

Toxicidad del heptamolibdato y tetratiomolibdato de amonio en ratas*

Brem, J.J.; Pochon, D.O.; Trulls, H.E.

Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE,
Sargento Cabral, 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax: 54–03783–425753,
E–mail: fisbiol@vet.unne.edu.ar

Resumen

Brem, J.J.; Pochon, D.O.; Trulls, H.E.: Toxicidad del heptamolibdato y tetratiomolibdato de amonio en ratas. En rumiantes, la toxicidad de dietas con alto contenido de molibdeno ha sido adjudicada a los tiomolibdatos, especialmente tetratiomolibdatos producidos a nivel ruminal. Estos serían responsables del bloqueo de la absorción del cobre a nivel digestivo, así como también la utilización del cobre absorbido en los tejidos. El objetivo del trabajo fue demostrar los efectos comparativos de tetratiomolibdato (TTMo) y heptamolibdato (HMo) de amonio sobre el metabolismo del cobre, en la búsqueda de un modelo experimental de molibdenosis. La referencia de toxicidad fue la evolución de peso corporal, hematocrito (anemia), molibdeno hepático y cobre en sangre e hígado. Se trabajó con ratas machos cepa Wistar, agrupadas en lotes: testigo, TTMo y HMo con igual número de animales ($n = 11$). Recibieron una dieta preparada con un 70% de leche de vaca (entera en polvo) y 30% de harina de maíz, normalizándose sus tenores de hierro y cobre con el agregado de citrato férrico y sulfato de cobre. El lote TTMo recibió tetratiomolibdato de amonio sintetizado *in-vitro*, en dosis de 5 mg/100ml en el agua de bebida, sometiéndose a una dieta con 40 ppm de Mo. El lote HMo recibió 18,4 mg/100ml de heptamolibdato de amonio, exponiéndose a 200 ppm de Mo. Los animales TTMo comenzaron con deyecciones blandas hacia la primer semana, que se transformaron en diarreas hasta el final del ensayo, con progresiva pérdida del peso; los otros dos lotes no evidenciaron estos síntomas. Los valores medios obtenidos en testigos, TTMo y HMo fueron respectivamente ($p < 0,05$): hematocrito (39,3; 29,3 y 37,1%), cobre plasmático (72,0; 23,8 y 64,2 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y cobre hepático (43; 13 y 35 ppm). Ambos lotes tratados presentaron elevados niveles de Mo hepático respecto al testigo. Se concluye que el TTMo provocó los efectos clínicos y bioquímicos buscados para este modelo de molibdenosis experimental, no así el lote que recibió HMo, a pesar de las altas concentraciones de Mo registradas en el hígado.

Palabras clave: deficiencia de cobre, molibdenosis, rata.

INTRODUCCIÓN

Un alto contenido de molibdeno en la dieta del rumiante ocasiona una serie de disturbios metabólicos conocidos con el nombre de “molibdenosis”, “hipocuprosis secundaria” o “deficiencia secundaria de cobre”.

Las concentraciones de cobre y sulfatos en la dieta del rumiante determinan la cantidad de molibdeno que puede ser bien tolerada, ya que pueden causar una disminución de las reservas cúpricas del animal o dar como resultado una molibdenosis. Los rumiantes son particularmente susceptibles a la toxicidad del molibdeno, el cual provoca hipocuprosis concomitante⁷. Está bien establecido que las manifestaciones tóxicas del Mo, cuyo signo característico es la diarrea intensa, usualmente incluyen otras que son propias de una deficiencia secundaria de cobre¹⁷. Los animales monogástricos son

particularmente resistentes a la intoxicación con sales de Mo, con excepción de los tiomolibdatos, que son muy tóxicos posiblemente por provocar depresión de la actividad de sulfito–oxidasa hepática¹⁸.

Los compuestos químicos de la serie de los tiomolibdatos, especialmente tetratiomolibdatos, se originan en el rumen como productos de reacción del Mo con los sulfuros producidos por reducción bacteriana de los compuestos azufrados de la dieta. La presencia de estos compuestos son los responsables del bloqueo del cobre tanto a nivel digestivo como de la utilización tisular del oligoelemento absorbido, explicando la mayor sensibilidad que tienen los rumiantes respecto a otros animales monogástricos que comparten el mismo ambiente^{4–6, 9–11}. Esto ocasionó que muchas investigaciones se orientaran casi con exclusividad a la relación entre el elevado ingreso de molibdeno y su interacción metabólica con el cobre dietario, haciendo que un alto nivel de Mo en las pasturas quede asociado a una sintomatología clínica compatible con una deficiencia primaria de cobre:

* Trabajo financiado en parte por la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la UNNE, PI 399.

pérdida de ganancia de peso y desarrollo corporal, diarreas, acromotriquia, anemia, infertilidad y osteopatías. Por otro lado, la orientación de algunos trabajos están referidos con más exclusividad a la acción directa que puede tener el molibdeno por sí mismo en animales de experimentación^{3, 15-16}.

El objetivo del trabajo fue demostrar los efectos comparativos de heptamolibdato de amonio (HMo) y tetratiomolibdatos (TTMo) sobre el metabolismo del cobre en este modelo experimental, que en estudios previos de molibdenosis², resultó ser adecuado para trabajar en condiciones mejor controladas que en las especies mayores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterio para la evaluación de toxicidad: se tomaron como referencia de toxicidad algunos parámetros que se alteran en esta patología, como ser sintomatología clínica, evolución del peso corporal, hematocrito y niveles de molibdeno hepático y de cobre en sangre e hígado.

Síntesis de tetratiomolibdatos: los TTMo utilizados fueron obtenidos *in-vitro* a partir de heptamolibdato de amonio disuelto en amoníaco, burbujeado con H₂S proveniente de un aparato de Kipps por acción del ácido clorhídrico diluido sobre piedras de sulfuro férrico (*pirita*). El producto obtenido fue caracterizado mediante absorción espectral en UV/visible por espectrofotometría de absorción molecular en espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 con módulo digital computarizado. Los monitoreos de las densidades ópticas se realizaron desde 200 hasta 510 nm, con intervalos de 5 nm. El grado de pureza fue corroborado por los valores de absorbancia obtenidos en los tres picos característicos de esta sustancia (220, 320 y 470 nm).

Animales y muestras: se utilizaron 33 ratas machos cepa Wistar de 85 días de edad, agrupadas en lotes testigo, TTMo y HMo con igual número de animales; la duración del ensayo fue de 43 días. El consumo de alimento y bebida fue *ad libitum* y el control de peso se efectuó dos veces por semana mediante balanza apropiada. Al final de cada prueba se extrajeron muestras de sangre anticoaguladas con EDTA a partir de la vena yugular a todos los animales para la determinación de cupremia y hematocrito y, realizada la necropsia, se tomaron muestras de hígado para analizar el contenido de cobre y molibdeno.

Alimentación y tratamientos: los animales recibieron una dieta especialmente preparada con un 70% de leche de vaca (entera en polvo) y 30% de harina de maíz. Los tenores de Fe y Cu se normalizaron con el agregado de 98 mg de sulfato de cobre y 145 mg de citrato férrico por kilogramo de alimento, respectivamente. La cuantificación química por espectrofotometría de absorción atómica, reveló que las concentraciones finales de Cu, Mo y Fe fueron de 5,1 ppm, 0,40 ppm y 33 ppm respectivamente. Uno de los lotes recibió TTMo en dosis de 5 mg/100 ml en el agua de bebida, sometiéndose a una

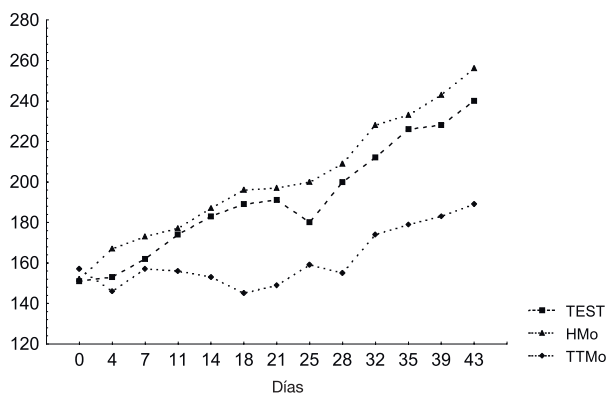


Figura 1. Evolución del peso corporal en los 3 lotes de ratas, expresado en gramos.

dieta con 40 ppm de Mo. A otro lote se le suministró HMo en dosis de 18,4 mg/100 ml en el agua de bebida, exponiéndose a una dieta con 200 ppm de Mo. Ambas dosificaciones fueron preparadas diariamente, controlándose su consumo.

Determinaciones químicas: la concentración sanguínea de cobre se efectuó por espectrofotometría (480 nm) mediante el método de la batocuproína, previa desproteinización del suero con ácido tricloroacético. El hematocrito se determinó según técnica del microhematocrito con centrifugado a 12.000 rpm, durante 5 minutos y lectura en ábaco. Las concentraciones de cobre y molibdeno hepático se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica, con valores expresados en ppm.

Análisis Estadístico: todas las variables fueron tratadas mediante estadística descriptiva. La evaluación del peso corporal en el tiempo se analizó por un diseño de medidas repetidas aplicando la técnica MANOVA (*Statística*, 1991) y las variables dependientes hematocrito, cobre sanguíneo, molibdeno y cobre hepático fueron analizadas mediante técnica ANOVA para un diseño completo al azar, de una sola vía. Pevio a los análisis se verificó que los datos se ajustaran a una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk; aditividad y homogeneidad de la variancia se verificaron por test de Bartlett.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los animales tratados con TTMo desarrollaron gradualmente una sintomatología clínica similar. Hacia la primer semana comenzaron con deyecciones blandas que se transformaron en diarreas hasta el final del ensayo; los otros dos lotes no mostraron estos síntomas. La pérdida del peso corporal en el lote TTMo fue progresiva, con diferencias que llegaron a ser muy significativas (Figura 1).

Los valores promedios de hematocrito mostraron el grado importante de anemia alcanzado en el lote TTMo (Tabla 1). Los cambios de peso y hematocrito resultaron similares a los observados en trabajos anteriores efectuados con esta sal, permitiendo diferenciar lo ocurrido respecto a una deficiencia primaria de cobre².

Tabla 1. Valores del hematocrito (%) a los 43 días de ensayo.

(n = 11)	testigo	TTMo	HMo
promedio	39,3 a	29,3 b	37,1 a
desvío est.	1,7	6,3	1,6
IC < a 95%	38,1	25,0	35,9
IC > a 95%	40,4	33,5	38,2

a y b: diferencias significativas, IC: intervalo de confianza.

Asimismo, en TTMo la hipocupremia fue evidente ya que las concentraciones de cobre plasmático llegaron a valores muy por debajo respecto a los lotes HMo y testigo (Tabla 2), en coincidencia con lo reportado por otros autores³, quienes utilizando tetratiomolibdatos en forma comparativa con di y tritiomolibdatos no lograron inducir signos clínicos ni bioquímicos de deficiencia de cobre. Estos autores incluso pudieron observar incrementos de la cupremia por retención de cobre por parte de la fracción albúmina del plasma, aunque utilizaron otra técnica para su determinación. Aparentemente, la potencialidad inhibitoria sobre la utilización del cobre es directamente proporcional al grado de tio-sustitución en los oxitiomolibdatos utilizados.

Tabla 2. Valores de cobre plasmático (µg/dl) al final del ensayo.

(n = 11)	testigo	TTMo	HMo
promedio	72,0 a	23,8 b	64,2 a
desvío est.	9,3	6,1	5,1
IC < a 95%	60,1	16,3	57,8
IC > a 95%	83,5	31,3	70,6

a y b: diferencias significativas, IC: intervalo de confianza.

Ambos lotes tratados presentaron elevados niveles de Mo hepático respecto a los testigos, pero solo el lote con TTMo mostró una disminución importante en la reserva de cobre en el hígado (Tabla 3).

Tabla 3. Cu y Mo hepáticos (ppm) a los 43 días del ensayo.

lotes (n = 11)	cobre	molibdeno
testigo	43,0	2,5
TTMo	13,3	24,0
HMo	35,0	22,8

Este hecho fue similar al comunicado en otros ensayos¹³ donde también se pudo observar la potente acción antagonista de esta sal sobre el metabolismo del cobre, ya sea inhibiendo su absorción a nivel digestivo como modificando el destino de lo absorbido. Sin embargo, el cobre hepático no sufrió cambios o bien disminuyó como consecuencia de la suplementación con Mo, lo cual significa que los efectos del Mo dependen considerablemente de los niveles de Cu dietario¹⁴; la dosificación de Mo fue más efectiva cuando la cantidad de Cu dietario fue la adecuada¹, tal como ocurrió en nuestro

ensayo. Las ratas deficientes en Cu también mostraron una menor acción efectiva del Mo al ser comparadas con las ratas adecuadas en Cu que recibieron 150–500 µg Mo/kg¹⁴.

La observación que el Mo dietario es menos efectivo para alterar la concentración de Cu y Mo en los tejidos corporales de la rata cuando la dieta es deficiente o excesiva en Cu, puede ser explicado por la formación de *cupromolibdatos* metabólicamente inactivos en tejidos y tracto digestivo⁸. Con un exceso de Cu alimentario, hay un complejo no absorbible de Cu y Mo en el tracto gastrointestinal que puede reducir la absorción de Mo. En ratas, las dietas adecuadas en Cu provocan la absorción de suficiente cantidad de Mo para formar *cupromolibdatos* con el Cu sistémico. Finalmente, en ratas deficientes en Cu hasta puede ocurrir una mayor absorción de Mo, pero debido al insuficiente Cu presente en plasma y tejidos solo puede formarse una limitada cantidad de estos complejos, por lo que un incremento de Mo dietario no sería capaz de elevarlos a niveles similares a los de las ratas adecuadas en Cu. El aumento de la excreción urinaria de Mo puede explicar la disminución de Cu y Mo en hígado y riñón de ratas deficientes en Cu. Concordantes con ello son los hallazgos que demostraron que los tiomolibdatos sintetizados *in vitro* y administrados oralmente a ratas, modificaron la concentración y distribución de Cu en plasma e hígado y redujeron la absorción dietaria de Cu, en tanto que el cobre dietario logró reducir la absorción de tiomolibdatos¹².

Se concluye que, bajo las condiciones del ensayo, TTMo provocó los efectos clínicos (diarreas, pérdida de peso corporal) y bioquímicos (bajas concentraciones de cobre sérico y hepático, aumento de Mo en el hígado), buscados en este modelo experimental. No ocurrió así en el lote con HMo, donde los efectos de la toxicidad no pudieron observarse a pesar de las altas concentraciones de Mo depositadas en el hígado.

Abstract

Brem, J.J.; Pochon, D.O.; Trulls, H.E.: Toxicity of ammonium tetrathiomolybdate and heptamolybdate in rats. Toxicity of dietary molybdenum has been related to thiomolybdates, especially to tetrathiomolybdates produced in the rumen. These compounds would be responsible for the blockage of the copper absorption on the digestive system and its later utilization by tissues. The aim of this study was to demonstrate the comparative effects of ammonium tetrathiomolybdate (HMo) and heptamolybdate (TTMo) on copper metabolism, in search of an experimental model of molybdenosis. Reference parameters of toxicity were the evolution of body weight, hematocrit (anemia), hepatic molybdenum and copper levels in blood and liver. Male Wistar rats were grouped in three lots (n = 11 each): controls, TTMo and HMo. Animals were fed with 70 % cow milk powder and 30 % corn flour; ferric citrate and copper sulfate were added to the mixture to balance iron and copper levels. TTMo lot received 5 mg of *in-vitro* syn-

thesized tetrathiomolybdate in 100 ml of drinking water, with a total administration of 40 ppm Mo. HMo lot was administered with 18.4 mg/100 ml of ammonium heptamolybdate, being Mo final dose of 200 ppm. After the first week, animals of TTMo lot had soft stools, which became diarrhea that persisted until the end of the assay. Loss of body weight was also evident. None of the animals of the other lots showed any symptoms. For each lot, mean values of hematocrit were 39.3, 29.3 and 37.1%; copper levels were 72.0, 23.8 and 64.2 µg/dl; and hepatic copper concentrations were 43, 13 and 35 ppm ($p < 0.05$). Animals of TTMo and HMo lots had increased hepatic molybdenum levels, compared to controls. We conclude that TTMo caused the expected clinical and biochemical effects for our experimental model of molybdenosis. On the contrary, this was not observable in lot HMo, despite of the high molybdenum concentrations observed in the liver.

Key words: copper deficiency, molybdenosis, rat.

REFERENCIAS

1. **Al-Othman AA, Rosenstein F, Lei KY.** 1994. Pool size and concentration of plasma cholesterol are increased and tissue copper levels are reduced during early stages of copper deficiency in rats. *J. Nutr.* 124: 628–635.
2. **Brem JJ, Pochon DO, Trulls HE.** 1997. Ratas sometidas a dietas con exceso de molibdeno y deficientes en cobre. *Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE, Corrientes, Argentina.*
3. **Bremner I, Mills CF, Young BW.** 1982. Copper metabolism in rats given di or trithiomolibdates. *J. Inorg. Biochem.* 16: 109–119.
4. **Clarke NJ, Laurie SH.** 1982. The copper–molybdenum antagonism in ruminants. II. Interactions of thiomolibdates with copper (II) in aqueous media. *Inorg. Clin. Acta.* 66: 35–38.
5. **Clarke NJ, Laurie SH.** 1986. The copper–molybdenum antagonism in ruminants. The formation of thiomolibdates in animal rumen. *J. Inorg. Biochem.* 12: 32–43.
6. **Dick AT, Dewey D, Gawthorne IW.** 1975. Thiomolibdates and the copper–molybdenum sulphur interaction in ruminant nutrition. *J. Agric. Sci.* 85: 567–580.
7. **Fell BF, Dinsdale D, El-Gallard TT.** 1979. Gut pathology of rats dosed with tetrathiomolybdate. *J. Comp. Pathol.* 89: 495–514.
8. **Huisingh J, Gomez GG, Matrone G.** 1973. Interactions of copper, molybdenum and sulfate in ruminant nutrition. *Fed. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32: 1921–1924.
9. **Kincaid RL, White CL.** 1988. The effects of ammonium tetrathiomolibdate intake of tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. *J. Anim. Sci.* 66: 3252–3258.
10. **Mason, J.** 1986. Thiomolibdates: mediators molybdenum toxicity and enzyme inhibitors. Review paper. *Toxicology* 42: 99–109.
11. **Mills C, Dalgarno AC, Wenham, G.** 1976. Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br. J. Nutr.* 35: 309–331.
12. **Mills CF, Bremner I, El-Gallad TT, Dalgarno AC, Young BW.** 1978. Mechanisms of molybdenum/sulphur antagonism of copper utilization by ruminant. In: *Trace Element Metabolism in Man and Animal*, Vol. 3, (Kirchgesner M Ed.). Freising Weihenstephan: Arbeitskreis Tierernährungsforschung, p. 150–158.
13. **Mills CF, El-Gallad TT, Bremner I, Weham G.** 1981. Copper and molybdenum absorption by rats given ammonium tetrathiomolybdate. *J. Inorg. Biochem.* 14: 163–175.
14. **Nederbragt H.** 1980. The influence of molybdenum on the copper metabolism of the rat at different Cu levels of the diet. *Br. J. Nutr.* 43: 329–338.
15. **Rokicha A.** 1969. Changes in the rats liver in the course of poisoning with ammonium molibdate. *Folio Histochem. Cytochem.* 7: 151–157.
16. **Spence JA, Suttle NF, Wenham G, El-Gallad T, Bremner I.** 1980. A sequential study of the skeletal abnormalities which develop in rat given a small dietary supplemented of ammonium tetrathiomolibdate. *J. Comp. Path.* 90: 139–153.
17. **Underwood EJ.** 1977. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4th ed., Academic Press, New York.
18. **Van Reen R.** 1959. The specificity of the molybdate–sulfate interrelationship in rats. *J. Nutr.* 68: 243–250.