

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Canalis AM, Pérez RD, Falchini GE, Soria EA. Arsenotoxicidad aguda experimental en ratones Balb/c: marcadores orgánicos y compromiso esplénico. *Biomédica*. 2021;41 (1).

Recibido: 16-07-20

Aceptado: 23-09-20

Publicación en línea: 01-10-20

Arsenotoxicidad aguda experimental en ratones Balb/c: marcadores orgánicos y compromiso esplénico

Experimental acute arsenotoxicity in Balb/c mice: organic markers and splenic involvement

Inmunotoxicidad por arsénico: evaluación *in vivo*

Alejandra Mariel Canalis ^{1,2}, Roberto Daniel Pérez ^{3,4}, Gisele Evangelina Falchini ⁴,
Elio Andrés Soria ^{2,5*}

¹ Escuela de Nutrición, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Córdoba, Argentina

³ Facultad de Matemáticas, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET, Instituto de Física Enrique Gaviola, Córdoba, Argentina

⁵ Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Correspondencia: Elio Andrés Soria, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Ciudad Universitaria, Córdoba 5014, Argentina.

Telephone/Fax: +543514334020.

easoria@fcm.unc.edu.ar

Contribución de los autores:

Alejandra Mariel Canalis: desarrollo de la investigación y escritura del manuscrito.

Elio Andrés Soria: dirección y desarrollo de la investigación.

Roberto Daniel Pérez y Gisele Evangelina Falchini: determinación de arsénico en las muestras en estudio mediante la aplicación de técnicas innovadoras y escritura del manuscrito.

Introducción. El arsénico (As) es un tóxico ambiental ampliamente diseminado en todo el mundo. Diversos órganos y tejidos, en hombres y animales, son blancos de sus efectos deletéreos, entre ellos los del sistema inmune.

Objetivo. Establecer la arsenotoxicidad aguda en tejidos y células diana, mediante el desarrollo de una metodología *in vivo*.

Materiales y métodos. Ratones Balb/c ($n \geq 3$) fueron inyectados ip con 9,5 y 19 mg/kg/día de NaAsO_2 , o un volumen equivalente de solución fisiológica (Control). Tras media hora, los animales fueron sacrificados obteniéndose esplenocitos y bazos, timos, hígados, riñones y sangre. Se determinó en cada muestra la concentración de As, polifenoles y hierro, y se evaluaron marcadores oxidativos [peróxidos, productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) y grupos sulfhidrilos libres (SH)]. En esplenocitos, se determinó adicionalmente viabilidad celular y potencial mitocondrial.

Resultados. La exposición a NaAsO_2 , en dosis aguda, redujo la función mitocondrial de los esplenocitos que derivó en la muerte celular. Simultáneamente, la presencia de As confirmada en las muestras de bazo y la citotoxicidad resultante tuvieron lugar con una disminución de los polifenoles, los SH y una alteración en el contenido y distribución del hierro, pero no incrementó la producción de peróxidos.

Conclusión. Estos hallazgos aportan evidencia científica sobre los cambios en biomarcadores involucrados en la inmunotoxicidad del arsénico y ofrecen, además, una metodología para ensayar potenciales tratamientos frente al accionar deletéreo de este compuesto sobre el sistema inmune.

Palabras clave: arsénico; toxicidad aguda; estrés oxidativo; sistema inmunológico, ratones.

Introduction: Arsenic (As) is an environmental toxic widely spread throughout the world. Various organs and tissues, in men and animals, are targets of its deleterious effects, including those of the immune system.

Objective: To establish acute arsenotoxicity in tissues and target cells, by development of an *in vivo* methodology.

Materials and methods: Balb/c mice ($n \geq 3$) were intraperitoneally (ip) injected with 9,5 and 19 mg/kg/day of NaAsO_2 , or an equivalent volume of physiological solution (Control). After 30 minutes, the animals were sacrificed obtaining splenocytes and spleen, thymus, liver, kidneys and blood. The concentration of As, polyphenols and iron was determined in each sample, and oxidative markers [peroxides, advanced products of protein oxidation (PAOP) and free sulfhydryl groups (SH)] were evaluated. In splenocytes, cell viability and mitochondrial potential were further determined.

Results: Exposure to NaAsO_2 , in acute dose, reduced the mitochondrial function of splenocytes, which resulted in cell death. Simultaneously, the presence of As confirmed in spleen samples and the resulting cytotoxicity occurred with a decrease in polyphenols, SH and an alteration in the content and distribution of iron, but did not increase the production of peroxides.

Conclusion: These findings provide scientific evidence about the changes in biomarkers involved in the immunotoxicity of arsenic and also offer a methodology to test possible treatments against the deleterious action of this compound on the immune system.

Key words: Arsenic; acute toxicity; oxidative stress; immune system; mice.

Los compuestos derivados de arsénico (As) constituyen un gran número de agentes químicos con una elevada toxicidad para el ser humano. Sus fuentes de procedencia son diversas y pueden ingresar al organismo a través de la vía respiratoria, dérmica y, en mayor medida, oral a través del agua de bebida y los alimentos o la ingesta accidental (1,2).

Existen diversos estudios que plantean los mecanismos de toxicidad del arsénico en sus distintos estados de oxidación, frente a los cuales los órganos y tejidos hemolinfáticos se posicionan como blancos de sus efectos deletéreos (3). En este sentido, es reconocido que la toxicidad del As(III) es varias veces mayor que la del As(V) dada su mayor reactividad y se considera que los compuestos arsenicales de naturaleza inorgánica poseen un poder tóxico superior que los derivados orgánicos de este elemento (4). No obstante, todos los derivados de arsénico se constituyen como poderosos inmunotóxicos, responsables probados de la adquisición de enfermedades infecciosas y el desarrollo de tumores y otras patologías de base crónica por promoción de inmunodeficiencia secundaria con compromiso de las defensas del organismo (5).

En la actualidad se conoce que alrededor de 60 a 100 millones de personas en todo el mundo se encuentran expuestas a este contaminante y vulnerables a sus efectos tóxicos (6), por lo que se constituye como un serio problema de atención pública en numerosos países, entre ellos la República Argentina, que requiere de investigaciones en el área que aporten datos significativos para avanzar en el abordaje y solución de la problemática.

En este sentido, el presente trabajo de investigación, plantea establecer los efectos del arsénico en los biomarcadores involucrados en su inmunotoxicidad y, en

consecuencia, el desarrollo de una metodología adecuada para el ensayo de potenciales protectores frente a su accionar deletéreo.

Materiales y métodos

Condiciones experimentales

Se emplearon ratones Balb/c machos de 8 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones estándares de bioterio con alimentación e hidratación *ad libitum*, con dieta comercial (200 ± 13 g/Kg/día; Cargill SACI, Argentina) y agua potable (150 ± 10 mL/Kg/día; Aguas Cordobesas SA, Argentina), respectivamente, hasta el momento de la intervención.

Todos los animales fueron testeados y sacrificados conforme a la metodología evaluada y aprobada por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Córdoba, Argentina), el cual acepta y reglamenta los principios y normas internacionales para el uso de animales en investigación, para el presente trabajo (UNC-FCM-SECYT-CICUAL-2014-09-02). De acuerdo con ello, para su sacrificio, los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano (Piramal Healthcare, Reino Unido), procediéndose así a su sangrado a blanco mediante punción cardíaca.

Condiciones experimentales

Se conformaron 3 grupos de animales ($n \geq 3$). Dos de éstos fueron inyectados intraperitonealmente -ip-, empleando jeringas de 1 mL (0,50x15 mm - 25 G 5/88"-), con 9,5 y 19 mg/kg/día de arsenito de sodio, (NaAsO_2 , forma molecular disponible de arsénico trivalente con mayor toxicidad; Laboratorio Anedra, Argentina), en 100 μL de solución acuosa respectivamente (DL_{50} ip en ratones: 19,0 mg/kg – 46,3 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal). El grupo Control, por su parte, recibió 100 μL de solución fisiológica (7).

El sacrificio de los animales, y su posterior autopsia, se llevó a cabo una vez transcurridos los 30 minutos desde la administración de la inyección intraperitoneal, tiempo durante el cual fueron mantenidos con hidratación oral *ad libitum* y se observó la evolución clínica de cada individuo. Se obtuvo sangre por punción cardíaca en los animales anestesiados y, luego, se extrajeron timo, bazo, hígado y riñón para su posterior procesado y análisis. El bazo fue dividido en dos mitades, una de las cuales fue empleada para el cultivo primario de sus esplenocitos. La otra mitad, junto con los demás órganos, fue mecánicamente homogeneizada en 2 mL de solución salina isotónica. Cada muestra líquida así conformada fue dividida en dos alícuotas, previa medición del contenido proteico empleando un kit comercial (Wiener Lab Group, Argentina), para estandarizar las variables que posteriormente se estudiaron. Así, los homogenatos de tejidos fueron empleados en la determinación de arsénico, hierro, peróxidos, productos avanzados de oxidación proteica y grupos sulfhidrilos libres. Por otra parte, la fracción restante fue tratada con metanol y ácido tricloroacético al 50% (relación respectiva de volúmenes 4:6:0,5) a 50°C por 30 minutos (Cicarelli, Argentina), a fin de obtener un sobrenadante, por centrifugación a 10000 g durante 1 minuto (sobrenadante), para dosar polifenoles. Todas las muestras fueron conservadas a -18°C hasta su análisis.

Cultivo primario de esplenocitos

Manteniendo condiciones de máxima asepsia, cada muestra esplénica fue disgregada mecánicamente en 2 mL de solución hemolítica. La suspensión celular obtenida fue recogida en un tubo cónico estéril, centrifugada para recuperar el precipitado y resuspendida en 10 mL de: medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol suplementado con 10% de suero fetal bovino, con 2 g/L de bicarbonato de sodio, 10 mg/L de ciprofloxacina y 3,25 µL/L de mercaptoetanol.

Finalmente, se contabilizaron las células en cámara de Neubauer, expresando los resultados como células/ μ L. Las suspensiones celulares fueron mantenidas a 37°C en ambiente estéril con 5% de CO₂ hasta su análisis.

Determinaciones

Arsénico

Se determinó su presencia / ausencia en muestras de bazo y riñón (éste último dado su rol en la excreción de este mineral) mediante fluorescencia de rayos X (XRF).

Para ello 30 μ L del homogenato de cada muestra con el agregado de un estándar interno de cloruro de estroncio fueron depositados sobre una película de celulosa de 0,1mm de espesor. Posteriormente, cada una de las muestras fue irradiada con rayos X de 17,44 keV seleccionados mediante un monocromador de cristal desde un tubo de rayos X de 3kW de potencia con foco lineal de 12mmx0,4mm y ánodo de molibdeno (modelo PW2275/20, Philips, Países Bajos). La radiación característica emitida por el arsénico se registró a través de un detector de estado sólido dispersivo en energía de cristal de silicio (modelo XT marca MOXTEK Inc., EE.UU.). La preparación de muestra delgada combinada con la excitación monocromática permitió minimizar el ruido espectral mejorando considerablemente el límite de detección de la técnica alcanzando para As los 0,2 ppm p/p (8).

Viabilidad celular

La metodología a aplicar y las condiciones óptimas de reacción, fueron previamente ensayadas y establecidas. A partir de ello, las suspensiones celulares fueron incubadas en placa de 96 pozos, en oscuridad y a 37°C, con solución de resazurina 0,05 mg/mL en proporción 1:100 v/v. Luego de 5 horas, se procedió a medir la absorbancia a 600 nm usando un multilector de microplacas Multi-GloMax® (Promega Corp., EE.UU.) y se calcularon los niveles de viabilidad celular como

porcentaje de absorbancia respecto del grupo Control (%), luego de estandarizar los valores obtenidos por el número de células contenido en cada suspensión celular (9).

Polifenoles

Mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, solución de Folin 2 N, agua destilada y solución saturada de bicarbonato de sodio, fueron incorporados a los sobrenadantes ácido-metanólico de las muestras, sembrados previamente en placa de 96 pozos en proporción 1:6:2:1 v/v/v/v. La mezcla resultante fue incubada en oscuridad por 30 minutos a 37°C, tras lo cual se midió absorbancia a 750 nm y se calculó el contenido de polifenoles por interpolación de las lecturas obtenidas con una curva estándar de ácido gálico (0-0.1 mg/mL) y expresados por mg de proteína (EAG µg/mg de proteína) (10).

Hierro

Se determinó sobre los homogenatos de las muestras, midiendo espectrofotométricamente a 570-640 nm la formación de un complejo azul-violáceo a partir de los cationes ferrosos con 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-2(sulfofuril)-1,2,3-triazina (Ferene) (Ferroquant, GT Lab, Argentina). Los resultados fueron expresados como µg hierro por mg de proteína, para lo cual se empleó como estándar una solución de sales ferrosas 100 µg/dL provista por el kit comercial (11).

Peróxidos acuosos y lipídicos (HP y LP)

Cada muestra fue sometida a reacción con la solución cromógena (1:10 v/v), e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Para HP, dicha solución consistió en sulfato amonio ferroso 25 mM en ácido sulfúrico 2,5 M reconstituido con sorbitol 100 mM y naranja de xilenol 125 µM. Para LP, el sulfato amonio ferroso fue reconstituido con hidroxitolueno butilado 4 mM y naranja de xilenol 125 µM en

metanol al 90% (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Las concentraciones de HP y LP fueron calculadas como porcentajes de absorbancia a 540 nm respecto al grupo Control, tras restar el blanco correspondiente y estandarizar por el contenido proteico (12).

Productos avanzados de oxidación proteica (PAOP)

Se midieron mediante espectrofotometría a 340 nm en condiciones ácidas y en presencia de yoduro de potasio, siguiendo la transformación de los iones I⁻ a I₂ que provocan los PAOP y utilizando como patrón de referencia a cloramina T. Para ello se colocó, en placa de 96 pozos, la muestra junto con solución PBS 0,015 M, IK 1,16 M y ácido acético en relación 4:16:1:2. La concentración de PAOP fue calculada de acuerdo a la ecuación de la curva de estándar y expresada como mg de equivalentes de cloramina T por mg de proteína (13).

Grupos sulfhidrilos libres (SH)

Para su determinación en las muestras se utilizó el reactivo de Ellman, 5, 5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), también conocido como DTNB. La técnica necesitó ser desarrollada y puesta a punto y, para ello, se preparó una solución madre 10 mM de DTNB empleando DMSO como solvente, la cual se diluyó 100 veces con Tris-HCl 0,1M pH 7,5 para obtener una solución de trabajo 0,1 mM cada vez que se lo requirió. De esta manera, 190 µL de la solución diluida se incorporaron, en placa de 96 pozos, a los homogenatos de muestras (10 µL) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente previo a la medición de absorbancia en espectrofotómetro (412 nm). La determinación de SH se calculó como mg N-acetilcisteína por mg de proteína, para lo cual se restaron los blancos correspondientes a las lecturas obtenidas y se interpolaron los valores estandarizados por proteínas contenidas en la muestra con una curva de estándar

($R^2 > 0,97$) realizada con 0,032- 1,02 μg de N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) (7).

Determinación del potencial mitocondrial

Se incubaron las muestras a 37°C por 15 minutos en oscuridad 148 μL de suspensión celular con 2 μL de reactivo yoduro de 3,3´dihexiloxacarbocianina (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) preparado en dimetilsulfóxido (concentración final del fluoróforo de 40 nM), para luego leer la absorbancia a 485 nm. Tras estandarizar por conteo celular, los resultados se expresaron como porcentaje de área respecto al grupo control (%).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de las distintas determinaciones se expresaron como media \pm error estándar (EE), calculados con el programa estadístico InfoStat 2018 (estadística descriptiva). Para establecer el efecto en las muestras animales, se empleó análisis de la varianza, seguidos por la prueba de Fisher ($p < 0,05$) (14).

Resultados

Acumulación tisular de arsénico

Teniendo en consideración los límites de detección de la metodología aplicada, la presencia de arsénico fue confirmada en las muestras de bazo y riñón de animales tratados con NaAsO_2 ($> 0,2$ ppm p/p), y se determinó la ausencia o valores no detectables en aquellas originarias del grupo Control ($< 0,2$ ppm p/p). Estos hallazgos confirman la acumulación de Arsénico en aquellos grupos que fueron inyectados con NaAsO_2 .

Disminución de la viabilidad celular

El análisis de los datos por regresión lineal indicó un descenso de la viabilidad celular dependiente de la concentración de arsénico ($R^2 = 0,7$; $p < 0,0001$), siendo

significativa estadísticamente la respuesta de la DL₅₀ (19 mg/Kg de NaAsO₂ ip) respecto a control (46,95%; p<0,05) (figura 1).

De acuerdo a los resultados obtenidos, las siguientes determinaciones fueron conducidas, en primera instancia, sobre las muestras de bazo y timo de los grupos Control y 19 As, denominado Arsénico en adelante. Posteriormente, cada test fue repetido sobre las muestras obtenidas de los órganos metabólicos (hígado y riñón) de los mismos grupos.

Compromiso de los polifenoles biodisponibles

La concentración de polifenoles dosada en los bazos ($0,33 \pm 0,07$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) y timos ($0,06 \pm 0,03$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) del grupo Arsénico fue inferior respecto a Control ($0,59 \pm 0,11$ EAG $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), verificándose una depleción en la biodisponibilidad de estos antioxidantes provenientes de la dieta, que resulta estadísticamente significativa para timo. Por otra parte, en sangre y órganos metabólicos no se observaron diferencias entre grupos (figura 2).

Estos hallazgos dan cuenta de un compromiso de los polifenoles biodisponibles, a partir de la incorporación de arsénico al organismo.

Reducción variable del hierro tisular

La inyección intraperitoneal de arsenito de sodio (DL₅₀) condujo a una reducción significativa, respecto a Control ($0,150 \pm 0,030$ μg de hierro/mg de proteína), en la concentración total de hierro a nivel del bazo ($0,086 \pm 0,012$ μg de hierro/mg de proteína; p<0,05), dando cuenta ello de una alteración en el contenido y distribución del hierro mediada por el arsénico. No se observaron variaciones en la concentración del metal dosado entre los timos, riñones e hígados de los animales de los diferentes grupos experimentales (figura 3).

Oxidación renal sin compromiso de otros órganos

El análisis de los resultados no evidenció diferencias significativas en la producción de peróxidos acuosos y lipídicos entre ambos grupos (Control y Arsénico). Sólo en los riñones del grupo Arsénico se observó un incremento en la producción de HP del 165,85% respecto a Control ($p < 0,05$) (figura 4).

En concordancia con estos valores, no se encontraron diferencias significativas al evaluar, y comparar entre grupo Control y Arsénico, la formación de PAOP que tienen lugar como resultado de la oxidación de macromoléculas de naturaleza proteica (figura 5).

Estos datos, evaluados en simultáneo, dan cuenta de que la dosis aguda empleada sólo induce estrés oxidativo en riñón, por lo que no sería ésta la causa del descenso de viabilidad observado en los esplenocitos.

Efecto diferencial sobre grupos sulfhidrilos libres (SH)

En bazo, tras la inyección intraperitoneal de arsenito de sodio (grupo arsénico), la concentración de SH tiende a disminuir ($0,0072 \pm 0,0014$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) con respecto a control ($0,0142 \pm 0,0014$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína), aunque no representa una reducción significativa estadísticamente. En tino, por el contrario, se presente una tendencia a incrementarse la concentración de SH en las muestras obtenidas del grupo arsénico ($0,037 \pm 0,009$ mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) con respecto al control ($0,015 \pm 0,002$ mg de N-acetilcisteína/ mg de proteína). Adicionalmente, en las muestras de sangre, riñones e hígados no se observaron variaciones significativas entre los resultados de ambos grupos (figura 6).

De esta manera, los hallazgos obtenidos tras la medición de este biomarcador, evidencian una interacción del arsénico administrado con los SH disponibles en bazo y timo.

Disminución del potencial mitocondrial

Se observó una reducción del 23,08% en el potencial mitocondrial de los esplenocitos obtenidos de los animales que recibieron la DL₅₀ de arsenito de sodio. En este sentido, el análisis estadístico de los datos disponibles determinó un efecto, dosis dependiente, inverso o negativo del arsénico ($p=0,0632$), dando cuenta ello de que la caída en la función mitocondrial, se correlaciona con el incremento de este metal en el organismo.

Discusión

Tras el análisis de los resultados obtenidos, pudo confirmarse la existencia de arsénico en muestras de bazo y riñón derivados de los animales inyectados con arsenito de sodio y su ausencia en los mismos tejidos provenientes del grupo Control, lo cual confirma a éstos como acumuladores de compuestos arsenicales (15,16). En adición, la presencia de arsénico en bazo, determinada por la administración de arsenito de sodio, condujo a una pérdida dosis-dependiente de la viabilidad de los esplenocitos, confirmándose éstos como células dianas del efecto deletéreo, por muerte celular, de los compuestos arsenicales (17).

Posteriormente, las concentraciones de hierro y polifenoles fueron dosados en las muestras orgánicas obtenidas de los animales experimentales. Así, al analizar la concentración de polifenoles en las muestras de ambos grupos, se observó, en bazo y timo, una disminución tisular de estos compuestos en los animales tratados con arsénico. Este hallazgo da cuenta de un posible agotamiento de los polifenoles disponibles en el grupo Control (provenientes de la dieta) mediado por el aporte de

arsenito de sodio al organismo (18). Resultados análogos fueron encontrados, en bazo, tras determinar la concentración de hierro. Así, pudo corroborarse una disminución en los niveles de este mineral con la administración de arsénico, lo cual puede corresponderse con un desplazamiento del hierro hacia la corriente sanguínea o el espacio intersticial movilizadas por la capacidad de lisis del arsénico (19). En este sentido, otros autores han reportado previamente el efecto directo que tiene la bioacumulación de arsénico sobre el contenido y distribución de hierro en los tejidos hemolinfáticos e, indirectamente, sobre la homeostasis de otros metales tales como cobre, zinc y manganeso (20,21), lo cual compromete las respuestas enzimáticas de las células y contribuye a la inmunodeficiencia inducida por arsénico. Adicionalmente, se midió la formación de peróxidos (HP y LP) y PAOP en los tejidos de ambos grupos, detectándose que la dosis de arsenito de sodio sólo resulta en un aumento de los HP en riñón. En este sentido, frente a la dosis aguda empleada, se constata que la inducción de estrés oxidativo no sería la vía involucrada en la disminución de la viabilidad de los esplenocitos y, en una primera aproximación, los resultados recabados dan cuenta de una muerte celular temprana, sin variación en los parámetros redox dosados (22).

Por otra parte, el uso de arsénico representa una tendencia a disminuir la concentración de SH en bazo, respecto a control, confirmando esto la capacidad de los arsenicales trivalentes de interactuar con los grupos tioles de péptidos y proteínas, tales como el glutatión celular (GSH) y diversas enzimas y cofactores, e inhibir su accionar (23). No obstante, este efecto no se observó en timo, donde la concentración de SH se ve incrementada en el grupo Arsénico, probablemente como resultado de una diferenciación en el proceso de biotransformación que tienen lugar en ambos tejidos, a partir del cual se concentra el ácido metilarsónico (MMA) en timo

de acuerdo a lo observado por Xu y colaboradores, quienes describen la capacidad elevada de este metabolito para inducir genotoxicidad y apoptosis en este tejido (24), aunque posee diferencias con el arsénico trivalente en la selectividad de interacción con los grupos tioles (25,26).

Finalmente, se observó una reducción en el potencial de membrana mitocondrial de los esplenocitos obtenidos del grupo Arsénico, respecto a control. En este sentido, existen diversos estudios que proponen al arsénico como un poderoso mitocondriotóxico, fundamentando su capacidad de inducir apoptosis a partir de la acción directa sobre la cadena respiratoria mitocondrial y el poro de transición mitocondrial (mPTP) (27), lo cual conduce a un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna y externa, la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (28). Consecuentemente, este evento deriva en una disminución del ATP y muerte celular (29), lo cual explica de forma coincidente la caída de la viabilidad observada en el presente trabajo.

En su conjunto, los resultados brindan evidencia fehaciente de que la administración de arsenito de sodio, en dosis agudas, conlleva a una reducción en la función mitocondrial de los esplenocitos que modularía la muerte celular, revalidando de esta manera la reconocida actividad citotóxica de los compuestos arsenicales (30,31). Paralelamente, queda demostrado que los mecanismos de toxicidad de esta sustancia, involucran una disminución en los niveles de polifenoles y una alteración en el contenido de SH y distribución de hierro, en perjuicio de los tejidos estudiados. De esta manera, los hallazgos del presente estudio aportan evidencia científica sobre los cambios en biomarcadores involucrados en la inmunotoxicidad del arsénico y ofrecen, además, un diseño experimental delimitado para ensayar

potenciales tratamientos frente al accionar deletéreo del arsénico trivalente y sus derivados sobre el sistema inmune.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado y financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (SECYT).

Conflictos de Intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiación

Este estudio ha sido financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT-313/2016) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP-11220130100239CO), Argentina.

Referencias

1. **Grinyó JM, Cruzado JM, Bestard O, Vidal-Castañeira JR, Torras J.** Immunosuppression in the era of biological agents. *Adv Exp Med Biol.* 2012;741:60-72. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2098-9_5
2. **Ferrario D, Gribaldo L, Hartung T.** Arsenic Exposure and Immunotoxicity: a Review Including the Possible Influence of Age and Sex. *Curr Environ Health Rep.* 2016;3:1-12. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0082-3>
3. **Cordero H, Morcillo P, Martínez S, Meseguer J, Pérez-Sirvent C, Chaves-Pozo E, et al.** Inorganic arsenic causes apoptosis cell death and immunotoxicity on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar Pollut Bull.* 2018;128:324-32. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.052>
4. **Hughes MF, Beck BD, Chen Y.** Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol Sci.* 2011;123:305-32. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>

5. **Acharya S, Chaudhuri S, Chatterjee S, Kumar P, Begum Z, Dasgupta S, et al.** Immunological profile of arsenic toxicity: a hint towards arsenic-induced carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11:479-90.
6. **Ng JC.** Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. *Environ Chem.* 2005;2:146-60. <https://doi.org/10.1071/EN05062>
7. **Miranda AR, Soria EA.** Análisis proteasomal y multidimensional en quimioencefalopatía aguda inducida por arsénico trivalente en ratones y neuroprotección por ácido clorogénico. En: INC. Becas de investigación en cáncer 2015 - 2016: Informes finales de estudiantes avanzados y graduados. 1ra. Edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer; 2017.p. 73-84.
8. **Perez RD, Falchini GE, Cometto Vincente F, Soares L, Poletti ME, Sánchez HJ.** A new spectrometer using a crystal monochromator and parallel plates beam guides. *Nuc Istr Meth.* 2019;440:48-53.
<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.11.030>
9. **Chen JL, Steele TWJ, Stuckey DC.** Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115:351-8.
<https://doi.org/10.1002/bit.26475>
10. **Ait Baddi G, Cegarra J, Merlina G, Revel JC, Hafidi M.** Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *J Hazard Mater.* 2009;165:1119-23.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.102>
11. **Pieroni G, Khalil L, Charlotte F, Poynard T, Piton A, Hainque B, et al.** Comparison of bathophenanthroline sulfonate and ferene as chromogens in

- colorimetric measurement of low hepatic iron concentration. Clin Chem. 2001;47:2059-61.
12. **Soria EA, Goleniowski ME, Cantero JJ, Bongiovanni GA.** Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. Hum Exp Toxicol. 2008;27:341-6.
<https://doi.org/10.1177/0960327108092192>
 13. **Piowar A.** Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. Pol Merkur Lekarski. 2010;28:166-9.
 14. **InfoStat.** InfoStat versión 2018. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2018.
 15. **Rubatto Birri PN, Pérez RD, Cremonuzzi D, Pérez CA, Rubio M, Bongiovanni GA.** Association between As and Cu renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake. Environ Res. 2010;110:417-23. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.09.002>
 16. **Soria EA, Pérez RD, Queralt I, Pérez CA, Bongiovanni GA.** Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. Toxicol Lett. 2017;266:65-73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.014>
 17. **Patra PH, Bandyopadhyay S, Bandyopadhyay MC, Mandal TK.** Immunotoxic and genotoxic potential of arsenic and its chemical species in goats. Toxicol Int. 2013;20:6-10. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.111533>
 18. **D'Archivio M, Filesi C, Varí R, Scazzocchio B, Masella R.** Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversias. Int J Mol Sci. 2010;11:1321-42.
<https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

19. **Mahmud H, Föller M, Lang F.** Arsenic-induced suicidal erythrocyte death. Arch Toxicol. 2009;83:107-13. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0338-2>
20. **Wang L, Xu ZR, Jia XY, Han XY.** Effects of dietary arsenic levels on serum parameters and trace mineral retentions in growing and finishing pigs. Biol Trace Elem. 2006;113:155-64. <https://doi.org/10.1385/BTER:113:2:155>
21. **Cui X, Okayasu R.** Arsenic accumulation, elimination and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. Food Chem Toxicol. 2008;46:3646-50. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.040>
22. **Montelescaut E, Vermeersch V, Commandeur D, Huynh S, Danguy des Deserts M, Sapin J, et al.** Acute arsenic poisoning. Ann Biol Clin (Paris). 2014;72:735-8. <https://doi.org/10.1684/abc.2014.1012>
23. **Watanabe T, Hirano S.** Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. Arch Toxicol. 2013;87:969-79. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0904-5>
24. **Xu H, Medina S, Lauer FT, Douillet C, Liu KJ, Stýblo M, et al.** Genotoxicity induced by monomethylarsonous acid (MMA⁺³) in mouse thymic developing T cells. Toxicol Lett. 2017;279:60-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.897>
25. **Xu H, McClain S, Medina S, Lauer FT, Douillet C, Liu KJ, et al.** Differential sensitivities of bone marrow, spleen and thymus to genotoxicity induced by environmentally relevant concentrations of arsenite. Toxicol Lett. 2016;262:55-61. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.008>
26. **Zhou X, Sun X, Mobarak C, Gandolfi AJ, Burchiel SW, Hudson LG, et al.** Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. Chem Res Toxicol. 2014;27:690-8. <https://doi.org/10.1021/tx500022j>

27. **Pelicano H, Feng, L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, et al.**
Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species mediated mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278:37832-9.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301546200>
28. **Belzacq AS, El Hamel C, Vieira HL, Cohen I, Haouzi D, Metivier D, et al.**
Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene.* 2001;20:7579-87. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204953>
29. **Skulachev VP.** Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 2006;11:473-85. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-5881-9>
30. **Moe B, Peng H, Lu X, Chen B, Chen L, Gabos S, et al.** Comparative cytotoxicity of fourteen trivalent and pentavalent arsenic species determined using real-time cell sensing. *J Environ Sci (China).* 2016;49:113-24.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.10.004>
31. **Rahman MT, De Ley M.** Arsenic induction of metallothionein and metallothionein induction against arsenic cytotoxicity. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2017;240:151-68. https://doi.org/10.1007/398_2016_2

Figuras

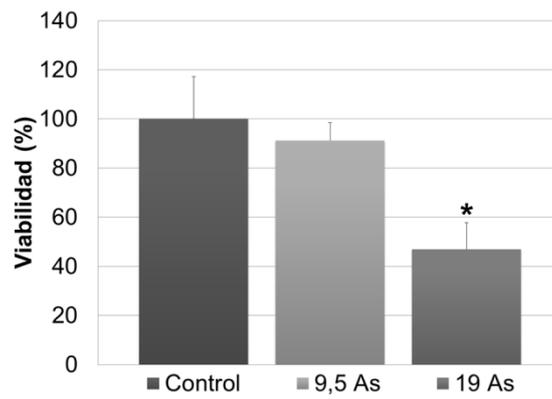


Figura 1. Viabilidad de esplenocitos obtenidos por cultivo primario de bazo de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 9,5 mg/Kg de NaAsO₂ ip (9,5 As), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (19 As). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3).

*p<0,05.

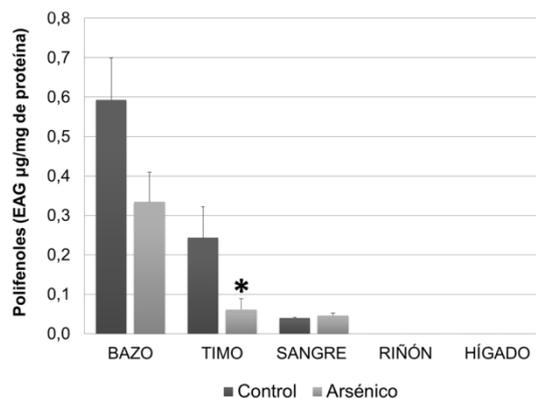


Figura 2. Concentración de polifenoles en bazos, timos, sangre, riñones e hígados de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico). Los valores son expresados como la media (EAG µg/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *p<0,05.

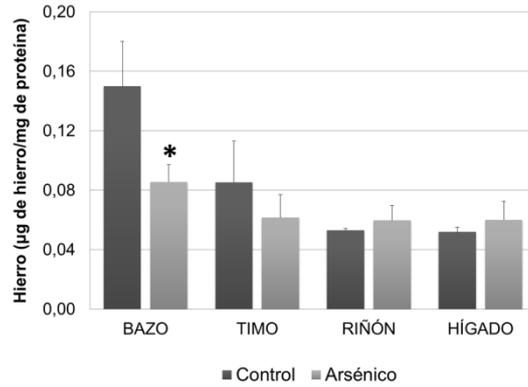


Figura 3. Concentración de hierro en bazos, timos, riñones e hígados de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico). Los valores son expresados como la media (µg de hierro/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *p<0,05.

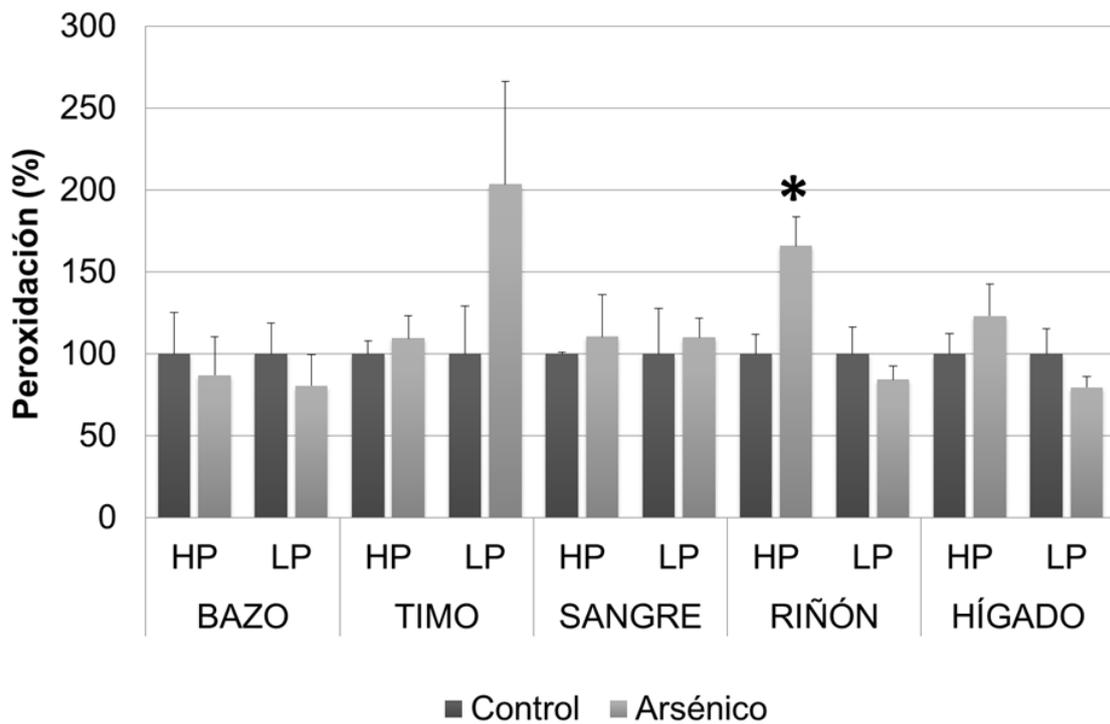


Figura 4. Formación de hidroperóxidos (HP) y lipoperóxidos (LP) bazos, timos, sangre, riñones e hígados de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico). Los valores son expresados como la media (% de área según control) +/- E.E. (n>3). *P<0,05.

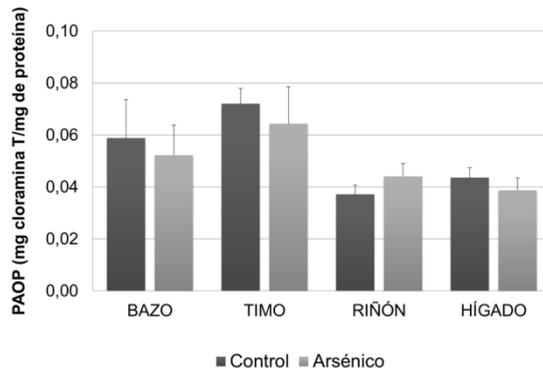


Figura 5: Formación de productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) en bazos, timos, riñones e hígados de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico). Los valores son expresados como la media (mg de cloramina T/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *p<0,05.

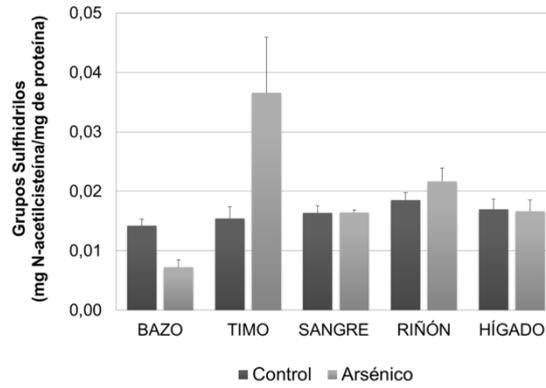


Figura 6: Concentración de grupos sulfhidrilos en bazos, timos, sangre, riñones e hígados de ratones Balb/c sometidos a las siguientes condiciones experimentales: 0 mg/Kg de NaAsO₂ (Control), 19 mg/Kg de NaAsO₂ ip (Arsénico). Los valores son expresados como la media (mg de N-acetilcisteína/mg de proteína) +/- E.E. (n>3). *p<0,05.