5 minutos, el separador atrapo el coagulo y se extrajo el suero con pipeta de 1000 μ L, se transvaso a un vial de 2mL, los cuales se recentrifugaron en una centrifuga eppendorf a 14,000 rpm, durante 8 minutos, extrayendo el suero de cada muestra las cuales se conservaron en congelación a -20°C hasta su procesamiento, se realizó el estudio de bioquímica clínica y hematológica para encontrar alteraciones de los valores de las siguientes enzimas y metabolitos:

- Alanino aminotransferasa (ALT)
 - Aspartato aminotransferasa (AST)
 - Gamma Glutamil transferasa (GGT)
-

- Urea
- Creatinina
- Hematocrito
- Proteínas totales

La lectura de las enzimas se realizó en un Espectrofotómetro de bioquímicas, marca BioSystems BTS-350, con reactivos Clinical chemistry Marca: Instrumentation laboratory, seleccionando la enzima a evaluar eligiendo la unidad de medida, se ingresó muestra a la manguera de teflón que la absorbente, se pulso la bomba, entre cada muestra ingresa un tubo con agua destilada y se lavó.

Alanino aminotransferasa (ALT)

Se utiliza para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de Alanino aminotransferasa ALT, usada para el diagnóstico y tratamiento de ciertos tipos de enfermedades hepáticas y cardíacas, con un análisis cinético la formulación del reactivo es conforme a la recomendación de la IFCC. Método modificado sin piridoxal fosfato, la absorbancia se mide a una longitud de onda de 340 nm utilizando 50 µL de suero y 560 µL de reactivo, para la lectura con una incubación interna de 60 segundos y 126 segundos de lectura de resultado.

Aspartato aminotransferasa (AST)

Se utiliza para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de Aspartato aminotransferasa AST, usada para el diagnóstico y tratamiento de ciertos tipos de enfermedades hepáticas y cardíacas, con un análisis cinético la formulación del reactivo es conforme a la recomendación de la IFCC, Método modificado sin piridoxal fosfato, en el que la absorbancia se mide a una longitud de onda de 340 nm utilizando 50 µL de suero y 560 µL de reactivo, para la lectura con una incubación interna de 60 segundos y 126 segundos de lectura de resultado.

γ-Glutamil transferasa (GGT)

Utilizada para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de gamma glutamil transferasa, se usan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades

hepáticas tales como cirrosis, obstrucción biliar y tumores hepáticos primarios y secundarios, con un análisis cinético conforme a la recomendación del método de Szazs/Persijn, en el que la absorbancia se mide a 405 nm, utilizando 600 μ L de reactivo y 60 μ L de muestra, con una incubación de 43 segundos y 125 segundos de resultado.

Urea

Utilizado para la determinación diagnóstica *in vitro* de Urea y nitrógeno de urea, los incrementos en los valores de urea sérica (nitrógeno de urea) pueden ser resultado de disfunción hepática u obstrucción en el tracto urinario, análisis de tiempo fijo con una metodología de enzima acoplada ureasa/GLDH, en el que la disminución de la absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADH es proporcional a la concentración de la urea presente en la muestra, utilizando 600 μ L de reactivo y 6 μ L de la muestra, con una incubación interna de 95 segundos.

Creatinina

Se utiliza para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de Creatinina, utilizada para el monitoreo de enfermedades renales, con un análisis cinético con un método colorimétrico basado en la reacción de creatinina con ácido pícrico, en medio alcalino, en el que la absorbancia se mide a 510 nm, utilizando 300 μ L de reactivo 1 con 40 μ L de muestra a incubar a 37°C por 72 segundos, agregar 300 μ L de reactivo 2 e introducir al equipo con una incubación interna de 90 segundos.

Hematocrito

Se realizó con la sangre contenida en tubos capilares de 75 mm de longitud y con un diámetro interno de aproximadamente 1 mm. Pueden ser tubos simples para uso con muestras sanguíneas revestidos internamente con 1 μ L de heparina para la recogida directa de la sangre capilar. La centrífuga utilizada para los tubos capilares proporciona una fuerza centrífuga de 12,000 g y una centrifugación de 5 min. Permite obtener un hematocrito constante. Hay que dejar que la sangre, procedente de una muestra bien mezclada penetre en el tubo por capilaridad, dejando al menos 15 mm vacíos. Después, se sella el tubo con plastilina. No se recomienda el sellado del tubo por medio de calor pues el

sello tiende a estrecharse progresivamente y existe la probabilidad de que se produzca lisis. Después de la centrifugación de 5 min, se mide a proporción de células con respecto a la columna total (es decir, el hematocrito) utilizando el dispositivo de lectura como lector óptico (Dacie y Lewis, 2007).

FIGURA 3. Centrífuga para capilares. Fotografía original



Proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó para evaluar el estado general del organismo, o bien que el cuerpo no absorba bien suficientes proteínas, se colocó el refractómetro frente a una buena fuente de iluminación, se comprobó la limpieza de los prismas, con el capilar sobre la superficie del prisma inferior en posición horizontal, se pusieron de 1 ó 2 gotas de suero, se cerró el prisma. Observando por el ocular, se observó la última barra hacia la derecha que indica la cantidad de proteínas totales en una escala de 100/gr.



FIGURA 4 Refractómetro veterinario Reichert. Fotografía original

7.5 Examen Anatomopatológico e histopatología

El día 30 después de la toma de muestras sanguíneas, se pesaron y sacrificaron humanitariamente de acuerdo con la NOM-033-ZOO-1995 por técnica de Insensibilización por desnucamiento y desangrado; corte de yugular dentro de los 30 segundos después de la insensibilización todos los animales de los grupos DL75 y un individuo del grupo control. Posteriormente se realizó la necropsia como lo describen Aluja y Constantino (2002), se identificaron lesiones macroscópicas y se realizó la toma fotográfica de órganos y su pesaje.

7.6 Tratamiento de los tejidos para histopatología

Se tomaron muestras de hígado, corazón, riñón, cerebro, intestino delgado, bazo y pulmón, se conservaron en formol al 10% (1:10) (Aluja y Constantino, 2002) y se enviaron al laboratorio de histopatología para su inclusión en parafina.

El primer paso en la preparación de una muestra de tejido u órgano es la fijación para conservar la estructura.

La fijación, en general obtenida mediante el empleo de sustancias químicas individuales o mezclas de estas sustancias, conserva la estructura del tejido en forma permanente para permitir el tratamiento ulterior. Las muestras tienen que

sumergirse en el fijador inmediatamente después de extraerse del organismo. La fijación se utiliza para:

- Abolir el metabolismo celular.
- Impedir la degradación enzimática de las células y los tejidos por autólisis (autodigestión).
- Destruir los microorganismos patógenos como las bacterias, los hongos o los virus.
- Endurecer los tejidos como consecuencia de la formación de enlaces cruzados o la desnaturalización de las moléculas proteicas.

El fijador de uso más común es la formalina, una solución acuosa de formaldehído al 37%, en diluciones variadas y en combinación con otras sustancias químicas y amortiguadores (buffers). El formaldehído preserva la estructura general de la célula y de los componentes extracelulares al reaccionar con los grupos amino de las proteínas (con mucha frecuencia forma enlaces cruzados entre residuos de lisina). Dado que el formaldehído no altera en forma significativa su estructura tridimensional. Las proteínas mantienen su capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos. Esta propiedad es importante en los métodos de tinción inmunocitoquímica.

En el segundo paso la muestra se dispone para su inclusión en parafina con el fin de permitir su corte.

Para poder examinar la muestra hay que infiltrarla con un medio de inclusión que permita realizar cortes muy delgados, típicamente de 5 - 15 μm (1 micrómetro [μm] equivale a la milésima parte de un milímetro) luego de la fijación la muestra se lava y se deshidrata en una serie de soluciones alcohólicas de concentración creciente hasta alcanzar al 100%. En el paso siguiente, el aclarado, se utilizan solventes orgánicos, como xileno o tolueno, que son miscibles tanto en alcohol como en parafina, para extraer el alcohol al 100% antes de la infiltración de la muestra con parafina fundida.

Cuando la parafina fundida se ha enfriado y endurecido se empareja para formar un bloque de tamaño adecuado. Este bloque, llamado taco, se coloca entonces en una máquina cortadora especial, el micrótopo, que lo corta en rebanadas

finas con una cuchilla de acero. Luego los cortes obtenidos se montan sobre portaobjetos de vidrio a los que antes se les habrá añadido una pequeña cantidad de albúmina para que sirva de adhesivo.

En el tercer paso, la muestra se tiñe para permitir su examen.

Dado que los cortes en parafina son incoloros, la muestra todavía no está lista para su examen bajo el microscopio óptico. Para colorear o teñir los cortes histológicos la parafina debe disolverse y extraerse, de nuevo con xileno o tolueno, y los tejidos deben rehidratarse mediante el uso de una serie de alcoholes de concentración decreciente. Luego el tejido colocado sobre los portaobjetos se tiñe con hematoxilina en agua. Como el colorante de contraste, eosina, es más soluble en alcohol que en agua, se vuelve a deshidratar la muestra en soluciones alcohólicas de concentración creciente y después se tiñe con eosina en alcohol. Luego de la coloración la muestra se hace pasar por xileno o tolueno y se le coloca un medio de montaje no acuoso antes de cubrirla con un cubreobjetos para lograr un reparado permanente. (Samuelson, 2007) se realizó su estudio histopatológico (tinción HE). De igual forma, en el día 60 se realizó el manejo antes descrito en los grupos de DL50.

7.7 Determinación de arsénico

La detección de las concentraciones de As, se realizó a través de Espectrometría de Masas y los resultados se expresaron en ppm (mg/Kg).

Se recolectaron muestras de pelo de la región dorsal de los conejos para completar aproximadamente 1 gr de pelo, 1 gr de heces, y 0.5 mL orina y sangre los cuales se guardaron en viales de plástico: orina, sangre y órganos, y bolsas de plástico para: heces y pelo, previamente identificadas por animal / grupo / fecha de obtención muestra.

Se envió una muestra de alimento de aproximadamente 5gr-10gr, agua destilada, y diluciones preparadas del metaloide, en tubos eppendorf de 15mL, muestras de hígado, corazón, riñón y cerebro, en viales con capacidad de 2 mL, al finalizar los días de experimentación para la determinación de arsénico.

Las muestras se transportaron en refrigeración, a los laboratorios del Centro Experimental de Oaxaca pertenecientes al Servicio Geológico Mexicano donde se realizó determinación del metal.

VIII. LÍMITE DE ESPACIO

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del “Centro de Investigación y Estudios Avanzados En Salud Animal (CIESA),” ubicado en la carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco Km 13.1, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México y en los laboratorios del Centro Experimental de Oaxaca pertenecientes al Servicio Geológico Mexicano.

IX. LÍMITE DE TIEMPO

El presente trabajo se realizó a partir del mes de Febrero del 2014 concluyendo con el trabajo experimental en Abril del 2014, para el análisis de datos.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Durante el trabajo de investigación donde se utilizó al conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza nueva Zelanda como modelo biológico Fueron analizadas 197 muestras para detección de Arsénico, en sangre, pelo, heces, orina, hígado, cerebro, riñón y músculo. Se corrieron 140 bioquímicas, 7 necropsias y lectura de 49 tejidos histopatológicos, en modelo conejo *Oryctolagus cuniculus* de raza Nueva Zelanda.

Utilizando dos grupos correspondientes DL50 (dosis media) y DL75 (dosis intermedia letal) con las sales de arsenito de sodio; DL50 12 mg/kg y DL75 18 mg/kg utilizando estas dosis durante los periodos predeterminados de 30 y 45 días según la dosis respectiva, con la finalidad de valorar el efecto sobre los organismos expuestos y correlacionarlos con los que actualmente puede estar ocurriendo a nivel mundial con la contaminación ambiental e incluso de alimentos que se consumen por el hombre, como potencial efecto a la salud pública.

10.1 Resultados de Arsénico en conejos expuestos a DL 50 y DL75.

10.1.1 Excreción promedio de Arsénico en heces y orina en conejos expuestos a DL 50 y 75.

Tabla 3. Excreción promedio de arsénico en heces y orina en conejos expuestos a DL 50 y DL 75

| Indicador / Periodo | Día 0 | Día 15 | Día30 | Día 45 | Día 60 |
|---------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| HECES (ppm) | | | | | |
| DL50 | 0.2392 ^c ± 0.0239 | 43.06 ^b ± 7.81 | 96.27 ^a ± 3.64 | 104.1 ^a ± 36.7 | 47.89 ^b ± 2.52 |
| DL75 | 0.2819 ^c ± 0.0327 | 73.4 ^a ± 17.4 | 36.01 ^b ± 5.23 | - | - |
| ORINA (ppm) | | | | | |
| DL50 | 0.14144 ^c ±0.00312 | 45.33 ^a ±11.22 | 31.04 ^b ± 3.00 | 53.36 ^a ± 12.54 | 40.28 ^{a,b} ± 3.86 |
| DL75 | 0.0467 ^b ± 0.258 | 45.863 ^a ± 1.17 | 40.25 ^a ± 11.17 | - | - |

Literales diferentes por fila muestran diferencia estadística (Fisher, p<0.05)

En la orina se midió la cantidad de arsénico excretado, considerando que la cantidad fue aumentando en la DL 50 las lesiones mostradas y su eliminación

están correlacionadas a la cantidad absorbida de éste mineral a través de ésta vía en donde al día 45 se detectó una concentración de 53.36 ± 12.54 ppm ($p < 0.05$) (cuadro 3). Un estudio considera la orina la principal vía de eliminación del arsénico, cuando es ingerido en pequeñas cantidades y puede permanecer en el cuerpo durante meses o años. (Luiz y Corey, 1987)

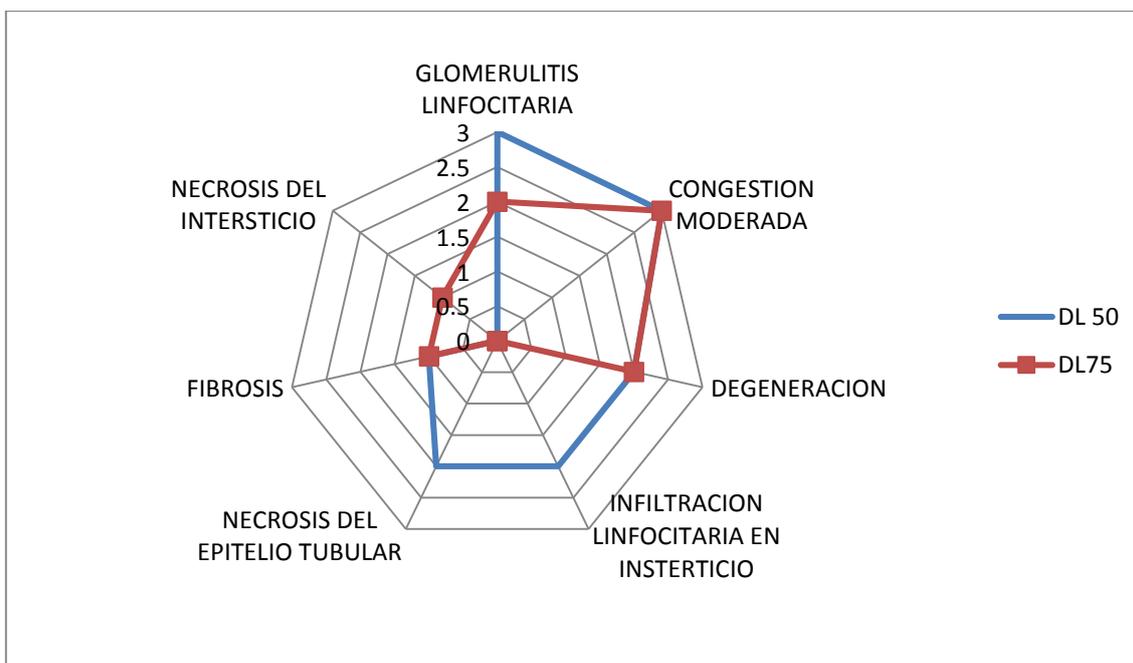


Figura 5. Lesiones histopatológicas en riñón por ingestión de arsénico

En las heces se determinó la cantidad excretada del metal de interés, considerando el Arsénico la proporción excretada fue aumentando en la DL 50 a través de esta vía, las lesiones que se mostraron en intestino con la DL 75 y la eliminación mostrada al no ser absorbido el metal debido al daño celular, por lo cual se detectó una concentración de 36.01 ± 5.23 ppm al día 30 ($p < 0.05$)

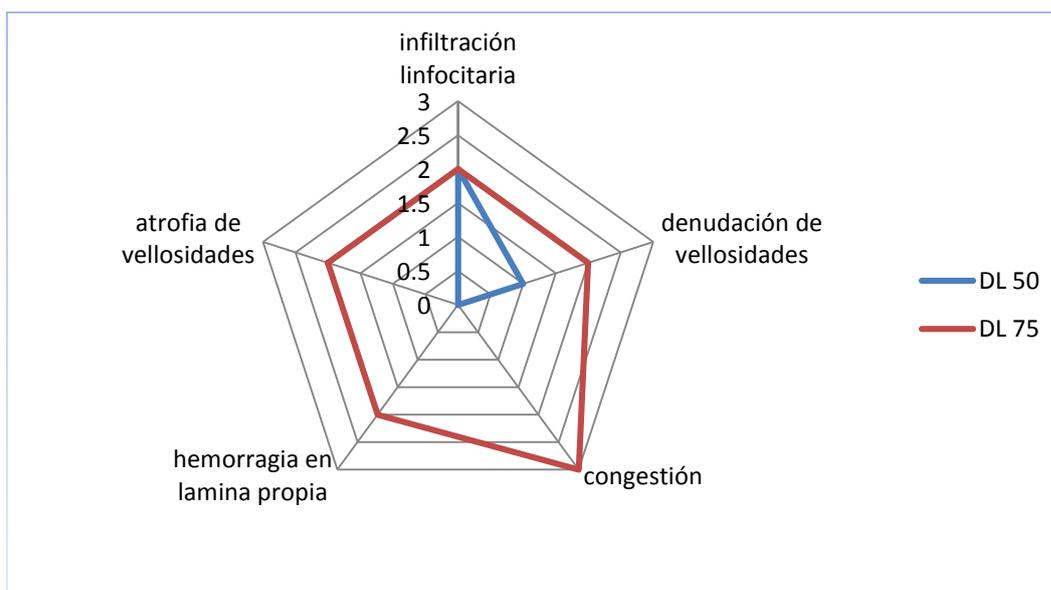


Figura 6. Lesiones histopatológicas en intestino por ingestión de Arsénico.

Tabla 4 Concentraciones de arsénico ($P < 0.05$) en sangre, pelo, heces, orina en conejos expuestos a DL50 y DL75 ANOVA ($P < 0.05$), método LSD de Fisher, confianza de 95%.

| Indicador / Periodo | Día 0 | Día 15 | Día 30 | Día 45 | Día 60 |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| SANGRE (ppm) | | | | | |
| DL 50 | 0.0081412 ^b ±0.001715 | 0.2611 ^a | 0.3635 ^a | 0.4035 ^a | 0.2809 ^a ±0.0722 |
| | 1 | ±0.0422 | ±0.1312 | ±0.1407 | |
| DL75 | 0.008141 ^b ± | 0.5058 ^a | 0.674 ^a ± 0.208 | - | - |
| | 0.0017151 | ±0.0195 | | | |
| PELO (ppm) | | | | | |
| DL50 | 0.03358 ^d ±0.01160 | 3.42 ^{c,d} ± 2.37 | 23.52 ^{bc} ±16.00 | 42.00 ^b ±8.89 | 74.6 ^a ±20.1 |
| DL75 | 0.0582 ^b ± 0.0444 | 13.46 ^b ± 5.05 | 32.58 ^a ± 11.59 | - | - |

Las concentraciones en sangre de arsénico en la DL50 aumentaron crecientemente comenzando en el día 0 0.0081 ± 0.0017 mostrando una diferencia estadística significativa, al día 15 presenta 0.26 ± 0.04 ppm, en el día 30 con 0.36 ± 0.13 ppm, por un aumento a 0.403 ± 0.14 ppm al día 45, y al muestreo final del día 60 descender a 0.28 ± 0.07 ppm. La DL75 mostro un comportamiento distinto los primeros dos muestreos; al día 0 los resultados observables fueron 0.0081 ± 0.0017 ppm mostrando en el primer muestreo diferencia estadística significativa, al día 15 mostró un aumento con 0.008 ± 0.001 ppm y al día 30 se obtuvo 0.674 ± 0.208 ppm, su concentración por vía oral

fue mayor a la DL50 obteniendo aumento en la concentración de sangre a comparación de la dosis media (Tabla 4).

El pelo manifestó un comportamiento de acumulación creciente en DL50, al día 0 mostró 0.033 ± 0.011 ppm siendo significativa estadísticamente diferente, al día 15 3.42 ± 2.37 ppm, al día 30 23.52 ± 16 ppm, al día 45 42 ± 8.89 ppm y finalizar con una acumulación de 74.6 ± 20.1 ppm al día 60 siendo los dos últimos significativos estadísticamente diferentes, en la DL75 se observó al día 0 0.0582 ± 0.044 ppm, al día 15 de 13.46 ± 5.05 ppm, ascendiendo al día 30 con 32.58 ± 11.59 ppm siendo la última significativa y estadísticamente diferente (Tabla 4).

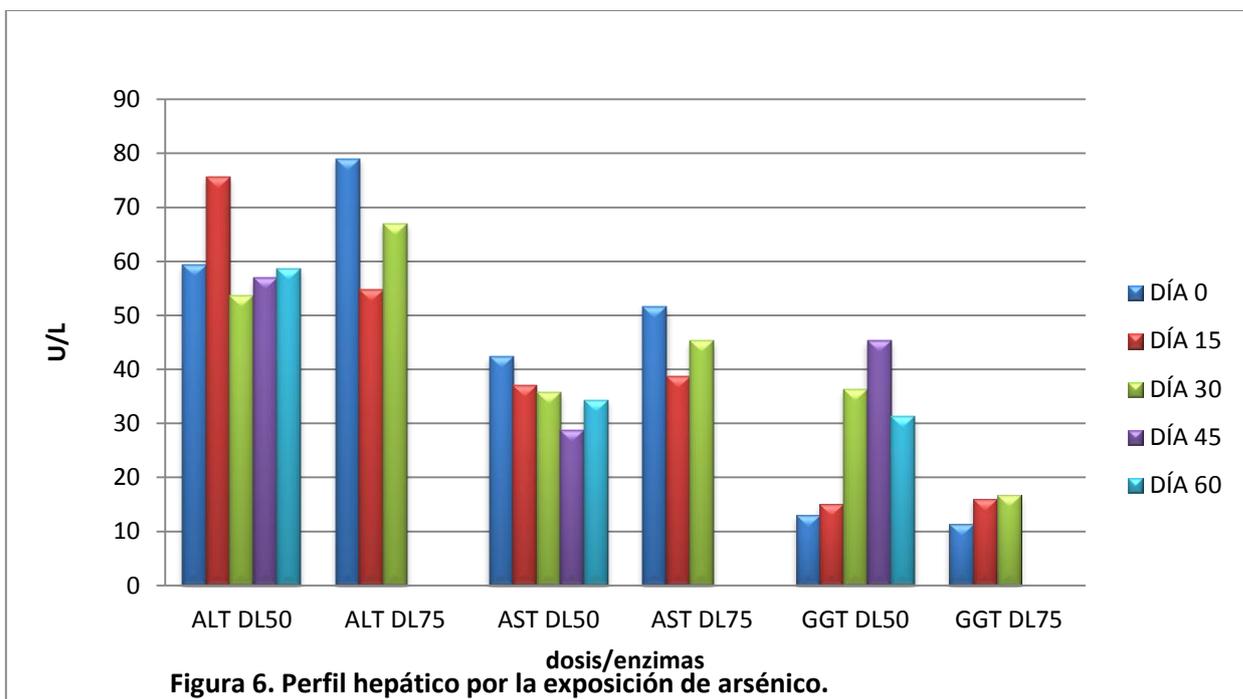
10.1.2 Valoración del funcionamiento hepático (AST, ALT, GGT) en organismos expuestos a DL50 y DL 75 con arsénico a diferentes periodos.

Tabla 5 Valoración del funcionamiento hepático en conejos expuestos a DL50 y DL75 con arsénico ANOVA (P<0.05), método LSD de Fisher, confianza de 95% KANEKO (2008).

| Indicador / Periodo | Día 0 | Día 15 | Día30 | Día 45 | Día 60 | Valores de referencia |
|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| ALT (U/L) | | | | | | |
| DL50 | $59.33^a \pm 15.28$ | $75.7^a \pm 24.7$ | $53.67^a \pm 7.23$ | $57.0^a \pm 5.29$ | $58.7^a \pm 23.7$ | 79 U/L |
| DL75 | $79^a \pm 17.8$ | $54.67^a \pm 8.14$ | $67^a \pm 13.89$ | - | - | |
| AST (U/L) | | | | | | |
| DL50 | $42.33^a \pm 10.97$ | $37.00^a \pm 9.17$ | $35.67^a \pm 3.21$ | $28.67^a \pm 10.97$ | $34.33^a \pm 9.71$ | 47 U/L |
| DL75 | $51.7^a \pm 24.2$ | $38.67^a \pm 7.64$ | $45.33^a \pm 5.03$ | - | - | |
| GGT (U/L) | | | | | | |
| DL50 | $13.0^a \pm 2.65$ | $15^a \pm 11.27$ | $36.3^a \pm 28.1$ | $45.3^a \pm 35.9$ | $31.3^a \pm 15.82$ | 9 U/L |
| DL75 | $11.33^a \pm 4.51$ | $16^a \pm 13$ | $16.67^a \pm 8.96$ | - | - | |

La Alanino aminotransferasa (ALT) en suero de la DL50 se mantuvieron sin mostrar diferencias estadísticas significativas al día 0 con 59.33 ± 15.28 U/L, para el día 15 presenta un aumento con 75.7 ± 24.7 ppm, el día 30 mostró un descenso con 53.67 ± 7.23 U/L, al día 45 mostró 57 ± 5.29 U/L, presentando en el día 60 un resultado de 58.7 ± 23.7 U/L. en la DL75 se presento de igual manera comenzando al día 0 con 79 ± 17.8 U/L y terminando al día 30 con 67 ± 13.89 U/L (Tabla 3) pero no fueron estadísticamente significativos considerando que los valores normales de ALT son de 79 U/L (Kaneko, 2008).

La Aspartato aminotransferasa (AST) en la DL50 no presentó diferencias estadísticas, el día 0 con 42.33 ± 10.97 U/L, el día 15 disminuyó con 37.00 ± 9.17 U/L, al día continuó descendiendo 35.67 ± 3.21 U/L, al día 45 se mostró un descenso 28.67 ± 10.97 U/L y al día 60 presentó un aumento con 34.33 ± 9.71 U/L sin mostrar diferencia estadística a los otros muestreos. La DL75 se mostró normal en todos los grupos muestreados, comenzando al día 0 con 51.7 ± 24.2 U/L, 38.67 ± 7.64 U/L al día 15, y al día 30 presentó 45.33 ± 5.03 U/L, (tabla 5).



Fuente: datos originales

La Gama Glutamil transferasa (GGT), es una enzima ligada a la membrana celular, los aumentos de GGT sérica se consideran como marcador de enfermedad hepática (Shelly, 2011) en la DL 50 se comportó en aumento durante los muestreos, comenzó al día 0 13.0 ± 2.65 U/L, al día 15 15 ± 11.27 U/L, al día 30 con 36.3 ± 28.01 U/L, al día 45 un ascenso de 45.3 ± 35.9 U/L, y al día 60 un descenso con 31.3 ± 15.82 U/L sin mostrar diferencia estadística significativa. La DL 75 presentó un comportamiento creciente comenzando al día 0 con 11.33 ± 4.51 U/L, el día 15 aumentando 16 ± 13 U/L, finalizando al día 30 con $16.67 \pm$

8.96 U/L, aún cuando ninguna de las dos dosis presento diferencias estadísticas en los muestreos (tabla 5).

Por lo cual se demostró que una dosis media y dosis media letal a exposición prolongada de arsénico causa un mayor incremento en la GGT, no siendo así en la ALT y AST.

10.1.3 Valoración del funcionamiento renal (Urea y Creatinina) de conejos expuestos a DL 50 y DL 75 con arsénico a diferentes periodos.

Tabla 6 Valoración del funcionamiento renal de conejos expuestos a DL 50 y 75 con arsénico ANOVA (P<0.05), método LSD de Fisher, confianza de 95% KANEKO (2008).

| Indicador / Periodo | Día 0 | Día 15 | Día30 | Día 45 | Día 60 | Valores de referencia |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| UREA (mmol/L) | | | | | | |
| DL50 | 23.93 ^d ± 3.16 | 34.82 ^{a,b} ± 5.78 | 32.18 ^{b,c} ± 1.83 | 28.10 ^{c,d} ± 2.4 | 39.46 ^a ± 1.20 | 3.45 ± 0.85 mmol/l |
| DL75 | 20.57 ^c ± 2.15 | 40.82 ^a ± 6.90 | 30.8 ^b ± 2.55 | - | - | |
| CREATININA (umol/L) | | | | | | |
| DL50 | 97.63 ^b ± 15.46 | 97.03 ^b ± 10.21 | 116.2 ^{a,b} ± 19.5 | 115.33 ^{a,b} ± 4.2 | 135.30 ^a ± 9.88 | 70.7-227.2 µmol/L |
| DL75 | 108.8 ^a ± 6.70 | 119.17 ^a ± 17.11 | 100.73 ^a ± 2.54 | - | - | |

La Urea mostró un interesante cambio estadístico, al día 0 comienza con 23.93±3.16 mmol/L siendo significativamente diferente a los demás muestreos, al día 15 se presenta 34.82 ± 5.78 mmol/L, al día 30; 32.18 ± 183 mmol/L, en el día 45 con 28.10 ± 2.4 mmol/L siendo estos tres muestreos no estadísticamente diferentes entre ellos, con diferencia a los otros muestreos, al día 60 presento 39.46 ± 1.2 mmol/L siendo el último muestreo estadísticamente diferente a los demás. La DL75 mostro diferencias estadísticas entre los muestreos, al día 0 se obtuvo la urea con 20.57±2.15 mmol/L aumentando de manera creciente al día 15 con 40.82 ± 6.90 mmol/L y finalizando al día 60 con 30.8 ± 2.55 mmol/L (tabla 6).

La Creatinina mostró un cambio estadístico entre muestreos, manifestando un comportamiento al inicio ondulante y finalizar de forma creciente. Al día 0 presentó 97.63 ± 15.46 µmol/L siendo estadísticamente significativo, al día 15

con 97.03 ± 10.21 , al día 30 con $116.2 \pm 19.5 \mu\text{mol/L}$, hasta el día 45; $115.33 \pm 4.26 \mu\text{mol/L}$, y terminar con un aumento al día 60 con $135.30 \pm 9.88 \mu\text{mol/L}$ siendo ésta última estadísticamente significativa. La DL75 no manifestó diferencias estadísticas, al día 0 presento $108.8 \pm 6.70 \mu\text{mol/L}$, al día 15 $119.17 \pm 17.11 \mu\text{mol/L}$, y al 30 100.73 ± 2.54 no presentando diferencias estadísticas entre ellos (tabla 6).

10.1.4 Concentración de proteínas totales y hematocrito de conejos expuestos a DL 50 y DL75 con arsénico a diferentes periodos.

Tabla 7 Concentración de proteínas totales y hematocrito de conejos expuestos a DL 50 y DL 75 con arsénico ANOVA ($P < 0.05$), método LSD de Fisher, confianza de 95% (SCHALM'S, 2008; Olayeni et al., 2007).

| Indicador / Periodo | Día 0 | Día 15 | Día30 | Día 45 | Día 60 | Valores de referencia |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| HEMATOCRITO (%) | | | | | | |
| DL50 | 43.00^a ± 2.65 | $40.33^{a,b} \pm 2.08$ | $38.33^{a,b} \pm 4.16$ | $37.33^{b} \pm 2.52$ | $42.00^{a,b} \pm 1.73$ | 40.5 ± 2.6 % |
| DL75 | 44.677^a ± 2.31 | $44.33^b \pm 2.89$ | $36.67^a \pm 5.13$ | - | - | |
| PROTEÍNAS TOTALES (grs/dL) | | | | | | |
| DL50 | 6.267^a ± 0.306 | $7.1^a \pm 0.1$ | $7.133^a \pm 0.681$ | $6.933^a \pm 0.586$ | $6.8^a \pm 5.20$ | 5.7 ± 0.6 grs/dl |
| DL75 | $6.7^b \pm 0.265$ | $7.3667^a \pm 0.1528$ | $6.3^c \pm 0.1$ | - | - | |

Para conocer el estado fisiológico del organismo se realiza el análisis de hematocrito y proteínas totales con el fin de determinar valores que nos indiquen algún tipo de alteración fisiológica. Al evaluar la sangre por refractometría se toma en cuenta el hematocrito (Ht) y las proteínas totales (PT). Si el Ht es elevado se denomina como eritrocitosis (policitemia), y para el caso de las proteínas, las variantes encontradas en el estudio fueron desde unas PT elevadas o hiperproteinemia, PT en rango o normoproteinemia o con PT disminuido o hipoproteinemia, en los diferentes grupos y de acuerdo con los periodos evaluados, e interrelacionando ambos parámetros: Ht disminuido o anemia con PT elevada o hiperproteinemia, PT en rango o normoproteinemia o con PT disminuida o hipoproteinemia (Núñez, 2007; Schalm's, 2008) reporta como valores normales para el Ht en conejos de 40.5 ± 2.6 y para las proteínas

totales de $(5.7 \pm 0.6 \text{ g/dL Olayemi, 2007})$, por lo que las variaciones en la concentración en el grupo expuesto a la DL 50, el día 0 con 43.00 ± 2.65 y la PT de $6.267 \pm 0.306 \text{ g/dL}$ lo que se considera como eritrocitosis (Núñez, 2007) a su vez en el siguiente muestreo (día 15) se comportó de forma distinta mostrando 40.33 ± 2.08 en hematocrito (Tabla 7).

La DL75 presento al día 0: $44.677 \pm 2.31\%$, con un descenso al día 15 con $44.33 \pm 2.89 \%$, descendiendo al día 30 con $36.67 \pm 5.13 \%$, mostrando diferencias estadísticas significativas en el segundo muestreo (Tabla 7).

Las Proteínas totales de la DL 50 al día 0 se obtuvo $6.267 \pm 0.306 \text{ grs/dl}$, en el día 15 se mostró un ligero aumento con $7.1 \pm 0.1 \text{ grs/dl}$, al día 30 se mantuvo con $7.133 \pm 0.681 \text{ grs/dl}$, al día 45 desciende ligeramente con $6.933 \pm 0.586 \text{ grs/dl}$, al día 60 con $6.8 \pm 5.20 \text{ grs/dl}$, pero no se presentaron diferencias estadísticas entre los muestreos.

La DL75 mostro diferencias estadísticas en los tres muestreos, al día 0 con $6.17 \pm 0.265 \text{ grs/dl}$, al día 15 tuvo un ligero ascenso a $7.3667 \pm 0.1528 \text{ grs/dl}$, al día 30 presentó $6.3 \pm 0.1 \text{ grs/dl}$.

10.1.5 Concentraciones en ppm de arsénico en hígado, cerebro, riñón, músculo en conejos expuestos a DL 50 y DL 75.

Tabla 8 Concentración de manganeso de biopsias de conejos expuestos a arsénico DL50 y DL 75 ANOVA ($P < 0.05$), método LSD de Fisher, confianza de 95%.

| Dosis / ppm | Hígado | Cerebro | Riñón | Músculo |
|-------------|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| DL 50 | $7.67^a \pm 1.74$ | $0.2604^a \pm 0.0513$ | $1.707^a \pm 0.379$ | $0.952^a \pm 0.212$ |
| DL75 | $5.43^a \pm 2.16$ | $0.4168^b \pm 0.1050$ | $2.35^a \pm 2.25$ | $0.712^c \pm 0.678$ |
| Control | 2.57 ± 0.13 | 0.45 ± 0 | 1.81 ± 0.14 | 0.28 ± 0.03 |

La concentración basal de arsénico en los distintos tejidos se manifestó evidente el grupo control presento $2.57 \pm 0.13 \text{ ppm}$ en hígado, en la dosis DL 50 se acumuló $7.67 \pm 1.74 \text{ ppm}$ al día 60, aunque no presento diferencias estadísticas ante los demás órganos en el grupo DL 50, a comparación con la DL 75 a los 30 días se observa una menor acumulación con $5.43 \pm 2.16 \text{ ppm}$ y fue estadísticamente diferente contra el cerebro y el músculo, pero sin manifestar

esta diferencia estadística en riñón. El hígado el órgano en que se presentó una detección más elevada en ppm a comparación de los demás (tabla 8).

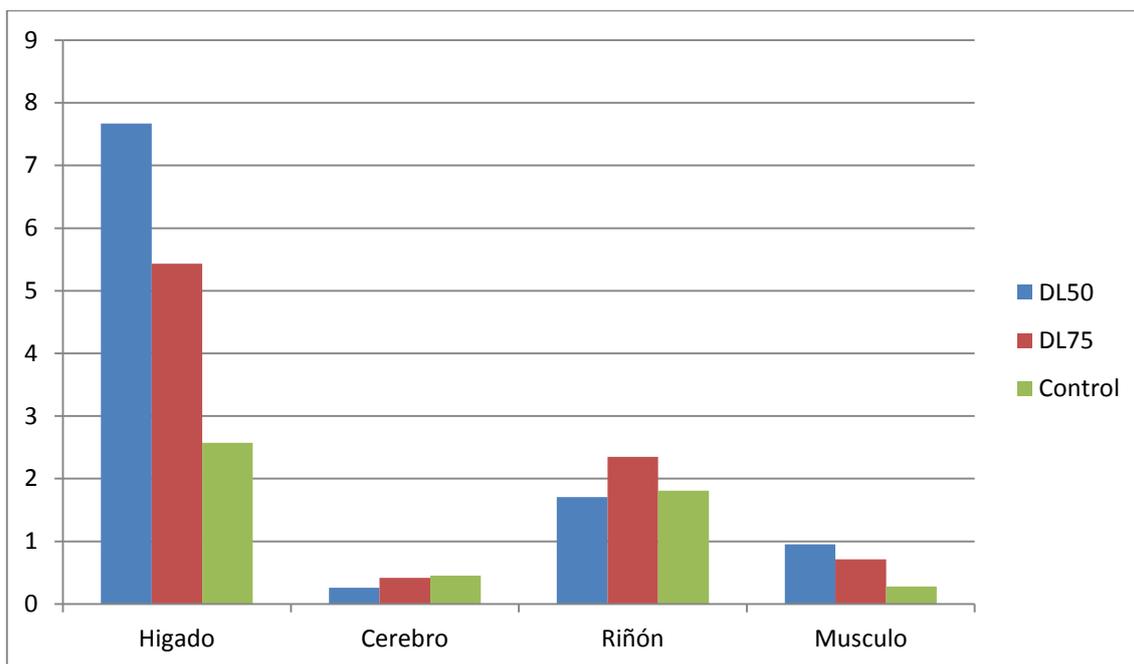


Figura 7. Bioacumulación de Arsénico en diversos tejidos

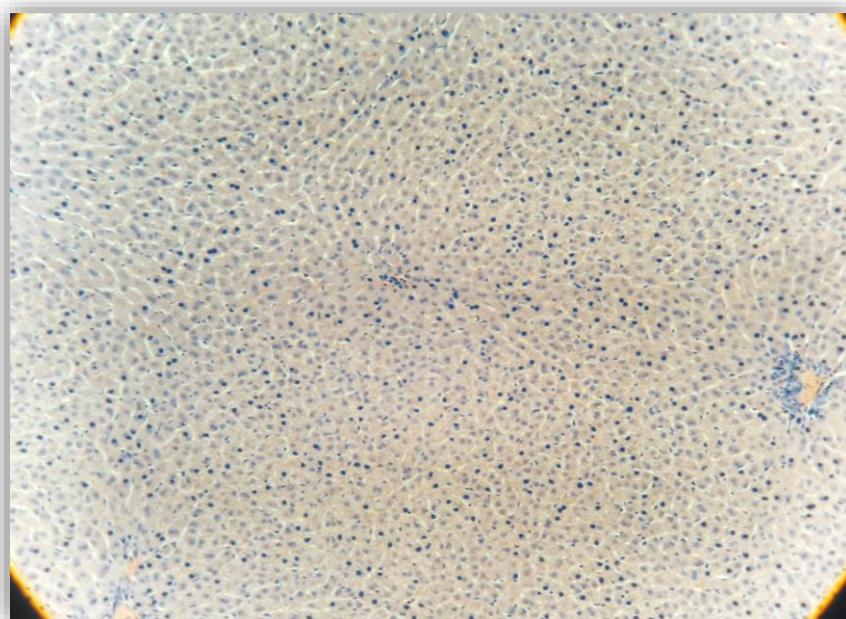


Figura 5. Histopatología en hígado 10X; congestión moderada y degeneración hidrópica en organismos expuestos a arsénico (fotografía original).

En el cerebro el grupo control manifestó una acumulación de 0.45 ± 0 ppm, en la DL 50 una concentración de 0.2604 ± 0.0513 ppm, aunque no presentó diferencias estadísticas con los demás tejidos de esta dosis, pero fue menor su acumulación a comparación de la DL75 en donde aumenta a 0.4168 ± 0.1050

ppm, demostrando ambos grupos la acumulación de arsénico en contra del grupo control (tabla 8).

El riñón presentó en la DL 50 una acumulación de 1.707 ± 0.379 ppm, sin presentar diferencia estadística con los demás tejidos de su grupo, pero si fue menor la detección a lo encontrado en la DL75 con 2.35 ± 2.25 ppm, lo cual no fue significativamente diferente al compararlo con la concentración en hígado de su grupo, pero si con los otros tejidos muestreados. En el grupo dL75 se mostró una detección mayor a los parámetros del grupo control el cual presentó 1.81 ± 0.14 ppm (Tabla 7).

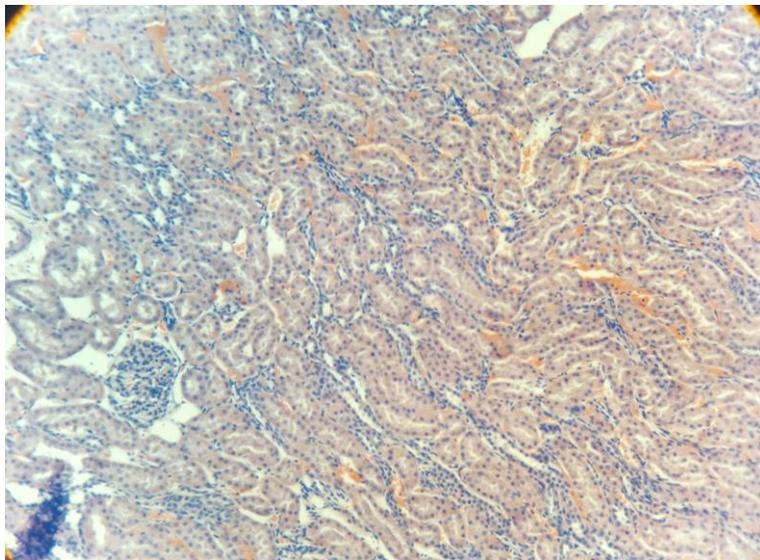


Figura 6. Histopatología en riñón 10x; congestión moderada, degeneración y necrosis de células del epitelio tubular (fotografía original).

Conjuntando los datos de enzimología clínica y valores detectados de As, y al realizar la necropsia se observó congestión corticomedular severa y en pelvícula renal, hemorragias en corteza en forma de estrías. Dentro del estudio histopatológico los conejos expuestos a la DL50 presentaron congestión moderada, glomerulitis linfocitaria en intersticio, fibrosis, degeneración y necrosis de células del epitelio tubular. Los sujetos expuestos a la DL75 a su vez presentaron degeneración hidrópica a nivel de túbulos congestión moderada, hemorragia en pelvis renal, glomerulitis linfocitaria moderada, necrosis del

intersticio y fibrosis lo que sugiere un daño evidente por la acumulación de arsénico.

De igual manera se evaluó el músculo debido a que la carne de conejo es consumida comúnmente en la dieta humana, en donde los valores encontrados en el grupo control fueron de 0.28 ± 0.03 ppm, la DL50 presentó una mayor acumulación con 0.952 ± 0.212 ppm sin presentar diferencias estadísticas con los demás tejidos del grupo DL 50, y en la DL75 se encontraron 0.712 ± 0.618 ppm, mismos que mostraron diferencia estadística con los demás órganos de su grupo, y una acumulación menor respecto a la DL50 (tabla 8).

10.1.6 Cambios anatomopatológicos, histológicos, manifestaciones clínicas producidos por la exposición DL 50 y DL 75 arsénico en el modelo conejo según su cronicidad.

Estudio Anatomopatológico.

En la DL50 se observó a la necropsia en el sistema respiratorio: pulmones con áreas circulares con centro deprimido, enfisema moderado; en el sistema digestivo se observó congestión generalizada de hígado, hígado con una tonalidad café amarillenta. En el sistema urinario se presentó congestión corticomedular marcada y en pelvícula renal. El sistema nervioso no presentó cambios patológicos aparentes. El aparato circulatorio presentó hidrotórax e hidropericardio y congestión en miocardio.

Las lesiones Anatomopatológicas en la DL75 fueron: el sistema respiratorio mostraron enfisema en pulmones. A nivel renal se presentó congestión corticomedular severa, hemorragias en corteza en forma de estrías. En aparato circulatorio presentó corazón congestionado en bazo áreas redondas oscuras contrastando con pálidas. En sistema digestivo el hígado se mostró congestionado, contrastando áreas pálidas de coloración naranja, la vesícula biliar presenta un contenido de coloración amarillo paja. En sistema nervioso un individuo presentó palidez marcada en encéfalo.

Estudio Histopatológico

Al estudio histopatológico se evaluaron 7 órganos, en los que se valoró el daño ocasionado por la intoxicación por arsénico.

En la DL50, en cerebro se observó Congestión moderada en encéfalo, edema, hemorragia leptomenígea, infiltrado linfocitario a nivel de tallo cerebral, satelitosis moderada. En el riñón se observó congestión moderada, glomerulitis linfocitaria en intersticio, fibrosis, degeneración y necrosis de células del epitelio tubular.

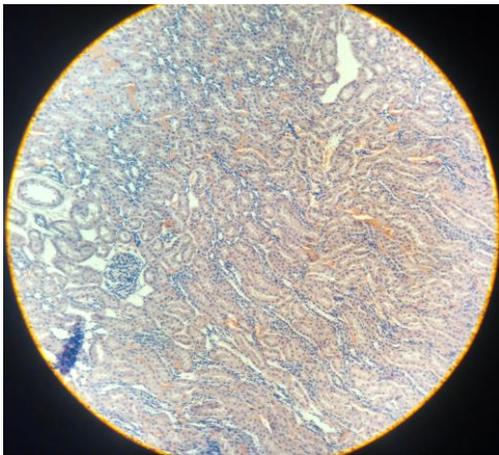


FIGURA 7. Histopatología en riñón 10x DL50

En pulmón se presentó congestión moderada, hemorragias difusas, enfisema severo, engrosamiento de paredes alveolares con infiltración linfocitaria, edema.

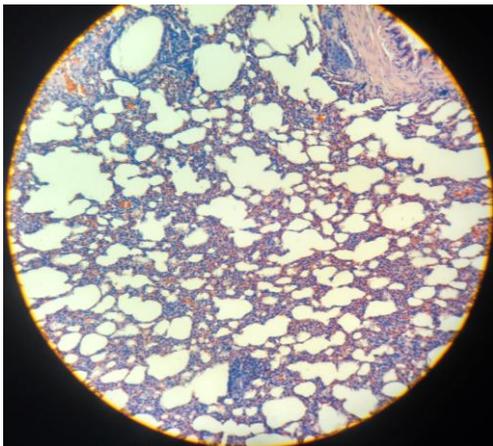


FIGURA 8. Histopatología en pulmón 10x DL50

El hígado manifestó a la histopatología congestión moderada, degeneración hidrópica, infiltración linfocitaria centrolobulillar severa, acúmulos linfoides, mitosis franca y fibrosis moderada.

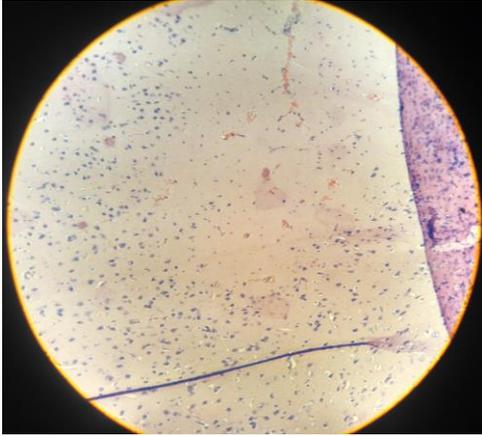


FIGURA 9. Histopatología en hígado 10x DL50

El corazón presento congestión moderada, infiltración linfocitaria en miocardio, ondulación de fibras musculares.

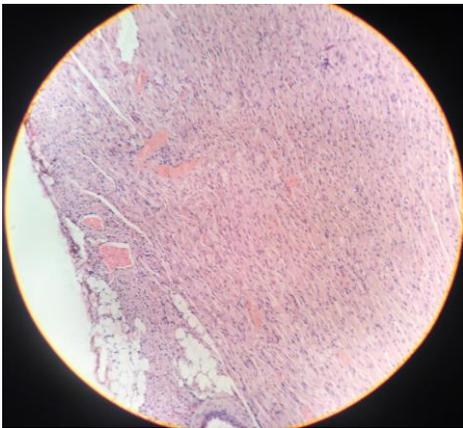


FIGURA 10. Histopatología en corazón 10x DL50

El bazo presentó congestión moderada, hemosiderosis y depleción linfoide marcada.

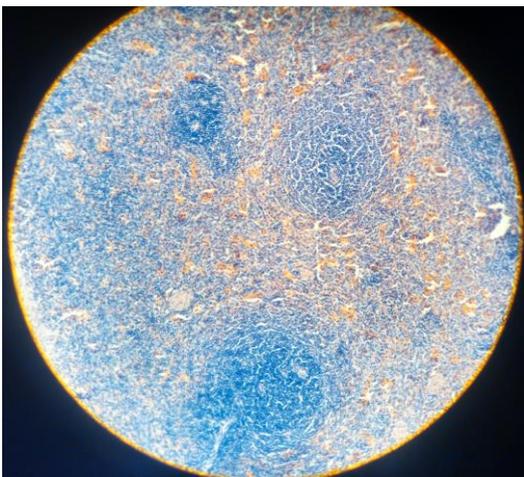


FIGURA 11. Histopatología en bazo 10x DL50

El intestino presento infiltración linfocitaria leve y denudación de vellosidades.

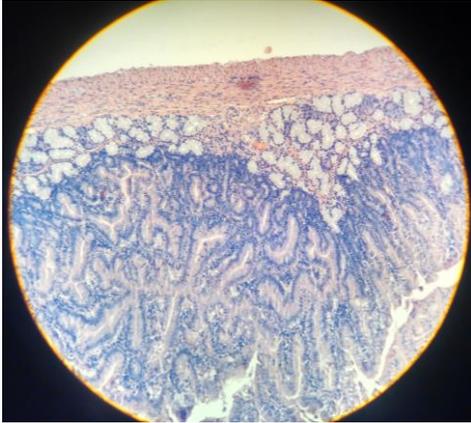


FIGURA 12. Histopatología en intestino 10x DL50

En la DL75, se observó en el cerebro Congestión y hemorragia leptomenígea moderada, satelitosis ligera, neuronofagia y vasculitis.

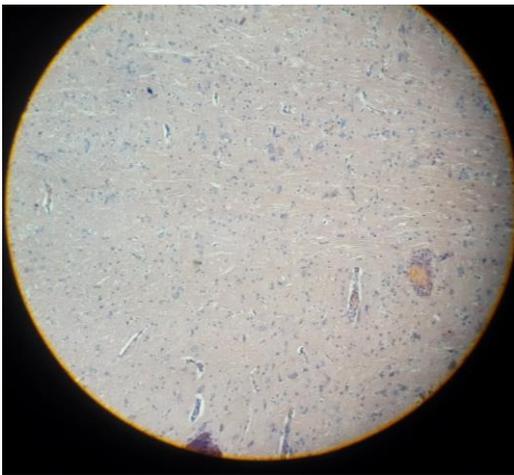


FIGURA 13. Histopatología en cerebro 10x DL75

En riñón presentó degeneración hidrópica a nivel de túbulos congestión moderada, hemorragia en pelvis renal, glomerulitis linfocitaria moderada, degeneración hidrópica de túbulos y necrosis del intersticio, fibrosis.

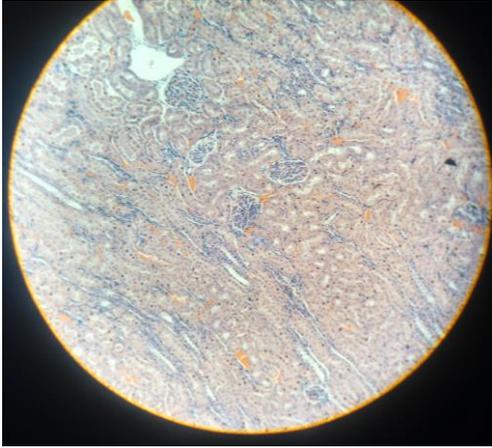


FIGURA 14. Histopatología en riñón 10x DL75

En el pulmón se observó congestión y hemorragias severas, engrosamiento de paredes alveolares, enfisema moderado, infiltrado mononuclear.

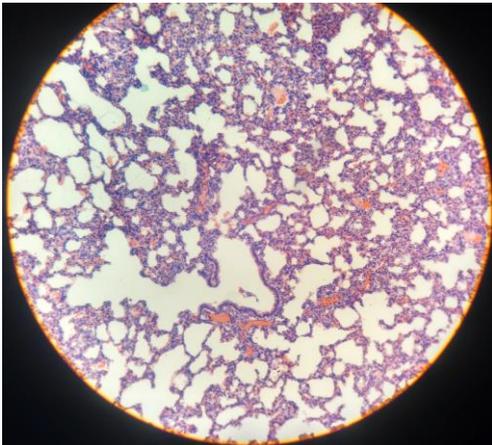


FIGURA 15. Histopatología en pulmón 10x DL75

El hígado presenta congestión, tumefacción y degeneración hidrópica marcada, infiltrado linfocitario centrolobulillar, fibrosis, mitosis ligera.

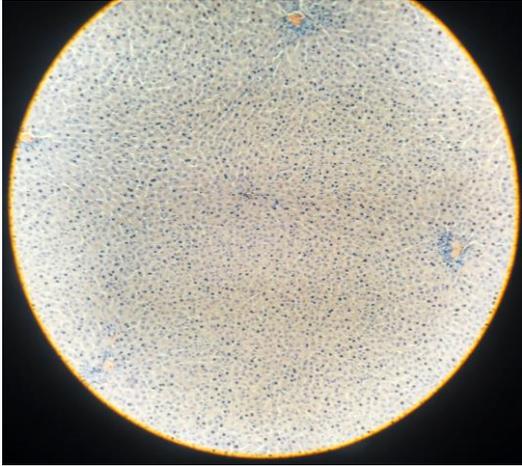


FIGURA 16. Histopatología en hígado 10x DL75

El corazón presenta congestión y hemorragias moderadas, hemorragias moderadas de endocardio y pericardio, infiltraciones linfocitarias difusas, ondulación de fibras musculares.

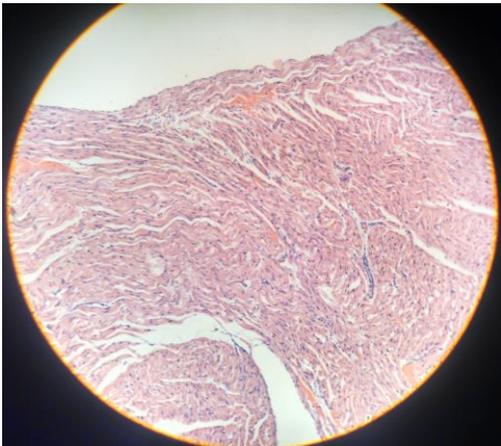


FIGURA 17. Histopatología en corazón 10x DL75

El bazo presenta congestión, depleción linfoide marcada.

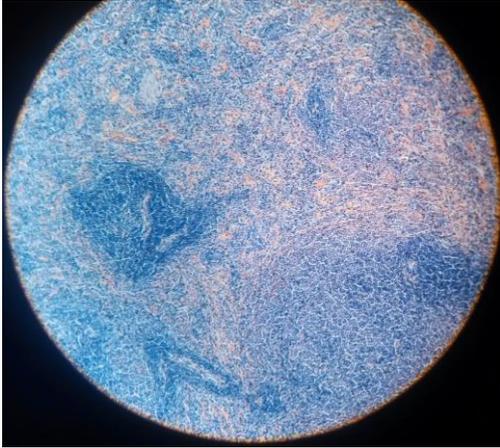


FIGURA 18. Histopatología en bazo 10x DL75

El intestino presento congestión y hemorragia moderada en lámina propia, denudación y atrofia de vellosidades e infiltración linfocitaria.

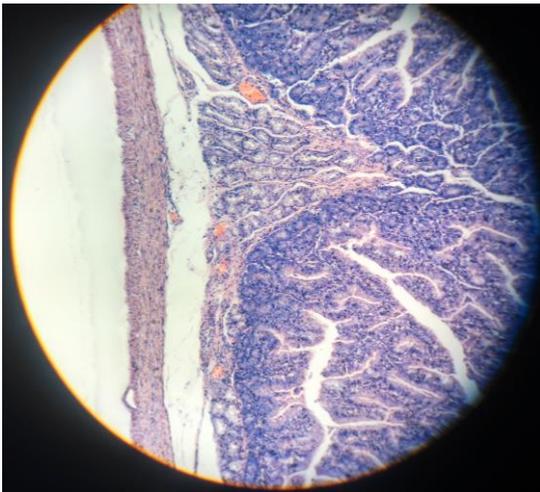


FIGURA 19. Histopatología en intestino 10x DL75

Las principales vías de entrada del arsénico al cuerpo son la ingesta y la inhalación, aproximadamente el 70% del arsénico se excreta, principalmente por la orina.

Después de haber sido absorbido en los pulmones o en el tracto digestivo, el arsénico se distribuye ampliamente por el cuerpo vía torrente sanguíneo.

De dos a cuatro semanas después que cesa la exposición al arsénico, esta sustancia puede encontrarse en tejidos ricos en queratina como:

- Cabello
- Huesos y dientes, en menor medida
- Piel
- Uñas

El arsénico se absorbe en el torrente sanguíneo a nivel celular y se incorpora en:

- Glóbulos blancos
- Glóbulos rojos
- Y otras células que reducen el arsenato a arsenito.

Es necesario que el arsenato (As V) se reduzca a arsenito (As III) esta reacción requiere del glutatión. Una parte del arsenito (As III) se metila en el hígado por la transferencia enzimática del grupo metilo de la S-adenosilmetionina que forma el arsenato de dimetilo (DMA V).

Los metabolitos resultantes de este proceso pueden ser excretados con mayor facilidad.

Se considera que la metilación es la principal vía de desintoxicación de arsénico, aunque recientemente diversos estudios proponen otros mecanismos alternos de desintoxicación. Por ejemplo, se sabe que varias especies animales carecen de mecanismos de metilación del arsénico pero son capaces de excretar arsénico inorgánico. Esto sugiere que puede haber en los mamíferos otros mecanismos importantes de desintoxicación de arsénico. Otras investigaciones sugieren la existencia de mecanismos adicionales de desintoxicación, como:

- Defensas antioxidantes
- Resistencia a la apoptosis
- Transporte

Otras investigaciones del metabolismo del arsénico sugieren que la metilación del arsénico inorgánico puede ser una ruta de intoxicación más que de desintoxicación. Más aún, sugieren que los metabolitos metilados de arsénico trivalente, especialmente el ácido monometilarsenoso (MMA III) y el ácido

dimetilarsenoso (DMA III), "rara vez son capaces de interactuar con objetivos celulares como proteínas y ADN".

Aparentemente, la eficiencia de la metilación en los seres humanos decrece a dosis altas de arsénico. Los patrones observados en especies de arsénico metilado (en orina) son similares entre hermanos y, entre padres y hermanos. Esto sugiere que la metilación del arsénico está ligada genéticamente.

Cuando una persona sobrepasa la capacidad de metilación del hígado, y sigue expuesta a niveles altos de arsénico inorgánico, se observa un incremento en la retención del arsénico en los tejidos blandos.

Puntos clave

- La metilación es el principal método de metabolización del arsénico.
- Investigaciones recientes apuntan hacia la existencia de otros mecanismos importantes de desintoxicación de arsénico en mamíferos.
- La orina es la principal vía de excreción del arsénico.
http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic/destino_biologico.html

XI. CONCLUSIONES

Los niveles de Arsénico con una exposición de DL 50 provocan mayor alteración a nivel hepático y un incremento de los valores enzimáticos obtenidos con una acumulación de este metal en comparación con el grupo de la DL75, y se identifica el hígado como el mejor indicador de bioacumulación de este metal.

A nivel renal se presentaron daños en ambas dosis al incrementarse marcadamente la urea y la creatinina a niveles significativos, corroborándose con los daños tisulares evidentes al estudio histopatológico.

A su vez el sistema circulatorio mostró varios cambios por la acumulación del metal, siendo evidente que el bazo fue afectado de manera progresiva y severa en ambas dosis, siendo mayor en la DL 50 debido al mayor tiempo de exposición.

XII. SUGERENCIAS

Considerando las actividades diarias del hombre, la salud ambiental, animal y pública debe reconsiderarse la utilización de estos metales y su manejo con el fin de generar estrategias para minimizar los daños, además de la implementación de una mayor apertura a esta información dado que el acceso a ella es muy limitado en México para el público en general.

1. Fomentar la educación de conciencia ambiental y daños a la salud, regulando a las industrias en la utilización de productos tóxicos.
2. Buscar alternativas biológicas como la fitoremediación para el tratamiento de la contaminación ambiental, debido a que su exposición es cada vez más presente.
3. Realizar estudios sobre los niveles de metales pesados en las zonas expuestas a diversos de ellos y sus efectos en el organismo, ya que se tiene muy poca información de los cuadros clínicos, por lo cual no se está preparado para afrontar este tipo de intoxicaciones.

XIII. LITERATURA CITADA

Alfaro-Burgos, S. (2013) Alteraciones morfológicas del bazo de ratas (*Rattus norvegicus*), tratadas con trióxido de arsénico.

Aluja S.A.; Constantino C.F. (2002): Técnica de necropsia en animales domésticos. 2ª ed. Manual moderno. México.

Alvarado, L.G.; Valdés, P.M.E. (1991): Concentración y distribución de metales pesados (cromo, cadmio, plomo y mercurio) en los suelos de la llanura baja de inundación del río Lerma, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Escuela de Geografía, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Baker, E.; Hoyes, C.; Landrigan, P.; Handke, J. (1977): Nation Wide Surrey of heavy metal absorption in children living near primary copper, lead and zinc smelters. *Am.J Epidemiol.* 106: 261-273.

Bergmeyer H.U (1983): Method of Enzymatic Analysis 3ª ed., Wiley-Blackwell. USA.

Benjamín M. (1991): Manual de patología clínica en veterinaria. Noriega. México.

Brenes AP, Brenes JP, Pontes M. (1977): Requerimientos nutritivos del conejo. XV Reunión Anual de la Sociedad ibérica de Nutrición. Valencia, Universidad Autónoma de Barcelona.

Capó M. (2007) Principios de Ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente, Editorial Tébar, Madrid, España.

Church CD. (1993): El rumiante. Fisiología digestiva y Nutrición. Acribia S.A. Zaragoza. España.

Dawson, B., Trapp, R.G. (2001), Basic and Clinical Biostatistics, New York: Lange Medical Books-McGraw Hill.

Dacie J, Lewis M. (2007): Hematología práctica. 10^a ed., Elsevier. Barcelona, España.

HARRISON ONLINE (2006) the McGraw-Hill Companies. Parte XVI. Intoxicaciones, sobredosis medicamentosas y envenenamientos > Capítulo 376. Intoxicación por metales pesados http://www.luisloop.com/BAC2_Bio/MEDICINA%20INTERNA2/harrison%20part16.pdf (16 de Febrero 2014)

Holgate, M.W. (1979): A perspective of Environment Pollution, Cambridge University Press. Cambridge-U.K.

Kaneko J. (2008): Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Blood Analyte Reference Values in Small and Some Laboratory Animals. 6^a ed., Academic Press. USA.

Kopito, L.; Briley, A. (2012): Chronic plumbims in children. Diagnosis by Hair Analysis. *JAMA*. 209: 2.

LAFEBERVET. (2013): [Small Mammal Medicine: Rabbit](http://www.lafebervet.com/small-mammal-medicine/rabbits/blood-collection-in-rabbits-2/). Blood Collection in Rabbits. <http://www.lafebervet.com/small-mammal-medicine/rabbits/blood-collection-in-rabbits-2/> (20 de Junio 2014).

Lleonart, R.F., Campos, Ch., Valls, P., Castellano, Ll.B.P. y Pontes, P.M. (1980): Tratado de Cunicultura. Principios Básicos, mejora, selección y alimentación. Vol. 1. Ed. Tecnograf, Barcelona España.

Luiz, AC. Corey G. (1987): Serie vigilancia 6. Manganeso. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. México.

Milhaund, E.; Snail, M. (1988): Indicators of lead Zinc and exposure in cattle: resulted in a polled area. *Vet. Human. Toxicol.* 30:513:516.

Núñez OL, Bouda J. (2007): Patología Clínica Veterinaria. FMVZ-UNAM, México DF.

Olayemi FO, Nottidge, Helen O. (2007): Effect of Age on the Blood Profiles of the New Zealand Rabbit in Nigeria, African Journal of Biomedical Research, 10: 73-76.

SAGARPA. (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación. 24 de junio de 1996.

SAGARPA. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. 22 de agosto de 2001.

Salas, J.H.; Muños, F.A. (1987): Manual de evaluación y manejo de sustancias Tóxicas en aguas superficiales. OMS, OPS, Metepec, México.

Samuelson Don A. (2007). Veterinary Histology. Sounderss Elsevier, st Louis Missouri, USA.

Schalm's. (2008): Veterinary Hematology, Reference Erythrocyte Parameters of the New Zeland White (NZW) Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) 6^a ed., Wiley-Blackwell. USA.

Shelly L. (2011): La consulta veterinaria en 5 minutos. Pruebas de laboratorio y procedimientos de diagnóstico en pequeños animales. Intermedica, Argentina.

SIGMA-ALDRICH. (2014), Ficha de datos de seguridad, Arsenito de sodio SIGMA-ALDRICH, MEX

Takeshi M, Hideo Y, Noboru. (2008): Accumulation of heavy metals in the organs of wild rodents, Osaka, Japan. <http://www.rist.kindai.ac.jp/no.21/minami.pdf> (10 de Marzo 2014)

Thrall M. A., Baker D. C., Campbell T. W., DeNicola D., Fettman M. J. (2006). Veterinary hematology and clinical chemistry. Blackwell, USA.

UABCS, 2004. Área Interdisciplinaria de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia <http://www.uabcs.mx/maestros/descartados/mto05/razas.htm>
