



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

Evaluación del daño al ADN en leucocitos humanos tratados *in vitro*
con acetato de talio

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

EDUARDO JARAMILLO CRUZ

Director de tesis.

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

México D. F., agosto 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
EVALUACION DEL DAÑO AL ADN EN LEUCOCITOS
HUMANOS TRATADOS IN VITRO CON ACETATO DE
TALIO

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta:

Eduardo Jaramillo Cruz

Tesis dirigida por el Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en el laboratorio de Toxicología Reproductiva y Teratogénesis (L-5 PA), de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), que se encuentra a cargo del Dr. Mario A. Altamirano Lozano, dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, UNAM.

El desarrollo de ésta investigación se recibió el apoyo de PAPIIT-DGAPA, proyecto IN-216809.

Se recibió la beca de Tesis Licenciatura COMECYT promoción 2009, folio 09BTL0294.

Agradecimientos:

De manera muy especial a mi Director de Tesis el Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su paciencia y todo el apoyo brindado durante la realización de esta Tesis.

Al jurado:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Elia Roldán Reyes

Dra. Lucila Álvarez Barrera

M. en C. Carlos Bautista Reyes

Por sus valiosas aportaciones en la revisión y elaboración de esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio que siempre me ayudaron en especial a Miriam por su invaluable apoyo, gracias a todos les deseo lo mejor.

Dedicatorias

†A mi Abuelo:

Siempre fuiste el pilar que sostiene a nuestra familia, nunca olvidaremos todo lo que hiciste por nosotros, donde quiera que estés nuestro amor y cariño está contigo, gracias por ser como un padre para mi.

A mi abuela

Por ser tan dulce como la miel y despertar en nosotros ese cariño de madre que solamente tu nos puedes brindar, gracias por ser como una segunda madre para mi.

A mi madre:

Las palabras no me alcanzan para decirte lo mucho que te amo, cada paso, cada logro, cada día de felicidad son gracias a ti. Simplemente la mejor madre de todo el mundo.

A mi padre:

Gracias papa por estar siempre a mi lado, eres mi superhéroe y nunca dejaras de serlo, todo lo bueno que veo en ti se ve reflejado en mi ser.

A mi hermana:

Gracias a mi estrella gemela, siempre has sido una excelente amiga para mi, espero que siempre estemos tan unidos como ahora.

A mis sobrinos:

Por llenar el hogar de esa alegría y darle brillo a nuestra sonrisa todos y cada uno de nuestros días.

Los amo son mi vida entera

A mis tíos:

†Tomas Cruz López, †Claudio Cruz López, David Cruz López, Guillermo Cruz López, Gabriel Cruz López, Roberto Cruz López, Martín Cruz López.

Siempre fueron las mejores figuras paternas que pude haber tenido, los quiero mucho y los amo, para los que no están mas con nosotros se que su espíritu nos acompaña a cada momento.

Antonio

Gracias por todo su apoyo, le estaré muy agradecido por siempre estar a nuestro lado

A mis tías:

Graciela, Maribel, Claudia, Maricela, Georgina

Las adoro a todas me encanta su sonrisa y todo el amor que brindan a la familia, son las flores que esta familia mas aprecia.

†Guadalupe

Siempre que volteo a la luna te recuerdo tía, gracias por ser una parte muy hermosa de mi vida

A mis primos:

El oso, Beavis y Nakéchi.

Para ese trió que siempre estuvo conmigo y que compartimos tantas cosas siempre fueron los hermanitos que nunca tuve, gracias por todo son la neta.

Dianita, Cesar y Luis

Su sola presencia siempre inunda nuestro hogar de felicidad.

Axel, Emiliano y Brian

Por ser tan buena onda y siempre estar dando lata a la familia.

Yazmin

Bienvenida a la familia hermoso pedazo de cielo, esta familia es más feliz desde que tú llegaste.

Alejandro y Gabriela

Primos siempre tengo recuerdos muy buenos de ustedes dos, los quiero mucho

A mis camaradas licántropos

Alex, Genaro, Naae, Osiriz

Gracias por compartir conmigo el maravilloso mundo de la obscuridad y enseñarme el verdadero significado de la palabra amigo.

A mi negrita hermosa

Mil gracias a la mujer que más he amado, eres lo más hermoso que he tenido nunca dejo pensar en ti mis sentimientos más profundos son para ti, eres esa parte de mi vida que siempre me llena de alegría. Tu belleza, inteligencia, alegría son el motor para seguir adelante. Te amo.

A la banda skatorama

Femur, Beto, Yilo y Chuchin.

Mis hermanos del skate, siempre me brindaron tantos ánimos, tantas risas, es un honor para mí conocerlos y saber que siempre estaremos en contacto neta que ustedes hicieron una hermosa pauta en mi vida.

El chabe, el vaqa, el pato, el seitan, zirce y la china

Con ustedes compartí los colores que no conocía, ojalá siempre estemos en contacto y les deseo lo mejor.

Para todos mis compañeros de la universidad personas de las cuales aprendí tantas cosas y que estoy seguro que tendrán mucho éxito en la vida.

Para mi alma máter, nunca dejare de trabajar para hacer de la universidad la mejor institución educativa que pueda existir.

ÍNDICE

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Toxicología	1
II. MARCO TEÓRICO	2
A. Toxicología genética	2
B. Genotoxicidad	2
1. Daño al material genético	3
C. Reparación de ADN	4
1. Reparación de apareamientos incorrectos	5
2. Reparación de escisión de bases	6
3. Reparación de escisión de nucleótidos	7
4. Reparación de rompimientos de cadena doble	7
D. Pruebas para evaluar genotoxicidad	8
1. Ensayo cometa	9
E. Metales	10
F. Talio	11
1. Abundancia y propiedades fisicoquímicas.....	12
2. Usos	12
3. Concentraciones en agua, aire y suelo	13
4. Toxicidad	15
5. Biocinética	16
6. Mecanismo de acción	16
7. Efectos teratogénicos del Tl	17
8. Mutagenesis y genotoxicidad del talio	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
A. General	21
B. Particulares	21
VI. MATERIAL Y MÉTODO	22
A. Obtención de las muestras	22
B. Tratamiento	22
C. Prueba de viabilidad	22
D. Ensayo cometa pH >13	22
E. Categorías de daño	23
F. Ensayo cometa a pH 12.1	24
G. Reactivos	24
H. Análisis estadístico	24

VII.	RESULTADOS	26
A.	Viabilidad celular	26
B.	Ensayo cometa a pH >13	27
C.	Ensayo cometa a pH 12.1	29
D.	Rompimientos de cadena sencilla y sitios afines al álcali	30
VIII.	DISCUSIÓN	39
A.	Viabilidad Celular	39
B.	Cometa pH >13	40
C.	Cometa pH 12.1	42
D.	Rompimientos de cadena sencilla y sitios afines al álcali	43
IX.	CONCLUSIONES	44
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
XI.	ANEXO	50

RESUMEN

El talio es un metal pesado ampliamente usado en diversas industrias como la minera, la metalúrgica, la eléctrica y la cementera, las cuales a su vez son fuentes de liberación de este elemento al ambiente. No se ha determinado su necesidad para algún procesos metabólico y es considerado extremadamente tóxico para el humano y cualquier ser vivo. Presenta dos estados de oxidación Tl^+ y Tl^{3+} , los compuestos $3+$ son menos numerosos, en tanto que los compuestos talio $1+$ son más numerosos debido a su estabilidad. Posee la capacidad de mimetizarse con otros cationes de carga y radio iónico similar, de esta forma es incorporado al interior de la célula por medio de canales iónicos.

No es claro el mecanismo de la toxicidad por el cual actúa este metal, sin embargo diversos estudios han mostrado que en concentraciones mM y μ M es capaz de aumentar el contenido oxidante intracelular, además, presenta afinidad por los grupos sulfhídrico de las proteínas y por las bases nitrogenadas de la molécula de ADN.

Existen muy pocos estudios sobre su efecto genotóxico, algunos trabajos han hallado que este metal induce daño en los cromosomas y en el material genético, sin embargo estos resultados son controvertidos y su información es limitada. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad celular y el daño inducido *in vitro* por acetato de talio (CH_3COOTl) utilizando el modelo de leucocitos humanos y el ensayo cometa. Para tal fin se extrajo sangre periférica de 4 donadores clínicamente sanos, se incubaron los leucocitos de sangre completa en medio de cultivo y se trataron durante 1 o 2 horas con 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 μ g/ml del compuesto de talio. Al finalizar el tratamiento las células se embebieron en gel de bajo punto de fusión y se hicieron las preparaciones. Después de lisar las células se realizó la electroforesis a dos condiciones de corrimiento: pH > 13 que detecta rompimientos de cadena sencilla, rompimientos producidos por sitios de reparación retardada y sitios sensibles al álcali, y pH 12.1 que detecta rompimientos de cadena sencilla así como sitios de reparación retardada. En tanto que para determinar la viabilidad se siguió la técnica de tinción diferencial utilizando dos colorantes fluorescentes, que permiten detectar daño en la membrana celular y actividad metabólica.

Los resultados obtenidos no mostraron cambios consistentes en la viabilidad, pero sí diferencias significativas en la longitud de la cola del cometa y un incremento en el número de células con daño en todas las concentraciones, en ambos tiempos de incubación y en las dos condiciones de pH. Tal comportamiento es diferentes en cada donador por lo cual no existe una tendencia dosis efecto, este comportamiento puede ser explicado por diferentes factores intrínsecos, exógenos y además por condiciones experimentales.

De lo anterior podemos concluir que el acetato de talio produce ligera toxicidad celular en tiempos cortos de exposición y puede inducir daño sobre el material genético a bajas concentraciones, donde los sitios álcali sensibles son un tipo de lesiones que ocupan un lugar importante en la formación del cometa.

INTRODUCCIÓN

A. Toxicología

Como toxicología se entiende a la disciplina que estudia las interacciones dañinas entre un químico y los sistemas biológicos por este motivo es de gran importancia para el hombre, conocer la gran gama de sustancias nocivas a las que se están expuestos como lo son metales, químicos inorgánicos simples hasta grandes y complejas moléculas orgánicas. Tan solo en los Estados Unidos de Norteamérica son producidos unos 65 000 químicos y de 500 a 1000 nuevos compuestos son añadidos a la lista cada año y muchos de los cuales representan riesgo ocupacional, terapéutico y ambiental.

La toxicología es una disciplina científica y médica la cual encuentra su origen en el siglo XIX, como producto de la revolución industrial se presenta como una disciplina nacida de la farmacología. El envenenamiento para propósitos criminales se ha mantenido como un problema hasta la actualidad, por esta razón el desarrollo de la toxicología ha llevado ímpetu primordial sobre el campo forense. Otro motivo más para el desarrollo de la toxicología son las claras descripciones de efectos adversos a productos médicos.

En los últimos 30 años el crecimiento de la toxicología como una ciencia se debe en gran medida a una sucesión de desastres, uno de los cuales sucedió en Estados Unidos de América en el año de 1937 el cual tuvo como consecuencia la muerte de 107 personas al envenenarse con un elixir de sulfanilamida, debido al dietilenglicol que se utilizaba como excipiente en su preparación.

Los estudios toxicológicos no conciernen exclusivamente a los efectos adversos de agentes químicos sino también evalúa el manejo, el potencial de riesgo, define precauciones adecuadas, medidas restrictivas así como medidas terapéuticas. La toxicología es esencialmente una disciplina a cargo de estudiar el potencial de las sustancias químicas para producir efectos dañinos en organismos y determinar las implicaciones de estos. Dicho lo anterior podemos definir a la toxicología como el estudio de las interacciones entre químicos y sistemas biológicos, para así poder determinar el potencial para provocar efectos adversos en los seres vivos e investigar la naturaleza, incidencia y mecanismo de producción, factores que influyen su desarrollo y la posible reversión de dichos efectos (Ballantyne y Marrs 1993, Timbrell 2002, Gilbert 2004).

I. MARCO TEÓRICO

A. Toxicología genética

Dentro de las disciplinas que auxilian a la toxicología se encuentran las ciencias de humanidades y las ciencias exactas como la estadística, la farmacología, la biología celular, la biología molecular, la epidemiología y la genética. Esta última conforma la toxicología genética, la cual, se describe como una especialidad de la toxicología que identifica y analiza la acción de los agentes cuya toxicidad recae en el material hereditario (ADN, ácido desoxirribonucleico) de los organismos. La toxicología genética posee como objetivo primordial detectar y entender las propiedades de los agentes químicos naturales o sintéticos que producen efectos en el material hereditario desde efectos deletéreos hasta letales. Por lo tanto, es esencialmente multidisciplinaria y pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a sustratos exógenos desarrollados por el hombre conocidos comúnmente como “xenobióticos” y la inducción de alteraciones genéticas en las células germinales como en las células somáticas de los organismos, y a partir de ello valorar los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos.

La toxicología genética fue reconocida como una disciplina en 1969 cuando la Sociedad de Mutagenesis Ambiental se encontraba a cargo del Dr. Alexander Hollaender y muchos otros genetistas que estaban consientes del potencial de impacto genético asociado al incremento de xenobióticos en el ambiente (Brusick 1987, Albert y Robert 1991).

B. Genotoxicidad

Independientemente del agente físico, químico o biológico que sea capaz de producir daño sobre el ADN, de manera directa o indirecta, se le denomina agente con propiedades tóxicas sobre el material genético o genotóxico. Dichos efectos incluye mutaciones en genes, en cromosomas y en el genoma, o bien, pueden modificar mecanismos asociados a la reparación, replicación y recombinación del ADN, sin dejar a un lado los que afectan la maquinaria del huso y el reparto de los cromosomas durante la división celular (Pimentel *et al* 2006).

En humanos las mutaciones sobre las células germinales incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades de tipo hereditarias y las mutaciones de células somáticas pueden terminar en cáncer. Las mutaciones son usualmente divididas en dos categorías, mutaciones de gene simple y mutaciones multi-*locus*. Las primeras también referidas como mutaciones puntuales o microlesiones pueden ser observadas a un nivel molecular como alteraciones en la secuencia de nucleótidos del ADN. Las mutaciones multi-*locus* se conocen como mutaciones cromosómicas incluyen cambios estructurales en los cromosomas (rompimientos, pérdidas y reordenamientos) o cambios numéricos en el genoma (Albert y Robert 1991, Ballantyne y Marrs 1993, Greim y Snyder 2008).

1. Daño al material genético

Las alteraciones en la estructura del ADN que dan cambios permanentes en la información genética se denominan mutaciones. Es muy común para todas las células la presencia de daño en su material genético, así los efectos genotóxicos pueden ser categorizados en aquellos que provocan directamente alteraciones transmisibles como mutación de genes o daño cromosómico y aquellos que son secundarios a la producción de cambios transmisibles por ejemplo los que provocan rompimientos en la cadena de ADN y alteraciones en los procesos de reparación (Sancar *et al* 2004, Nelson y Cox 2005).

A continuación revisaremos brevemente una serie de estructuras bioquímicas que se forman en el material genético o en sus precursores, las cuales están relacionadas con la formación de mutaciones y alteraciones en los cromosomas. Muchas bases nitrogenadas en la cadena de ADN sufren la pérdida espontánea de su grupo amino exocíclico, este proceso es llamado desaminación y ocurre a una tasa de 100 mutaciones espontáneas promedio al día en una célula de mamífero (Figura 1). Además existe otra reacción muy importante en los desoxinucleótidos, la cual es la hidrólisis del enlace N- β -glucosídico entre la base y la pentosa, esta reacción conlleva a un proceso de depuración (Ballantyne y Marrs 1993, Nelson y Cox 2005, Greim y Snyder 2008).

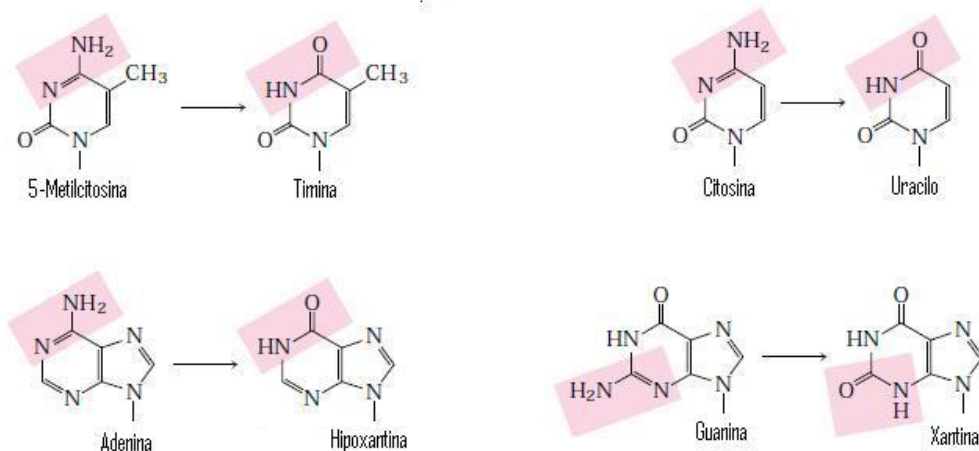


Figura 1. En color rosado podemos observar la pérdida del grupo amino exocíclico y la forma en que concluyen la reacción de desaminación en las bases de los nucleótidos en la cadena de ADN (tomado de Nelson y Cox 2005).

El ADN también puede ser dañado por reactivos químicos que son arrojados por las industrias. Dos clases importantes de estos agentes son: agentes como el ácido nitroso o compuestos que pueden formar metabólicamente ácido nitroso o nitritos (nitrito sódico, nitrato sódico, nitrosamina) y los agentes alquilantes (S-adenosilmetionina,

dimetilnitrosamina, dimetilsulfato, mostaza nitrogenada). A demás de estas reacciones existen factores físicos como la luz UV la cual induce una condensación de dos grupos etileno para así formar un anillo ciclo butano. Esta reacción se lleva acabo más comúnmente en residuos de timina adyacentes dentro de la misma hebra de ADN a demás existe un segundo tipo de dímero de pirimidina el cual es llamado fotoproducto 4-6 (Figura 2). También, en la figura 2 se pueden observar, diferentes tipos de daño al ADN como rompimientos de cadena sencilla, dos rompimientos de cadena sencilla próximos en la misma hebra de ADN que conducen a la formación de brechas de cadena sencilla, rupturas en ambas cadenas, así como enlaces cruzados entre la toxina como el *cis*-platino y el ADN (Brusick 1987, Albert y Robert 1991, Sancar *et al* 2004, Nelson y Cox 2005).

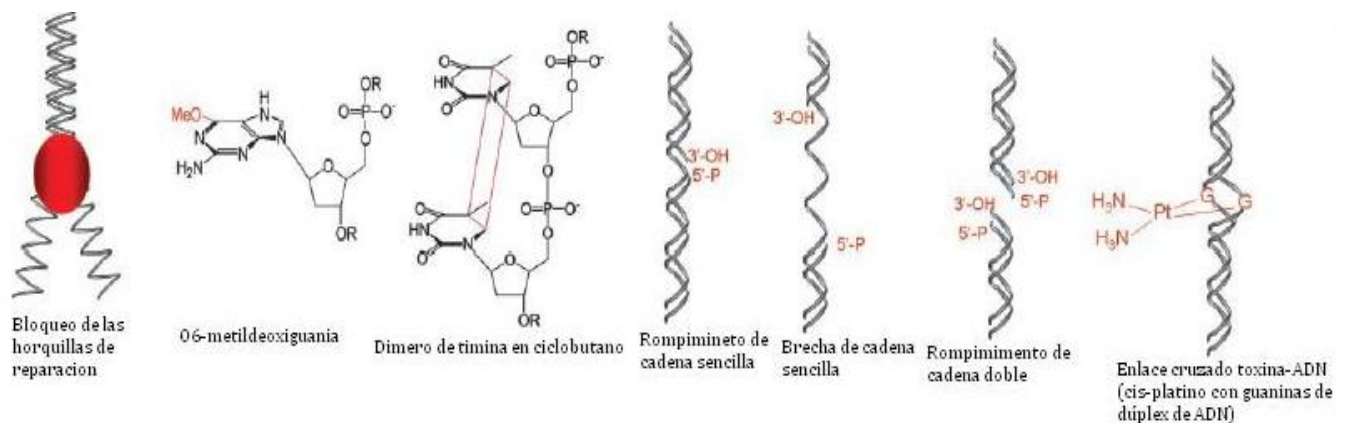


Figura 2. Tipos de daño presente en la molécula y algunas estructuras que causan respuesta en la maquinaria de reparación de ADN (tomado de Sancar *et al* 2004).

C. Reparación de ADN

Todas las células tanto procariontes como eucariontes poseen diferentes mecanismos para reparar el daño en la molécula de ADN. Estos son requeridos para proteger las células de los efectos letales y mutágenos que tienen sobre el proceso como la hidrólisis de ADN, luz ultravioleta y químicos reactivos al ADN. Existen diversos sistemas de reparación mediante el cual se resguarda la integridad del ADN, por ejemplo en células de levadura tenemos que el número de genes implicado en la reparación de ADN llega a ser de 100. El número de genes involucrados en células de mamífero se conoce que es igual o incluso ligeramente mayor (Ballantyne y Marrs 1993, Nelson y Cox 2005). A continuación se mencionaran los principales mecanismos que reparan los diversos tipos de daño en células procariontes y eucariontes; en particular mamíferos y humano.

1. Reparación de apareamientos incorrectos

La célula es capaz de reparar apareamientos incorrectos debido a que distingue entre la hebra que existe antes de la replicación (hebra molde) y la que fue recientemente sintetizada. Así la hebra molde está totalmente metilada mientras que la hebra recién sintetizada no lo está por un periodo de tiempo suficiente para corregir los apareamientos incorrectos. Este mecanismo envuelve la actividad del complejo de proteínas MutHLS, codificado por los genes, *mutH*, *mutL*, y *mutS* en *Escherichia coli*. Este complejo de proteínas reparador reconoce lesiones que causan solamente distorsiones menores en la molécula de ADN, incluyendo aquellas causadas por desapareamientos de pares de base, incorporaciones de análogos de base, colorantes intercalantes y algunos tipos de daño alquilante (Sancar *et al* 2004, Nelson y Cox 2005).

Este mecanismo es un proceso en 4 pasos (Figura 3), en el primero el complejo de proteínas recorre una molécula de ADN hemimetilada en busca de distorsiones menores. En el segundo paso MutS interactúa con dos proteínas MutH y una MutL y se forma un complejo que se fija en la molécula de ADN, el complejo MutHLS enrolla el ADN en ambas direcciones en busca de la secuencia hemimetilada específica, 5'GATC 3' donde la adenina sobre la hebra parental esta metilada y la adenina es metilada en la posición C6 por la enzima, deoxyadenosina metilasa (DAM metilasa).

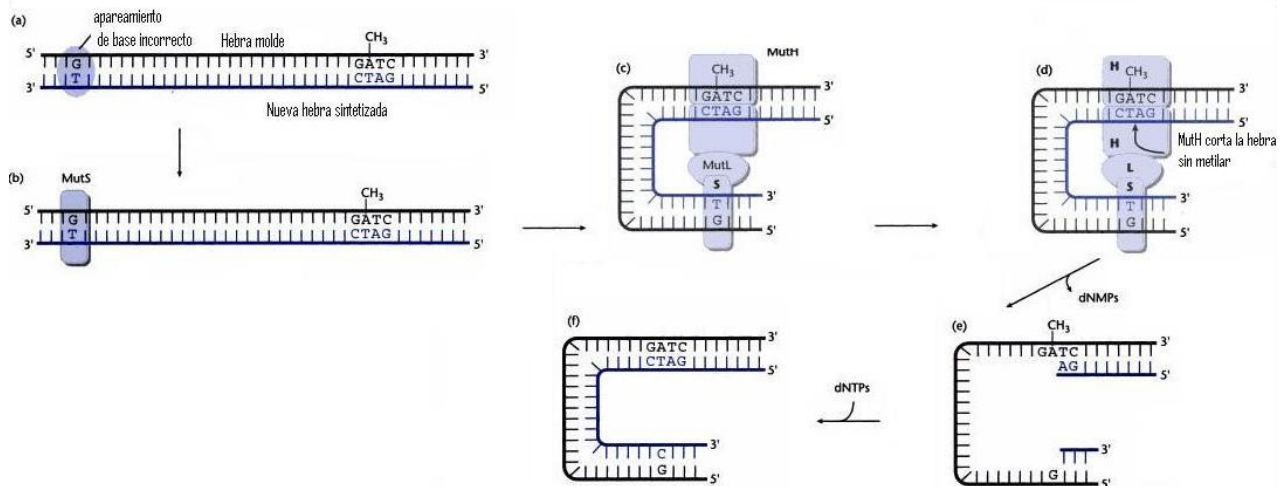


Figura 3. El mecanismo de reparación de apareamiento de bases incorrecto consta de cuatro pasos: la molécula de ADN hemimetilada es reconocida (a) y el complejo de proteínas se une a la molécula de ADN (b), ocurre enrollamiento de la molécula de ADN por parte del complejo MutHLS se da un corte enzimático (c y d), finalmente se remueve la secuencia incorrecta y la ligasa sella el hueco (e y f) (modificado de Trun y Trempy 2004).

En el tercer paso, arriba de la secuencia GATC hemimetilada, uno de las proteínas MutH cataliza un corte (rompimiento de enlace fosfodiéster) y la hebra hija cortada es degradada de 5' a 3' por la actividad de la exonucleasa, removiendo la secuencia de nucleótidos incluyendo los apareamientos incorrectos y finalmente la ligasa sella el esqueleto fosfodiéster (Ballantyne y Marrs 1993, Trun y Trempy 2004, Nelson y Cox 2005). En mamíferos se sigue el mismo procedimiento para reparar los apareamientos incorrectos con proteínas homologas que tiene distintos nombres, sin embargo en bacterias este procedimientos ha sido más estudiado y se tiene bien descrito (Friedberg *et al* 1995).

2. Reparación de escisión de bases

Las células poseen un tipo de enzimas llamadas DNA glicosilasas estas tienen propiedad de reconocer lesiones comunes en las bases nitrogenadas del ADN y removiendo la base afectada rompiendo el enlace *N*-glucosilo. Este rompimiento crea un sitio apurínico o apirimidinico en el ADN, comúnmente llamado sitio AP o abásico. Dependiendo de cómo es removida la base inicialmente, puede catalogarse como un parche de reparación corto cuando es un solo nucleótido o un parche largo cuando se ven envueltos de 2 a 10 nucleótidos. Una vez que se forma un sitio AP la desoxirribosa-5'-fosfato es eliminada y reemplazada por un nuevo nucleótido. La enzima AP-endonucleasa corta la hebra de ADN que contiene el sitio AP, así un segmento de ADN y el sitio AP son removidos, la ADN polimerasa-I reemplaza el fragmento y la muesca es sellada por la enzima ADN ligasa (Figura 4) (Friedberg *et al* 1995, Nelson y Cox 2005, Sancar *et al* 2004).

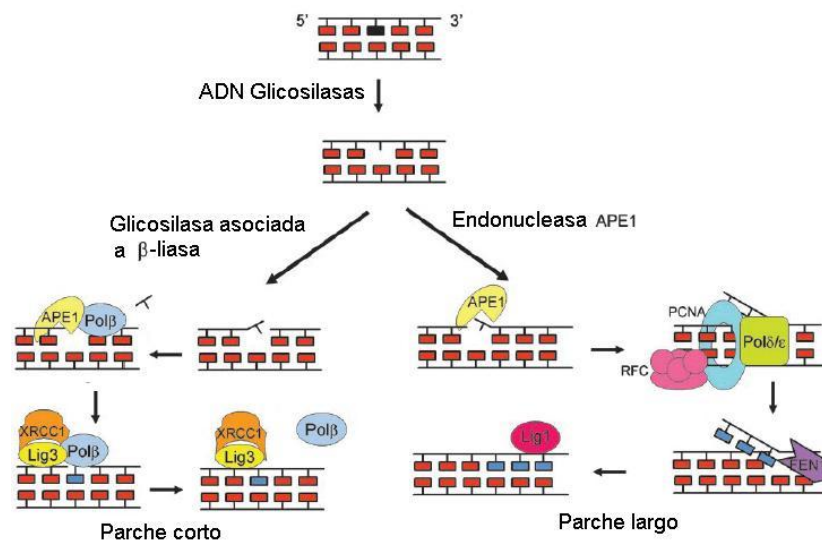


Figura 4. Esquema de la maquinaria de reparación por escisión de bases mostrando los parches de reparación corto y largo (modificado de Sancar *et al* 2004).

3. Reparación de escisión de nucleótidos

En este tipo de reparación una enzima hidroliza dos enlaces fosfodiéster, uno en cada lado de la distorsión provocada por el nucleótido dañado. En humanos el sistema de enzimas hidroliza el sexto enlace fosfodiéster de la cadena 3' y el enlace fosfodiéster en el lado 5', produciendo un fragmento de 27 a 29 nucleótidos. Así el oligonucleótido es separado formando una muesca el cual posteriormente es llenado por la ADN polimerasa- ϵ , la ADN ligasa cierra la muesca (Figura 5) (Sancar *et al* 2004, Nelson y Cox 2005, Wei *et al* 2007).

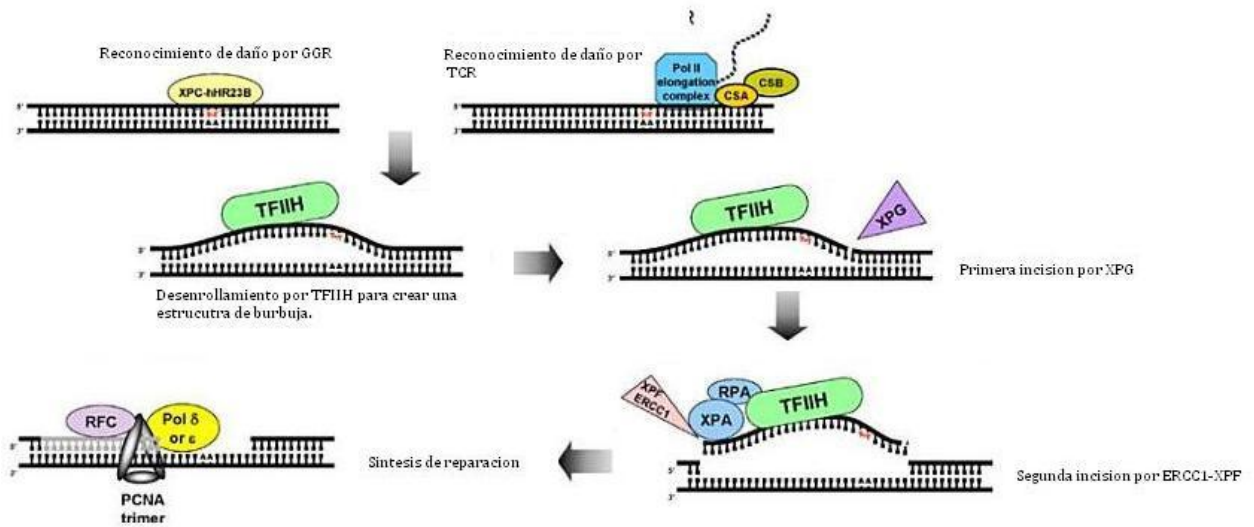


Figura 5. Mecanismo molecular de reparación por escisión de nucleótidos (modificado de Wei *et al* 2007).

4. Reparación de rompimientos de cadena doble

La reparación por recombinación es el mecanismo principal para la reparación de roturas de hebra doble. Dado que este tipo de lesiones afecta ambas cadenas del material genético, es particularmente difícil de reparar. La recombinación con secuencias de ADN homologas sobre un cromosoma sano proporciona un mecanismo de reparación de este tipo de daño y permite restablecer la secuencia normal de ADN.

Es posible también reparar directamente las uniones pero esto conlleva a una frecuencia de errores resultantes de la pérdida de bases en torno al punto dañado. Un modelo de recombinación genética conocido como modelo de Holliday propone que la recombinación se inicia mediante la introducción de cortes en la misma posición en las dos moléculas parentales. En cada corte de la cadena de ADN se desenrollan parcialmente, invadiendo cada una a la otra molécula por medio de la complementariedad con la hebra sin romper.

Este ligamiento es conocido como la unión o el intermediario de Holliday (Sancar *et al* 2004).

Una vez formada esta unión se pueden formar dos isómeros dependiendo de la orientación de la unión de Holliday. En el isómero resultante del intercambio de hebras inicial, las hebras cruzadas son aquellas que se rompieron al inicio del proceso de recombinación, en este caso, la progenie de moléculas contiene regiones heteroduplex pero no son recombinantes en el ADN que flanquea estas regiones. En el caso de que exista una rotación por parte de este isómero el corte y la unión de las hebras cruzadas dan como resultado una progenie de moléculas que son recombinantes en el ADN que flanquea las regiones heteroduplex (Cooper 2002).

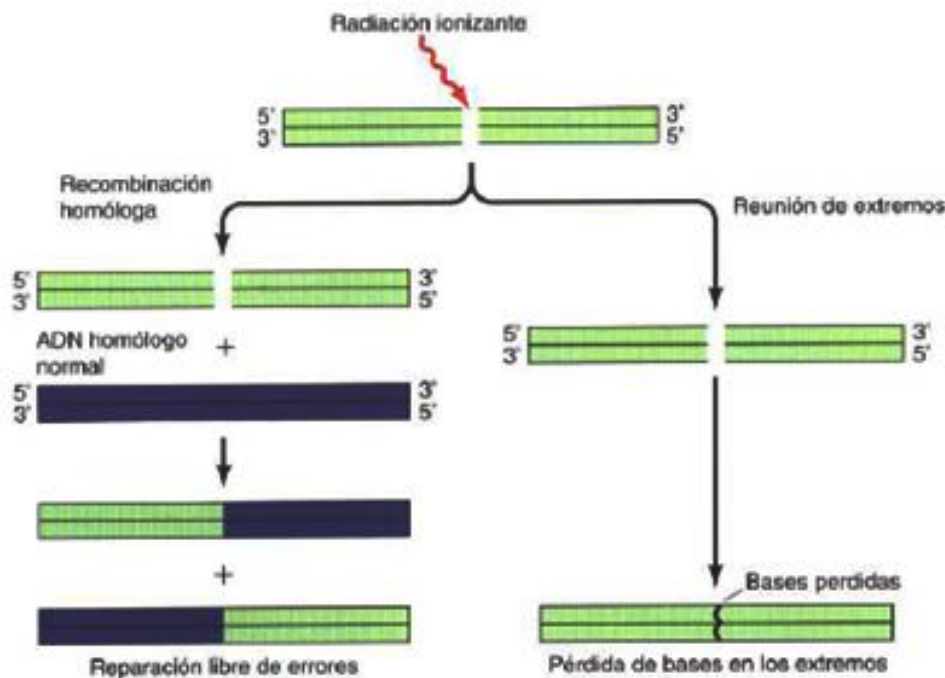


Figura 6. Esquema de la secuencia de reparación de rompimientos de cadena doble producidos por radiación ionizante o algún químico que tenga la facultad de producir este tipo de lesiones (tomado de Cooper 2002).

D. Pruebas para evaluar genotoxicidad

Dentro de las baterías de prueba para la evaluación de genotoxicidad se encuentra la prueba de aberraciones cromosómicas. Este término engloba a las alteraciones en la estructura de los cromosomas y modificaciones del número cromosómico. Para probar los posibles efectos genotóxicos de una sustancia, las células son cultivadas con el compuesto por un periodo de tiempo determinado. Después de este lapso de tiempo el cual debe ser

equivalente a 1.5 ciclos celulares, las células son fijadas y preparadas para el análisis cromosómico. Este análisis se lleva a cabo de manera clásica únicamente en células en metafase, ya que en esta etapa de la división celular los cromosomas se presentan en una forma muy compacta y son ideales para analizar su estructura en el microscopio (Brusick 1987, Ballantyne y Marrs 1993).

Otro recurso utilizado en las pruebas de evaluación genotóxica es la denominada prueba de micronúcleos. Este término refiere a los pequeños cuerpos extranucleares formados de cromatina, pueden ser fragmentos de cromosoma o cromosomas completos que no fueron integrados en el núcleo de una de las células hijas durante la división celular. Los micronúcleos son considerablemente más pequeños que el núcleo, por consiguiente pueden ser visualizados sin ningún problema con un microscopio óptico después de su tinción (Greim y Snyder 2008, Vaughan 2000).

Una más de las pruebas utilizadas es la tinción diferencial de cromátidas hermanas, en la cual existe intercambio de material genético entre las cromátidas del mismo cromosoma evento que sucede durante la síntesis del ADN. El intercambio se basa en rompimientos en la cadena de ADN de ambas cromátidas hermanas en sitios idénticos con la unión subsecuente de ambas moléculas en los sitios de rompimiento durante la replicación, de esta manera el intercambio es recíproco y usualmente no conlleva a la alteración de la secuencia del material genético. Para esta prueba las células son cultivadas en la presencia de un análogo de base, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante dos ciclos celulares. Como resultado la BrdU se incorpora en el ADN recién sintetizado tomando el lugar de la timina. Durante la metafase, cuando los cromosomas están presentes en su forma más condensada, las dos cromátidas se tiñen de forma diferencial, distinguiendo una cromátida de su hermana (Greim y Snyder 2008, Albert y Robert 1991).

Existen algunos otros métodos para evaluar genotoxicidad, uno de ellos es la electroforesis unicelular en gel o comúnmente llamado ensayo cometa, esta prueba ha mostrado ser muy confiable y posee una alta sensibilidad que permite la detección de daño en prácticamente cualquier tipo celular (Rojas *et al* 1999).

1. Ensayo cometa

La electroforesis unicelular en gel conocida como ensayo cometa, es una técnica experimental sencilla que permite evaluar rompimientos de cadena sencilla y doble entre otro tipo de lesiones en el ADN nuclear (Singh *et al* 1988, Collins 2004). El principio de esta técnica consiste en colocar células eucariontes individuales en una matriz de agarosa y someterlas a un campo eléctrico dentro de una solución amortiguadora a pH conocido, si el ADN está dañado y existen rompimientos en la cadena habrá un desplazamiento del material genético. Al observar las células al microscopio de fluorescencia, estas dan una apariencia de un cometa, con su cabeza (el núcleo) y una cola que contiene en este caso

fragmentos de ADN que se desplazan hacia el ánodo (Singh *et al* 1988, Collins 2004, Witte *et al* 2007).

En la última década el ensayo cometa ha ganado terreno y popularidad posesionándose como una prueba estándar para estudios de genotoxicidad, biomonitorio, ecogenotoxicología e incluso con ciertas modificaciones es utilizada para diferenciar entre células que mueren por apoptosis de las que mueren por necrosis, así como estudios de cinética de reparación del ADN (Moller *et al* 2000, Collins 2004), a demás, es muy útil como herramienta para evaluar genotoxicidad local en células de tejidos y órganos cuando no se puede realizar por otros métodos (Brendler-Schwaab *et al* 2005).

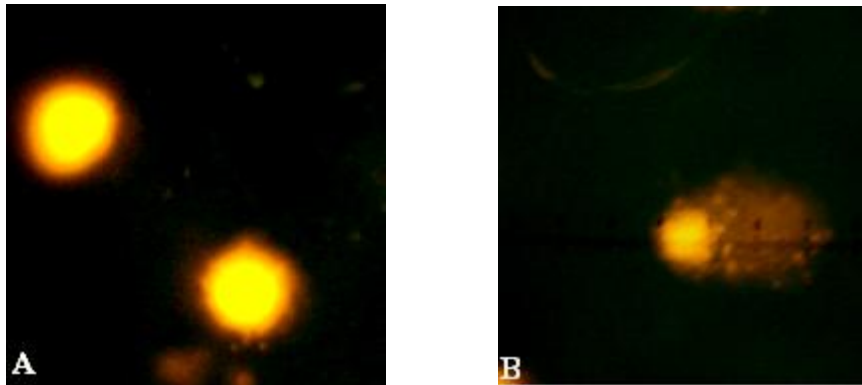


Figura7. Fotografías donde se muestran núcleos de linfocitos humanos sin daño (A) y núcleos con desplazamiento hacia el ánodo del material genético fragmentado (B) a 40 X.

Dentro de las ventajas que ofrece esta metodología una vez montada en el laboratorio es que es de bajo costo, fácil de llevar a cabo, con una alta sensibilidad, es sumamente rápida y no requiere grandes cantidades de muestra (Ellhueñe y Perez-Alzola 2004, Collins 2004, Siddique 2005, Brendler-Schwaab *et al* 2005).

El ensayo cometa es una excelente herramienta en diversos estudios, sin embargo, es importante considerar para que los resultados sean realmente fiables y cuantitativos un punto importante es estandarizar la metodología, esto nos brindara una medición del daño similar para todos los casos cada vez que se realice la técnica o nos brindara información clara de cuando algún aspecto del ensayo este cambiando.

E. Metales

La mayor parte de los elementos metálicos exhibe el lustre brillante que asociamos a los metales. Estos conducen el calor y la electricidad, son maleables y dúctiles son sólidos a

temperatura ambiente con excepción del mercurio. Los metales tienden a tener energías de ionización bajas y por tanto se oxidan cuando sufren reacciones químicas. Se utilizan con fines de construcción, fabricación de recipientes, conducción del calor y la electricidad (DEIMD 1988).

Muchos de los iones metálicos cumplen funciones biológicas importantes, por ejemplo el hierro, calcio, magnesio, sodio, potasio, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno, cromo, estaño, vanadio y níquel forman parte esencial de muchos sistemas biológicos. En el interior de la célula catalizan de muchas reacciones, funcionan como mediadores en el metabolismo y en el transporte de oxígeno, además estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales, entre otras funciones. Sin embargo, en concentraciones altas los organismos muestran poca adaptabilidad y algunos de estos producen efectos no deseados sobre las células y los organismos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Otros metales como el caso del talio no son esenciales y son considerados peligrosos para la salud humana y la vida silvestre por su elevada toxicidad (Singh 2005, Sherameti y Varma 2009).

F. Talio

El descubrimiento del talio (Tl) se llevó a cabo como consecuencia de una investigación premeditada. En el año de 1861 William Crookes extrajo selenio de lodos de depósito en cámaras de plomo que se utilizan para la fabricación de ácido sulfúrico. Destiló los residuos y supuso que había obtenido telurio, pero cuando los examinó en el espectroscopio observó una línea verde, a este nuevo elemento lo llamó talio debido a que asemejaba un tallo verde vegetal, del latín *thallus* (Ramsden 2007).

El Tl es un metal pesado considerado como contaminante ambiental y ocupacional por la agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (EPA 2009) y otras organizaciones mundiales (IPCS 1996, USCHPPM 2007), y del cual poco se conocen sus efectos tóxicos a nivel celular y genético. La Conferencia Americana de Higienistas Industriales (ACGIH, por sus siglas en inglés.) ha establecido un límite para la exposición de Tl en los sitios de trabajo, la cual es de 0.1 mg/m^3 parámetro que es aplicado para todos sus compuestos (Stokinger 1981).

Existen diversos compuestos de este metal, dentro de estos las sales inorgánicas de Tl son sumamente tóxicas para todos los sistemas biológicos, en el presente trabajo de tesis se evaluará el efecto de la sal acetato de talio sobre un modelo biológico *in vitro*.

El acetato de talio, de fórmula química CH_3OOTl , forma cristales blancos inodoros delicuescentes, con una densidad de 3.68 g/cm^3 , su peso molecular es de 264.4098 g/mol , tiene un punto de fusión de 129°C , a temperaturas muy altas empieza a descomponerse (Figura 8). Este sal es muy soluble en agua fría, también presenta solubilidad en alcohol y

cloroformo; es insoluble en acetona. El acetato de talio en solución acuosa da una solución que es básica, al realizar reacciones de neutralización con ácidos se libera muy poco calor, cuando este compuesto es expuesto al fuego produce humos que son tóxicos al ser inhalados (Vernugopal y Luckey 1978, Kazantzis 1986).



Figura 8. Estructura química del acetato de talio (CH₃COOTl) en estado sólido (A) y estructura química en solución acuosa (B) (tomado de <http://www.sigmaaldrich.com>, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1. Abundancia y propiedades fisicoquímicas

El Tl es un elemento metálico que se presenta en la corteza terrestre en una concentración de 0.1 a 1.7 mg/kg. Este elemento es principalmente encontrado en minerales como crookesita (TlCuAg₂Se), lorandita (TlAsS₂) y orbita (TlAs₂SbS₅) (Vernugopal y Luckey 1978, Kazantzis 1986).

En su estado elemental es más blando que el plomo, cuando esta recién fundido su blancura asemeja al estaño, tiene una densidad de 11.85 g/cm³, su peso molecular es de 204.37 g/mol, su punto de fusión y ebullición son de 303.5°C y 1457°C respectivamente. Al contacto con el aire forma una capa de óxido de Tl, este metal es muy reactivo, con vapor de agua forma hidróxido de talio, la reacción con alcohol caliente produce un etóxido, en combinación con el ácido sulfúrico produce sulfato de talio y con ácido nítrico puede producir nitratos de talio (TlNO₃ o Tl(NO₃)₃). Presenta dos estados de oxidación Tl⁺ y Tl³⁺, los compuestos 3+ son menos numerosos y poco estables, en tanto que los compuestos talio 1+ son los más numerosos y considerandos los más tóxicos para los animales y la vida silvestre (Repetto y Del Peso 2001).

2. Usos

El uso del Tl se estableció desde su descubrimiento (1861) época en la que se utilizó en la industria manufacturera de lentes y ha sido utilizado como remedio para diferentes enfermedades tales como la sífilis o tuberculosis (Ramsden 2007). El uso más común es en pesticidas como rodenticidas, insecticidas y nematocidas, en algunos países de Norteamérica y Europa ha sido prohibido para estos fines (Carson *et al* 1987, EPA 2009),

sin embargo, en muchos otros países se siguen preparando venenos a base de Tl. En nuestro país existían preparados comerciales llamados pasta de zelio y el Rat-Kill que contienen sulfato de talio en la proporción de 2 y 1 por ciento respectivamente, y aunque en la actualidad está prohibida dicha sustancia se sospecha que de manera clandestina se sigue fabricando raticidas y plaguicidas a base de este metal (Guerra y Martinez 1990). El amplio uso dado como rodenticida ha causado la muerte de muchos animales domésticos, así como en el ser humano (Kazantzis 1986, Repetto y Del Peso 2001).

A demás, el Tl se emplea en la fabricación de varias aleaciones, así como, en la fabricación de celdas fotoeléctricas, cristales altamente reflexivos y de bajo punto de fusión, interruptores eléctricos y en sellos que trabajan a temperaturas bajo cero, termómetros de bajo rango, fuegos artificiales, en la manufacturación de gemas sintéticas, y como catalizador de síntesis química (USCHPPM 2007).

3. Concentraciones en agua, aire y suelo

La fuente principal de Tl en el medio ambiente son las filtraciones ocurridas en los procesos de mineralogía, la mayor concentración de Tl en agua, suelo y emisión de gases proviene de fabricas cementeras y plantas de energía a base de carbón (Kazantzis 1986).

Una vez depositados en la tierra o en el agua, el Tl y sus compuestos no se volatilizan, sin embargo es posible una dispersión del suelo contaminado cuando está seco. El Tl puede filtrarse a los mantos acuíferos y/o puede ser absorbido por las plantas por medio de su sistema radical. El grado de infiltración depende de la composición y del pH del suelo, un incremento en la acidez corresponde a una mayor infiltración (USCHPPM 2007).

Los niveles de Tl en el agua de lugares no contaminados son bajos. En la literatura los niveles de Tl en agua marina contienen de 0.01 a 0.02 $\mu\text{g/l}$, para el agua proveniente de ríos el rango está entre 0.01 a 1 $\mu\text{g/l}$. En regiones con cierta actividad volcánica se han hecho mediciones con bajas concentraciones de este metal (0.25 $\mu\text{g/l}$), en cuanto a aguas hidrotermales se han realizado estimaciones las cuales arrojan un límite de 0.6 $\mu\text{g/l}$. En el caso de algunas filtraciones de zonas lacustres este metal ha sido medido en concentraciones superiores a 0.41 $\mu\text{g/l}$ (Frattini 2005, Karlsson 2006).

En el agua de lugares contaminados con Tl, para el caso de areas en las cuales existe actividad industrial las concentraciones varían y tienden a alcanzar valores altos. Una concentración máxima de 2.4 mg/l han sido reportados por aguas residuales, a demás en el agua superficial en la cercanía de estas regiones industriales la concentración de Tl ha sido reportada en el rango de 1 a 100 mg/l. En zonas con actividad minera se han encontrado valores de 0.7 a 88 $\mu\text{g/l}$ en ríos ubicados en Nueva Inglaterra en la provincia de Brunswick. En tres plantas de tratamiento de aguas residuales en Massachusetts, las cuales no reciben

agua de tipo industrial las concentraciones de talio fueron menores a 5 $\mu\text{g/l}$ (Frattoni 2005, Karlsson 2006).

En el aire el principal agente contaminante son las cenizas provenientes de las plantas de energía a base de carbón, existe una estimación de la cantidad de Tl liberada a la atmosfera la cual es de 27 toneladas en promedio para el año de 1987 (Frattoni 2005).

Se han reportado concentraciones de Tl en el rango de 29 a 76 $\mu\text{g/g}$ en cenizas arrojadas a la atmosfera por plantas de energía, estas concentraciones están consideradas como representativas para ocho diferentes estados de Norteamérica en donde existen plantas energéticas de este tipo (Frattoni 2005, Kazantzis 2000).

Existen valores medios para estimar las partículas de Tl por metro cubico en el aire, para Europa se ha estimado que es de 0.06 ng/m^3 y 0.22 ng de Tl/m^3 para Norteamérica, otro autor da una cifra diferente la cual está en el rango de 0.1 a 30 ng de Tl/m^3 para Estados Unidos de Norteamérica, también se evaluó el aire de seis grandes ciudades en los estados unidos y estas evaluaciones arrojaron el siguiente rango 0.04 a 0.1 $\text{ng de Tl por metro cubico}$ (Frattoni 2005, Kazantzis 2000).

En suelo de jardines domésticos el Tl se encuentra en concentraciones de 0.12 mg/kg (Kazantzis 1986, Vernugopal y Luckey 1978) en tanto que suelos provenientes de una planta cementera ubicada en Lengerich Alemania, la medición en los sedimentos de ríos y arroyos ubicados en las proximidades se encontró que a un kilómetro de distancia de la fabrica existe una concentración de Tl de 18 mg/kg , cuando se muestrearon los sedimentos del arroyo ubicados a cuatro kilómetros de la cementera la concentración de este metal disminuyo a 8.7 mg/kg , al analizar los sedimentos del río Glane en el cual este arroyo desemboca se obtuvieron valores de 7.5 mg/kg (Karlsson 2006, Heim 2002).

En la República de China se reporta un caso de intoxicación crónica debido a la dispersión de grandes cantidades de desechos provenientes de minas de mercurio y carbón, se midieron los niveles de Tl presente en el suelo de los jardines de las personas intoxicadas, la cantidad de este metal encontrada fue de 28 a 61 mg/kg con una media de 43 mg/kg , en lo que respecta al suelo de las familias no afectadas presento concentraciones de 6 a 11 mg/kg con una media de 8 mg/kg (Heim 2002).

El incremento del uso del Tl para actividades industriales se ha vuelto más común colocando este metal como un agente contaminante a larga escala, este catión tiene la propiedad de fijarse fuertemente al suelo (Carson *et al* 1987), como consecuencia de esto las concentraciones de este metal que llegan a los productos agrícolas es mayor (Ouameur *et al* 2003, Radic *et al* 2009).

4. Toxicidad

Desde inicios de su descubrimiento se ha reconocido al Tl como un agente extremadamente tóxico, este metal hoy en día es considerado como un catión que tiende a acumularse en tejidos y es tóxico para todos los organismos, e incluso su toxicidad es comparable a la de metaloides y metales muy estudiados como el arsénico, plomo y mercurio. De hecho el Tl no es necesario en ningún proceso biológico en el hombre, en algún otro animal o planta (Vernugopal y Luckey 1978, Repetto y Del Peso 2001, Galvan-Arzate *et al* 2005).

Los síntomas por envenenamiento de talio varían según la edad, dosis y agudeza de la intoxicación, en general los síntomas que se manifiestan más comúnmente son polineuritis, desordenes gastrointestinales, neuritis retrobulbar, alopecia y encefalopatía (Vernugopal y Luckey 1978, Downs 1993).

La sintomatología en casos agudos por la exposición en altas dosis orales se encuentran las hemorragias gastrointestinales, gastroenteritis, sabor metálico en la boca, salivación, náusea y vomito. En cuanto a síntomas neurológicos se presenta, delirio, alucinaciones, convulsiones, dolor en las extremidades, debilidad muscular y el estado de coma se presenta al segundo o tercer día. Se ha reportado que del quinto al séptimo día después del la ingesta de Tl las personas que mueren es a causa de falla respiratoria (Cornelis 2005).

En cuanto a la toxicidad crónica y subcrónica podemos decir que está asociada con la acumulación del metal en los tejidos, así pues en cualquier momento el Tl acumulado en los tejidos puede ser liberado y de esta forma presentarse síntomas de intoxicación aguda, como consecuencia los síntomas de la intoxicación crónica son muy variables (Venugopal y Luckey 1978, Repetto y Del Peso 2001). Excitación e insomnio son los síntomas iniciales. Después de semanas o meses de exposición se presenta dolor en las articulaciones (tobillos, rodillas y la espina dorsal), debilidad y polineuritis, sin embargo uno de los síntomas característicos en el humano es la presencia de alopecia que se presenta a los 10 días seguido de una pérdida de pelo completa transcurridos 30 días (Kazantzis 1986).

Se ha determinado la dosis letal media (LD₅₀) de varias sales de talio en mamíferos pequeños como cerdos de guinea, conejos, rata, ratón y perros, esta se encuentra en el rango de 15 a 50 mg de Tl/kg de peso. En particular para el caso del **acetato de talio** se tiene que la LD₅₀ en ratones por vía oral es de 35.2 mg/kg, en ratas por la misma vía de administración es de 41.3 mg/kg y por vía intraperitoneal es de 29.6 mg/kg (Venugopal y Luckey 1978, Repetto y Del Peso 2001).

5. Biocinética: exposición, absorción, distribución y excreción en mamíferos y humanos

Las fuentes de exposición más importantes para la población en general son las emisiones de aire provenientes de las plantas generadoras de energía a base de carbón y las fundidoras de cobre, plomo y zinc. La contaminación de agua potable por Tl puede ocurrir también en los alrededores de las minas de cobre, zinc y cadmio. Existen casos de envenenamiento por Tl al consumir vegetales y frutas cultivadas en las cercanías de fábricas cementeras. En el caso de alimentos, pequeñas cantidades de este elemento pueden entrar en la cadena trófica por fertilizantes a base de potasio, pero las concentraciones no son muy altas. Debido a la similitud química con el potasio este catión es fácilmente asimilado en las plantas y de esta forma entra en la cadena alimenticia; existen casos en los cuales el consumo de vegetales y frutas contaminadas ha dado como resultado niveles de Tl en orina de 75 µg/l siendo los niveles normales 2 µg/l (Venugopal y Luckey 1978, Ramsden 2007).

No importando la ruta de contacto o administración, la absorción de Tl se lleva a cabo de forma muy rápida, por medio de las mucosas en boca, pulmón y tracto digestivo; además el Tl puede ser absorbido por la piel, la razón es que las membranas celulares no tienen barreras para los iones de Tl ya que este catión es muy similar al sodio en carga y tamaño iónico y las células no pueden distinguir de un ion y otro. Por lo anterior, en la primera hora después de la exposición en personas y animales de experimentación se puede encontrar residuos de Tl en la orina. Una vez absorbido una parte es retenida por los eritrocitos de la sangre y el resto es distribuido a todos los tejidos del cuerpo (Venugopal y Luckey 1978, Kazantzis 1986, Repetto y Del Peso 2001).

Los estudios en rata muestran que el Tl se acumula en grandes cantidades en riñón, seguida de los huesos, hígado, pulmón, bazo y cerebro, además la mucosa gástrica e intestinal, el páncreas, las glándulas salivares, en los folículos pilosos y los globos oculares acumulan el metal en cantidades apreciables. El sistema nervioso central después de varios días de la administración presenta niveles comparables a los encontrados en el hígado (Venugopal y Luckey 1978, Repetto y Del Peso 2001).

Una fracción significativa del Tl en plasma atraviesa la barrera placentaria, la barrera hematoencefálica y gonadal. En mamíferos este catión es eliminado de forma lenta y prolongada, la excreción es principalmente urinaria y fecal, en menor cantidad en sudor, leche y lagrimas (Kazantzis 1986, Downs 1993, Repetto y Del Peso 2001).

6. Mecanismo de acción

El conocimiento del mecanismo de la toxicidad del Tl no es claro; al igual que otros metales pesados tienen afinidad por los grupos sulfhídricos de proteínas y de las membranas

mitocondriales, de esta forma inhiben una serie de reacciones enzimáticas lo que provoca cambios en la homeostasis celular, hasta la muerte (Ramsden 2007).

Como se menciona con anterioridad, la entrada del Tl a los sistemas biológicos es a través de los canales iónicos, los iones de Tl^+ poseen un radio de 1.54 \AA que es similar al radio iónico del potasio (K^+ , 1.44 \AA), donde el intercambio entre estos dos iones se lleva a cabo en todo el organismo debido a su similitud entre ambos cationes tanto en carga como radio iónico. Dicho intercambio interfiere con la fosforilación oxidativa inhibiendo el complejo enzimático Na^+/K^+ y en células nerviosas puede interferir con la función de los neurotransmisores provocando severos trastornos sobre sistema nervioso (Repetto y Del peso 2001, Cornelis 2005).

7. Efectos teratogénicos del Tl

Existen muy pocos estudios acerca de la teratogenesis de los compuestos de Tl y los existentes no arrojan evidencias contundentes sobre sus efectos. Un estudio de 297 nacimientos de una población expuesta al metal no generó un incremento en los defectos al nacer. Además hay un número de casos que reportan ingestiones agudas en humanos durante el embarazo, en el cual no hay mención de anomalías congénitas (Seiler 1994). Sin embargo, se tiene conocimiento de aumento de muertes embrionarias y malformaciones congénitas en la descendencia de trabajadores laboralmente expuestos y de personas que habitan cerca de cementeras (IPCS 1996, Hoffman 2000).

8. Mutagénesis y genotoxicidad del Tl

Se han reportado casos en los cuales personas de forma accidental han sufrido envenenamiento por Tl en dosis que van de 25 a 2700 $\mu\text{g/l}$, como consecuencia presentan aberraciones cromosómicas estructurales, en otro estudio se observó que la administración de Tl en dos pacientes mostró un incremento significativo en la presencia de micronúcleos (Yildirim *et al* 2006).

En estudios efectuados con dos sales inorgánicas de Tl^+ se obtuvieron resultados negativos en cuanto al efecto genotóxico de estas sales por medio de la técnica llamada ensayo de reparación por recombinación, sin embargo estos estudios no demuestran ser significativos para determinar los riesgos sobre la genotoxicidad de este metal, debido a que diversas instituciones consideran que hubo fallas en la metodología empleada. Otro experimento se condujo usando las mismas sales, en el cual se observó un incremento en la transformación de células embrionarias de hámster utilizando un adenovirus de simio SA7 (Leónard y Gerber 1997).

Actualmente dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (FES-Zaragoza) se realizan diversos estudios *in vivo* y *in vitro* con sales de Tl ya que los

estudios de la literatura son escasos y no muestran la capacidad que tiene este metal de afectar la segregación de cromosomas durante la división celular, así como producir aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas y daño al ADN.

II. JUSTIFICACIÓN

El Tl es considerado uno de los cationes metálicos más tóxico del cual hasta el momento no se ha descrito su necesidad en algún proceso biológico. Es considerado como un contaminante ambiental y ocupacional, a demás de que su uso en varios países como pesticida ha provocado muchos accidentes que llegan a ser fatales, de este modo los sistemas biológicos no están exentos de algún tipo de exposición a este metal. Por tal motivo es importante realizar estudios que nos den información que nos ayude a comprender sus efectos tóxicos a nivel celular y genético. La técnica comúnmente llamada “ensayo cometa” es una excelente herramienta para medir rupturas de cadena sencilla y de cadena doble así como otro tipo de lesiones en el ADN, a demás de que es considerada sensible para detectar diversos tipos de daño al ADN, reproducible y requiere de un número pequeño de células de cualquier tejido u órgano.

Por lo dicho anteriormente se propuso estudiar el daño que puede provocar el acetato de talio sobre la molécula de ADN, usando como modelo de prueba los leucocitos humanos de sangre periférica.

III. HIPÓTESIS

Parte de la toxicidad del talio es producto de la competencia o inhibición de cationes esenciales como el potasio o el sodio. Algunos autores colocan al talio como agente capaz de dañar la célula y el material genético, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual puede inducir este efecto. Se conoce que las lesiones al ADN originan rupturas sobre el mismo, por lo tanto si esto sucede en células de sangre periférica humana expuesta *in vitro* al acetato de talio, entonces podemos esperar que este catión incremente el daño al ADN.

IV. OBJETIVOS

A. General

Evaluar el efecto sobre la viabilidad y el daño al ADN inducido por el acetato de talio en leucocitos de sangre periférica tratados *in vitro* durante una o dos horas.

B. Particulares

- Evaluar la viabilidad celular de los leucocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de acetato de talio.
- Estimar la capacidad del acetato de talio de inducir daño al ADN por medio de la técnica de electroforesis unicelular en gel a pH>13.
- Estimar la capacidad del acetato de talio de inducir daño al ADN por medio de la técnica de electroforesis unicelular en gel a pH 12.1.
- Determinar qué tipo de lesiones predominan en el ADN dañado por al acetato de talio, comparando los datos de ambas versiones de electroforesis unicelular en gel.
- Encontrar las diferencias estadísticas entre los diferentes parámetros evaluados.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

A. Obtención de las muestras

Se obtuvo sangre periférica por venopunción con una jeringa previamente heparinizada, de cuatro varones adultos, clínicamente sanos y no fumadores.

B. Tratamiento

Se colocaron 40 μ l de sangre completa en tubos eppendorf con 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 y las siguientes concentraciones; 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 μ g/ml del compuesto acetato de talio (CH_3OOTl con 99% de pureza, CAS 563-68-8). Las muestras se incubaron por un periodo de tiempo de 1 ó 2 horas a 37°C, después las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm, se colectó el botón celular y se dividió en dos partes: 20 μ l se utilizaron para las pruebas de viabilidad y 20 μ l para realizar el ensayo cometa. Se contó con un testigo negativo al cual no se le dio ningún tratamiento y también se contó con un lote experimental tratado 15 minutos a 4°C con 200 μ M peróxido de hidrógeno, el cual se utilizó como testigo positivo. En todos los casos los experimentos se hicieron por duplicado.

C. Prueba de viabilidad

Para cada muestra de cada tratamiento se evaluó la viabilidad celular, se utilizaron dos colorantes fluorocromados; bromuro de etidio (0.025 μ g/ μ l) y 5-6 diacetato de carboxifluoresceína (0.125 μ g/ μ l) de acuerdo a la técnica descrita por Strauss 1991. Brevemente, las soluciones de ambos colorantes se mezclaron en una proporción 1:1 y en los 20 μ l de las muestras destinadas para viabilidad se adicionaron 20 μ l de los fluorocromos, las muestras se re-suspendieron y se incubaron 10 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se agregó 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640, se re-suspendió se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, esto con el fin de eliminar el exceso de colorante, este paso se repitió tres veces. Todos estos pasos fueron llevados a cabo con luz amarilla. Finalmente las preparaciones se observaron a doble ciego en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 con una longitud de onda de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm (filtro verde), se evaluaron 100 células donde se distinguieron las células viables que tiñen de verde, de las no viables las cuales su núcleo tiñe de rojo.

D. Ensayo cometa pH >13

En portaobjetos totalmente esmeriladas y con ayuda de un cubreobjetos se colocó una capa uniforme de agarosa de punto normal de fusión al 1% (500 mg en 50 ml de PBS), posteriormente se mezclaron 75 μ l de agarosa de punto bajo de fusión al 0.5% (250 mg en 50 ml de PBS) y 10 μ l del botón celular a 37 °C, con esta mezcla se formó una segunda capa. Una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión fue colocada. Se mantuvieron en

frio las laminillas (4 °C) para solidificar cada capa, colocando un cubreobjetos para de esta manera homogenizar cada capa.

Posteriormente las laminillas fueron sometidas a una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10, se adiciono un detergente suave Triton X-100 al 1% y DMSO al 10%) preparada en el momento a 4 °C, se mantuvieron en esta solución por un periodo de tiempo no menor a 1 hora. Este proceso disgrega las membranas lipídicas de las células y las interacciones existentes entre el ADN con las proteínas nucleares dejando libre la molécula de ADN. El siguiente proceso consiste en la desnaturalización del material genético para ello se colocaron las laminas en una cámara de electroforesis horizontal, las laminas fueron embebidas en una solución amortiguadora (NaOH 300 mM y EDTA 1mM a pH >13) durante 20 minutos para desnaturalizar el ADN, al terminar este periodo de tiempo se inicio el proceso de electroforesis a temperatura ambiente durante 20 minutos a 25 voltios y 300 miliamperios. Este proceso se llevo a cabo en completa oscuridad o con luz amarilla. A continuación las laminas se colocaron en una solución de Tris (0.4 M a pH 7.5) para neutralizar las condiciones alcalinas, se realizaron dos cambios de 5 minutos cada uno. Al final se deshidrataron las preparaciones con etanol al 70% durante 5 minutos y después se realizo un cambio a etanol al 90% durante 5 minutos y posteriormente se dejaron secar al aire (Collins 2004, Singh et al 1988).

Para realizar la evaluación al microscopio de fluorescencia las preparaciones fueron teñidas con 75 µl de una solución de bromuro de etidio con una concentración de 20 µg por ml de PBS. La migración de ADN se midió mediante una escala ocular (400x) adaptada al microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2) equipado con un filtro de G-2a. Las laminillas se evaluaron a doble ciego cuantificando 100 células por tratamiento por donador.

E. Categorías de daño

Se caracterizaron cinco tipos de daño, las categorías de daño son dependientes del promedio de la longitud del núcleo, donde los núcleos íntegros son catalogadas como “sin daño”, núcleos con una migración de ADN igual o menor que el diámetro de un núcleo se catalogo como “daño bajo”, núcleos con migración de hasta dos veces el diámetro de un núcleo se catalogo como daño medio, cuando la migración del material genético sobrepasa los dos núcleos de longitud se catalogo como daño alto, cuando existió una dispersión de todo el material genético y no se distingue un núcleo bien definido se caracterizo como daño severo.

F. Ensayo cometa a pH 12.1

Para esta versión del ensayo fue necesario ajustar el pH de la solución buffer, esto se logro pipeteando HCl concentrado a la solución buffer hasta alcanzar el pH de 12.1. El método siguiente fue exactamente igual al descrito arriba, se desnaturaliza el ADN por 20 minutos en la solución buffer, concluido este tiempo se procede a correr las preparaciones en la cámara de electroforesis por 20 minutos a 25 voltios y 300 miliamperios (Figura 9).

G. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de la compañía de químicos Sigma (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) a excepción del peróxido de hidrogeno y el hidróxido de sodio (JT Baker de México S.A. de C.V.), el medio de cultivo (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

H. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la viabilidad celular fueron sometidos a la prueba estadística de *ji* cuadrada, para las categorías de daño se utilizo la prueba antes mencionada, los resultados de la electroforesis unicelular en gel fueron analizados con el *análisis de varianza* seguido de una prueba de *Tukey*, con la cual se compara al grupo testigo contra los diferentes tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizo el paquete SPSS versión 13.

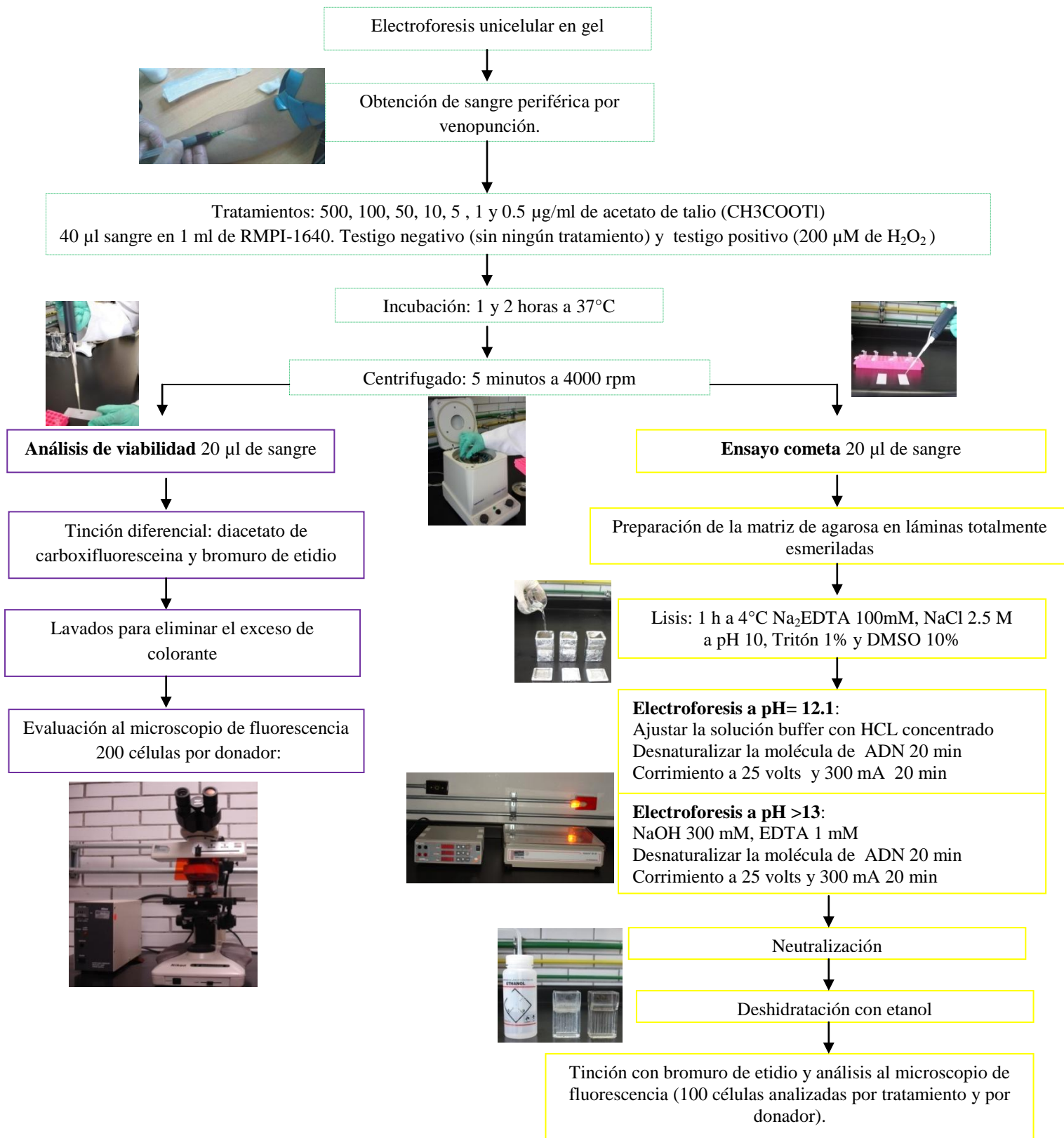


Figura 9. Metodología de viabilidad celular y ensayo cometa.

VII. RESULTADOS

A. Viabilidad Celular

En el Cuadro I se muestran los resultados de viabilidad de las células expuestas durante una y dos horas a las diferentes concentraciones de acetato de talio, además el promedio de viabilidad y el error estándar de cada tratamiento; también se aprecia el valor del testigo negativo al que no se le aplicó ningún tratamiento (0 µg/ml) y del testigo positivo tratado 15 minutos con 200 µM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los donadores fueron varones clínicamente sanos, sin historia reciente de exposición a alguna droga o radiación terapéutica, además, para el manejo de los datos a los donadores se les asignaron letras: A, B, C, y D; de 32, 24, 27 y 25 años de edad, respectivamente.

Cuadro I. Viabilidad celular de leucocitos humanos tratados *in vitro* durante 1 o 2 horas con acetato de talio (CH₃COOTl).

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	% de viabilidad *				Promedio de viabilidad ± E.E.
	Donador A	Donador B	Donador C	Donador D	
<i>1 hora</i>					
0 (testigo)	96.02	93.54			95.00 ± 0.12
0.5	93.53	97.09			95.50 ± 0.17
1	90.64	93.54			92.50 ± 0.14
5	91.00	89.00			90.00 ± 0.09
10	87.56 ^a	92.05			90.00 ± 0.22
50	80.89 ^c	91.87			86.50 ± 0.54
100	92.47	83.12 ^b			87.50 ± 0.46
500	93.50	83.99 ^a			89.00 ± 0.47
H ₂ O ₂	95.00	84.69 ^a			90.00 ± 0.51
<i>2 horas</i>					
0 (testigo)			96.53	97.01	97.00 ± 0.02
0.5			97.62	96.50	97.50 ± 0.05
1			98.01	77.49 ^c	87.50 ± 1.02
5			90.59	88.00 ^b	89.50 ± 0.12
10			89.00 ^a	99.02	94.00 ± 0.50
50			97.11	99.02	98.00 ± 0.09
100			87.50 ^b	97.06	92.50 ± 0.47
500			83.38 ^c	95.15	89.00 ± 0.58
H ₂ O ₂			88.05 ^b	91.73	90.00 ± 0.18

* Valores dados en porcentaje de 200 células analizadas por tratamiento de cada donador

H₂O₂ en 200 µM

^a P < 0.05, ^b P < 0.025, ^c P < 0.005 con respecto a su testigo

La viabilidad fue evaluada con la técnica dual de colorantes fluorescentes, con la cual al microscopio de fluorescencia se distinguieron las células vivas que tiñen de color verde de las no viables que colorean su núcleo de color rojo. Los datos muestran, que después de una o dos horas de tratamiento con el acetato de talio, la viabilidad celular baja con diferencias estadísticas en algunas de las concentraciones, por ejemplo, en una hora en 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ para el donador A y en 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del donador B, mientras que, en los tratamientos dos horas en 10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$ para el donador C y en 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para el donador D. Sin embargo, al realizar el análisis en cada tiempo (una o dos horas), los datos promedio no muestran cambios considerables en la viabilidad celular. La razón de evaluar la viabilidad en una hora para el donador A y B con respecto a dos horas en el donador C y D, fue debido a que estudios preliminares que se hicieron en el laboratorio, al incubar las células con el compuesto de talio, no mostraron variaciones estadísticas independientemente del tiempo al que fueron expuestas las células.

En relación a los resultados obtenidos en los tratamientos durante 15 minutos con 200 μM de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), no se observaron cambios considerables al promediar los datos de viabilidad de dos de los donadores.

B. Ensayo cometa a pH >13

Los resultados del ensayo cometa a pH > 13 de las células no tratadas y tratadas durante una o dos horas con talio, se presentan en los Cuadros II, III, IV, V y en las Figuras 10, 11 y 12.

En los cuadros se presentan los datos por donador, en ellos se muestra el porcentaje de células en cada una de las categorías de daño y la media de la longitud de la migración del ADN con su error estándar, del mismo modo se muestran los datos de las células tratadas durante 15 minutos con peróxido de hidrógeno. Con respecto a este último, como se menciono en la sección de material y métodos el H_2O_2 es un químico que causa daño al ADN y en todos los casos dio positivo para esta prueba como era de esperarse.

En el cuadro II, se muestran los datos obtenidos de la evaluación del daño inducido al ADN sobre los leucocitos de sangre completa del donador A por el acetato de talio. Las células fueron expuestas durante 1 o 2 horas al compuesto y posteriormente procesadas con la técnica de electroforesis unicelular en gel a pH > 13. En este cuadro, en la columna de categorías de daño se aprecia disminución del porcentaje de células sin daño, lo anterior en ambos tiempos de exposición en todos los tratamientos con talio, concomitantemente se incrementa el porcentaje de células con daño bajo, daño medio, daño alto y daño severo; además se pueden apreciar algunas diferencias estadística, las cuales se dan desde la concentración más baja (0.5 $\mu\text{g/ml}$). En relación a la media de la migración del ADN se puede observar que la longitud de la cola del cometa se incrementa de dos a cinco veces en

los núcleos de las células tratadas con el acetato de talio respecto a su testigo, ya sea con 1 o 2 horas de exposición, y con diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos.

Los datos obtenidos con las muestras del donador B se muestran en el cuadro III. Los resultados presentan un comportamiento parecido al del donador A, en la categoría de daño disminuye el porcentaje de los núcleos intactos y se incrementan los núcleos que caen en las categorías de daño medio a daño severo, con cambios estadísticos en 1 o 2 horas de exposición a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de talio o mayores. La longitud de la migración también se incrementa en presencia del agente químico, sin embargo las significancias se dan únicamente en 50 $\mu\text{g/ml}$ en una hora de exposición y en 5 $\mu\text{g/ml}$ para dos horas. Para las dosis restantes el promedio de migración de ADN no muestra diferencias estadísticas en ninguna de ellas, esto es reflejo del número de células que se encuentran en la categoría de daño severo debido a que estas son excluidas del análisis. Al someter los leucocitos durante una hora al compuesto solo dos dosis presentan valores significativos, siendo estas las que presentan el mayor incremento en la migración de ADN y los errores estándar más amplios en este cuadro. De forma similar al proporcionar dos horas de incubación a los leucocitos solo un valor es diferente estadísticamente correspondiendo a este evento el mayor valor de migración de ADN y error estándar más amplio en su categoría.

Para el caso del tercer individuo, donador C, el análisis de las células expuestas a las concentraciones del metal en comparación con las de los grupos testigo muestran baja respuesta, únicamente se dan diferencias en dos de los tratamientos (Cuadro IV). En una hora a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y en dos horas a 10 $\mu\text{g/ml}$, para estos dos eventos el número de células con daño aumenta ($P < 0.025$), presentan el valor más alto en la migración de ADN ($P < 0.005$) y la amplitud de sus errores estándar son los más notables del cuadro.

El donador D presenta un comportamiento particular (Cuadro V). En los tratamientos de 1 hora los núcleos en la categoría de daño medio y alto se incrementan notablemente, en particular de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ situación que no se observa cuando las células son expuestas por 2 horas, sin embargo en ambos tiempos de incubación la cantidad de núcleos con daño aumenta desde la concentración más baja (5 $\mu\text{g/ml}$ con $P < 0.05$) y se mantiene en el resto de los tratamientos (con significancia en la mayoría de las concentraciones), con excepción de 500 $\mu\text{g/ml}$ a 2 horas. Dicho comportamiento se refleja en la longitud de la migración de la cola del cometa donde los cambios estadísticos se dan de 10 hasta 500 $\mu\text{g/ml}$ a 1 hora y a pesar de que no hay significancia en 2 horas la mayor longitud de migración del ADN se observa en concentraciones bajas y medias (con excepción del tratamiento de 500 $\mu\text{g/ml}$) de acetato de talio.

Independientemente del donador y el tiempo de tratamiento con talio el porcentaje de células sin daño disminuye a la par que incrementan las células en las diferentes categorías

de daño. Lo anterior se puede verificar al realizar el análisis del conjunto total de datos que se presenta en la figura 10 y 11. En estas figuras se muestran los porcentajes de células en cada categoría de daño correspondiente a los cuatro donadores con 1 o 2 horas de tratamiento, respectivamente; se muestra además su error estándar y cálculos estadísticos. En ambas figuras disminuyen las células sin daño e incrementan las células en las diferentes categorías de daño, donde las células con daño alto y daño severo se incrementan de manera importante.

Por otra parte la figura 12 describe el comportamiento del promedio de la migración de ADN de los datos de los cuatro donadores con 1 o 2 horas, donde, además en cada barra se trazo su error estándar y se muestra la estadística. Primeramente al observar las barras correspondientes a una hora de exposición al compuesto es fácil observar el cambio en el patrón de daño desde la primera concentración (0.5 $\mu\text{g/ml}$) en la cual se triplica el valor con relación al grupo testigo ($P < 0.005$). Las siguientes dos concentraciones (1 y 5 $\mu\text{g/ml}$) presentan una ligera baja del daño con respecto a la concentración anterior alcanzando un aumento de dos veces con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$) y nuevamente elevándose el valor correspondiente a 10 $\mu\text{g/ml}$, arroja el mismo comportamiento que la dosis más baja (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y manteniéndose a la alza en las en las concentraciones mayores (50, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) de acetato de talio.

Cuando los leucocitos fueron expuestos durante dos horas al acetato de talio (Figura 12) se observo un aumento que resulta significativo en todas las concentraciones y que alcanza a duplicar el daño comparándolo con el valor del testigo en la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, con una tendencia a incrementarse el daño con la concentración hasta 10 $\mu\text{g/ml}$, manteniéndose una meseta en concentraciones altas (50, 100 y 500 0.5 $\mu\text{g/ml}$) de talio.

C. Ensayo cometa a pH 12.1

Para esta versión del ensayo a pH 12.1, los resultados se muestra el cuadro VI y en las figuras 13 y 14. El cuadro muestra el porcentaje de células en cada categoría de daño y el promedio de la longitud de la migración de ADN con su error estándar de dos de los donadores, A y B. Para esta prueba, a pH 12.1, solo se evaluó el químico con una hora de exposición debido a que es el tiempo donde se encontró mayor daño, con respecto a dos horas. En la figura 13 podemos observar la distribución promedio de células de los dos donadores en cada categoría de daño, mientras que en la figura 14 se muestra el promedio de la migración de ADN de los dos donadores con su error estándar y sus diferencias estadísticas.

La evaluación a pH 12.1 muestra que en los tratamientos con talio disminuye el porcentaje de los núcleos sin daño e incrementan los núcleos en las diferentes categorías de daño tanto para el donador A como para el B, con diferencias en concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ o mayores (Cuadro VI). En cuanto a la longitud de la migración se incrementa en todas las

concentraciones, sin embargo las diferencias estadísticas aparecen solo en algunas correspondiente solamente al donador A (Cuadro VI); de manera similar a los resultados de la evaluación a $\text{pH} > 13$ pero con un menor valor de la migración, es decir, colas del cometa más cortas (ver cuadro II, III). Lo anterior se aprecia mejor al promediar los datos (Figura 13 y 14), donde en todos los tratamientos se incrementa el daño al ADN.

D. Rompimientos de cadena sencilla y sitios afines al álcali

En la figura 14 se muestra los promedios de longitud del ADN en las dos versiones de pH ($\text{pH} > 13$ vs $\text{pH} 12.1$), con una hora de exposición al acetato de talio. Como se menciona arriba, para el caso del ensayo a $\text{pH} 12.1$ se promediaron los datos obtenidos de los donadores A y B, en tanto que, para la versión alcalina a $\text{pH} > 13$ se promediaron los datos de cuatro donadores.

Al contrastar los promedios de la migración de ADN es evidente la forma en que la versión a $\text{pH} 12.1$ muestra una menor migración en comparación con la versión alcalina del ensayo en la cual los valores son superiores en todas las concentraciones.

En la figura 15 se muestra una estimación de los sitios afines al álcali (sitios AP) en el ADN de leucocitos humanos después de su incubación durante 1 hora con diferentes concentraciones de acetato de talio. Las diferentes columnas corresponden a cada concentración del químico contra la cantidad de sitios AP en unidades arbitrarias, esta estimación se obtuvo sustrayendo el promedio de migración del ADN en ambas versiones del ensayo consecutivamente se obtiene la cantidad de veces que corresponde este daño en relación de porcentaje a su testigo, tomando en cuenta que los valores de migración en la versión alcalina son siempre superiores este valor será el minuendo al cual el valor de migración a $\text{pH} 12.1$ será el sustraendo la diferencia obtenida será dividida en todos los casos por la resta obtenida de los testigos. De esta forma se obtuvo una estimación la cual al no poseer unidades dimensionales y se les otorga unidades arbitrarias.

Cuadro II. Evaluación a pH > 13 del daño al ADN inducido por acetato de talio (CH₃COOTl) en leucocitos humanos de sangre periférica del donador A durante 1 o 2 horas de exposición.

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	Categoría de daño (%) *					Longitud de la migración de ADN en µm ± EE
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño severo	
<i>1 hora</i>						
0 (testigo)	88	11	1	0	0	1.66 ± 0.50
0.5	80	14	2	0	4	6.50 ± 1.02 ^a
1	63 ^d	24	11	1	1	7.52 ± 1.14 ^c
5	81	13	6	0	0	3.56 ± 0.84
10	74 ^a	16	6	1	3	4.82 ± 1.01
50	70 ^c	20	10	0	2	6.04 ± 1.04 ^a
100	78	16	5	1	0	5.00 ± 1.07
500	64 ^c	23	6	3	4	7.31 ± 1.26 ^c
H ₂ O ₂	52 ^d	18	14	0	16	8.64 ± 1.32 ^d
<i>2 horas</i>						
0 (testigo)	90	10	0	0	0	0.90 ± 0.27
0.5	66 ^d	21	2	1	10	4.60 ± 1.01 ^a
1	82	12	5	0	1	3.47 ± 0.83
5	80	14	5	0	1	3.49 ± 0.80
10	76	18	3	0	3	3.40 ± 0.70
50	76 ^a	13	8	2	1	5.01 ± 1.07 ^a
100	76 ^b	12	9	0	3	4.29 ± 0.92
500	62 ^d	19	11	1	7	6.88 ± 1.15 ^d
H ₂ O ₂	45 ^d	19	18	1	17	9.73 ± 1.39 ^d

* 100 células analizadas por tratamiento por cada tiempo

H₂O₂ en 200 µM

EE, error estándar de la media

^a P < 0.05, ^b P < 0.01, ^c P < 0.005 y ^d P < 0.001 comparado con su testigo

Cuadro III. Evaluación a pH > 13 del daño al ADN inducido por acetato de talio (CH₃COOTl) en leucocitos humanos de sangre periférica del donador B durante 1 o 2 horas de exposición.

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	Categoría de daño (%) *					Longitud de la migración de ADN en µm ± EE
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño severo	
<i>1 hora</i>						
0 (testigo)	88	11	1	0	0	
0.5	86	8	6	0	0	2.68 ± 0.73
1	88	8	2	0	2	1.82 ± 0.56
5	72 ^a	15	7	2	4	5.48 ± 1.09
10	77 ^a	9	11	0	3	4.97 ± 1.05
50	70 ^b	10	8	3	9	5.91 ± 1.32 ^a
100	72 ^a	15	6	1	6	4.53 ± 0.95
500	79	14	3	1	3	3.24 ± 0.78
H ₂ O ₂	51 ^c	20	9	1	19	7.83 ± 1.26 ^c
<i>2 horas</i>						
0 (testigo)	90	10	0	0	0	1.14 ± 0.37
0.5	81	15	4	0	0	2.92 ± 0.64
1	84	11	4	1	0	3.16 ± 0.79
5	70 ^b	20	9	0	1	5.98 ± 1.05 ^d
10	77	14	5	0	4	3.67 ± 0.81
50	78 ^a	14	4	0	4	3.54 ± 0.79
100	80	12	1	3	4	3.56 ± 0.95
500	80 ^a	10	4	0	6	3.13 ± 0.89
H ₂ O ₂	51 ^c	22	9	0	18	7.41 ± 1.15 ^c

* 100 células analizadas por tratamiento por cada tiempo

EE, error estándar de la media

H₂O₂ en 200 µM

^a P < 0.05, ^b P < 0.025 y ^c P < 0.005, comparado con su testigo

Cuadro IV. Evaluación a pH > 13 del daño al ADN inducido por acetato de talio (CH₃COOTl) en leucocitos humanos de sangre periférica del donador C durante 1 o 2 horas de exposición.

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	Categoría de Daño (%) *					Longitud de la migración de ADN en µm ± EE
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño severo	
<i>1 hora</i>						
0 (testigo)	93	6	1	0	0	
0.5	72 ^b	16	10	0	2	5.61 ± 1.05 ^c
1	88	10	0	0	2	1.61 ± 0.50
5	89	7	3	1	0	2.62 ± 0.85
10	91	6	2	0	1	1.47 ± 0.51
50	86	6	7	0	1	3.33 ± 0.94
100	80	15	3	0	2	3.16 ± 0.72
500	81	15	3	0	1	3.21 ± 0.75
H ₂ O ₂	54 ^c	12	12	0	22	7.40 ± 1.34 ^c
<i>2 horas</i>						
0 (testigo)	93	7	0	0	0	1.16 ± 0,43
0.5	94	6	0	0	0	1.00 ± 0.40
1	82	16	2	0	0	2.74 ± 0.61
5	88	6	5	1	0	2.88 ± 0.90
10	73 ^b	17	6	2	2	5.31 ± 1.14 ^c
50	92	8	0	0	0	1.06 ± 0.38
100	83	10	2	2	3	2.89 ± 0,86
500	85	13	2	0	0	2.74 ± 0.73
H ₂ O ₂	53 ^c	16	16	0	15	8.64 ± 1.32 ^c

* 100 células analizadas por tratamiento por cada tiempo

EE, error estándar de la media

H₂O₂ en 200 µM

^a P < 0.05, ^b P < 0.025 y ^c P < 0.005, comparado con su testigo

Cuadro V. Evaluación a pH > 13 del daño al ADN inducido por acetato de talio (CH₃COOTl) en leucocitos humanos de sangre periférica del donador D durante 1 o 2 horas de exposición.

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	Categoría de Daño (%) *					Longitud de la migración de ADN en µm ± EE
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño severo	
<i>1 hora</i>						
0 (testigo)	90	9	1	0	0	
0.5	75 ^a	16	7	1	1	4.89 ± 1.03
1	77	20	2	1	0	4.16 ± 0.93
5	77	19	3	0	1	3.76 ± 0.76
10	71 ^b	12	5	10	2	9.16 ± 1.85 ^b
50	57 ^b	18	12	8	5	10.86 ± 1.64 ^c
100	62 ^c	8	15	13	2	13.12 ± 2.07 ^c
500	66 ^c	13	11	7	3	9.57 ± 1.72 ^b
H ₂ O ₂	45 ^c	7	7	21	20	20.43 ± 3.04 ^c
<i>2 horas</i>						
0 (testigo)	90	9	1	0	0	2.24 ± 0.59
0.5	76 ^a	13	11	0	0	5.26 ± 0.99
1	80	10	5	3	2	4.71 ± 1.22
5	72 ^b	12	13	1	2	6.33 ± 1.16
10	70 ^b	16	9	1	4	6.08 ± 1.17
50	76 ^a	16	1	3	4	4.31 ± 0.99
100	79	17	4	0	0	3.44 ± 0.72
500	88	11	1	0	0	2.10 ± 0.58
H ₂ O ₂	43 ^c	12	6	22	17	19.25 ± 2.69 ^c

* 100 células analizadas por tratamiento por cada tiempo

EE, error estándar de la media

H₂O₂ en 200 µM

^a P < 0.05, ^b P < 0.025 y ^c P < 0.005, comparado con su testigo negativo

Cuadro VI. Evaluación a pH > 12.1 del daño al ADN inducido por acetato de talio (CH₃COOTl) en leucocitos humanos de sangre periférica de dos donadores (A y B) durante 1 hora de exposición.

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/ml	Categoría de Daño (%) *					Longitud de la migración de ADN en µm ± EE
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño severo	
Donador A						
0 (testigo)	93	7	6	1	0	
0.5	82	18	17	1	0	2.12 ± 0.50
1	85	15	14	1	0	2.24 ± 0.56
5	84	16	14	2	0	1.75 ± 0.44
10	90	10	8	2	0	1.64 ± 0.53
50	79 ^b	21	21	0	0	3.56 ± 0.71
100	51 ^c	40	7	1	1	8.02 ± 0.95 ^c
500	68 ^c	32	28	4	0	4.86 ± 0.79 ^c
H ₂ O ₂	33 ^c	33	19	1	14	12.11 ± 1.12 ^c
Donador B						
0 (testigo)	96	4	0	0	0	0.38 ± 0.20
0.5	91	7	2	0	0	1.30 ± 0.44
1	89	9	0	0	2	1.53 ± 0.50
5	90	7	1	0	2	1.32 ± 0.46
10	87	9	1	1	2	2.10 ± 0.62
50	91	3	4	0	2	1.53 ± 0.59
100	81 ^a	17	1	0	1	2.44 ± 0.57
500	83 ^c	17	0	0	0	2.54 ± 0.58
H ₂ O ₂	52 ^c	19	7	0	22	5.94 ± 1.03 ^c

* 100 células analizadas por tratamiento por cada tiempo

EE, error estándar de la media

H₂O₂ en 200 µM

^a P < 0.05, ^b P < 0.025 y ^c P < 0.005, comparado con su testigo negativo

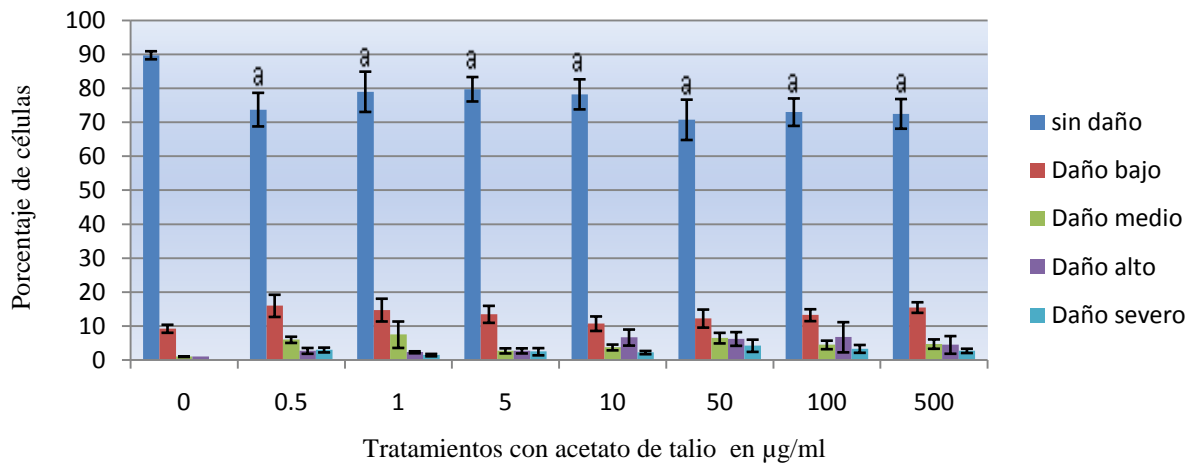


Figura 10. Porcentaje de células en cada categoría de daño. Promedio (\pm EE) de los cuatro donadores con *una hora* de exposición al compuesto y evaluado pH >13 (^a $P < 0.05$ con respecto al testigo, 0 $\mu\text{g/ml}$).

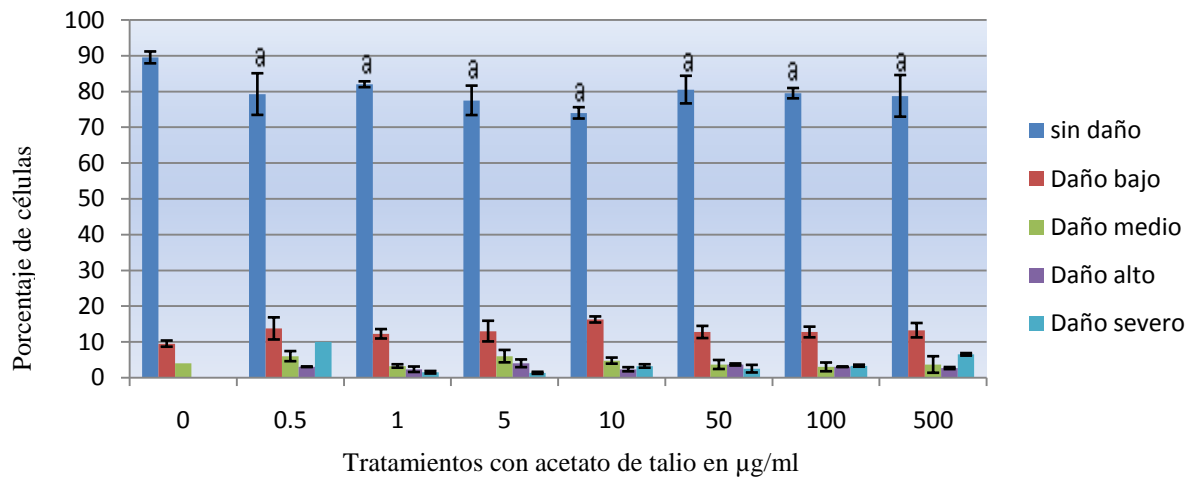


Figura 11. Porcentaje de distribución de las células en cada categoría de daño. Promedio (\pm EE) de los cuatro donadores con *dos horas* de exposición al compuesto y evaluado pH >13 (^a $P < 0.05$ con respecto al testigo, 0 $\mu\text{g/ml}$).

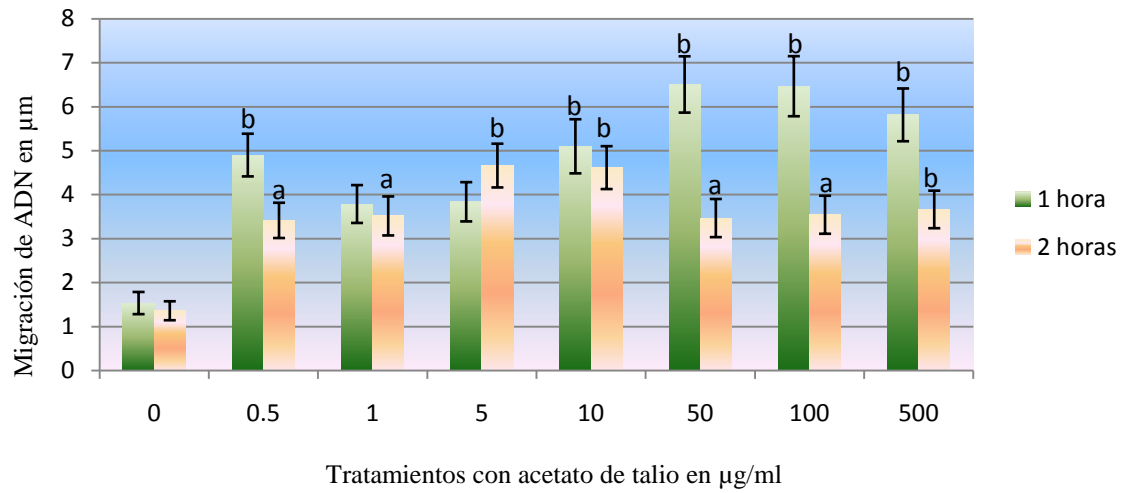


Figura 12. Promedio de la longitud de la migración del ADN (\pm EE) de los cuatro donadores a pH >13 con una hora y dos horas de incubación (^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.005$ comparado con respecto al testigo, 0 µg/ml).

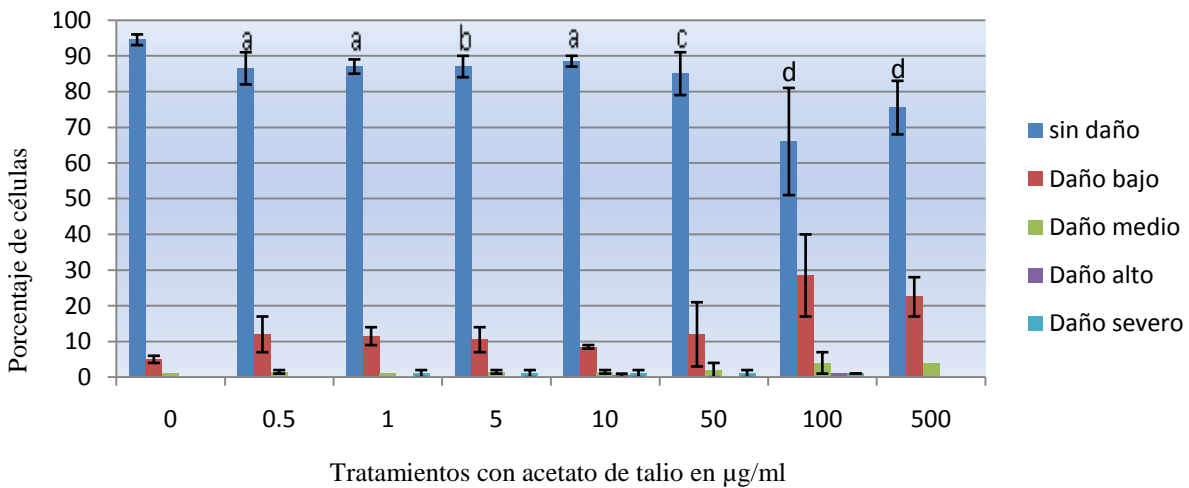


Figura 13. Porcentaje de distribución de las células en cada categoría de daño. Promedio (\pm EE) de dos donadores con una hora de exposición al compuesto y evaluado pH >12.1 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.025$ y ^d $P < 0.005$ comparado con respecto al testigo, 0 µg/ml).

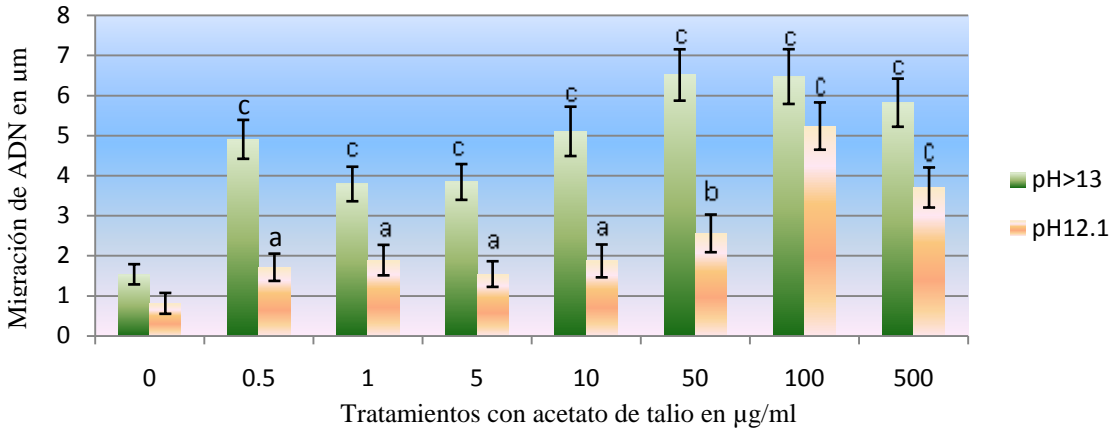


Figura 14. Promedio de la longitud de la migración del ADN (\pm EE) de los cuatro donadores con la versión de pH >13 y de dos donadores para pH 12.1, en ambos caso de pH una hora de exposición (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.025$ y ^c $P < 0.005$, con respecto a su testigo).

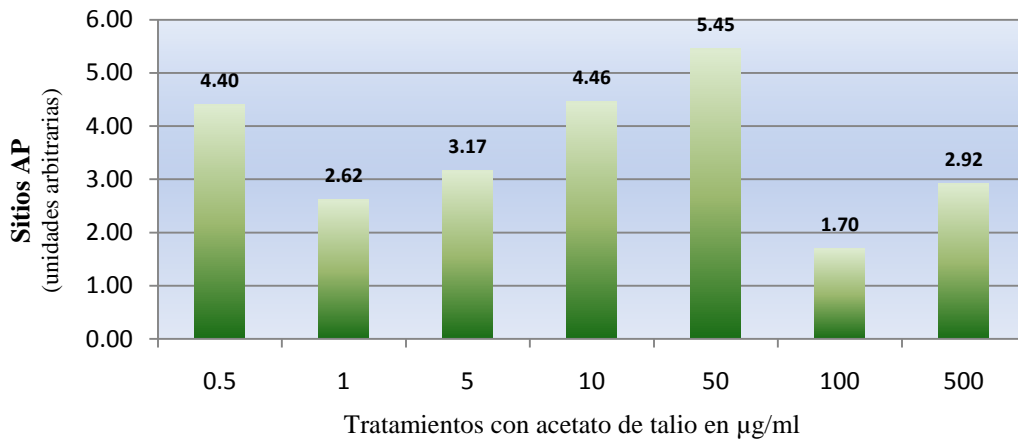


Figura 15. Estimación de sitios afines al álcali, o bien sitios apurínicos y apirimidínicos (AP), originados en el ADN de los linfocitos humanos tratados con talio (la escala está representada en unidades arbitrarias).

VIII. DISCUSIÓN

A demás del talio, existen diversos elementos considerados como tóxicos entre los que se encuentran antimonio, arsénico, bismuto, cadmio, cromo, cobalto, cobre, galio, oro, hierro, plomo, manganeso, mercurio, nickel, platino, plata, telurio, estaño, uranio, vanadio y zinc (Singh 2005, Sherameti y Varma 2009), a muchos de los cuales se han descrito sus efectos citotóxicos y genotóxicos. Mientras otros como el Tl se conocen poco acerca de sus efectos por exposición a corto plazo.

A. *Viabilidad celular.*

Cuando se trabaja en sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar algún efecto tóxico es indispensable determinar la toxicidad celular, la cual informa si hay alguna perturbación en las funciones celulares que conllevan a fluctuaciones en los procesos fisiológicos normales sin causar necesariamente la muerte de la célula, pero que puede llevar a ella y causar repercusiones que pueden ser fatales (Henderson *et al* 1998).

Una de los ensayos más recurridos para determinar muerte celular es metabolismo y alteraciones en la membrana celular (Strauss 1991). Muchos agentes citotóxicos son capaces de bloquear procesos bioquímicos e inducir cambios en la permeabilidad celular provocando huecos en la membrana que finalmente puede conducir a la muerte de la célula (Strauss 1991, Hartmann y Speit 1997).

Existe una variedad de colorantes para evaluar viabilidad celular. La combinación de bromuro de etidio con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) es una de las más veraces y menos ambiguas para discriminar células viables y no viables. Estos tiñen las células de forma diferencial, el bromuro de etidio es impermeable a la membrana celular, únicamente pasa cuando hay perforaciones en la misma, su presencia dentro de la célula tiñe al núcleo de color rojo, en tanto que el CFDA es permeable a la membrana y cuando la célula lo metaboliza se forma un compuesto esterificado que fluoresce en verde (Rowland-Jones y McMichael 2000, Greim y Snyder 2008).

Por las razones arriba descritas es importante evaluar la viabilidad de los leucocitos expuestos a las diferentes concentraciones de la sal acetato de talio, a demás que de esta

forma podemos evitar dar falsos positivos al evaluar el efecto sobre el material genético mediante el ensayo cometa, es decir que la fragmentación de la cromatina producida por toxicidad celular puede llevar a tomar la decisión equivocada de considerar la medición del daño al ADN como un efecto positivo producto del tratamiento (Henderson *et al* 1998, Hartmann y Speit 1997).

Los resultados indican que el talio a pesar de que produce algunos cambios estadísticos en la viabilidad celular, en algunas concentraciones, el análisis promedio de los datos no muestra cambios consistentes. A partir de estos resultados podemos argumentar que el acetato de talio (el cual tiene estado de oxidación 1+) induce ligera toxicidad celular tiempos cortos de exposición, 1 o 2 horas. Los resultados obtenidos muestran similitud con otros estudios *in vitro* en los que al utilizar la misma técnica para evaluar viabilidad en células adrenales de rata (PC12) expuestas a nitratos de talio (1+ y 3+) en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM después de 24 horas el porcentaje de células disminuyo pero este cambio desde el punto de vista estadístico no fue significativo con respecto al control, sin embargo al incrementar el tiempo de exposición (48 horas) concentraciones 50 y 100 μM induce muerte celular por apoptosis y disminución de la viabilidad en un 20% (Hanzel y Verstraeten 2009). Este efecto también se ha observado con acetato de talio en líneas celulares JurKat (linfoblastoides-T humanos transformados) expuestas durante 16 horas en concentraciones de 0.25 a 1 mM (Bragadin *et al* 2003) y en células de glioma C6 en concentraciones de de 10 μM a 100 mM en tiempos de exposición de 24 horas o más (Chia *et al* 2005).

B. Cometa pH > 13

En relación con la evaluación de daño al ADN a pH >13 en los cuatro donadores, los datos muestran que los tratamientos con talio en 1 y 2 horas de exposición siempre incrementa el número de células en las diferentes categorías de daño y al mismo tiempo se incrementa la longitud de la migración del ADN (Cuadros II-V). El análisis de los datos promedio muestra el mismo comportamiento con diferencias estadísticas en la mayoría de las concentraciones empleadas, sin una clara tendencia dosis efecto (Figuras 10 a la 12).

Las variaciones de los resultados en los grupos testigos pueden ser atribuidas factores intrínsecos y exógenos, como la carga genética, la edad, la dieta y estilo de vida. Además, por las condiciones experimentales, ya que se conoce que las fluctuaciones en el voltaje y amperaje durante la electroforesis provocan variaciones en la migración. No obstante, no hay diferencias entre los dos tiempos de exposición y entre donadores.

Se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan la toxicidad del talio. Este metal cruza las membranas biológicas por difusión simple por su semejanza con iones esenciales como el de K^+ y de esta manera distribuirse en el interior de la célula. En concentraciones μM incrementa la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria a iones como Na^+ , K^+ e H^+ abriendo los poros de transición, este efecto es acompañado por un aumento del contenido oxidante de la mitocondria (Hanzel y Verstraeten 2009). No se sabe la forma en la que llega al núcleo pero si es permeable a la membrana celular o a la membrana mitocondrial, y seguramente lo es también a la membrana nuclear, por el daño al ADN observado en este estudio.

Desde el punto de vista bioquímico el talio $1+$ al igual que otros cationes monovalentes, entre los que se encuentran el K^+ y Na^+ , tiene fuerte afinidad por los ácidos nucleicos, específicamente por regiones ricas en guanina-timina de los telómeros (Howerton *et al* 2001), y a pesar de que estos iones estabilizan ciertas estructuras del ADN, la función biológica de estas no se ha determinado. Además (Ouameur *et al* 2003) encontraron que los iones de Tl^+ tienen fuerte afinidad por las guaninas ubicadas en el surco mayor del B-ADN. Si consideramos que el talio no es esencial y que además interacciona con el material genético, la interacción ADN-metal puede ser causa de reconocimiento de algo extraño que tiene que ser removido de la cadena de ADN por los sistemas de reparación por escisión de bases y nucleótidos.

Se conoce que los cationes Tl^+ y Tl^{3+} tienen afinidad por los grupos sulfhídrico de las proteínas, y en concentraciones μM ($25 \mu M$ de $Tl(OH)_3$) disminuye la actividad y la concentración intracelular de glutatión, lo que conduce a la disminución de defensa antioxidante dependiente de glutatión, en sistemas *in vitro* (Hanzel *et al* 2005), lo cual puede conducir a cambios en la homeostasis de la célula y estar expuesta al ataque de las especies reactivas del oxígeno producidas de forma endógena e incrementar el estrés celular

(Dhaoui *et al* 2011), lo anterior debido a que las especies reactivas de oxígeno son químicamente inestable y reaccionan con los componentes celulares y en el ADN se pueden producir rupturas en la cadena de fosfatos, oxidación de azúcares y bases, además de producir sitios apurínicos y apirimidínicos (sitios AP) cuando las bases oxidadas son reconocidas y removidas por los mecanismos de reparación.

Como se describió anteriormente las pruebas bioquímicas indican que el talio tiene afinidad por las bases nitrogenadas en particular por regiones ricas en guanina del ADN, así como disminuye la actividad del glutatión que está involucrado en la protección celular, situación que incrementa el estrés oxidante que finalmente puede conducir a daño en la estructura del material genético. Si esto sucede en los leucocitos humanos de sangre periférica expuestos al acetato de talio, entonces podríamos explicar el aumento de la longitud de migración de ADN detectada con el ensayo cometa a $\text{pH} > 13$.

C. Cometa pH 12.1

Con respecto a la evaluación del daño al ADN a $\text{pH} 12.1$ esta versión del ensayo se utilizó con la intención de detectar únicamente rompimientos en la cadena de ADN (incluyendo a los rompimientos de cadena doble que puedan ser inducidos y revelados) omitiendo los sitios AP, ya que bajo estas condiciones de pH no se expresan y por tanto los fragmentos que puedan ser producto de este tipo de daño no forman parte de la longitud de la cola del cometa (Hashimoto *et al* 2007, Rojas *et al* 2009). Los resultados de esta prueba (Cuadro VI y Figura 13) muestran que el acetato de talio incrementa las células con daño e induce rupturas en la cadena ADN en todas las concentraciones empleadas sin un claro efecto dependiente de esta.

Soto-Reyes *et al.* (2005) encontraron que el arsénico en forma de sales inorgánicas y en forma de arsénico metilado, trivalente y pentavalente, inducen daño al ADN por estrés oxidante, atribuyendo parte de este daño a los sitios AP. Ellos observaron que la magnitud del daño al ADN a $\text{pH} > 13$ es superior en comparación con la evaluación a $\text{pH} 12.1$.

No obstante, existen otros metales que exhiben comportamientos diferentes. Wozniak y Blasiak (2003) utilizaron ambas versiones del ensayo cometa e incubaron linfocitos

humanos durante una hora a 37 °C con diferentes concentraciones de acetato de plomo (1, 10, 100 μ M), con este estudio se concluyo que no existen diferencias entre la longitud de los cometas a pH 12.1 y la migración de ADN a pH >13. Estas disimilitudes nos indican que las rupturas en la cadena de ADN son las responsables de la migración de los cometas y no los sitios AP.

Los mismos autores realizaron experimentos similares utilizando sulfato de vanadilo en concentraciones mM (0.05, 0.1, 0.5, 1 mM) y tampoco encontraron diferencias en la longitud de los cometas ya sea a pH 12.1 o a pH >13.

Los experimentos anteriores junto con los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten comprender que los metales tienen diferentes mecanismos para inducir daño en el material genético, sea como rompimientos en la cadena de ADN de forma directa o indirecta, incluyendo inhibición o disminución de las barreras que actúan como defensa en la célula.

D. Rompimientos de cadena sencilla y sitios afines al álcali

Finalmente es necesario referirnos a la figura 14, en esta los promedios de migración de ADN para ambas versiones del ensayo son comparados, de esta manera es posible observar la magnitud de daño producto de las lesiones en el ADN; ya sean rompimientos (de cadena sencilla y doble) o sitios AP.

El análisis de las graficas nos indica por un lado que la magnitud del daño evaluado a pH 13 es mayor con respecto a pH 12.1, que se interpreta como lesiones AP que no se revelan en la versión alcalina a pH 12.1, y por el otro que los sitios AP producidos por el tratamiento con acetato de talio (Figura 15) es una fuente importante de daño sobre ADN.

No se conoce si el talio produce la formación de especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo (\cdot OH). Se sabe que algunos metales incrementan daño celular por estrés oxidante, y de esta manera incrementar la longitud de la migración del ADN. Por lo que sería conveniente evaluar indicadores de daño oxidante en las bases del ADN, para conocer si los sitios AP inducidos por el talio son producto de este efecto.

IX. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

- La viabilidad celular de los leucocitos humanos tratados *in vitro* durante 1 o 2 horas con acetato de talio no mostraron cambios consistentes, sin embargo, no podemos descartar que induzca toxicidad celular debido a la presencia de algunas diferencias estadísticas. Por lo anterior se puede concluir que este compuesto produce ligera toxicidad celular en tiempos cortos de exposición.
- La evaluación del daño al ADN a pH > 13 indican que el acetato de talio es capaz de inducir diversos tipos de lesiones como lo son rompimientos de cadena sencilla, posiblemente rompimientos de cadena doble (evaluados como de cadena sencilla), sitios de reparación retardada y sitios sensibles al álcali.
- La evaluación del daño al ADN a pH 12.1 indican que dentro de las lesiones que induce el acetato de talio se encuentran los rompimientos de cadena sencilla, posiblemente rompimientos de cadena doble y sitios de reparación retardada (es importante mencionar que esta versión no revela los sitios abásicos: apurínicos y apirimidínicos).
- La comparación entre las dos versiones de pH: pH > 13 vs pH 12.1, muestran que la formación de sitios AP son lesiones importantes que contribuyen al daño a la molécula de ADN inducido por este agente.
- De las conclusiones anteriores se desprende que el acetato de talio puede ser considerado un agente inductor de daño primario sobre el ADN, daño que potencialmente puede conducir a efectos mutagénicos y genotóxicos.
- Las variaciones interindividuales entre los diferentes parámetros evaluados pueden ser atribuidas a factores intrínsecos y exógenos, como la carga genética, la edad, la dieta, los hábitos y en general el estilo de vida, entre otros.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Albert PL, Robert H. (1991). Genetic toxicology. Telford press, Nueva Jersey; 493 págs.
- Ballantyne B, Marrs TC. (1993). General and applied toxicology. Stockton Press, Nueva York; 1493 págs.
- Bragadin M, Toninello A, Bindoli A, Rigobello M, Canton M. (2003). Thallium induces apoptosis in Jurkat cells. *Ann NY Acad Sci.* 1010: 283-291.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit GS. (2005). The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* 20(4): 245-254.
- Brusick D. (1987). Principles of genetic toxicology. Plenum press. Nueva York; 284 págs.
- Carson BL, Ellis HV, McCann JL. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans including feasibility and need. Publicaciones Lewis. Londres 243-255.
- Chia CF, Chen SC, Shih CM, Lee HM. (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci.* 1042: 523-530.
- Collins AR. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3): 249-261.
- Cooper G. Hausman RE. (2002). La célula. Marbán, Madrid; 716 págs.
- Cornelis R. (2005). Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine & occupational health. John Wiley y Sons. Chichester; 768 págs.
- DEIMD, Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina Dorland. (1988). Interamericana-McGraw-Hill. España, Madrid; 1711 págs.
- Dhaoui M, Auchère F, Blaiseau P, Lesuisse E, Landoulsi A, Camadro J, Haguenaer-Tsapis R, Belgareh-Touzé N. (2011). Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Mol Biol Cell.* 22(12): 2054-2067.
- Downs AJ. (1993). Chemistry of aluminium, gallium, indium, and thallium, Chapman y Hall. Londres; 526 págs.
- Ellhueñe MF, Perez-Alzola LP. (2004). Preliminary evaluating of DNA damage related with the smoking habit measured by the comet assay in whole blood cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(7): 1223-1229.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. EUA; En línea: www.epa.gov/iris
- Frattini P. (2005). Thallium properties and behaviour - A Literature Study GTK; 38 págs.

- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington DC; 698 págs.
- Galvan-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Vazquez-Roman B, Rios C, Santamaría A. (2005). Delayed effects of thallium in the rat brain: Regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol.* 43: 1037-1045.
- Gilbert SG. (2004). A small dose of toxicology. Taylor and Francis press. Gran Bretaña; 266 págs.
- Greim H, Snyder R. (2008). Toxicology and risk assessment: a comprehensive introduction. Wiley. Gran Bretaña; 677 págs.
- Guerra R, Martinez HR. (1990). Thallium poisoning. Experience with 50 patients. *Gac Med Mex.* 126(6): 487-494.
- Hanzel C, Verstraeten S. (2009). Tl(I) and Tl(III) activate both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 236: 59-70.
- Hanzel C, Villaverde MS, Verstraeten S. (2005). Glutathione metabolism is impaired *in vitro* by thallium(III) hydroxide. *Toxicology.* 207: 501-510
- Hashimoto K, Takasaki W, Sato I, Tsuda S. (2007). DNA damage measure by comet assay and 8-OH.dG formation related to blood chemical analyses in aged rats. *J Toxicol Sci.* 32(3): 249-259.
- Hartmann A, Speit G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay) *Toxicol Lett.* 90(2-3): 183-188
- Heim M. (2002). Thallium in terrestrial environments-occurrence and effects. *Ecotoxicology.* 11: 369-377.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S,(1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins *Mutagen.*13: 89-94.
- Hoffman RS. (2000). Thallium poisoning during pregnancy: a case report and comprehensive literature review. *Clin Toxicol.* 38: 767-775.
- Howerton SB, Sines CC, Vanderveer D, Williams LD. (2001). Locating monovalent cations in the grooves of B-DNA. *Biochemistry.* 40: 10023-10031
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. (1996). Thallium. Environmental health criteria. Vol. 182. World Health Organization. Suiza.
- Karlsson U. (2006). Environmental level of thallium-Influence of redox properties and anthropogenic sources. *Universitetsbiblioteket;* 44 págs.

- Kazantzis G. (1986). Handbook on the toxicology of metals. 2 edición, Elsevier Science Publishers BV. 549-567.
- Kazantzis G. (2000). Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health*. 22: 275-280.
- Leonard A, Gerber GB. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutat Res*. 387: 47-53
- Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9: 1005-1015.
- Nelson DL, Cox MM. (2005). *Lehninger: principios de bioquímica*, 4ta edición. Academic Press; 1100 págs.
- Ouameur AA, Nafisi S, Mohajerani N, Tajmir-Riahi, HA. (2003). Thallium-DNA complexes in aqueous Solution. Major or Minor groove binding. *J Biomol Struct Dyn*. 20(4): 561-565.
- Pimentel E, Ortiz A, Breña M. (2006). *Tópicos de genética*. Universidad Autónoma del estado de México. México; 387 págs.
- Radic S, Cvjetko P, Glava K. (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad bena (*Vicia faba L.*) seedlings induced by thallium. *Environ Toxicol Chem*. 28: 189-196.
- Ramsden DB. (2007). Thallium. En: Waring, RH, Steventon GB, Mitchell SC. (2007) en: *Molecules of death*. 2da edición. Imperial College Press. Londres; 415-422.
- Repetto G, Del Peso A. (2001). Gallium, indium, and thallium. En: *Patty's Toxicology*. Bingham E, Cohlrsen B, Powell C. (eds.). 5 edición. Wiley-Interscience Publication. Nueva York; 486-487.
- Rodríguez-Mercado JJ. Y Altamirano-Lozano MA. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 22: 173-189.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromat B*. 722: 225-254.
- Rojas E, Mussali P, Tovar E, Valverde M. (2009). DNA-AP sites generation by Etoposide in whole blood cells. *BMC Cancer*. 9:398.
- Rowland-Jones SL, McMichael AJ. (2000). *Lymphocytes: a practical approach* Oxford University Press. EUA; 352 págs.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 73: 39-85
- Seiler H. (1994). *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, Marcel Dekker. Nueva York; 753 págs.

- Sherameti I, Varma A. (2009). Soil heavy metals. Springer. Nueva York; 429 págs.
- Siddique R. (2005). Validation of drosophila melanogaster as an in vivo model for genotoxicity assesment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 20(4): 285-290.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175: 184-191.
- Singh VP. (2005). Metal toxicity and tolerance in plants and animals. Sarups y Sons. Nueva Delhi; 328 págs.
- Soto-Reyes E, Del Razo LM, Valverde M, Rojas E. (2005) Role of the alkali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic. *Biometals*. 18(5):493-506.
- Stokinger HE. (1981). Thallium, Tl. En: Patty's Industrial Higiene and toxicology Clayton GD, Clayton FE (eds), 3ra edicion. Wiley-Interscience Publication. New York; 1915-1931.
- Strauss GHS. (1991). Non random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BTL), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res*. 252:1-15.
- Timbrell JA. (2002). Introduction to toxicology 3 edicion. Taylor and Francis press. Gran Bretaña; 215 págs.
- Trun N, Trempey J. (2004). Fundamental bacterial genetics. Blackwell publishing. Nueva York; 28 págs.
- USCHPPM, US Army for Health Promotion and Preventive Medicine. (2007) Wildlife Toxicity Assessment for Thallium. Document No: 37-EJ1138-01O, EUA.
- Vaughan P. (2000). DNA repair protocols. Humana Press. Nueva Jersey; 209 págs.
- Vernugopal B, Luckey TD. (1978). Metal toxicity in mammals.2 chemical toxicity of metals and metalloids. Department of Biochemistry. University of Missouri, Columbia. Plenum Presss. Nueva York; 122-127.
- Wei Q, Li L, Chen D. (2007). DNA repair, genetic instability, and cancer. World Scientific publishing. Singapur; 353 págs.
- Witte I, Plappert U, Wall H, Hartmann A. (2007). Genetic toxicity assesment: Employing the best science for human safety evaluation part III: The comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicol Sci*. 97(1): 21-26.
- Wozniak K, Blasiak J. (2003). In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res*. 535(2): 127-139.

Yildirim M, Mevlit I, Tulay T, Seven Bedri, Pirim I. (2006). Genotoxicity of thallium-201 in patients with angina pectoris undergoing myocardial perfusion study *Exp. Med.* 206: 299-304.



Sociedad Mexicana de Genética

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2010

“100 años con *Drosophila* como
modelo en genética”



Programa & Resúmenes
19-22 de Octubre



C-017 EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN EN LEUCOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO CON ACETATO DE TALIO

Jaramillo-Cruz E, Altamirano-Lozano MA y *Rodríguez-Mercado JJ. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. L5-PA, UMIE, FES-Zaragoza, UNAM. México D.F., Tel: 52-5623-0706.

juserom@correo.unam.mx

El talio es un metal pesado, no esencial y muy tóxico para los seres vivos. Es considerado contaminante ambiental, ocupacional y por su uso en medicina representa riesgo terapéutico. Diversas agencias gubernamentales lo han prohibido en varias de sus aplicaciones, no obstante en el ambiente se encuentra a causa de su uso por parte de la industria minera, cementera y eléctrica. Existen muy pocos estudios sobre su efecto genotóxico, algunos trabajos han hallado que este metal induce daño en los cromosomas y en el material genético, sin embargo estos resultados son controvertidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la genotoxicidad del acetato de talio mediante el ensayo cometa y la viabilidad celular. Se extrajo sangre periférica de donadores clínicamente sanos, se incubaron los leucocitos de sangre completa en medio de cultivo y se trataron durante 1 hora con 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de talio. Al finalizar el tratamiento las células se embebieron en gel de bajo punto de fusión y se hicieron las preparaciones. Después de lisar las células se realizó la electroforesis a dos condiciones de corrimiento: pH 12.1 para detectar rompimientos de cadena sencilla así como sitios de reparación retardada, y pH>13 que a demás detecta sitios sensibles al álcali. Los resultados obtenidos no mostraron cambios en la viabilidad, pero sí diferencias significativas en la longitud de la cola del cometa en todas las concentraciones y en ambas condiciones de pH. Los valores registrados a pH 12 fueron 1.71, 1.89, 1.54, 1.87, 2.56, 5.23, 3.70 μm (en 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de talio, respectivamente) comparados con 0.81 μm del testigo, en tanto que los datos de pH>13 fueron 4.90, 3.79, 3.84, 5.10, 6.51, 6.47, 5.81 μm respectivamente comparados con 1.54 μm de su testigo. De lo anterior podemos concluir que el acetato de talio no induce toxicidad celular en tiempos cortos de exposición, pero puede inducir daño sobre el material genético a concentraciones bajas, donde los sitios álcali sensibles son un tipo de lesiones que ocupan un lugar importante en la formación del cometa