



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL ACETATO DE
TALIO (CH_3COOTI) *IN VITRO* MEDIANTE TINCIÓN
DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MIRIAM FELIPE REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ

MERCADO



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y compartir este momento tan especial con mis seres queridos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y permitir que las enseñanzas y aprendizaje lo obtuviera a través de ella.

De manera especial al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por permitirme ser parte del laboratorio, por su paciencia, consejos, enseñanzas y todo el apoyo y tiempo brindado durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado:

M.C. Raúl Zavala Chavero

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Dra. Ma. Del Carmen García Rodríguez

Por el tiempo brindado durante la revisión de esta tesis, por sus consejos y aportaciones para mejorar el desarrollo de la misma.

Al M.C. Rodrigo Anibal Mateos Nava por la disposición que siempre ha mostrado para responder las dudas surgidas, por sus aportaciones y comentarios acertados siempre con la intención de mejorar profesionalmente.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, especialmente a Paula, Alfonso, Karina, Raúl, Azucena, Eduardo y Heriberto por hacer del laboratorio un lugar agradable de trabajo, por su compañía, apoyo y amistad brindada durante este tiempo.

.....Infinitamente Gracias

DEDICATORIA

A mis padres, Tere y Alberto, porque sin escatimar esfuerzo alguno me han dado la oportunidad de seguir adelante con mis estudios, han estado para mí en todo momento apoyándome e impulsándome a luchar por conseguir mis sueños, los quiero mucho y espero que este sea uno de tantos logros que faltan por compartir.

A mis hermanos, Diana y Alberto, por su cariño, confianza, comprensión y apoyo que me han mostrado, ustedes son una parte muy importante de inspiración para seguir adelante, los quiero y espero seguir compartiendo momentos especiales como este.

A mis abuelitas por su cariño, preocupación, consejos y el apoyo incondicional que me han dado, las quiero.

En memoria de Enrique Reyes† porque aunque no estés presente físicamente tus consejos y sobre todo el cariño brindado siguen presentes en mi memoria y corazón.

A mis tíos, en especial a Antonio Reyes, Jesús Reyes y Adriana Vásquez aunque están lejos nunca han dejado de preocuparse por mí, por su cariño demostrado a lo largo de este tiempo y por todo el apoyo incondicional que me han dado.

A mis primos Daniela, Marcel, Jeseli, Fany, Omar, Cesar y Alan esperando seguir compartiendo momentos especiales como este.

A una persona muy especial, Saúl, desde que llegaste a mi vida has estado cerquita de mí cuidándome, alentándome a ser mejor cada día, apoyándome, mostrándome que la esperanza tiene que perdurar porque siempre hay algo positivo para rescatar, por tu paciencia y el tiempo que hemos compartido, por ofrecerme tu hombro y dejarme desahogar, por todo el cariño y amor que has dado..... TE AMO.

A mis viejos y mejores amig@s Sandra, Marcela, Marco, Fanny, Wendy y Mundo por la amistad, cariño y apoyo incondicional que me han brindado durante estos años, además de todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos los quiero mucho.

A mi amiga Dulce porque desde el primer semestre me brindaste una amistad sincera, además de las travesuras que compartimos y de todo el apoyo tanto académico como moral infinitamente gracias... te quiero niña.

A Adriana mi amiga y cómplice de salidas a campo, gracias por tu amistad y cariño brindado en todo momento, te quiero loquita.

	Pág.
RESUMEN	<i>i</i>
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	
<i>Propiedades fisicoquímicas del talio y usos</i>	2
<i>Limites de exposición</i>	3
<i>Biocinética del talio</i>	4
<i>Casos de intoxicación de talio en la literatura y efectos sobre la salud</i>	6
<i>Mecanismo de toxicidad</i>	6
<i>Efectos genotóxico in vivo e in vitro del talio</i>	7
<i>Sistema de prueba</i>	8
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODO	14
<i>Reactivos</i>	14
<i>Concentraciones utilizadas para el tratamiento</i>	14
<i>Obtención de la muestra de sangre</i>	14
<i>Cultivo de linfocitos humanos</i>	14
<i>Preparación de laminillas y tinción diferencial</i>	15
<i>Evaluaciones del índice mitótico e índice de replicación</i>	15
<i>Evaluaciones de los intercambios de cromátidas hermanas</i>	16
<i>Análisis estadístico</i>	16
RESULTADOS	18
<i>Índice mitótico e índice de replicación</i>	18
<i>Intercambio de cromátidas hermanas</i>	21
DISCUSIÓN	23
<i>Índice mitótico e índice de replicación</i>	24
<i>Intercambio de cromátidas hermanas</i>	25
CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	27
REFERENCIAS	28
ANEXOS	36

RESUMEN

Diversas investigaciones han reportado la toxicidad que ejerce el talio y sus compuestos sobre los seres vivos, pero los estudios relacionados con los efectos celulares y genéticos no son contundentes. Este es un metal que forma compuestos orgánicos e inorgánicos en estado de oxidación I y III (Tl^+ y Tl^{3+}) la mayoría de ellos incoloros, inodoros e insípidos. Para su comercialización se obtiene de la fundición y refinación de cadmio, plomo, cobre y zinc. Industria como la cementera, la eléctrica y otras que usan carbón como fuente de energía liberan talio al ambiente, razón por la cual es considerado contaminante. Como metal no es común que cause intoxicaciones, pero sus sales son ampliamente usadas en la elaboración de diversos productos del sector salud, la industria cosmética y en la fabricación de plaguicidas.

El ion talioso (Tl^+) es más estable que el ion tálico (Tl^{3+}). El Tl^+ presenta propiedades parecidas al catión de potasio (K^+) en radio iónico y carga eléctrica, características que le permiten interferir con varios procesos celulares incluyendo las funciones dependientes de K^+ . La toxicidad del talio y sus compuestos en humano y otros organismos está bien documentada, sin embargo sus efectos a nivel celular y sobre el material genético son escasos y poco contundentes.

Por lo anterior en el presente estudio se propuso valorar los efectos sobre el índice mitótico (IM), índice de replicación (IR) y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de acetato de talio (CH_3COOTl). Para cubrir el objetivo planteado, se tomaron muestras de sangre periférica de tres donadores jóvenes clínicamente sanos y sin historia reciente de exposición a fármacos o radiación. Se hizo la siembra de células, los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 h, a las 24 h se aplicó las concentraciones de acetato de talio, al mismo tiempo se agregó 5 $\mu\text{g/ml}$ de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), y con la intención de obtener las células en metafase a las 71 h se adicionó 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de colcemida. Finalmente, a las 72 h se realizó la cosecha, después las células se fijaron, se gotearon en portaobjetos y se realizó la tinción diferencial.

El análisis de los resultados mostró reducción significativa del IM en los cultivos de los tres donadores en todas las concentraciones empleadas de acetato de talio. Los valores del IR fueron menores al grupo testigo con diferencias estadísticas a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, además, ambos índices disminuyen de forma dependiente de la concentración. En cuanto a la evaluación de los ICH, estos no se analizaron en las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ para dos de los donadores debido a elevada toxicidad celular, sin embargo, el promedio de los datos de los tres donadores mostraron diferencias significativas en la concentración de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Lo anterior indica que el acetato de talio es un compuesto citotóxico y citostático, que puede bloquear la cinética de ciclo celular. Además, el talio no es un buen inductor de ICH, ya que los resultados de los tres donadores no son consistentes y el promedio revela efecto en 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo, en la concentración más alta la comparación estadística son los datos de un donador contra el promedio, lo que limita la interpretación.

INTRODUCCIÓN

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre en concentraciones muy bajas. No obstante, debido a la gran actividad humana en las últimas décadas se ha propiciado el aumento en los niveles de estos elementos en la atmósfera, principalmente por su uso en las industrias y en la fabricación de distintos productos, los ha llevado a que varios de ellos sean considerados contaminantes ambientales.

Dentro del grupo de los metales se encuentran los pesados que son aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua, entre ellos se encuentran el cadmio, cobalto, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, estaño, zinc, selenio, vanadio y talio. Estos son ampliamente distribuidos en el ambiente por la erosión de formaciones rocosas, se producen en forma de partículas o disueltos en los suelos, ríos, lagos, agua de mar y los sedimentos del fondo marino. Además los volcanes también liberan metales pesados a la atmósfera, sin embargo, la actividad en las áreas de producción agrícola e industrial se puede detectar mayores concentraciones, en comparación con los niveles de zonas de poca actividad antrópica (Babula *et al.* 2008).

Una vez liberados sobre el ambiente pueden permanecer por tiempo indefinido, incrementando su contacto con los seres vivos y en el caso de ser tóxicos incrementando su peligrosidad, así también al no ser biológicamente degradables tienden a acumularse en los tejidos e incrementar su presencia en las cadenas tróficas (Fu *et al.* 2011).

Varios metales son esenciales para la vida y benéficos en bajas concentraciones, otros no son esenciales pero también resultan benéficos, sin embargo la mayoría en elevadas concentraciones son tóxicos y constituyen un factor de riesgo para la salud (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Por su necesidad, los metales pesados se clasifican en dos grupos, los oligoelementos y los no esenciales. Los primeros llamados micronutrientes son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza por plantas, animales y el humano; participan en diversos procesos metabólicos y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Los no esenciales, no tienen funciones biológicas reconocidas y dependiendo de sus propiedades y la dosis algunos tienen propiedades terapéuticas, pero otros a bajas dosis pueden causar efectos adversos sobre los organismos. Sin embargo esenciales o no la mayoría pasado cierto umbral se vuelven tóxicos, entre ellos se encuentran antimonio, arsénico, cadmio, cromo, boro, cobalto, cobre, cromo, hierro, molibdeno, manganeso, níquel, plomo, selenio, vanadio, **talio** y zinc (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Maury *et al.* 2010).

Dentro de los metales no esenciales y considerados peligrosos para el ser humano y las distintas formas de vida se encuentra el talio (Tl).

MARCO TEÓRICO

El talio es un metal que ha incitado a diversos investigadores a su estudio por su elevada toxicidad. Desde la antigüedad hasta la actualidad se conocen casos de envenenamiento por talio y a pesar de que en los 70s la Organización Mundial para la Salud, la Agencia de protección al Ambiente, el Comité Europeo de la Salud entre otras, prohibieron su empleo en productos de uso cotidiano y en plaguicidas, se siguen atendiendo en todo el mundo casos de envenenamiento por este metal (Cvjetko *et al.* 2010, EPA 2009).

Propiedades físico-químicas del talio y usos

El talio fue descubierto en 1861 por William Crookes, es un metal del grupo III, con número atómico de 81, de color blanco a gris azulado, muy suave, maleable e insoluble en agua, con masa atómica de 204.38, densidad de 11.83 g/cm³, cuenta con dos valencias y dos estados de oxidación correspondientes al ion talioso (Tl⁺) y tállico (Tl³⁺), que cuentan con un radio iónico de 1.40 Å y 0.95 Å, respectivamente. Los compuestos orgánicos e inorgánicos formados por el ion talioso son más estables que los del ion tállico, el primero muestra características parecidas al ion potasio (K⁺) en el radio iónico y carga eléctrica, que es de 1.33 Å y 1+, respectivamente (Peter y Viraraghavan 2005, EPA 2009).

El talio, se encuentra extensamente distribuido en la naturaleza, principalmente en los minerales como crookesita (TlCuAg₂Se), lorandita (TlAsS₂), urbaita (TlAs₂SbS₅). Comercialmente es obtenido de los humos de la fundición y refinación de cadmio, plomo, cobre y zinc, y como subproducto de los barros obtenidos en la fabricación de ácido sulfúrico, aislándose por electrólisis (Martí y Desoille 1993, Nriagu 1998).

En los últimos años la concentración de talio en la atmósfera se ha incrementado como consecuencia de sus amplios usos, por lo que en la actualidad es considerado contaminante ambiental y un problema ecológico derivado de su elevada toxicidad en flora y fauna, con un impacto comparable a la de plomo y mercurio (Peter y Viraraghavan 2005, IPCS 1996).

Este metal es liberado por la quema de combustibles fósiles, durante el refinamiento de las fracciones de petróleo, la fundición de metales ferrosos y minerales no ferrosos, por procesos industriales como la producción de cemento y en la producción de energía eléctrica como las principales fuentes de emisión (Nriagu y Pacyna 1988, IPCS 1996, Lan y Lin 2005, EPA 2009).

Ha sido utilizado como catalizador en ciertos tipos de aleaciones, en joyería de fantasía, en termómetros de baja temperatura, en semiconductores, en la elaboración de pigmentos y colorantes para la industria pirotécnica, en la fabricación lentes ópticos, vidrio de fusión baja, lámparas de mercurio y celdas fotoeléctricas, como depilatorio del vello facial y corporal, así como en la elaboración de una amplia gama de plaguicidas entre los

que se encuentran rodenticidas, insecticidas, nematocidas, fungicidas, herbicidas, acaricida, molusquicidas y formícidas (Gil 2005, Pelclova *et al.* 2009, EPA 2009).

En el sector salud se ha usado para combatir enfermedades como sífilis, gonorrea, disentería, tuberculosis y malaria. Pero debido a su elevada toxicidad, en la actualidad su uso está restringido. Si bien es un elemento altamente tóxico, se ha estudiado en un grado mucho menor que otros elementos considerados elevadamente tóxicos para el humano tales como el plomo, cadmio o mercurio (Pelclova *et al.* 2009, EPA 2009).

El talio y sus compuestos son de gran importancia en las diferentes industrias, por ejemplo, el talio 201 es utilizado ampliamente en las imágenes de miocardio, el acetato de talio se utilizó en la fabricación de productos para la depilación; el sulfato de talio es un precursor al sulfuro del talio (Tl_2S) del cual la conductividad eléctrica cambia con la exposición a la luz infrarroja haciendo con ello sus compuestos útiles en fotoresistores; el cloruro de talio funciona como catalizador en la cloración y lámparas de bronceado; el carbonato de talio por su parte es utilizado como producto químico intermedio en la fabricación de diamantes de imitación; el óxido de talio es empleado en la fabricación de vidrios de color amarillo verdoso, cerámicas y semiconductores y la aleación con óxido de silicio forma parte de fibras ópticas; por último el nitrato de talio se usa en análisis químicos y bengalas de emergencia (IPCS 1990, Martí y Desoille 1993, Gil 2005).

Debido a que las sales que forma el talio son solubles en agua (Cuadro I) permite que el metal este biodisponible y al contacto con los organismos y en particular con los animales pueden incorporarse al cuerpo por ingestión, inhalación, o a través de contacto con la piel, causando efectos en el tracto gastrointestinal, sistema nervioso, hígado, riñón y sistema cardiovascular (Galván-Arzate y Santamaría 1998, WHO 2006, Babula *et al.* 2008).

Limites de exposición

El límite de exposición laboral de acuerdo a la Administración de Salud y Seguridad en el trabajo (OSHA, de sus siglas en ingles), el Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo (NIOSH) y la Conferencia Mundial de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH) es de 1 mg/cm^3 como promedio durante un turno laboral de 8 a 10 horas (NJDHSS 2000a-d, 2004a-b, y 2007).

Por lo general las concentraciones en las que el talio se encuentra distribuido en la corteza en forma de sales y minerales oscilan entre 0.3 a 0.6 mg/kg, en la corteza oceánica es de 0.013 mg/kg, además se estima que la concentración media en el agua de mar es de 65 pmol/kg. El nivel indicado para el agua potable es de 0.002 mg/l, en el suelo de cultivo de 1 mg/kg, el límite óptimo para los cultivos va desde 0.03 a 0.3 mg/kg y en plantas terrestres de 8 $\mu\text{g/kg}$ a 1mg/kg (Cvjetko *et al.* 2010).

La provincia de Guizhou en China, la mina Allchar en Kavadarci, Macedonia, Lengenbach en Suiza y Rotokawa en Nueva Zelanda son áreas en donde se encuentran altas concentraciones de talio de forma natural (Cvjetko *et al.* 2010).

Cuadro I. Propiedades de los compuestos de talio con importancia industrial y toxica

Compuesto (fórmula)	Estado de oxidación	Peso molecular	Densidad (g/cm ³)	Solubilidad en agua (g/l)	Color
Talio (Tl)	1+,3+	204.38	11.83	Insoluble	Gris azulado
Acetato de talio (CH ₃ COOTl)	1+	263.43	3.7	Soluble	Blanco
Acetato de talio ((CH ₃ COO) ₃ Tl)	3+	381.52	Sd	Sd	Sd
Carbonato de talio (Tl ₂ CO ₃)	1+	468.78	7.1	40.3	Blanco
Cloruro de talio (TlCl)	1+	239.84	7	2.9	Blanco
Tricloruro de talio (TlCl ₃)	3+	310.74	Sd	862	Cristales
Oxido de talio (Tl ₂ O)	1+	424.77	9.52	Insoluble	Negro
Oxido de talio (Tl ₂ O ₃)	3+	456.76	Sd	Insoluble	Negro
Nitrato de talio (TlNO ₃)	1+	266.39	5.56	95.5	Blanco
Nitrato de talio trihidratado (Tl (NO ₃) ₃ +3H ₂ O)	3+	444.44	Sd	Descompone	Cristales
Sulfato de talio (Tl ₂ SO ₄)	1+	504.82	6.77	Soluble	Blanco
Sulfito de talio (Tl ₂ S)	1+	440.85	8.46	0.2	Sd

Sd= Sin datos

Modificado de IPCS 1996, NJDHSS 2000a-d, 2004a-b, y 2007, EPA 2009

Biocinética del talio

La intoxicación en humanos con talio aparece inmediatamente después de su absorción ya sea por la exposición vía respiratoria, por la ingestión de alimentos contaminados o a través de la piel. El tipo de exposición se puede considerar de aguda a crónica según el tipo de manifestaciones clínicas, la dosis y la edad. De hecho debido a que las sales de este metal son incoloras, inodoras e insípidas, han sido utilizadas con fines de homicidio, en casos de envenenamiento intencional y accidental (Galván-Arzate y Santamaría 1998).

En general en los mamíferos, la absorción gastrointestinal de las sales de talio es rápida y en su totalidad. Se conoce que los óxidos y la mayoría de las sales de talio se absorben también rápidamente por la mucosa del aparato respiratorio, la boca y los

pulmones, así como por la piel. Se distribuye en todo el organismo por vía hemática en su forma iónica y se acumula preferentemente en el hígado y riñón, sin embargo una acumulación adicional se produce en las paredes intestinales, el tejido muscular, huesos, piel, glándulas sudoríparas y sebáceas, uñas, pelo y en todo el sistema nervioso. Además es capaz de atravesar la barrera placentaria y hematoencefálica, y una parte es absorbida por los eritrocitos. Es eliminado en la orina, saliva, pelo, uñas, leche y lágrimas, parte es descargado por bilis en el tracto digestivo y consecuentemente eliminado en las heces (Figura 1) (WHO 2006, Babula *et al.* 2008, EPA 2009).

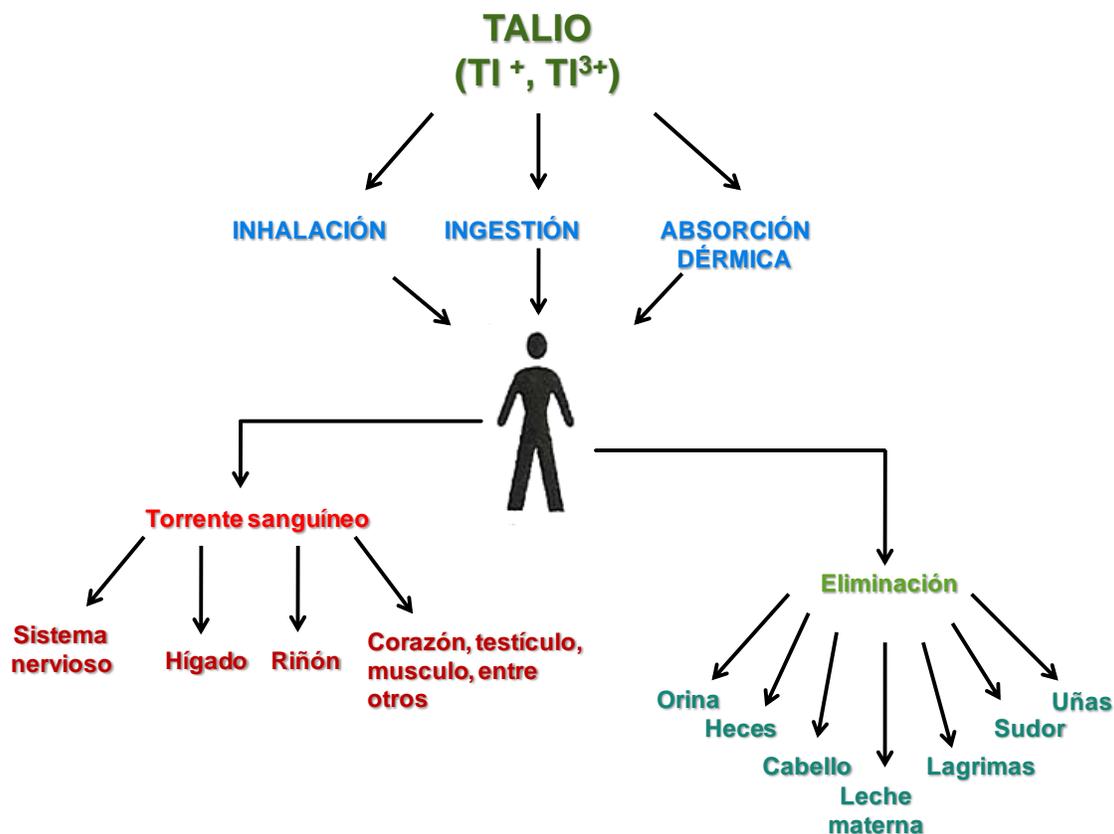


Figura 1. Biocinética del talio en mamíferos.

Los síntomas característicos de intoxicación por exposición o envenenamiento intencional u accidental a corto plazo son dolor y distensión abdominal, náuseas, vómito y diarrea, seguidos de parestesias en las extremidades distales, erupciones cutáneas eritematosas en las mejillas y la región peribucal e hiperqueratosis y líneas de Mees; a largo plazo se presenta alopecia, alucinaciones, convulsiones, coma, hipertensión arterial, nefrotoxicidad, taquicardia, e insuficiencia cardíaca grave. Así mismo las secuelas que pueden presentar los pacientes después del tratamiento son insuficiencia renal y cardíaca, alteraciones mentales y ceguera (Martínez *et al.* 2003, Tsai *et al.* 2006, Sharquie *et al.* 2011).

Casos de intoxicación de talio en la literatura y efectos sobre la salud

En la literatura existen un número considerable de casos de exposición a talio, no obstante a continuación se describen algunos casos seleccionados con la intención de dar un panorama general de la toxicidad en humanos y sus repercusiones.

En nuestro país por ejemplo se tiene el caso de un recién nacido expuesto a talio en el vientre materno, durante su gestación, al nacer presentó insuficiencia respiratoria, criptorquidia bilateral, ano imperforado, estupor, cianosis distal y petequias, además a las 24 horas de nacido se encontraron 60 µg/l de talio en orina. Con tratamiento adecuado los síntomas fueron desapareciendo pero a los tres años presentó retraso psicomotor (Rangel-Guerra *et al.* 1990).

En otro caso, sucintado también de nuestro país, un niño de cinco años que ingirió raticida con un contenido de 1.2 g de sulfato de talio (equivalente 30 mg/kg de TI) presentó anorexia, náusea, dolor difuso en el abdomen, mialgias, debilidad en los miembros pélvicos, dolor y aumento en las articulaciones, síntomas que inicialmente hicieron suponer Lupus eritematoso, pero la alopecia y los niveles de talio en sangre (37.2 µg/dl) y orina (23.30 µg/l) determinaron la intoxicación por este metal (Montoya-Cabrera *et al.* 1991). Estos son solo algunos de muchos casos que estos autores han descrito de similar importancia.

Se tienen documentados otros casos de ingesta de sulfato de talio u otros compuestos no definidos pero que contenían altas concentraciones de talio (p.e. 35 g/l o gente que consumió agua contaminada), en los que se encontraron valores de 5240 µg/l y 69600 µg/l en suero y orina, además de presentar síntomas como parestesias, náuseas, vómitos, dolor y debilidad en las extremidades, pérdida del cabello y pérdida momentánea de memoria (Malbrain *et al.* 1997, Lu *et al.* 2007).

Mecanismo de toxicidad

El mecanismo de acción por el cual ejerce su efecto tóxico está relacionado con la incapacidad de las membranas celulares para distinguir entre el Tl^+ y el K^+ , ya que ambos iones poseen radios iónicos similares, de esta manera el Tl^+ es capaz de interferir en los procesos dependientes de K^+ y otros cationes como Na^+ y Mg^{2+} (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Nriagu 1998)

Como otro posible mecanismo de la toxicidad del talio se postula la capacidad del metal para reaccionar con grupos sulfhídrido de las proteínas, lo que interfiere con una variedad de procesos, el cloruro de talio (I) en solución acuosa es capaz de formar complejos con el azufre que contienen los aminoácidos, sin embargo, los resultados son poco contundentes por lo que los autores concluyen que es poco probable que este sea el principal mecanismo de toxicidad (Galván-Arzate y Santamaría 1998, EPA 2009).

El talio puede estimular el ATP en las células cromafines y por lo tanto conducir a un aumento de la secreción de catecolaminas, lo cual provoca taquicardia, además puede

producir daño directo al miocardio o llevar a cabo la despolarización de las membranas y antagonizar el efecto del calcio en el corazón (IPCS 1990).

Un posible mecanismo por el cual el talio puede ejercer efectos neurotóxicos es a través de la interacción de este con los fosfolípidos de las membranas, tanto en células de cerebro como de otro tipo de órganos, se ha demostrado que el talio produce alteraciones importantes en la fluidez de la bicapa lipídica lo cual podría afectar numerosos procesos como la actividad enzimática, el transporte intracelular, así como la funcionalidad de los receptores e inducir oxidación de lípidos. Además la interacción del talio con el fosfolípido cardiolipina, podría tener un profundo impacto en la funcionalidad de las mitocondrias y ser parcialmente responsable de la liberación de citocromo-c al citosol, con la consecuente activación de las caspasas efectoras, lo que conduciría a la muerte celular por apoptosis (Villaverde y Verstraeten 2003, Puga y Verstraeten 2008).

Efectos genotóxicos in vivo e in vitro del talio

Los estudios relacionados con los efectos del talio a nivel celular y sobre el AND *in vitro* e *in vivo* son muy pocos, y debido a esta situación no son concluyentes.

En hámster Chino a los que se administró en intervalos de 24 horas dos dosis de 5 ó 10 mg/kg de cloruro talio, se llevó a cabo la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células de médula ósea y esta no evidencio cambios con respecto al grupo control (Leonard y Gerber 1997).

En células binucleadas de linfocitos humanos cultivados de un individuo que ingirió aproximadamente 0.5 g de sulfato de talio se encontró incremento significativo de micronúcleos (MN), sin cambios en las evaluaciones tanto de ICH como de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), por lo cual se ha propuesto que el talio y sus compuestos posiblemente tienen efectos indirectos sobre el material genético, interviniendo con la segregación cromosómica durante la división celular (Leonard y Gerber 1997).

Así mismo los reportes que se tienen sobre acetato de talio suman un par y ambos son en células vegetales, como es el caso de *Lemma minor*, en el cual se cultivo esta planta durante 14 días con fotoperiodos de 16 horas seguidos de 8 horas de oscuridad a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con 0.2, 0.5, 1 y 2 μM de acetato de talio, los resultados obtenidos sugieren que puede inducir daño primario sobre el ADN (en forma de rupturas de cadena sencilla) en las plantas expuestas al compuesto y que este efecto es muy posible que se origine indirectamente debido a la disminución e inhibición en la actividad de enzimas encargadas de la defensa celular, como lo son algunas involucradas en abatir estrés oxidante (Babic *et al.* 2009).

Un estudio similar al anterior pero en la planta de *Vicia faba L.*, Radic *et al.* (2009) encontraron (después de 72 horas que el acetato de talio en concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/l}$) incremento de especies reactivas de oxígeno en las hojas y raíces de las plántulas. Estos autores concluyeron que el estrés oxidante está involucrado en el

mecanismo de toxicidad del talio y que la tolerancia de la plántula al metal se logra a través del aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo tanto los efectos del metal se dan de manera indirecta.

Sistemas de prueba

Los sistemas de prueba son utilizados para identificar los efectos tóxicos que produce los agentes ya sean físicos, químicos o biológicos. Entre estos sistemas se encuentra un amplio conjunto de modelos *in vivo* e *in vitro* conocidos como bioensayos, los cuales por un lado nos permiten conocer los efectos biológicos y por el otro los mecanismos por los que estos agentes actúan. A demás, permiten evaluar diversos aspectos fisiológicos, metabólicos y sobre el material genético, que conducen a la toxicidad (NRC 1992, Rodríguez 1995, Rodríguez-Mercado 2001).

Por medio de estos es posible cuantificar la exposición a cualquier agente y su impacto sobre los organismos y la salud. Para conocer, evaluar y cuantificar los efectos antes mencionados, los sistemas de prueba se apoyan en marcadores biológicos que a su vez se clasifican en tres tipos, de exposición, de susceptibilidad y de respuesta. Los primeros permiten identificar la medida de la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto tóxico, su metabolito o metabolitos en fluidos corporales. Los segundos sirven como indicadores de la respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o grupo de tóxicos, en tanto que los de respuesta indican cambios bioquímicos que acontecen tras la exposición a xenobióticos (Gil 2000).

Es importante tomar en cuenta que la variabilidad biológica entre individuos afecta tanto a biomarcadores de exposición como de respuesta (NRC 1992, Ostrosky 1994).

Como marcadores de efecto sobre el material genético están el clastogénico, mutagénico y genotóxico. Dentro de estos se encuentran las aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), los micronúcleos (MN), hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), el ensayo de electroforesis unicelular en gel y las mutaciones génicas, entre otras.

Diversos agentes pueden alterar el proceso normal de división celular, manifestándose como inhibición, retraso o aceleración en la división celular. Dos parámetros que pueden indicar estas alteraciones son el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), este último se calcula a partir de la cinética de proliferación celular, mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas (Garza-Jinich *et al.* 1992, Rodríguez-Mercado *et al.* 2003 y 2010).

El intercambio de cromátidas hermanas es una prueba que nos permite estudiar el daño al ADN tanto en células de animales de experimentación como en cultivos celulares, debido a su alta sensibilidad para cuantificar la mutagenicidad tanto de agentes físicos, químicos como biológicos; por lo que los ICH son considerados como un buen marcador de genotoxicidad (Evans 1982, Salamanca 1990).

Los ICH, fueron visualizados por primera vez por Taylor en células vegetales utilizando tritio y autorradiografía. Más tarde se descubrió que la incorporación de un análogo de base, como la 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), en combinación con el colorante de tinción Hoechst 33258 revela los ICH. Este fenómeno se puede observar debido a que el ADN se replica siguiendo un modelo semiconservativo, de esta manera el análogo de base se añade a la cadena nueva de ADN y en un segundo ciclo las dos cromátidas hermanas difieren en la cantidad presente de la base análoga, de tal manera que los cromosomas de la metafase de segunda división se encuentran con una cromátida bifilarmente sustituida con BrdU mientras que su cromátida hermana ésta unifilarmente sustituida, esta condición permite distinguir una cromátida de su hermana (Figura 2) (Schneider 1982, Rodríguez-Reyes y Morales-Ramírez 2003, Wilson y Thompson 2007).

Los ICH se consideran como una manifestación de daños causados al genoma, sin embargo, su significado biológico así como el mecanismo de su formación no ha sido explicado completamente. Se cree que los ICH pueden ser causados por la presencia de lesiones en el ADN, en el momento de la replicación o por alguna alteración de éste último proceso, ya que es en este momento cuando las cadenas de ADN están muy juntas y la recombinación homóloga puede llevarse a cabo con mayor facilidad (Eke y Celik 2008).

Los ICH no representan situaciones letales para la célula, sin embargo, se ha observado que la frecuencia de éstos aumenta cuando las células son expuestas a agentes tanto químicos como físicos que dañan el material genético, incluyendo agentes mutágenos o cancerígenos, y en el caso de ciertas enfermedades congénitas como el síndrome de Bloom, el padecimiento conocido como Xeroderma Pigmentosa y la enfermedad de Behcet, todas relacionadas con alteraciones en las moléculas encargadas de reparación y recombinación (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007; Morales-Ramírez 1988).

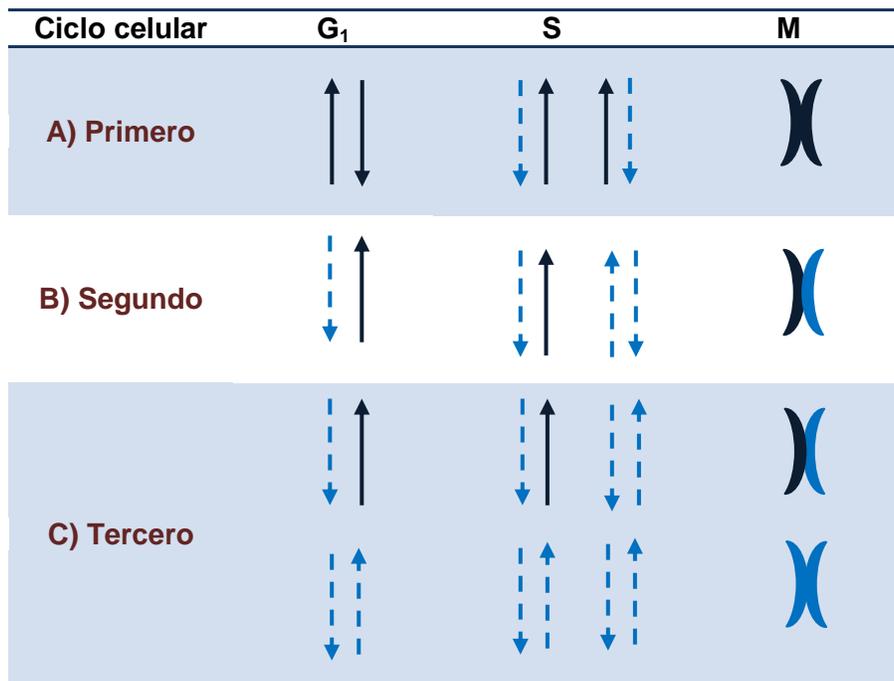


Figura 2. Tinción diferencial de cromátidas hermanas. ■ Cadena de ADN sin incorporación de BrdU. ■ Cadena de ADN con sustitución de BrdU. En **A** incorporación de BrdU durante el primer ciclo de división, en el cual las dos cromátidas están unifilarmente sustituidas; en **B** durante el segundo ciclo de división la incorporación de BrdU es bifilar en una cromátida mientras la otra es unifilarmente sustituida con BrdU y en **C** En un tercer ciclo o subsecuentes se encontrarán cromosomas con una cromátida bifilar y la otra unifilarmente sustituidas con la base analoga, así como también cromosomas con las dos cromátidas sustituidas bifilarmente.

JUSTIFICACIÓN

La toxicidad que ejerce el talio y sus compuestos sobre el humano y los organismos está bien documentada, sin embargo sus efectos a nivel celular y sobre el material genético son escasos y por lo tanto no son contundentes.

Sus sales han tenido múltiples aplicaciones como lo son la elaboración de diversos plaguicidas, cosméticos y en el sector salud para combatir diversas enfermedades; actualmente son útiles en la fabricación de vidrios, cerámicas y semiconductores, formando parte de fibras ópticas, a demás, por el uso de minerales con talio en industrias como la cementera y la eléctrica es liberado en el ambiente.

Algunos autores coinciden en que la toxicidad del metal es comparable a la del cadmio, níquel, mercurio o plomo. Se conoce que el ion talioso (Tl^+) cruza las membranas biológicas debido a que es confundido con los iones de K^+ , tendiendo a acumularse en el interior de las células interactuando con varias moléculas y procesos celulares, no obstante los mecanismos por los cuales ejerce sus efectos no se han descrito por completo.

De lo anterior se desprende la necesidad de estudiar la toxicidad del talio en diferentes sistemas de prueba, uno de los más utilizados para este fin son los modelos *in vitro* como lo es el cultivo de linfocitos humanos en combinación con la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas. Esta metodología permite evaluar genotoxicidad a través de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y al mismo tiempo permite analizar toxicidad celular y alteraciones en la división a través del parámetro de índice de replicación (IR) e índice mitótico (IM).

HIPÓTESIS

Los datos acerca del daño al ADN inducido por talio en diferentes sistemas de prueba son limitados y no muestran resultados contundentes, no obstante, es importante retomar los estudios con respecto a este tópico para incrementar el conocimiento de los efectos que el talio pueda inducir a nivel genético y celular.

Por ello, si el talio puede atravesar la membrana celular e interferir en los procesos de la célula, es posible que tenga la capacidad de interactuar con el material genético e inducir daño, el cual se manifestara como intercambio de cromátidas hermanas y además alterar el proceso normal de división celular, ya sea deteniendo el ciclo o produciendo muerte celular en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

OBJETIVOS

General

Valorar los efectos citotóxico y genotóxico en linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 µg/ml de acetato de talio (CH₃COOTl).

Particulares

Evaluar el IM en cultivo de linfocitos humanos tratados durante 48 horas con el acetato de talio.

Evaluar la cinética de división celular y determinar el IR en cultivo de linfocitos humanos tratados durante 48 horas con el acetato de talio.

Cuantificar la frecuencia de ICH inducidos en los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica expuestos durante 48 horas las diferentes concentraciones del acetato de talio.

Determinar mediante pruebas estadísticas las diferencias entre los tratamientos con talio y el grupo testigo.

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos

Todos los reactivos que se usaron fueron de Baker Analyxed de México, excepto el acetato de talio (CH_3COOTI , CAS 563-68-8, Riedel-de-Haën con 97% de pureza), la 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, Sigma, San Luis Missouri, EUA), la colcemida y el medio de cultivo RPMI-1640 PB-MAX (Gibco-Invitrogen, California, EUA), la Giemsa (Hycel de México) y la heparina (Pisa, México).

Concentraciones utilizadas para el tratamiento

Se preparó una solución patrón de acetato de talio en agua desionizada, de la cual se tomaron los volúmenes para obtener la concentración de 100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La solución de talio fue preparada en el momento y esterilizada por filtración con una membrana de 0.22 micras (Whatman, Inglaterra). Las concentraciones aplicadas en este trabajo se determinaron mediante una curva dosis efecto de acuerdo con la literatura y experimentos previos realizados en el laboratorio.

Obtención de la muestra de sangre

El estudio se llevó a cabo utilizando la muestra de sangre periférica de tres donadores jóvenes, no fumadores, clínicamente sanos y sin historia reciente de exposición a fármacos o radiación. Obteniéndose 10 ml de muestra por venopunción utilizando una jeringa con heparina, como anticoagulante.

Cultivo de linfocitos humanos

En condiciones de esterilidad, se realizaron cultivos de 72 horas, utilizando tubos de 15 ml, para lo cual se colocaron 0.5 ml de sangre en 4.5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 PB-MAX; constituido con L-glutamina, sulfato de gentamicina como antibiótico, suero fetal bovino y fitohematoglutinina como un agente estimulante de la mitosis. Los cultivos se incubaron a 37°C y a las 24 horas de iniciada la incubación se adicionó el tratamiento de acetato de talio 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, contando con cultivos testigo a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento. Al mismo tiempo del tratamiento con el metal, a todos y cada uno de los cultivos se añadió 5 $\mu\text{g/ml}$ del análogo de base BrdU. Una hora antes de concluir el periodo de incubación, se detuvieron las células en metafase, adicionando 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de colcemida.

Concluida la incubación los cultivos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, posteriormente los paquetes celulares fueron sometidos a un choque hipotónico, para lograr una adecuada dispersión cromosómica, durante 20 minutos a 37 °C con 5 ml de KCl (0.075M), concluidos los 20 minutos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos y cada paquete celular se fijó con una mezcla de metanol-ácido acético en proporción 3:1, preparado en el momento, se realizaron tres cambios con reposo de 15, 10 y 5 minutos respectivamente. Por cada tratamiento con talio y los testigos se hizo un cultivo con su duplicado (Herrera *et al.*1999, Rodríguez-Mercado 2001).

Preparación de laminillas y tinción diferencial

Las preparaciones se hicieron por goteo sobre laminillas previamente etiquetadas. Las preparaciones se flamearon y se dejaron secar al aire. Posteriormente se realizó la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas, que de manera breve consiste en irradiar con luz ultravioleta las preparaciones en un medio acuoso durante 20 minutos, seguido a esto se colocaron en un baño con solución citrato salina (2xSSC, 0.03 M de citrato de sodio mezclado con 0.3 M de cloruro de sodio) a 55 °C durante 20 minutos. Al terminar el tiempo en la solución salina las preparaciones se enjuagaron al chorro de agua y se tiñeron durante 20 minutos con Giemsa al 5%, quitando el exceso de colorante al chorro de agua y dejando completar el secado al aire (Apelt 1981, Gomez-Arroyo y Souza 1985, Rodríguez-Mercado 2001, Buyukleyla 2009).

Evaluaciones del índice mitótico e índice de replicación

El índice mitótico se evaluó mediante el conteo de un mínimo de 1000 células por cultivo, distinguiendo las células en metafase de las células en interfase (Figura 3). Los cálculos de IM se realizaron de acuerdo a la siguiente fórmula (Bolzán y Bianchi 2002):

$$IM = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Para el cálculo del índice de replicación se llevó a cabo el conteo de 100 células en división por cultivo, evaluando un total de 200 células por tratamiento, se clasificaron metafases en primer, segundo y tercer ciclo de división celular de acuerdo a la tinción diferencial de cromátidas hermanas, ésta técnica nos permite observar una tinción uniforme en las metafases de primer ciclo (M1), una tinción diferencial en metafases de segundo ciclo (M2) y en metafases de tercer ciclo (M3), se observa una parte de la metafase con tinción diferencial y el resto con tinción uniforme (Figura 4). Para conocer el valor del IR se utilizó la siguiente fórmula (Miller 1991, Albertini *et al.* 2000):

$$IR = \frac{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}{\text{Total de células}}$$

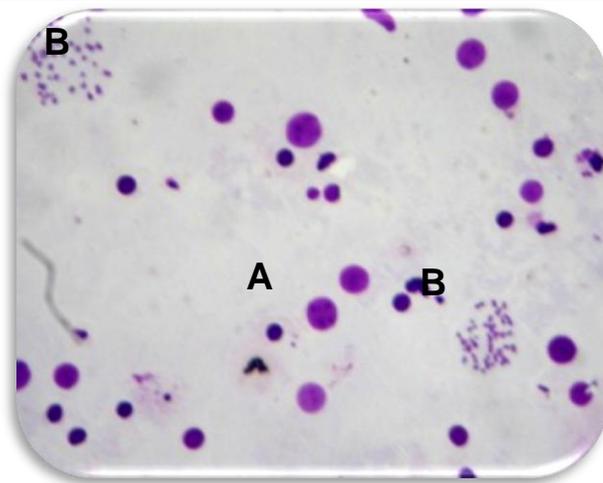


Figura 3. Fotografía tomada a 100x de las muestras analizadas en este trabajo, donde se muestran células en metafase (A) y células en interfase (B) de los cultivos de linfocitos humanos.

Evaluaciones de los intercambios de cromátidas hermanas

La frecuencia de ICH se realizó mediante el análisis de células en metafase de segundo ciclo de división, bien extendidas y con buena tinción a 100x en un microscopio de campo claro, evaluando un mínimo de 50 metafases por cultivo; se cuantificó el número y tipo de intercambios, considerando los intercambios sencillos o terminales como uno y los intersticiales como dos (Figura 4), evaluando 100 metafases por tratamiento (EPA 1998, Albertini *et al.* 2000, Eke y Celik 2008).

Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de los datos experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey para encontrar diferencias entre la medias de las frecuencias de ICH, mientras, para el IM se utilizó la prueba de Z y para el IR fue utilizada la prueba *ji* cuadrada (Dean y Danford 1984, Djelic 2006, Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003).

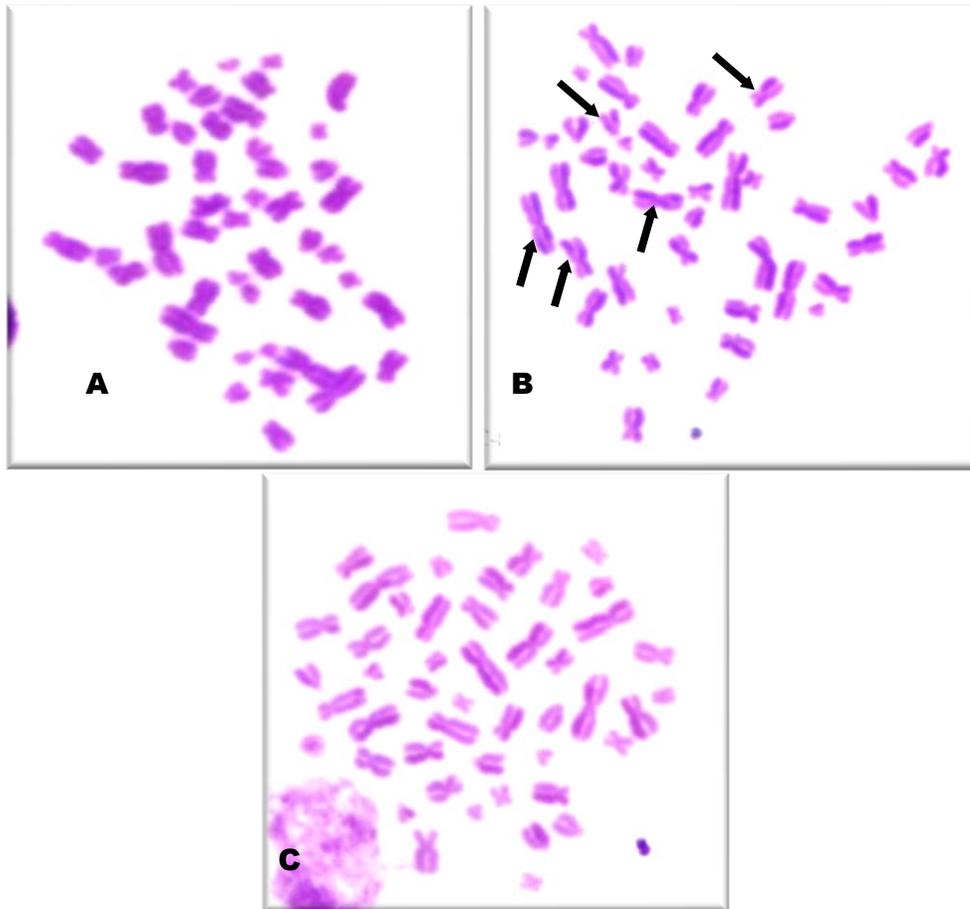


Figura 4. Células en metafase de los cultivos de linfocitos humanos. En (A) se muestra la metafase en primer ciclo de división celular en la cual se pueden observar los cromosomas con tinción intensa y uniforme; en (B) una metafase en segundo ciclo que presenta tinción diferencial de cromátidas hermanas en las cuales se aprecian ICH sencillos y al centro un intercambio intersticial o doble, y en (C) una célula en tercer ciclo de división que presenta tanto cromosomas con tinción diferencial como cromosomas con tinción débil. Fotografía tomada a 100x de las muestras analizadas en este reporte.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de los diferentes parámetros se muestran en los Cuadros II y III. Estos se analizaron por individuo y se indica al donador de 33, al de 22 y al de 23 años con la letra A, B o C, respectivamente, tanto de los cultivos testigo como de los tratados con las diferentes concentraciones de acetato de talio (CH_3COOTI). Además, el análisis de los promedios de los tres donadores para los diferentes parámetros evaluados se presentan en las Figuras 5, 6 y 7.

Índice mitótico e índice de replicación

En los cuadros y figuras, los datos de IM, frecuencia de ICH así como IR se dan en media con su error estándar, en los mismos se pueden observar la prueba y las diferencias estadísticas. En relación a la cinética de ciclo celular los valores se muestran en porcentaje.

En el cuadro II se presentan los datos del IM para cada uno de los donadores, este parámetro en los tres casos se redujo conforme aumenta la concentración. La diferencia estadística de la disminución del IM en el donador A se aprecia a partir de 5 $\mu\text{g/ml}$ y hasta 100 $\mu\text{g/ml}$, con $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente. Para el donador B las diferencias se dan en todas las concentraciones, desde la más baja de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$ o $P < 0.01$), mientras que, en el donador C se presenta la reducción en los tratamientos de 1 $\mu\text{g/ml}$ hasta 100 $\mu\text{g/ml}$. Es importante mencionar que en el caso del donador C en la concentración más alta probada de acetato de talio, de 100 $\mu\text{g/ml}$, solo se observaron células en interfase, ninguna en metafase, por lo que el valor del IM es cero, por tal razón en el análisis de los demás parámetros citogenéticos como los ICH no hay datos. En la figura 5 se muestra el promedio de los tres donadores, en donde se observa claramente la disminución de los cultivos tratados con talio y del grupo testigo, además se aprecia un comportamiento dependiente de la concentración.

Cuadro II. Índice mitótico (IM) en cultivo de linfocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio (CH_3COOTI)

CH ₃ COOTI en $\mu\text{g/ml}$	IM (%) \pm EE		
	Donador A	Donador B	Donador C
Testigo	1.64 \pm 0.06	1.08 \pm 0.04	1.49 \pm 0.09
0.5	1.54 \pm 0.06	0.67 \pm 0.04 ^a	1.38 \pm 0.05
1	1.45 \pm 0.08	0.57 \pm 0.02 ^b	1.18 \pm 0.05 ^a
5	1.43 \pm 0.13 ^a	0.50 \pm 0.02 ^b	1.00 \pm 0.05 ^b
10	1.35 \pm 0.16 ^a	0.40 \pm 0.02 ^b	0.82 \pm 0.06 ^b
50	1.27 \pm 0.05 ^b	0.12 \pm 0.02 ^b	0.40 \pm 0.07 ^b
100	1.19 \pm 0.07 ^b	0.05 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b

EE, error estándar

Prueba de Z para proporciones

^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.01$, comparado con su respectivo testigo

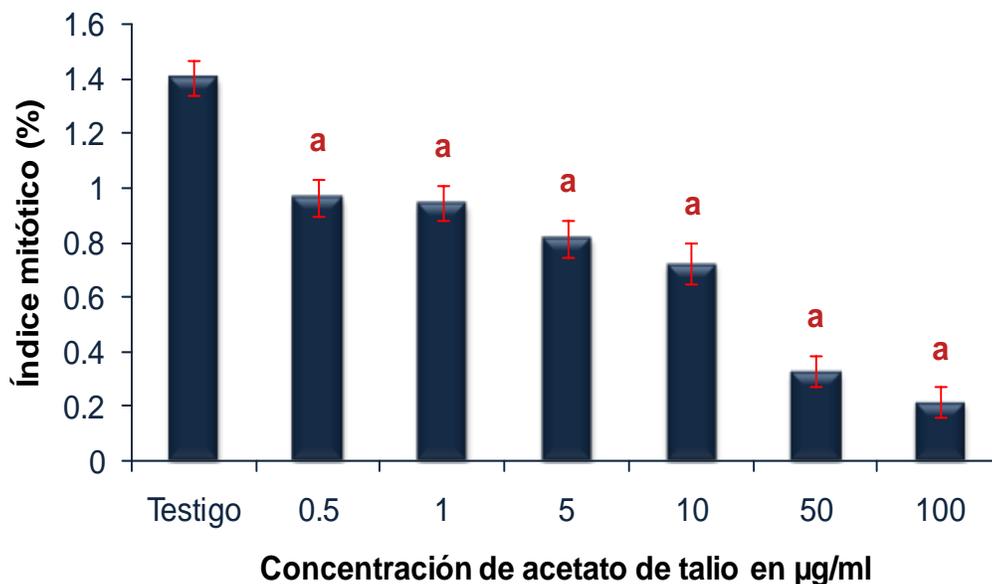


Figura 5. Índice mitótico de linfocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Los datos representan el promedio de los tres donadores, 48000 células analizadas por concentración (valor de la regresión lineal $R^2 = 0.935$; ^a $P < 0.01$ con prueba de Z para proporciones).

En el cuadro III se encuentran los resultados de cinética de ciclo celular, a partir de la cual se calculó el IR. Los valores de este parámetro en los cultivos tratados con talio de los tres donadores muestran el mismo comportamiento, se reducen conforme aumenta la concentración.

En el caso del donador A se puede observar que el porcentaje de células en primer ciclo es mayor a medida que la concentración del compuesto aumenta y consecuentemente las células en segundo y tercer ciclo disminuyen, además en 100 µg/ml se reduce el número de células en metafase que pueden ser analizadas (154 células en total), en comparación con el testigo e incluso con los demás tratamientos, donde las diferencias estadísticas con respecto al testigo aparecen en todas las concentraciones empleadas de acetato de talio, desde 0.5 µg/ml hasta la de 100 µg/ml ($P < 0.05$ y $P < 0.01$).

Los datos para el donador B presentan un comportamiento similar al del donador A en la cinética de ciclo celular y el resultado del IR, sin embargo en este el número de células en metafase encontradas disminuye en los tratamientos de 50 y 100 µg/ml (111 y 23 células en total, respectivamente), donde además, el cien por ciento de las metafases evaluadas se encuentran en primer ciclo de división.

En cuanto a los datos encontrados en las células de los cultivos del donador C, se observó el mismo comportamiento que en el donador B, en concentraciones altas de talio el cien por ciento de células en primer ciclo y en concentraciones media o baja acumulación paulatina de células en primer ciclo, lo que llevó a la reducción en los valores del IR, donde las diferencias con respecto a su testigo se dan a partir de la concentración de 1 µg/ml.

Cuadro III. Cinética de ciclo celular e índice de replicación (IR) y frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio (CH₃COOTI)

Donador	Tratamiento µg/ml	Cinética de ciclo celular					ICH	
		Células analizadas	M1 (%)	M2 (%)	M3 (%)	IR ± EE	Células analizadas	Frecuencia de ICH/cél ± EE
A	Testigo	200	23	45	32	2.09 ± 0.03	150	5.32 ± 0.33
	0.5	200	37.5	35	27.5	1.90 ± 0.01 ^a	150	4.98 ± 0.82
	1	200	37	34.5	28.5	1.91 ± 0.01 ^a	100	4.63 ± 0.94
	5	200	42.5	36.5	21	1.78 ± 0.01 ^b	150	4.36 ± 0.62
	10	200	40	34.5	25.5	1.85 ± 0.01 ^b	150	5.35 ± 0.84
	50	200	41	37	22	1.81 ± 0.01 ^b	100	4.76 ± 0.83
	100	154	78	21	1	1.19 ± 0.04 ^b	59	6.19 ± 0.81
B	Testigo	200	20.5	32.5	47	2.26 ± 0.03	100	3.82 ± 0.74
	0.5	200	27.5	33.5	39	2.12 ± 0.02 ^a	100	4.32 ± 0.88
	1	200	34	31.5	34.5	2.00 ± 0.02 ^b	100	3.89 ± 0.84
	5	200	40	25.5	34.5	1.94 ± 0.03 ^b	100	4.05 ± 0.81
	10	200	44	31.5	24.5	1.91 ± 0.07 ^b	100	4.57 ± 0.66
	50	111	99	1	0	1.01 ± 0.01 ^b	1	Nd
	100	23	100	0	0	1.00 ± 0.00 ^b	Nd	Nd
C	Testigo	200	27	31.5	41.5	2.14 ± 0.02	100	4.24 ± 0.76
	0.5	200	28.5	31.5	40	2.11 ± 0.02	100	4.59 ± 0.65
	1	200	34	30.5	35.5	2.01 ± 0.01 ^a	100	5.00 ± 0.88
	5	200	47	27	26	1.79 ± 0.01 ^b	100	5.31 ± 0.74 ^a
	10	200	51.5	26	22.5	1.71 ± 0.03 ^b	100	5.43 ± 0.70 ^a
	50	110	100	0	0	1.00 ± 0.00 ^b	Nd	Nd
	100	21	100	0	0	1.00 ± 0.00 ^b	Nd	Nd

EE = error estándar

Nd = no determinado (por ausencia de metafases)

M1, metafases de primer ciclo; M2, metafases de segundo ciclo; M3, metafases de tercer ciclo

IR prueba de χ^2 , ^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.01$, comparado con su respectivo testigo

ICH prueba de ANOVA-Tukey, ^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.01$, comparado con su respectivo testigo

El promedio de los valores del IR de los tres donadores, se muestra en la figura 6, en la cual se puede apreciar de manera clara el efecto dependiente de la concentración y la reducción significativa a partir de los tratamientos de 5 $\mu\text{g/ml}$ de acetato de talio con relación al grupo testigo.

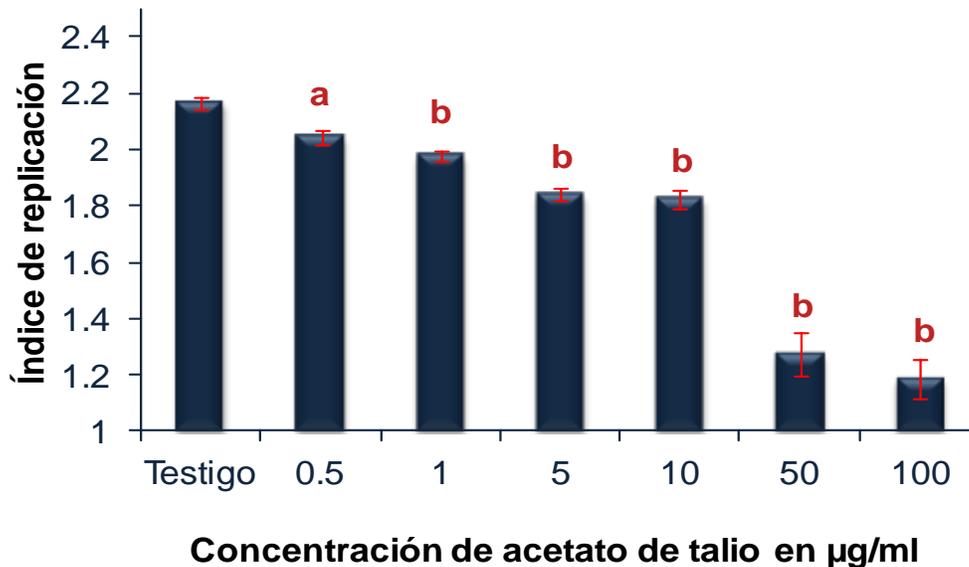


Figura 6. Índice de replicación de linfocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Los datos representan el promedio de los tres donadores, donde se cuantificaron 600 células por concentración, excepto en 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ donde fue de 421 y 256 células respectivamente (valor de la regresión lineal $R^2 = 0.881$; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ con prueba de χ^2).

Intercambio de cromátidas hermanas

El análisis de los ICH para cada donador al igual que la cinética de ciclo celular e IR se presenta en el cuadro III. En dicho cuadro se observa que la frecuencia de ICH encontradas el donador A no revela cambios estadísticos al comparar el grupo testigo con los cultivos tratados con acetato de talio, además el número de células evaluadas en la concentración más alta, de 100 $\mu\text{g/ml}$, es menor debido a que el mayor porcentaje de células se encuentran en primera división; además es importante mencionar que todas las células analizadas en esta concentración tenían ICH, hallando de 2 a 12 intercambios por célula y con una mayor frecuencia metafases con 4 hasta 7 intercambios, mientras que en las células del grupo sin tratamiento fue de 4 a 5 intercambios.

Para el donador B no hay diferencias en la frecuencia de los ICH, sin embargo para los tratamientos de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de acetato de talio, no fue posible el análisis de ICH, debido a que no se encontraron metafases en segundo ciclo.

En el caso del donador C se observan algunos incrementos ($P < 0.01$) en los tratamientos de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, con respecto al grupo testigo, sin embargo en dosis mayores no se determinaron los ICH por la baja o nula proporción de células en segundo ciclo de división, donde son visibles los ICH.

En la figura 7 se aprecia el promedio de los tres donadores, la grafica muestra algunas barras con diferencias con respecto al grupo testigo, sin una tendencia del comportamiento, donde solo las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ presentan estas diferencias ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente). Sin embargo, debe señalarse que los datos en 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ son únicamente de un donador, por lo que solo las concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ podrían ser representativas, ya que son evaluaciones de los tres donadores.

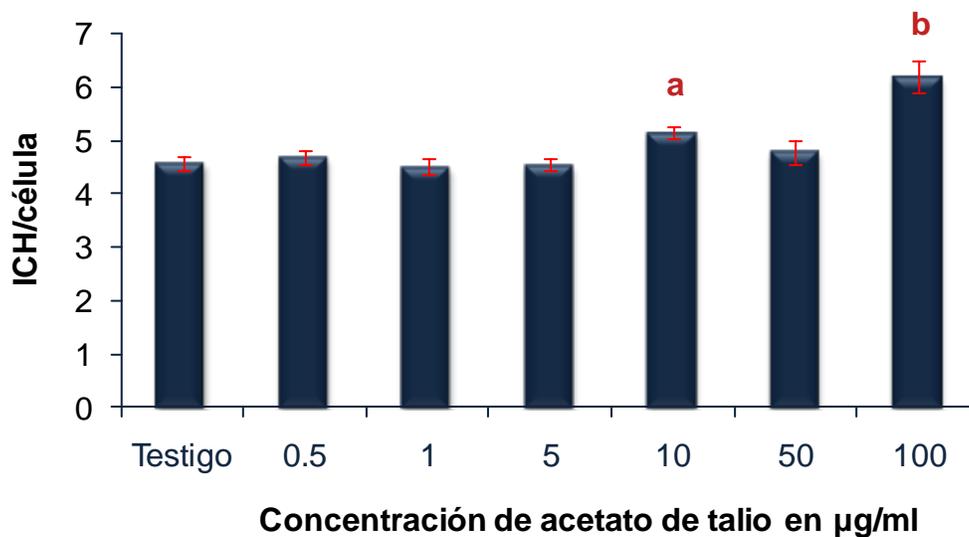


Figura 7. Frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas de linfocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Los datos representan el promedio de los tres donadores donde el análisis fue de un mínimo de 300 células en segundo ciclo de división por concentración, excepto en 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ que fue 101 y 59 células respectivamente (^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.01$ con prueba de ANOVA- Tukey).

DISCUSIÓN

Estudios han mostrado los efectos tóxicos que se presentan tras la exposición a talio como son gastrointestinales, cardiovasculares y neurológicos. En la actualidad varios grupos han retomado las investigaciones para dilucidar la manera en que el metal produce su toxicidad (Richelmi *et al.* 1980, Leonard y Gerber 1997, Malbrain *et al.* 1997, Gill *et al.* 2005, Peter y Viraraghavan 2005). Por lo anterior, la intención de este trabajo es contribuir al conocimiento de los efectos citotóxicos y genotóxicos del acetato de talio (CH_3COOTI), utilizando como modelo el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica y la prueba citogenética tinción diferencial de cromátidas hermanas.

En el Cuadro IV se muestra la cantidad de acetato de talio aplicada en los cultivos y su equivalencia en μM , con la intención de comparar los resultados de este estudio con los de la literatura. En el ser humano, se toma como cantidad de talio basal de 0.0015 a 0.0063 $\mu\text{g/ml}$ y de 0.001 a 0.0034 $\mu\text{g/ml}$ en orina y sangre, respectivamente (IPCS 1996, EPA 2009) No obstante en personas intoxicadas (accidental o intencionalmente), las concentraciones en orina aumentan hasta 21.6 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en sangre alcanzan valores de 0.08 $\mu\text{g/ml}$ (Richelmi *et al.* 1980, Malbrain *et al.* 1997, Cvjetko *et al.* 2010, Sharquie *et al.* 2011); valores que están en los fluidos biológicos y que se encuentran dentro del rango de las concentraciones que se evaluaron. De la misma forma se tienen reportes de la cantidad de talio en personas que viven cerca de plantas cementeras en las que los valores encontrados aumentan hasta 2.5 veces más (Brockhaus *et al.* 1981; Dolgner *et al.* 1983).

Cuadro IV. Equivalencia de acetato de talio en μM y cantidad de iones en el compuesto.

Acetato de talio		Cantidad de iones presentes en el compuesto (en $\mu\text{g/ml}$)	
$\mu\text{g/ml}$	Equivalencia en μM	TI^+	CH_3COO^-
0.5	1.89	0.387	0.112
1	3.79	0.775	0.224
5	19.98	3.879	1.120
10	37.96	7.758	2.241
50	189.80	38.793	11.206
100	379.60	77.586	22.413

Índice mitótico e índice de replicación

El IM y el IR son buenos marcadores biológicos sensibles para detectar toxicidad por muerte celular y alteraciones en la proliferación como lo es el retraso del ciclo celular (Garza-Jinich 1992, Rojas *et al.* 1992; Morales-Ramírez y García-Rodríguez 1994). La disminución del IM es consecuencia del retraso en la mitosis por arrestos en alguna de las fases previas del ciclo celular (G_1 , S G_2), pero también, es debido a la pérdida permanente de la capacidad de proliferación que puede conducir a la muerte de la célula (Ostrosky 1994, Rodríguez-Mercado *et al.* 2010). En el presente estudio los resultados muestran que el acetato de talio disminuye la cantidad de células que entran en mitosis, efecto que sigue un comportamiento dependiente de la concentración, y se observó al realizar el análisis de cada donador como al conjuntar los datos de los tres donadores y realizar el análisis promedio. Este efecto se ha observado en el mismo sistema de linfocitos humanos *in vitro* con diversos agentes químicos que en su composición tienen metales esenciales y no esenciales, tales como el cromo, plomo, aluminio, vanadio y hierro, por mencionar algunos, los cuales producen daño en las estructuras de la célula (Roldán y Altamirano 1990, Raja 1994, Lima *et al.* 2007, 2008).

El IR es considerado marcador de citostaticidad el cual permite identificar los agentes que pueden estimular o retrasar la cinética de división celular (Rojas *et al.* 1992, Ostrosky 1994). La cuantificación de la cinética de ciclo celular y el cálculo del IR muestran disminución de este parámetro en todas las concentraciones (Cuadro III), lo cual, indica que el proceso normal de división celular está siendo afectado.

Se tienen reportes en los que se describe la interacción del TI con los grupos sulfhídrico de las proteínas que conduce a la inhibición de varias enzimas (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Bolzán y Bianchi 2002, Villaverde y Verstraeten 2003). Chia *et al.* (2005) observaron en células de glioma C6 de rata que el acetato de talio (en concentraciones de 10 a 300 μM) puede modificar la expresión de la proteína p21, la cual se conoce que inhibe los complejos ciclina/CDK (ciclina/quinasa dependiente de ciclina) que controlan el paso de G_1 a S (ciclina D/CDK4) y de G_2 a M (ciclina B/CDK2) (Sancar *et al.* 2004). Situación que contribuye a explicar la disminución en el IR donde los tratamientos con acetato de talio indican que puede inducir arrestos en el ciclo celular afectando la transición de G_1/S o G_2/M , que compromete la proliferación celular y que finalmente puede conducir a muerte por apoptosis, como se ha observado en células de glioma C6 y otros tipos celulares.

La disminución del IM e IR, en la concentración de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (equivalente a 189.8 y 379.6 μM , respectivamente) obedece a que se encontró número bajo de células en metafase y a que estas además se encontraban en primer ciclo de división, lo cual indica por un lado efecto citostático y por otro muerte celular. Este comportamiento se ha observado en hepatocitos de rata cultivados y en células Jurkat (linfoblastos T de humano) tratados con acetato de talio y otras sales del metal en concentraciones que van de 100 a 500 μM (Bragandin *et al.* 2003, Reza *et al.* 2011).

Intercambio de cromátidas hermanas

En cuanto a los ICH, no mostraron cambios considerables con respecto al testigo, pero si una tendencia a incrementar en la concentración de 100 µg/ml, solo en uno de los donadores, por lo tanto los resultados no son claros y no muestran un efecto genotóxico contundente. Sin embargo, se han realizado estudios con otros metales pesados también presentes en la naturaleza como aluminio, arsénico, cadmio, cromo, mercurio, níquel, plomo y vanadio, en donde se ha encontrado que tienen la capacidad para inducir ICH, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Ohno *et al.* 1982, Léonard 1988, IPCS 1997 y 2006, Eke y Celik 2008).

Se ha propuesto que los ICH se originan durante la replicación de ADN, se forman como producto lesiones en el ADN así como por la inhibición de la síntesis del mismo (Morales-Ramírez *et al.* 1990, 1992). La naturaleza precisa de las lesiones involucradas en la inducción de los ICH no se conoce, sin embargo se han descrito diferentes tipos de mutágenos que producen lesiones en el ADN como aductos y entrecruzamientos e inducen ICH (Morales-Ramírez 1995). Entre ellos se encuentran algunos metales los cuales pueden unirse a los grupos sulfhídrico de las proteínas, intervenir en las funciones de las enzimas implicadas en la síntesis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y reparación del ADN, así mismo producir rompimientos de cadena sencilla y enlaces cruzados con el ADN (Hartwig 1995).

En relación con lo anterior, la mayoría de los metales, entre ellos el talio, tienen la capacidad de aumentar las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden interactuar con las proteínas o proteínas con actividad enzimática y como consecuencia alterar algunas de sus funciones celulares como la respuesta antioxidante, recepción y transmisión de señales, transporte de iones, así como los procesos de síntesis y reparación del ADN (IPCS 1996, 1997, 1998, Léonard y Gerber 1994 y 1997). Es decir no inducen lesiones directas sobre la hélice de ADN, sino que causan daño de forma indirecta.

No se conoce si el talio produce daño de manera directa al ADN. Pruebas bioquímicas demuestran que los iones de Tl^+ pueden unirse a ciertas regiones teloméricas ricas en G-T por su afinidad con los átomos de nitrógeno de las bases (Ouameur *et al.* 2003), sin embargo no se conoce si esto sucede en célula. En el caso de que este tipo de interacciones se formen en los linfocitos cultivados y tratados con Tl^+ , esto podría explicar el ligero aumento de ICH en la dosis alta. Por los antecedentes y lo arriba citado el talio posiblemente no es un inductor de ICH.

Metales como el aluminio, galio e indio que pertenecen al mismo grupo del talio y que son considerados de riesgo para humano han mostrado tener efectos citotóxicos y genotóxicos (Rocha *et al.* 2004). Por mencionar algunos ejemplos, en sistemas *in vivo* e *in vitro* el aluminio (cloruro de aluminio, Al^{3+}) incrementa las AC, ICH e induce rupturas en la cadena de ADN, en tanto que, el galio (cloruro de galio y nitrato de galio, Ga^{3+}) e indio (fosfuro de indio, In^{3+}) solo inducen ICH e incrementan la frecuencia de micronúcleos,

respectivamente (Kuroda *et al.* 1991, NTP 2000, IPCS 2006, Lima *et al.* 2007). Metales que entre ellos comparten diversas propiedades y que producen efectos tóxicos similares.

Finalmente, y de acuerdo con lo arriba mencionado la genotoxicidad de los metales depende de varios factores (Hartwig 1995, Lima *et al.* 2011) y a pesar de que el talio comparte propiedades con el aluminio, el galio y el indio que pertenecen al mismo grupo en la tabla periódica, cada uno ejerce efectos diferentes. Mientras que el aluminio y el galio induce ICH el indio no. Por su parte el talio no es un buen inductor de ICH y se comporta más al galio que a los otros dos metales. En general el talio se comporta como muchos metales, que no son buenos inductores de ICH y ni tampoco potentes mutágenos, más bien son considerados débiles mutágenos. Sin embargo, no podemos descartar el potencial genotóxico del talio, ya que recientemente se encontró en el laboratorio que el acetato de talio incrementa la frecuencia de AC e induce rupturas en la cadena de ADN (Hernández 2011, Jaramillo 2011).

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

- El cultivo de linfocitos humanos expuestos a acetato de talio durante 48 horas mostró que este compuesto disminuye de forma dependiente de la concentración el IM (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) y en concentraciones altas (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) abate este índice, lo cual coloca a este compuesto como agente citotóxico.
- Por otro lado, el acetato de talio también es capaz de disminuir el IR, incrementando las células que se encuentran en primera división y baja la proporción de células en segundo o sucesivos ciclos. Lo anterior es indicativo de que puede bloquear la cinética de ciclo celular induciendo retrasos en alguna de las fases (G_1 , S, G_2), por lo tanto, además de ser citotóxico también tiene acción citostática.
- El análisis de los ICH por donador revela algunas diferencias estadísticas, sin embargo, la frecuencia al promediar los datos solo muestran diferencias en concentración de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$, este comportamiento posiblemente se debe a que el talio al igual que otros metales no es buen inductor de ICH, no obstante, no se puede descartar la capacidad del talio para inducir dicho efecto. Por lo anterior, es importante utilizar otros marcadores de toxicidad genética.

REFERENCIAS

- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Harmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E.G., Tice R., Waters M.D., Aitil A. (2000). IPCS, guidelines for the monitoring effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463, 111-172.
- Apelt F., Kolin-Gerresheim G.J., Bauchinger M. (1981). Azathioprine, a clastogen in human somatic cells. Analysis of chromosome damage and SCE in lymphocytes after exposure *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research* 88, 61-72.
- Babic M., Radic S., Cvjetko P., Roje V., Pavalek B., Pavlica M. (2009). Antioxidative response of *Lemma minor* plants exposed to thallium (I)-acetate. *Aquatic Botany* 91, 166-172.
- Babula P., Adam V., Opatrilova R., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6, 189-213.
- Bragadin M., Toninello A., Bindoli A., Rigobello M.P., Canton M. (2003). Thallium induces apoptosis in Jurkat cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1010, 283-291.
- Buyukleyla M., Rencuzogullari E. (2009). The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology on Environmental Safety* 72, 943-947.
- Bolzán A.D., Bianchi M.S. (2002). Chromosomal response of human lymphocytes to streptozotocin. *Mutation Research* 503, 63-68.
- Brockhaus A., Dolgner R., Ewers U., Krämer U., Soddeman H., Wiegand H. (1981). Intake and health effects of thallium among a population living in the vicinity of a cement plant emitting thallium containing dust. *International Archives Occupational Environmental Health* 48, 375-89.
- Chia Ch.-F., Chen S.-Ch., Ang Chen Ch.-S., Shih Ch.-M., Lee H.-M., Wu Ch.-H. (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Annals New York Academy of Sciences* 1042, 523-530.
- Cvjetko P., Cvjetko I., Pavlica M. (2010). Thallium toxicity in humans. *Arhv za Higijenu Rada Toksikologiju* 2010 (61), 111-119.
- Dean B.J., Danford N. (1984). Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells. En: Mutagenicity testing a practical approach. IRL Press. Oxford; Cap. 7, 187-232.

- Djelic N., Spremo P.B., Bajic V., Djelic D. (2006). Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine *in vitro*. *Mutation Research* 604, 1-7.
- Dolgener R., Brockhaus A., Ewers U., Wiegand H., Majewski F., Soddemann H. (1983). Repeated surveillance of exposure to thallium in a population living in the vicinity of a cement plant emitting dust containing thallium. *International Archives Occupational Environmental Health* 52, 79-94.
- Eke D., Celik A. (2008). Genotoxicity of thimerosal in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation sister chromatid exchange analysis proliferation index and mitotic index. *Toxicology in Vitro* 22, 927-934.
- EPA, Environmental Protection Agency. (1998). Oppts harmonized test guidelines. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.regulations.gov/oldLinks.jsp?url=contentStreamer?disposition=attachme nt&objectId=09000064809bc908&contentType=pdf>
- EPA, Environmental Protection Agency. (2009). Health effects guidelines. In vitro sister chromatid exchange assay. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET>.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.epa.gov/ncea/iris/toxreviews/1012-tr.pdf>.
- Evans H.J. (1982). Sister chromatid exchanges and disease states in man. En: Sister chromatid exchanges, Wolff S. (eds). Segunda parte. Capitulo 7; 183-227.
- Fu F., Wang Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92, 407-418.
- Galván-Arzate. S., Santamaría A. (1998). Thallium toxicity. *Toxicology Letters* 99, 1-13.
- Garza-Jinich M., Rodríguez-Carranza C., Corkidi G., Toledo R., Montero R., Ostrosky-Wegman P. (1992). Supervised mitotic index scoring as a tool in citotoxicity studies. En: Advances in machine vision strategies and applications; 380.
- Gil H.F. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología* 17(1), 19-26.
- Gil H.F. (2005). Toxicología industrial (III) toxicidad de los metales pesados. En: Tratado de medicina del trabajo. Masson. Capitulo 40; 1060.

- Gill L.M., Strobel S.A., Loria P.J. (2005). TI NMR methods for the characterization of monovalent cation binding to nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*. 127 (47), 16723-16732.
- Gomez-Arroyo S., Souza S.V. (1985). In vitro and occupational induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes with furfuryl alcohol and furfural. *Mutation Research* 156, 233-238.
- Hartwing A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals* 8, 3-11.
- Herrera P.N., Ceballos Q.J.M., Pinto E.D. (1999). Prevalencia del intercambio de cromátidas hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Revista biomédica* 10, 71-76.
- Hernández C.H. (2011). Evaluación del daño cromosómico en índice mitótico en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México.
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1990). Thallium. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim525.htm>
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1996). Lead. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid25.htm>
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1996). Thallium. [En línea] Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc182.htm>.
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1997). Aluminium. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm>.
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1997). Sodium arsenate. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid78.htm>
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1998). Copper. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid57.htm>
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (2006). Gallium arsenide (IARC summary and evaluation). [En línea] [Fecha de acceso] En línea (09/09/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol86/volume86.pdf>

- Jaramillo C.E. (2011). Evaluación del daño al AND en leucocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México.
- Kuroda K., Endo G., Okamoto A., Yoo Y.S., Horiguchi S. (1991). Genotoxicity of beryllium, gallium and antimony in short-term assays. *Mutation Research* 264, 163-170.
- Lan C.H., Lin T.S. (2005). Acute toxicity of trivalent compounds to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 432-435.
- Lima P.D.L., Leite D.S., Vsaconcellos M.C., Cavalcanti B. C., Santos R.A., Costa L.V., Pessoa C., Moraes M.O., Burbano R.R. (2007). Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food and Chemical Toxicology* 45(7), 1154-1159.
- Lima P.D.L., Vsaconcellos M.C., Montenegro A.R., Sombra L.M.C., Bahia O.M., Costa-Lotufo V.L., Pessoa C., Moraes M.O., Burbano R.R. (2008). Genotoxic effects of iron sulfate in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicology in Vitro* 22(3), 723-729.
- Lima P.D.L., Vsaconcellos M.C., Bahia O.M., Montenegro A.R., Pessoa C., Costa-Lotufo V.L., Moraes M.O., Burbano R.R. (2008). Genotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicology in Vitro* 22(4), 1032-1037.
- Lima P.D.L., Vsaconcellos M.C., Montenegro A.R., Bahia O.M., Costa E.T., Antunes L.M.G., Burbano R.R. (2011). Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: A review of the literature. *Human and Experimental toxicology* Enero: 1-10.
- Léonard A. (1988). Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of *in vitro* approaches. *Mutation Research* 198, 321-326.
- Léonard A., Gerber G.B. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research* 317, 81-88.
- Léonard A., Gerber G.B. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of germanium compounds. *Mutation Research* 387, 141-146.
- Léonard A., Gerber G.B. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research* 387, 47-53.
- Lu Ch.-I., Huang Ch.-Ch., Chang Y.-Ch., Tsai Y.-T., Kuo H.-Ch., Chuang Y.-H., Shih T.-S. (2007). Short-term thallium intoxication. *Archives of Dermatology* 143 (1), 93-98.

- Malbrain G.M.L.N., Lambrecht Y.G.L., Zandijk E., Demedts A.P., Neels M.H., Lambert W., De Leenheer P.A., Lins L.R., Daelemans R. (1997). Treatment of severe thallium intoxication. *Clinical Toxicology* 35 (1), 97-100.
- Martínez R.N., Sant Y.R., Feldman G., Martínez R.N. (2003). Registro de pacientes intoxicados con talio en Tucumán luego de la prohibición de su uso como rodenticida en Argentina. *Toxicología Clínica*. [En línea] [Fecha de acceso] (09/09/2011): URL <http://www.sertox.com.ar/retel/n13/001.pdf>
- Martínez-Valenzuela C., Gómez-Arroyo S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23(4), 185-200.
- Martí M. J.A., Desoille H. (1993). Talio. En: Medicina del trabajo. 2ª ed. Mansson. Capítulo 31; 1050.
- Maury E., Matter A., Perozo K., Bravo A., Martínez E., Vizcarra M. (2010). Niveles plasmáticos de hierro, cobre y zinc en escolares Barí. *Pediatría (Asunción)* 3(2), 112-117.
- Miller K. (1991). Sister-chromatid Exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 274, 175-182.
- Montoya-Cabrera M.A., Saucedo-García J.M., Escalante Galindo P., López-Morales E. (1991). Intoxicación por talio que simuló lupus eritematoso sistémico en un niño. *Gaceta Médica de México* 127 (4), 333-336.
- Morales-Ramírez P. (1988). El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo* 14 (81), 65-72.
- Morales-Ramírez P., Rodríguez-Reyes R., Vallarino-Kelly T. (1990). Fate of DNA lesions that elicit sister chromatid exchanges. *Mutation Research* 232, 77-78.
- Morales-Ramírez P., Rodríguez-Reyes R., Vallarino-Kelly T. (1992). *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. *Mutation Research* 272, 215-221.
- Morales-Ramírez P., García-Rodríguez M.C. (1994). *In vivo* of chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Research* 320, 329-334.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2000a). Thallium acetate. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2000b). Thallium carbonate. Right to Know Program. Nueva Jersey.

- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2000c). Thallium chloride. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2000d). Thallium malonate. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2004a). Thallium. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2004b). Thallium nitrate. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. (2007). Thallium sulfate. Right to Know Program. Nueva Jersey.
- NRC, National Research Council. (1992). Biologic markers in immunotoxicity. The national academies press. Washington, D.C.; 9-22.
- Nriagu J.O. (1998). Thallium in the environmental. Jhon Wiley and Sons. EUA; 284.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- NTP, National Toxicology Program. (2000). Toxicology and carcinogenesis studies of gallium arsenide. [En línea] [Fecha de acceso] (08/08/2011): URL http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr492.pdf.
- Ohno H., Hanaoka F., Yamada M.-A. (1982). Inducibility of sister-chromadid exchanges by heavy-metal ions. *Mutation Research* 104, 141-145.
- Ouameur A.A., Navisi S., Mohajerani N., Tajmir-Riahi H.A. (2003). Thallium-DNA complexes in aqueous solution. Major in menor groove binding. *Journal Biomolecules Structures Dynamics* 20(4), 561-565.
- Ostrosky W. P. (1994). El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta Médica de México* 130(6), 432-437.
- Pelclova D., Urban P., Ridzon P., Senholdova Z., Lukás E., Diblínk P., Lacina L. (2009). Two-year follow-up of two patients after severe thallium intoxication. *Human and Experimental Toxicology* 28, 263-272.
- Peter A.L.J., Viraraghavan T. (2005). Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31, 493-501.
- Puga M.L.C., Verstraeten S.V. (2008). Thallium(III)-mediated changes in membrane physical properties and lipid oxidation affect cardiolipin–cytochrome c interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 2157-2164.

- Radic´ S., Cvjetko P., Glavas´ K., Roje V., Pevalek-Kozlina B., Pavlica M. (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Environmental Toxicology Chemistry* 28, 189-196.
- Rajah T., Ahuya R.Y. (1994). In vivo genotoxic effects of smoking and occupational lead exposure in printing press workes. *Toxicology Letters* 76(1), 71-75.
- Rangel-Guerra R., Martínez H.R., Villareal H.J. (1990). Intoxicación por talio. Experiencia con 50 pacientes. *Gaceta Médica de México*. 126 (6) 487-495.
- Reza E.M., Pourahmad J., Daraei B. (2011). Thallium (I) and Thallium (III) induce apoptosis in isolated rat hepatocytes by alterations in mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicological and Environmental Chemistry* 93 (1), 145-156.
- Richelmi P., Bono F., Guardia L., Ferrini B., Manzo L. (1980). Salivary levels of thallium in acute human poisoning. *Archives of Toxicology* 43, 321- 325.
- Rocha J. B., Tuerlinckx S. M., Schetinger C. M., Folmer V. (2004). Effect of group 13 metals on porphobilinogen synthase *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200, 169-176.
- Rodríguez A.R. (1995). Como se identifican los agentes genotóxicos en: Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Fondo de la cultura económica. México.
- Rodríguez–Mercado J.J. (2001) Evaluación de los efectos genotóxico y citotóxico inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a tetraóxido de vanadio. Tesis de Maestría.FES-Zaragoza, UNAM, México.
- Rodríguez-Mercado J.J., Roldán R.E., Altamirano L.M. (2003). Genotoxic of vanadium (IV) in human peropheral blood cells. *Toxicology Letters* 144, 359-359.
- Rodríguez-Mercado J.J., Altamirano-Lozano M.A. (2006). Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22 (4), 173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., Altamirano-Lozano M.A. (2010). Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 33 (1) 97-102.
- Rodríguez-Reyes R., Morales-Ramírez. P. (2003). Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagénesis* 18 (1), 65-72.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R., Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and linphocyte proliferation kinetics

-
- reproducible endpoints in genetic toxicology testing?. *Mutation Research* 282, 283-286.
- Roldán R.E., Altamirano L.M.A. (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research* 245, 61-65.
- Salamanca G.F. (1990). Citogenética humana, fundamentos y aplicaciones clínicas. Médica Panamericana. México; 400.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kacmaz K., Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Reviews of Biochemistry* 73, 39-85.
- Sharquie K.E., Ibrahim G.A., Noaimi A.A., Hamudy H.K. (2011). Outbreak of thallium poisoning among Iraqi patients. *Journal of the Saudi Society of Dermatology and Dermatologic Surgery* 15, 29-32.
- Schneider E.L. (1982). *In Vivo* Methods for Detecting Sister Chromatid Exchange. En: Sister chromatid exchanges, Wolff S. (eds). Segunda parte. Capítulo 8, 229-241.
- Tsai Y.-T., Huang C.-C., Kou H.-C., Wang H.-M., Shen W.-S., Shih T.-S., Chu N.-S. (2006). Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *Neuro Toxicology* 27, 291-295.
- Villaverde S.M., Verstraeten V.S. (2003). Effects of thallium (I) and thallium (III) on liposome membrane physical properties. *Biochemistry and Biophysics* 417, 235-243.
- Wilson D.M., Thompson L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister chromatid exchange. *Mutation Research* 616, 11-23.
- WHO, World Health Organization. (2006). Environmental Health Criteria 234. Environmental health criteria for elemental speciation in human health risk assessment. [En línea] [Fecha de acceso] (07/06/2011): URL <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc234.pdf>
-



Sociedad Mexicana de Genética

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA
2010**

**"100 años con Drosophila como
modelo en genética"**



Programa & Resúmenes
17-22 de Octubre

**C-018 VALORACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL ACETATO DE TALIO
MEDIANTE TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS EN
LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*.**

Felipe-Reyes M, Altamirano-Lozano MA, Mateos-Nava RA 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

La toxicidad del talio y sus compuestos está bien documentada, sin embargo los estudios relacionados con los efectos celulares y genéticos son controvertidos. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es valorar los efectos del acetato de talio (CH_3COOTl) mediante la técnica citogenética de tinción diferencial; la cual, nos permite evaluar genotoxicidad a través de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células de segundo ciclo de división, al mismo tiempo nos permite analizar alteraciones en la división a través del índice mitótico (IM) e índice de replicación (IR). A partir de muestras de sangre periférica de tres donadores jóvenes clínicamente sanos y sin historia reciente de exposición a fármacos o radiación, se hicieron cultivos, se aplicó talio en varias concentraciones (0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), se fijaron las células, se obtuvieron las preparaciones y se realizó la tinción. El análisis de los resultados mostró reducción significativa del IM en los cultivos de los tres donadores y en todas las concentraciones empleadas. Los valores del IR fueron menores al grupo testigo con diferencias estadísticas a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$; además ambos índices siguieron un comportamiento dependiente de la concentración. En cuanto a la evaluación de los ICH únicamente se observó diferencia en la dosis de 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de uno de los donadores. Lo anterior indica que el acetato de talio produce pérdida parcial o permanente en la capacidad de las células para entrar a ciclos consecutivos de división que pueden conducir a la muerte de la célula lo cual se reflejó de la reducción del IM e IR, en tanto que la prueba de ICH no reveló efecto reproducible por lo se sugiere confirmar estos resultados con otros parámetros de genotoxicidad.



EVALUACIÓN DE LOS INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS, ÍNDICE DE REPLICACIÓN E ÍNDICE MITÓTICO EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO* CON ACETATO DE TALIO

Felipe RM, Altamirano LMA y Rodríguez MJJ*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). L5PA Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, FES-Zaragoza, Campus II, UNAM A. P. 9-020, México 15000, D. F. * juserom@correo.unam.mx

Diversas investigaciones han reportado la toxicidad que ejerce el talio (Tl) y sus compuestos sobre los seres vivos. Como metal no es común que cause intoxicaciones, pero sus sales ampliamente usadas en la elaboración de diversos productos, como el carbonato en fungicidas, sulfato en raticidas o en formicidas y acetato de talio en la industria cosmética, por mencionar algunos, sumado a la liberación en el ambiente por la industria cementera y eléctrica, ha causado preocupación por los efectos adversos en la salud humana y su repercusión en la ecología. Algunos autores coinciden en que la toxicidad del Tl es comparable a la de otros metales como cadmio, níquel, mercurio o plomo. Sin embargo, los estudios relacionados con los efectos genotóxicos del Tl son escasos y poco concluyentes, por lo que en este trabajo se evaluó la toxicidad del acetato de talio (CH_3COOTl) en diferentes concentraciones (100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$) en cultivos de linfocitos humanos y la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas. Para lo cual se tomo una muestra de sangre periférica de un donador de 23 años, clínicamente sano y sin historia reciente de exposición a fármacos o radiación. Se hicieron dos cultivos por concentración de Tl y se evaluaron en total por tratamiento 16000 células para índice mitótico (IM), 200 células para índice de replicación (IR) y 100 células en segunda división para cuantificar los intercambios de cromátidas hermanas (ICH). Los resultados obtenidos muestran que el acetato de talio disminuye significativamente el IM en todos los tratamientos con un efecto dependiente de la concentración, del mismo modo disminuye el IR en los tratamientos de 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, en tanto que los datos de ICH no mostraron cambios considerables, pero si una tendencia a incrementar la concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$. Lo anterior sugiere que el acetato de talio tiene una actividad citotóxica, retrasa el proceso normal de división celular y no muestra un efecto genotóxico claro, sin embargo, es conveniente realizar otras evaluaciones para confirmar estos resultados.