

Toxicidad aguda y alteraciones hematológicas y séricas por algunas sales de cobalto en ratas

J. M. Llobet y J. L. Domingo

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
Reus/Tarragona (España)

(Recibido el 22 de febrero de 1983)

J. M. LLOBET and J. L. DOMINGO. *Acute Toxicity and Hematologic and Seric Alterations from Cobalt Salts in Rat*. Rev. esp. Fisiol., 39, 291-298. 1983.

The acute toxicities of chloride, acetate, cobalt nitrate and cobalt sulphate (II) were investigated in rats. The values obtained for the LD₅₀ (7 days) were 133, 194, 198 and 279 mg of Co/kg respectively, when the salts were given orally. The values for intraperitoneal administration were 10.6, 8.8, 8.3 and 11.5 mg of Co/kg. The majority of deaths occurred during the first 48 hours. The physical and clinical signs appearing after the intoxication disappeared for the most part after the first 72 hours.

Also, the effect produced by chloride and cobalt acetate (II) given orally and intraperitoneally, in some hematological parameters and serum parameters during the first 24 hours after intoxications, has been studied at several doses.

A noteworthy increase was observed in the hemoglobin and hematocrit as well as in the plasma proteins. There was significant hyperglycemia and also significant changes in the lipid parameters such as triglycerides and cholesterol. The duration and degree of the change depended on the dose. As a general rule, no significant differences were registered between the results obtained for the two salts.

El cobalto es un oligoelemento del que el hombre con el aporte diario en la dieta, de 5 a 8 mg en un régimen normal, tiene cubiertos sus requerimientos habituales (14). A dosis superiores, ejerce sin embargo una acción eritropoiética notable que puede conducir a la aparición de policitemia; aunque parece ser que este efecto depende del propio régimen alimenticio, y se ve disminuido e incluso suprimido si se administran simultánea-

mente ciertos aminoácidos como cisteína o metionina (12).

Esta acción del cobalto ha llevado a utilizarlo con fines terapéuticos para combatir ciertas anemias, pero con resultados contradictorios (18).

Son varios los autores que han estudiado las variaciones registradas en algunos parámetros sanguíneos tras la administración del metal; y que afectan a las tasas de hemoglobina y hematocrito, con

incrementos muy notables (5), además, se producen alteraciones significativas de algunos parámetros como las proteínas totales (2, 7, 16), glucosa (18) y lípidos del plasma (10).

Asimismo, el empleo incontrolado del cobalto en la alimentación, ha sido causa de importantes accidentes (17), entre los que destacan la intoxicación colectiva producida en Canadá en 1966 y cuyos orígenes se debieron al contenido del metal en la cerveza, a la cual se había adicionado para mejorar la estabilidad de la espuma (9).

Como consecuencia de lo anterior, y dado que algunas de las alteraciones de parámetros sanguíneos descritas, tales como glucosa (18) y proteínas totales (16) son especialmente significativas en el período inmediatamente posterior a la intoxicación, se ha considerado interesante estudiar las variaciones de hematocrito y hemoglobina por su significación en la producción de policitemia; proteínas totales por su importante variabilidad; triglicéridos, colesterol y lípidos totales por las modificaciones en el metabolismo lipídico general, y la glucosa por su relación con este metabolismo.

El estudio se realizó con dos sales de cobalto (II): cloruro y acetato, a fin de valorar posibles diferencias en función del anión. Las variaciones se han medido en las 24 horas siguientes a la administración del metal por dos vías: oral e intraperitoneal, y para diferentes dosis en cada una de ellas; dosis seleccionadas según los valores de las DL_{50} obtenidas en ensayos previos sobre toxicidad aguda de estas dos sales; ensayos que unidos a los realizados con sulfato y nitrato de cobalto (II), completan esta parte del estudio.

Material y métodos

Se han utilizado ratas albinas machos y hembras, cepa Sprague-Dawley, de pe-

sos promedio $192,5 \pm 22,3$ g. Para las determinaciones de las DL_{50} se emplearon lotes de ocho o diez animales, mientras que para la determinación de los parámetros sanguíneos se utilizaron lotes de cinco animales por parámetro, dosis y tiempo de medida.

Las sales de cobalto empleadas: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $Co(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ fueron de pureza analítica suministradas por Merck.

Oralmente, la administración de la sal en disolución acuosa se llevó a cabo con sonda intragástrica. Las disoluciones intraperitoneales fueron preparadas en tampón tris/HCl 10 mM, pH = 7,4. En ambos casos, las jeringas de precisión utilizadas fueron de capacidad 1 ml graduadas en centésimas de ml. La duración media de la administración única fue de unos cinco segundos.

Los volúmenes recibidos para ambas vías se ajustaron a 5 ml/kg de peso en cada una de las dosis empleadas con objeto de evitar variaciones de volumen importantes entre las distintas administraciones. Las ratas control recibieron volúmenes equivalentes de agua destilada para la vía oral o de tampón tris/HCl, pH = 7,4 para la intraperitoneal. Previamente a la administración, los animales habían sido mantenidos en ayunas durante 24 horas.

Para el estudio de toxicidad aguda, el criterio escogido ha sido la DL_{50} (7 días), dosis letales 50% al séptimo día; es decir, la dosis que expresada en mg de sal por kg de peso es susceptible de matar al 50% de los animales en una semana. Con anterioridad, y con sencillos lotes de dos o tres animales se investigó cuáles eran los límites entre los que no se producía muerte alguna y la zona completamente letal. Durante los siete días, las ratas recibieron agua y comida *ad libitum*.

Los valores de la DL_{50} y sus límites de confianza fueron calculados por el método de LITCHFIELD y WILCOXON (8).

Para los análisis sanguíneos, los animales fueron sacrificados por decapitación a diferentes tiempos, determinándose los siguientes parámetros: hematocrito por el método del microhematocrito usando centrífuga Clay-Adams; hemoglobina medida como oxihemoglobina mediante un hemoglobímetro de Coulter Electronic. La glucosa, el colesterol y las proteínas totales fueron analizados con analizador multicanal Technicon modelo SMA-12 y los triglicéridos y los lípidos totales se determinaron mediante las técnicas analíticas habituales. Las dosis seleccionadas y los tiempos de medida fueron los siguientes: $\text{Co}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oral: 615, 410 y 205 mg/kg (valores correspondientes a 3/4, 1/2 y 1/4 de la DL_{50} del acetato de cobalto vía oral), para tiempos de 1, 2, 4 y 24 horas.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oral: 375 y 125 mg/kg (correspondientes a 3/4 y 1/4 de la DL_{50} del cloruro de cobalto oral) a tiempos de 1, 2, 3 y 12 horas.

$\text{Co}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ intraperitoneal: 28, 18,5 y 9 mg/kg (correspondientes a 3/4, 1/2 y 1/4 de la DL_{50} del acetato de cobalto intraperitoneal), para tiempos de 15 minutos, 45 minutos, 2 horas y 8 horas.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ intraperitoneal: 32, 21 y 10,5 mg/kg (correspondientes a 3/4, 1/2 y 1/4 de la DL_{50} del cloruro de cobalto in-

traperitoneal) a tiempos de 30 minutos, 1, 3 y 12 horas.

La comparación estadística de los resultados se efectuó con el test de la *t* de Student-Fischer.

Resultados

Toxicidades agudas. Las diferentes dosis de las cuatro sales del cobalto estudiadas fueron seleccionadas en función de los resultados previos obtenidos con pequeños lotes de ratas. Las tablas I y II recogen los resultados de las toxicidades agudas así como los valores de sus correspondientes DL_{50} .

En la tabla III se indican las toxicidades comparativas por ambas vías de las cuatro sales referidas a mg de Co/kg de peso.

La observación de los animales durante los siete días posteriores a la administración del Co muestran que, aproximadamente un 95% de los que mueren lo hacen en las primeras 24 horas, y la mayoría dentro de las seis horas inmediatamente posteriores a la intoxicación. Muy raramente se produjo alguna muerte pasadas 48 horas.

Los signos físicos más notorios aparecieron poco tiempo después de la intoxicación: disminución muy importante de

Tabla I. Toxicidades agudas orales de algunas sales de cobalto (II). Valores de las DL_{50} .

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		$\text{Co}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados
350	100	600	100	1000	100	726	100
392	90	645	80	1110	90	802	87,5
450	62,5	693	80	1232	70	886	87,5
518	50	745	70	1368	50	979	62,5
595	25	801	50	1520	20	1081	12,5
684	25	861	50	1685	0	1196	0
787	0	926	30	control	100	control	100
control	100	995	0	$\text{DL}_{50} = 1330 \text{ mg/kg}$		$\text{DL}_{50} = 978 \text{ mg/kg}$	
$\text{DL}_{50} = 537 \text{ mg/kg}$		$\text{DL}_{50} = 819 \text{ mg/kg}$		(1220-1450)		(897-1066)	
(479-601)		(751-891)					

Tabla II. Toxicidades agudas intraperitoneales de algunas sales de cobalto (II). Valores de las DL_{50} .

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$		$Co(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$		$CoSO_4 \cdot 7H_2O$		$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	
Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados	Dosis (mg/kg)	% supervivientes tratados
25	100	25	100	25	100	25	100
32,5	87,5	32,5	50	34	100	32,5	87,5
42	37,5	42	25	46	75	42	25
55	25	55	25	61,5	37,5	55	25
71,5	0	71,5	0	83	0	71,5	0
control	100	control	100	control	100	control	100
$DL_{50} = 42,6$ mg/kg (35,5-51,1)		$DL_{50} = 37$ mg/kg (30,1-45,4)		$DL_{50} = 54,5$ mg/kg (45,2-65,7)		$DL_{50} = 41$ mg/kg (43,2-49,1)	

Tabla III. Toxicidades comparativas de algunas sales de cobalto.

Sal	Vía oral (DL_{50} mg Co/kg)	Vía i.p. (DL_{50} mg Co/kg)
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	133	10,6
$Co(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$	194	8,8
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	198	8,3
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	279	11,5

la actividad general, disminución del comportamiento exploratorio y de la frecuencia en levantarse; aumento del consumo de agua e importante déficit motor de los miembros posteriores, así como menor sensibilidad al dolor.

Los signos clínicos más destacados fueron: rubefacción general, órbita ocular sangrante, incremento del ritmo cardíaco y de la razón respiratoria, aunque

Tabla IV. Variación en función del tiempo de algunos parámetros sanguíneos, medidos

Parámetro	Dosis (mg/kg)	Inicio	1 hora	t	2 horas
Hematocrito %	125	$38,8 \pm 1,92$	$40,2 \pm 1,30$	0,762	$39,6 \pm 0,89$
	375		$43,2 \pm 0,84$	4,190**	$40 \pm 1,73$
Hemoglobina g/100 ml	125	$13,0 \pm 0,91$	$14,9 \pm 0,73$	3,728**	$13,5 \pm 0,46$
	375		$17,2 \pm 1,44$	5,516***	$15,3 \pm 0,85$
Proteínas totales g/100 ml	125	$6,8 \pm 0,11$	$7,4 \pm 0,41$	8,321***	$7,1 \pm 0,42$
	375		$7,6 \pm 0,16$	8,721***	$6,8 \pm 0,13$
Glucosa mg/100 ml	125	$128 \pm 7,0$	$144 \pm 6,9$	3,640**	$155 \pm 11,2$
	375		$170 \pm 8,6$	8,521***	$171 \pm 8,4$
Triglicéridos mg/100 ml	125	$76 \pm 4,8$	$70 \pm 7,9$	-1,418	$62 \pm 6,0$
	375		$118 \pm 5,7$	12,666***	$63 \pm 5,6$
Colesterol mg/100 ml	125	$100 \pm 6,7$	$124 \pm 4,4$	6,564***	$108 \pm 9,8$
	375		$130 \pm 9,1$	5,964***	$102 \pm 7,8$
Lípidos totales mg/100 ml	125	$200 \pm 23,2$	$330 \pm 23,7$	8,765***	$260 \pm 17,7$
	375		$270 \pm 26,7$	4,427***	$220 \pm 16,8$

t = Test de Student-Fischer. Grados de libertad = 8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

irregular, y aparición de intensa diarrea.

Por otra parte, prácticamente todos los animales presentaron una erección capilar notable.

La mayor parte de estos efectos desaparecieron transcurridas 72 horas. Los animales supervivientes fueron sacrificados al final de los siete días y no se observaron alteraciones macroscópicas en los órganos más significativos.

Variaciones en los parámetros sanguíneos. La tabla IV recoge las alteraciones de los diferentes parámetros en función del tiempo y tras la administración oral del cloruro de cobalto; siendo las más notables los incrementos de hemoglobina y hematocrito en la 1.^a hora, así como el de las proteínas totales. Aparece hiperglicemia en la 1.^a hora que se mantiene significativa para la dosis superior hasta las 24 horas, y hasta las 12 horas para la dosis inferior. Con respecto a los parámetros lipídicos, los triglicéridos sufren una dis-

minución significativa tras un incremento inicial, para volver a incrementarse entre las 3 y las 12 horas de modo significativo. El colesterol sufre un incremento inicial significativo al igual que los lípidos totales, y que se mantiene durante todo el tiempo del experimento.

La tabla V muestra los cambios en función del tiempo experimentados en los mismos parámetros tras la administración intraperitoneal del cloruro de cobalto. Las alteraciones más notables son: el incremento inicial del hematocrito; el de las proteínas totales que se mantiene significativo durante las doce primeras horas, especialmente para la dosis superior. Aparece hiperglicemia significativa para la dosis superior durante todo el tiempo de observación.

Para el acetato de cobalto, los resultados fueron generalmente análogos sin diferencias especialmente notables comparativamente con los del cloruro de cobalto.

en las horas inmediatamente posteriores a la administración oral de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

t	3 horas	t	12 horas	t	24 horas	t
0,791	$41 \pm 1,22$	1,948	$41,4 \pm 1,52$	2,136	$38,6 \pm 2,70$	-0,089
0,953	$41 \pm 1,58$	1,784	$40,6 \pm 1,67$	1,278	$40,4 \pm 1,14$	1,457
1,142	$14,5 \pm 0,84$	2,815*	$13,6 \pm 0,85$	1,118	$13,4 \pm 0,57$	0,829
4,139**	$14,5 \pm 0,55$	3,241*	$14,3 \pm 1,50$	1,736	$14,4 \pm 0,80$	2,666*
1,341	$6,8 \pm 0,11$	0	$6,7 \pm 0,17$	-1,510	$6,6 \pm 0,13$	-3,357*
-0,258	$6,6 \pm 0,21$	-2,331*	$6,9 \pm 0,21$	0,184	$6,9 \pm 0,21$	0,184
4,576**	$167 \pm 17,2$	4,738**	$153 \pm 8,1$	4,871**	$131 \pm 5,8$	0,884
8,937***	$155 \pm 5,8$	6,774***	$144 \pm 7,1$	3,585**	$110 \pm 5,1$	-4,061**
-4,109**	$58 \pm 9,1$	-3,958***	$94 \pm 7,4$	4,608**	$68 \pm 7,0$	2,918*
-3,859**	$67 \pm 4,4$	-3,293**	$119 \pm 11,5$	7,629***	$78 \pm 7,7$	0,445
1,474	$104 \pm 5,71$	1,089	$106 \pm 8,2$	1,268	$105 \pm 7,6$	1,014
0,436	$107 \pm 11,8$	1,152	$119 \pm 57,4$	4,300**	$110 \pm 0,6$	1,917
4,602**	$190 \pm 17,7$	-0,767	$225 \pm 16,0$	1,906	$220 \pm 23,9$	0,882
1,796	$190 \pm 19,4$	-0,740	$185 \pm 19,4$	-1,110	$190 \pm 23,2$	-0,682

Tabla V. Variación en función del tiempo de algunos parámetros sanguíneos, medidos en las horas inmediatamente posteriores a la administración intraperitoneal de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Parámetro	Dosis (mg/kg)	Inicio	t	1 hora	t	3 horas	t	12 horas	t
Hematocrito %	10,5 32	40,2 ± 1,58 41,4 ± 1,14	4,146** 6,713***	38,2 ± 1,64 36,8 ± 0,84	2,132 0,866	39 ± 0,71 40 ± 3,39	4,221** 2,339*	37,0 ± 1,22 36,8 ± 1,30	1,000 -0,728
Hemoglobina g/100 ml	10,5 32	14,8 ± 1,04 14,1 ± 0,55	3,455** 3,114*	13,6 ± 0,67 12,4 ± 0,34	1,839 -1,675	14,3 ± 0,36 13,7 ± 0,78	4,604** 2,181	12,7 ± 0,43 12,9 ± 0,65	-0,784 -0,202
Proteínas totales g/100 ml	10,5 32	5,9 ± 0,29 5,9 ± 0,17	8,765*** 13,015***	5,1 ± 0,31 5,2 ± 0,23	3,227* 4,996**	5,3 ± 0,42 5,1 ± 0,28	3,216* 3,450**	5,1 ± 0,41 5,3 ± 0,38	2,449* 3,796**
Glucosa mg/100 ml	10,5 32	147 ± 7,0 195 ± 8,6	0,663 10,606***	140 ± 8,4 208 ± 8,8	-0,823 13,178***	130 ± 7,5 235 ± 11,2	-3,237* 15,828***	157 ± 8,0 130 ± 12,8	2,804* -2,163
Triglicéridos mg/100 ml	10,5 32	84 ± 6,9 55 ± 9,1	2,174 -4,712**	57 ± 9,1 55 ± 4,9	-4,268*** -7,254***	60 ± 6,1 100 ± 11,5	-4,854** 4,289**	94 ± 6,0 106 ± 7,5	5,488*** 7,736***
Colesterol mg/100 ml	10,5 32	76 ± 9,1 60 ± 6,0	0,385 -3,119*	66 ± 7,4 64 ± 6,7	-1,729 -2,223	75 ± 7,3 63 ± 5,4	0,174 -2,672*	69 ± 8,3 48 ± 6,7	-1,019 -5,903***
Lípidos totales mg/100 ml	10,5 32	160 ± 18,7 150 ± 23,5	-1,633 -2,176	170 ± 20,0 120 ± 18,7	-0,791 -4,899**	220 ± 22,4 150 ± 21,2	2,981* -2,301	160 ± 15,8 150 ± 15,8	-1,754 2,631*

t = Test de Student-Fischer. Grados de libertad = 8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Discusión

Toxicidades agudas. Los anteriores resultados indican que las cuatro sales de cobalto utilizadas son moderadamente tóxicas cuando se administran vía oral y altamente tóxicas cuando se administran vía intraperitoneal. Esta notable distinción se debe, sin lugar a dudas, a un problema de absorción.

Aparecen diferencias entre los valores de las DL_{50} determinadas, y las publicadas en algunos casos: para el $CoSO_4$, 597 mg Co/kg oral y 13 mg Co/kg intraperitoneal (20), y para el $CoCl_2$, 144 mg Co/kg oral y 7,9 mg Co/kg intraperitoneal (11); las cuales pueden ser debidas al uso de distintas cepas, al número de días de observación post-tratamiento o incluso a la metodología empleada. De cualquier forma, la diferencia en los valores del sulfato oral es considerable y sugiere alguna variación entre especies.

El hecho de que prácticamente no se produzcan muertes transcurridas 48 horas, así como la desaparición de la mayor parte de los signos físicos y clínicos mencionados, se debe posiblemente a la rápida eliminación por heces y orina en más de un 90% (15), lo que justificaría en parte el incremento en el consumo de agua; por lo que en menos de 48 horas habría desaparecido ya la mayor parte del cobalto administrado.

Variaciones en algunos parámetros sanguíneos. Las alteraciones aparecidas en algunos parámetros sanguíneos tras la administración oral e intraperitoneal de cloruro y acetato de cobalto (II), son diferentes en duración y grado en función de la dosis recibida; y como era lógico esperar, se produjeron más rápidamente si se administraba el cobalto intraperitonealmente, dada la absorción más lenta que si se administraba oralmente.

Se observa para ambas sales y para las dos vías de administración un rápido in-

cremento en el hematocrito y en la hemoglobina, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por GIOVANNINI *et al.* (5), y concuerda con la aparición característica de policitemia originada por la ingestión excesiva de cobalto (1), la cual es probablemente la causa del incremento del ritmo cardíaco y de la fuerte rubefacción de orejas y extremidades que se detectó en los estudios de toxicidad aguda.

La acción hiperglicémica del metal, la cual se manifiesta también para las dos sales y vías de administración, corrobora los resultados de otros autores (6, 13, 19). La hiperglicemia puede ser atribuida a la liberación de adrenalina (3) o a los efectos tóxicos que el metal origina sobre el hígado y otros tejidos (4).

Respecto a las modificaciones registradas en las concentraciones de triglicéridos y del colesterol, los resultados concuerdan con los publicados por TELIB y SCHMIDT (18) al experimentar con conejos, a los que se había inyectado $CoCl_2$.

Se observa en los triglicéridos dos zonas claramente diferenciadas, un período inicial de incremento de corta duración, el cual se debe probablemente a un importante aumento de la lipólisis; y que viene sugerido según TELIB y SCHMIDT (18) por el incremento en los ácidos grasos libres del plasma al cabo de una hora de la administración del cobalto. Los cambios en el segundo período pueden explicarse por el efecto del metal sobre el hígado, elevando la concentración de triglicéridos en el suero y una inhibición de la oxidación de los ácidos grasos libres en este órgano acompañada por acúmulo de fosfoglicrato asociado con la desaparición de glucógeno hepático (18).

Por último, cabe destacar que no se observan diferencias notables entre la administración del cloruro y del acetato de cobalto (II), por lo que a resultados se refiere y, en consecuencia, el efecto del anión no se puede considerar en este caso especialmente significativo.

Resumen

Se investigan las toxicidades del cloruro, acetato, nitrato y sulfato de cobalto (II) en ratas. Los valores obtenidos para las DL_{50} (7 días) fueron 133, 194, 198 y 279 mg de Co/kg respectivamente, para la administración oral y 10,6; 8,8; 8,3 y 11,5 mg de Co/kg para la administración intraperitoneal. La mayor parte de las muertes ocurrieron en las primeras 48 horas. Los signos físicos y clínicos aparecidos tras la intoxicación, desaparecieron en su mayoría transcurridas las primeras 72 horas.

Se estudian asimismo, los efectos que el cloruro y el acetato de cobalto (II), administrados oral e intraperitonealmente, producen sobre algunos parámetros sanguíneos durante las 24 horas siguientes a la intoxicación; y a dosis correspondientes a fracciones de las DL_{50} de ambas sales.

Se observa un notable incremento del hematocrito y de la hemoglobina, así como de las proteínas plasmáticas. Aparece hiperglicemia significativa, y también significativas alteraciones en parámetros lipídicos como triglicéridos y colesterol. La duración y el grado de la alteración dependen de la dosis administrada. Por lo general, no se registran diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las dos sales.

Bibliografía

1. BROWNING, E.: «Toxicity of industrial metals». Butterworths, Londres, 1969.
2. BRYAN, S. E. y BRIGHT, J. E.: *Toxicol. Appl. Pharm.*, **26**, 109-117, 1973.
3. ELLIS, S., ANDERSON, H. A. y COLLINS, M. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 383-386, 1953.
4. FODDEN, J. H.: *Amer. J. Clin. Path.*, **23**, 1002-1011, 1953.
5. GIOVANNINI, E., PRINCIPATO, G. B., AMBROSINI, M. V., GRASSI, G. y DELL'AGATA, M.: *J. Pharm. Exp. Ther.*, **206**, 398-404, 1978.
6. GOLDNER, M. G., VOLK, B. W. y LAZARUS, S. S.: *Metabolism*, **1**, 554-548, 1952.
7. LIOTTI, F. S. y ANDREOLI, V.: *Riv. Biol.*, **54**, 487-518, 1961.
8. LITCHFIELD, J. T. y WILCOXON, F.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-109, 1949.
9. MORIN, Y. y DANIEL, P.: *Canad. Med. A. J.*, **97**, 926-931, 1967.
10. MUÑOZ-CALVO, R., VALCÁZAR, A. y LUCAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 61-64, 1972.
11. MURDOCK, H. R. y KLOTZ, L. J.: *J. Am. Pharm. Assoc.*, **48**, 140-142, 1959.
12. ORTEN, J. M. y BUCCIERO, M. C.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 961-968, 1948.
13. RAO, M. R. y DE, N. N.: *Acta. Endocrin.*, **18**, 293-298, 1955.
14. SCHLEETWEIN-GSELL, D. y MOMMSEN-STRAUB, B.: *Int. Vitaminforsch.*, **40**, 673-683, 1970.
15. SCHROEDER, H. A., NASON, A. P. y TIPTON, I. H.: *J. Chronic. Dis.*, **20**, 869-890, 1967.
16. SMITH, R. J. y CONTRERAS, J. F.: *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1095-1103, 1974.
17. TAYLOR, A. y MARKS, V. J.: *Human. Nutr.*, **32**, 165-177, 1978.
18. TELIB, M. y SCHMIDT, F. H.: *Endokrinologie*, **61**, 395-402, 1973.
19. VOLK, B. W., LAZARUS, S. S. y GOLDNER, M. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**, 406-411, 1953.
20. WIBERG, G. S., MUNRO, I. C., MERANGEN, J. C., MORRISON, A. B. y GRICE, H. C.: *Clin. Toxicol.*, **2**, 257-271, 1969.