



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA: BIOLOGÍA**

***ESTUDIO DEL EFECTO DEL SULFATO DE TALIO SOBRE LA  
FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y DE LA INDUCCIÓN DE  
APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE  
RATONES DE LA CEPA CD-1***

**Presenta: Graciela Pilar García Cárdenas**

**Director de tesis: Dra. María del Carmen García  
Rodríguez**



**Agosto 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

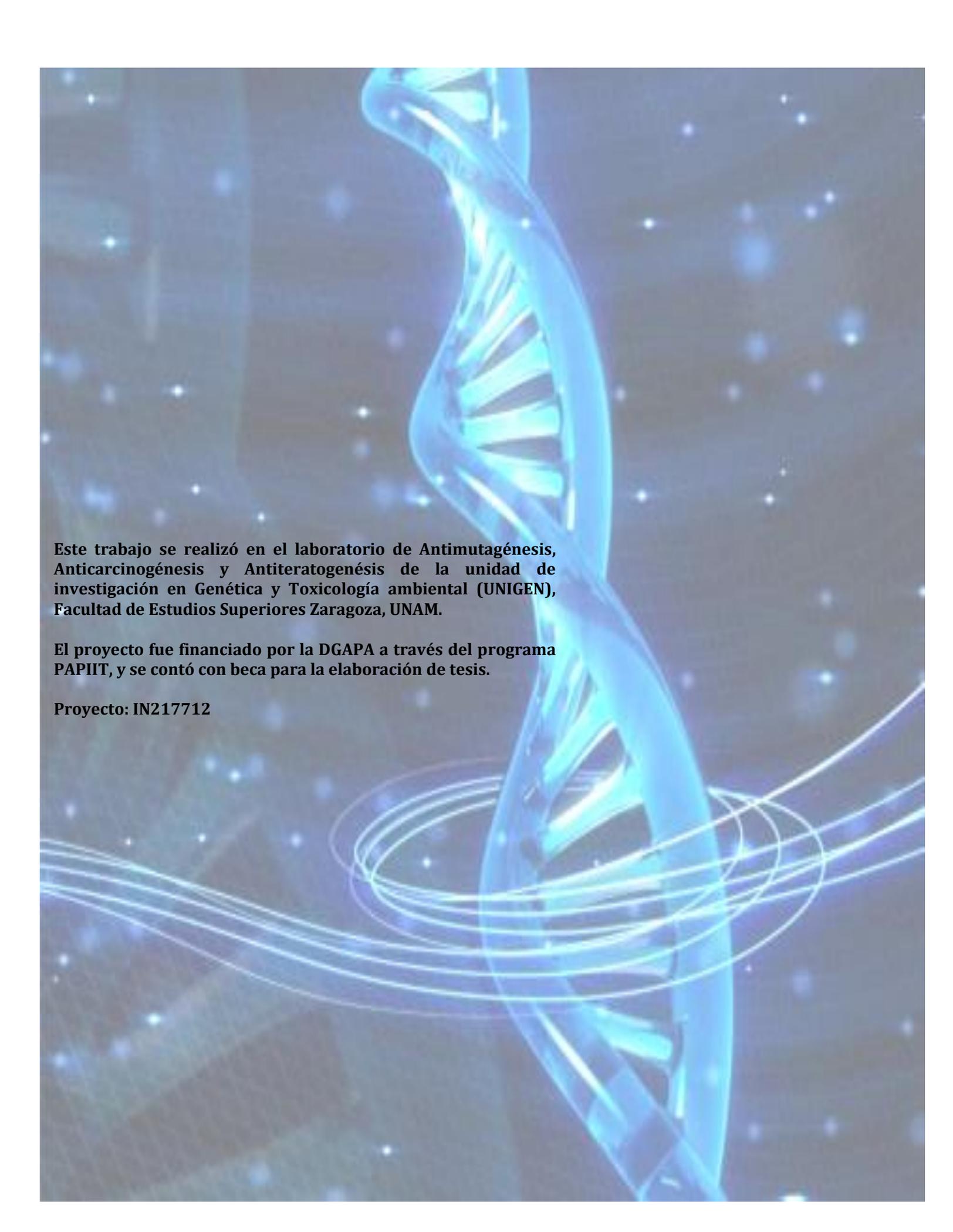


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la unidad de investigación en Genética y Toxicología ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

**El proyecto fue financiado por la DGAPA a través del programa PAPIIT, y se contó con beca para la elaboración de tesis.**

**Proyecto: IN217712**

## ***Agradecimientos***

### ***A mis padres Juana y Marcos:***

*Con todo mi amor, por apoyarme siempre y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. Mil gracias ya que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, no existen las palabras suficientes para agradecer por todo lo que me han dado. ¡¡¡¡LOS AMO TANTO!!!!*

### ***A mis hermanos Marco y Yatzin:***

*Por ser parte de mi vida, por que los adoro aunque a veces sean intratables, y por qué no importa que la vida nos lleve por caminos distintos siempre tendrán mi apoyo incondicional.*

### ***A mi tía Avy:***

*Por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento y en todas mis locuras.*

### ***A mis tí@s:***

*Sabas, Reyna, Fernando, Venancio, Faustino, Felix y Julio por su apoyo incondicional a mi mamy y por consecuencia a mí.*

### ***A mis primas:***

*Yanedt y Guadalupe por ser un rayito de sol en mis días difíciles.*

### ***A mis amigas:***

*Itzelita, Karina y Mary por ser más que mis amigas una parte de mi familia, por todas las experiencias que compartimos a lo largo de la carrera.*

*Mil gracias a esa persona que compartió mis sueños y me impulso a luchar por ellos, por tu apoyo y confianza, porque sabias que lo lograría y por jamás dudarle, por hacerme una mejor persona, simplemente por siempre ser más..... Gracias **Richie**.*

***A la Dra. María del Carmen García Rodríguez:***

*Por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por la confianza y apoyo que siempre me brindo, por compartir sus conocimientos y por enseñarme que el trabajo duro siempre trae recompensas.*

***A los miembros del jurado:***

*Biol. María Cristina Alvarado Domínguez*

*Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano*

*Dr. Juan José Rodríguez Mercado*

*M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava*

*Por contribuir con sus observaciones para el mejoramiento de esta tesis, por compartir su conocimiento y por el tiempo que le dedicaron.*

***A mis compañeras de laboratorio:***

*Ana, Paulina y Megumi por el apoyo durante la realización de los experimentos, en los seminarios y congresos, por hacer el trabajo en el laboratorio más fácil.*

*Y finalmente gracias a la **UNAM** por permitirme formar parte de la institución.*

# Índice de contenido

Índice de abreviaturas .....	i
Resumen.....	ii
I. Introducción.....	1
1.1 Metales pesados.....	1
1.2 Toxicidad de metales pesados.....	3
1.3 Genotoxicidad de metales pesados .....	3
1.4 Talio.....	4
1.4.1 Sulfato de talio .....	9
1.5 Evaluación del efecto genotóxico.....	10
1.5.1 Ensayo de MN.....	11
1.6 Apoptosis.....	13
1.6.1 Vía extrínseca.....	13
1.6.2 Vía intrínseca.....	14
1.7 Necrosis.....	15
II. Justificación .....	17
III. Hipótesis.....	17
IV. Objetivos.....	18
4.1 General .....	18
4.2 Particulares .....	18
V. Material y método .....	19
5.1 Animales.....	19
5.2 Reactivos .....	19
5.3 Tratamientos .....	19
5.4 Evaluación de la inducción de MN en EPC y de la relación de EPC con respecto a los ENC .....	20

5.4.1 Tiempos de evaluación.....	20
5.4.2 Preparación de laminillas .....	22
5.4.3 Toma de muestras.....	22
5.4.4 Evaluación de muestras.....	22
5.5 Evaluación de la viabilidad y apoptosis .....	23
5.5.1 Tiempos de evaluación.....	23
5.5.2 Preparación de colorantes.....	25
5.5.3 Toma de muestras.....	25
5.5.4 Evaluación de muestras.....	25
5.6 Análisis estadístico .....	26
VI. Resultados.....	27
6.1 Efecto del $Tl_2SO_4$ en ratones hembra de la cepa CD-1 .....	28
6.2 Efecto del $Tl_2SO_4$ en ratones macho de la cepa CD-1 .....	32
6.3 Efecto del $Tl_2SO_4$ sobre la apoptosis.....	35
6.4 Efecto del $Tl_2SO_4$ sobre la relación entre EPC/ENC.....	38
6.5 Efecto del $Tl_2SO_4$ sobre la viabilidad celular .....	41
VII. Discusión .....	43
VIII. Conclusión y comentarios finales .....	47
IX. Referencias bibliográficas.....	48
X. Anexos.....	56

## Índice de abreviaturas

ACE	Aberraciones cromosómicas estructurales
ATP	Adenosintrifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
DNA	Acido desoxirribonucleico
ENC	Eritrocitos Normocromaticos
EPA	<i>Enviromental Protection Agency</i>
EPC	Eritrocitos policromaticos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IARC	<i>International Agency for Research of Cancer</i>
ICH	Intercambio de cromatidas hermanas
IPCS	<i>International Programmed on Chemical Safety</i>
MN	Micronúcleos
NA	Naranja de Acridina
OPS	Organización Panamericana de la Salud
WHO	<i>World Health Organization</i>
Tl	Talio
LD <sub>50</sub>	Dosis Letal media

## RESUMEN

Diversos estudios muestran que la exposición ocupacional, ambiental o accidental a metales pesados puede inducir efectos sobre la salud humana, esto debido a que pueden interactuar con biomoléculas como el DNA, enzimas, proteínas y lípidos. A pesar de que los compuestos del talio son usados en diferentes industrias como la química, óptica, eléctrica y tabacalera y presentan una toxicidad comparable a la de metales como el plomo, cadmio y mercurio, han sido poco estudiados. La mayoría de los estudios de los compuestos del talio se centran principalmente en sus efectos tóxico-sistémicos. Por lo que en el presente estudio se evaluó el daño genotóxico y citotóxico del sulfato de talio ( $Tl_2SO_4$ ) en sangre periférica de ratones hembras y machos de la cepa CD-1. Grupos de 5 ratones hembra fueron tratados con 20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg de peso corporal y grupos de 5 ratones machos fueron tratados con 20, 30, 40 mg/kg de peso corporal de  $Tl_2SO_4$  por vía intraperitoneal. El efecto genotóxico se evaluó mediante la cinética de las frecuencias de micronúcleos (MN) y de la inducción de apoptosis, mientras que el daño citotóxico se evaluó mediante la viabilidad celular y la relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos normocromáticos (ENC), a partir de muestras de la vena caudal tomadas a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos. Para la prueba de MN se utilizó la tinción con naranja de acridina y para la de apoptosis la de naranja de acridina-bromuro de etidio. Los resultados mostraron un incremento significativo en las frecuencias de MN solo en la dosis de 70 mg/kg en hembras y en la dosis de 40 en machos. Los incrementos de MN fueron bajos (7/1000 MN-EPC) en comparación con agentes identificados claramente como genotóxicos (20/1000 MN-EPC). En las muestras que se evaluó apoptosis se observaron incrementos significativos en el número de células no viables apoptóticas, al igual que en el de células viables apoptóticas. Al evaluar la viabilidad celular se observó una disminución significativa en el número de células viables. Con base en estos resultados se puede sugerir que el  $Tl_2SO_4$  es un agente genotóxico débil, ya que la inducción de MN es baja. Sin embargo, presenta un claro efecto en la inducción de apoptosis y citotoxicidad. Además corrobora su efecto tóxico ya que indujo muerte en los organismos.

## **I. Introducción**

La contaminación consiste en una alteración nociva del estado natural del medio que resulta de la introducción de un agente ajeno y que causa inestabilidad, desorden o daño al ecosistema. Se estima que existen más de 70,000 sustancias químicas y que se introducen alrededor de 1,000 sustancias nuevas anualmente (UNEP, 2010). Hay tres factores que determinan la severidad de los efectos que puede tener un agente químico: a) la naturaleza química; determina hasta qué punto es activo y dañino para los organismos vivientes, b) la concentración; corresponde a la cantidad presente por unidad de volumen o de peso de aire, agua, suelo o peso corporal y c) la persistencia; corresponde al tiempo que permanece en el aire, suelo, agua o cuerpo (Albert, 1988; Clarkson *et al.*, 1988; Beltrami, 2001).

Debido a la relación que existe entre la exposición de las poblaciones a agentes químicos con la inducción de cáncer y defectos del nacimiento, diversas organizaciones internacionales como la World Health Organization (WHO), la Environmental Protection Agency (EPA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre otras, han tratado de controlar la entrada de nuevas sustancias al ambiente, así como estudiar las ya presentes; para lo cual se han propuesto diversas pruebas como son las de toxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Houge, 1984; Albert, 1988).

Dentro de los contaminantes químicos considerados como peligrosos se encuentran los metales pesados. De los 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales. La peligrosidad de estos radica en que no son química ni biológicamente degradables. Los metales pesados producidos principalmente por la actividad industrial y minera, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, por lo que tienden a acumularse en las plantas y tejidos orgánicos (Higueras, 2010).

### **1.1 Metales pesados**

Los metales pesados se definen como aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm<sup>3</sup> cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Son componentes naturales de la corteza terrestre (EPA, 1998; Zúñiga, 1999). Comprenden parte de la

contaminación debido a su distribución en el ambiente como parte de las actividades humanas y se les encuentra en las aguas como coloides, partículas minerales (sólidos en suspensión), o fases disueltas (cationes o iones complejos). Los compuestos orgánicos pueden capturar cationes metálicos, que en ocasiones dan lugar a fases extremadamente tóxicas (Higuera, 2010). A los metales pesados se le ha dividido en dos grupos de acuerdo a su función biológica (Fig. 1):

- a) Oligoelementos o micronutrientes: Estos comprenden aquellos necesarios en pequeñas cantidades traza para los organismos, y se requieren para que los organismos completen su ciclo vital, pero tóxicos una vez que se rebasa cierto umbral. Dentro de estos se encuentran: Boro, Cobalto, Cromo, Cobre, Molibdeno, Manganeso, Níquel, Selenio, Magnesio, Sodio, Potasio y Zinc.
  
- b) Sin función biológica conocida: Estos comprenden aquellos cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva a disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Son altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Dentro de estos se incluyen Bario, Cadmio, Mercurio, Plomo, Antimonio, Bismuto, Talio, entre otros. (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

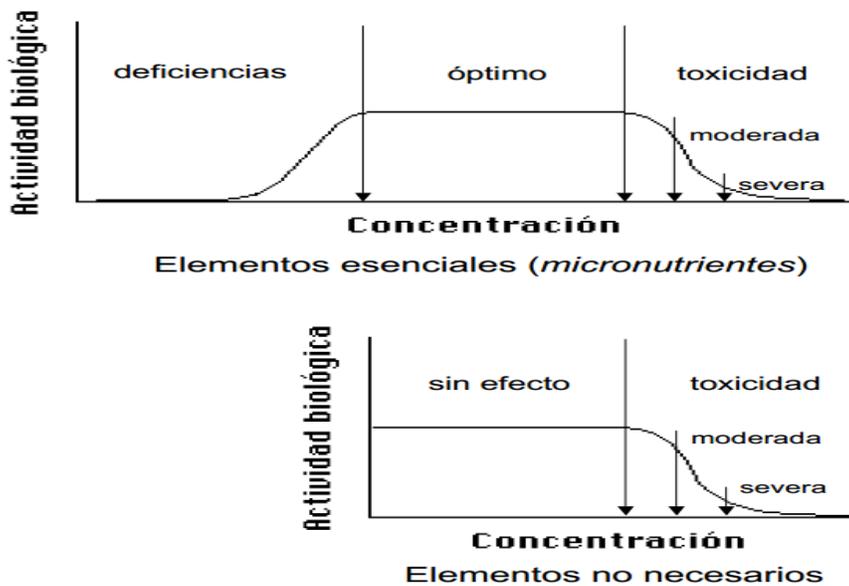


Fig. 1. Gráficas que muestran la concentración en relación con la toxicidad de los elementos (a) micronutrientes, (b) elementos sin función conocida. Tomado de García y Dorrnsoro, 1998.

## **1.2 Toxicidad de los metales pesados**

La toxicidad de los metales pesados es debida a que los organismos no son capaces de metabolizarlos y se acumulan en los tejidos generando serios problemas (Harwing, 1995). De igual manera los efectos tóxicos de un elemento dependen del tiempo que tarda en transformarse en una forma no toxica (Zúñiga, 1999). El mecanismo de acción toxica fundamental de los metales ocurre a nivel de la membrana celular, donde afectan tanto los fenómenos de permeabilidad, como el funcionamiento de las enzimas implicadas en el transporte (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

Además de los efectos tóxicos generales, los compuestos metálicos pueden inducir efecto genotóxico y citotóxico, el cual depende de sus propiedades químicas, su estado de oxidación y su solubilidad (Newman e Intosh, 1991). Uno de los metales más tóxicos es el talio (Tl), ya que la mayoría de sus compuestos tiene una alta capacidad para bioacumularse, sin embargo se han realizado muy pocos estudios sobre su genotoxicidad.

## **1.3 Genotoxicidad de los metales pesados**

El concepto de genotoxicidad se refiere a cualquier tipo de efecto causado sobre el material genético. Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a elementos que por sus propiedades físicas, químicas o biológicas, son capaces de provocar alteraciones en el DNA. La exposición a estos agentes mutagénicos, incrementa el grado de mutaciones en células de la línea germinal, pueden ser capaces de inducir cambios perjudiciales en el material genético de un organismo lo que origina problemas reproductivos y enfermedades genéticas en la descendencia, o bien en células somáticas, y a su vez conducir al desarrollo de diversas enfermedades crónicas y degenerativas, entre ellas aterosclerosis, enfermedades del corazón y cáncer (Arencibia y Rosario, 2009; Teaf y Middendorf, 2000).

La probabilidad de que una determinada sustancia cause daño al DNA depende del nivel de exposición, distribución y retención, así como de la eficiencia de los sistemas de activación metabólica, de detoxificación y la reactividad con las macromoléculas de las células. Lo que puede dar lugar a la formación de una lesión pre-mutágena o pre-cancerígena ya que una vez

establecido el efecto producido sobre el material genético es irreversible y acumulativo (Abrevaya, 2008; Arencibia y Rosario, 2009).

Los metales pueden inducir genotoxicidad por múltiples vías, ya sea por sí solos o por la potenciación de los efectos de otros agentes, es decir, por la interacción entre estos (Beyersmann y Hartwig, 1994). Se ha descrito que casi todos los metales causan daño en el DNA por la generación de estrés oxidativo en las células (Valko *et al.*, 2005), principalmente por las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden inducir la peroxidación de lípidos, daño en el DNA, la reducción de grupos sulfhidrilo, así como alteraciones de las vías de señalización celular y de la homeostasis del calcio [Ca<sup>2+</sup>]. Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por los metales pueden promover distintos tipos de daño en el DNA, tales como roturas de cadena simple y modificaciones de las bases del DNA. Sin embargo, los metales también pueden inducir genotoxicidad debido a su habilidad para inhibir los mecanismos de reparación del DNA (Ercal *et al.*, 2001). La disminución de la habilidad para eliminar el daño genético causado por los metales afecta la fidelidad de la replicación del DNA, debido a que son capaces de inhibir las enzimas involucradas en la replicación y en la síntesis de los nucleótidos, así como alterar los procesos de metilación del DNA y de los componentes del complejo de replicación del DNA (Wedrychowski *et al.*, 1986; Singh y Snow, 1998; Vaisman *et al.*, 2001).

#### **1.4 Talio**

El Tl (Tl) fue descubierto en 1861 por William Crookes, es un metal blando, pesado, brillante, dúctil y maleable. Pertenece al grupo 13, tiene un peso atómico de 204.383, número atómico 81, punto de fusión 303.58°C, punto de ebullición 1478°C. Ocupa el lugar 61 en la escala de frecuencia de ocurrencia de los elementos. No tiene olor ni sabor alguno, se puede encontrar combinado con otras sustancias tales como bromo, cloro, yodo y flúor. Tiene una apariencia incolora a blanca o amarilla (ATSDR, 1992; IUPAC, 2014). Sus compuestos se pueden encontrar en estados de oxidación 1<sup>+</sup> y 3<sup>+</sup>. Los compuestos de Tl (III) se asemejan al aluminio, tienen propiedades fuertemente oxidantes y se convierten lentamente al estado monovalente, mientras que los compuestos de Tl (I) tienen propiedades similares a las del potasio, lo que los hace altamente peligrosos ya que pueden entrar a los organismos por la vía de absorción del potasio. En contraste con los otros elementos, la forma monovalente de Tl es más estable

que la trivalente. En contacto con el aire el Tl se oxida y desarrolla rápidamente un color gris-azulado, que se parece al del plomo y en presencia de agua forma hidróxidos (ATSDR, 1992; Mulkey y Oehme, 1993).

El Tl entra al medio ambiente principalmente al quemar carbón y desde fundiciones de hierro, cobre, sulfuros y seleniuros; en ambos procesos, es un contaminante de la materia cruda, permanece por largo tiempo sin degradarse en el aire, el agua o el suelo. Algunos compuestos de Tl son eliminados de la atmósfera por la lluvia y la nieve. La fuente principal de exposición al Tl es el consumo de alimentos contaminados aunque también puede existir exposición por otras vías como: respirar aire en el trabajo donde se usa Tl, fumar cigarrillos, vivir cerca de sitios de desechos que contienen Tl (esto puede resultar en exposición a niveles por encima de lo normal), ingerir niveles bajos de Tl en agua (ATSDR, 1992).

El uso del Tl se ha incrementado en actividades industriales como la fabricación de equipos electrónicos especializados, la mayoría del equipo de detección de la radiación gamma, superconductores de alta temperatura y en las fábricas de cemento colocando este metal como un agente contaminante a larga escala, este catión tiene la propiedad de fijarse fuertemente al suelo (Carson *et al.*, 1987; CCME, 2003), 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).

Las concentraciones en las que el Tl se encuentra distribuido en la corteza oscila 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 oceánica es de 65 pmol/kg, el nivel indicado para el agua potable es de 0.002 mg/L y en el suelo de cultivo es de 1mg/kg (OEHHA, 2009; Cvjetko *et al.*, 2010), en el aire se encuentra en menos de 1 ng/m<sup>3</sup> pero cerca de zonas industriales puede llegar a ser de 58 ng/m<sup>3</sup>, mientras que las concentraciones de cenizas de las plantas de energía pueden alcanzar hasta 45 mg/kg, y en zonas cercanas a refinerías de petróleo y fabricas cementeras llega a alcanzar 21 mg/kg (WHO, 1996; Rao *et al.*, 2008).

- **Usos**

En el siglo pasado, el Tl se empleó principalmente como veneno para roedores, insectos, y otras plagas, en las décadas siguientes se utilizó como depilatorio, con fines clínicos para

tratar enfermedades de transmisión sexual como la sífilis y gonorrea (Villaverde y Verstraeten, 2003), para cesar la fiebre provocada por la tuberculosis y contra la tiña del cuero cabelludo. Además 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 manufactura de gemas sintéticas, y como catalizador de síntesis química (USCHPPM, 2007).

El Tl y sus compuestos son de gran importancia en las diferentes industrias, por ejemplo el Tl 201 es utilizado ampliamente en las imágenes del miocardio, el cloruro de talio funciona como catalizador en la cloración y lámparas de bronceado; el carbonato de talio es utilizado como producto intermedio para la fabricación de diamantes, el sulfato de talio es precursor del sulfuro de talio, del cual la conductividad eléctrica cambia con la exposición a la luz infrarroja, por lo cual son empleados en la fabricación de fotoresistores; por último el nitrato de talio se usa en análisis químicos y bengalas de emergencia (IPCS, 1990; Martí y Desoille, 1993; Gil, 2005). Su uso industrial a nivel mundial ha provocado incremento de las concentraciones de Tl en suelo, agua, aire y en los alimentos, causando efectos en los seres vivos y en particular en el ser humano, debido a la exposición directa o indirecta al metal (EPA, 2009).

Desde su descubrimiento el Tl ha sido reconocido como un agente extremadamente tóxico, se sabe que este elemento tiene la capacidad de bioacumularse en los tejidos y es tóxico para todos los organismos, e incluso su toxicidad es comparable a la de otros metales como el arsénico, plomo y mercurio (Vernugopal y Luckey, 1978; Repetto y Del Peso, 2001; Galván-Arzate *et al.*, 2005).

- ***Vías de exposición y toxicidad***

Se ha observado que la absorción se da a través de la piel, de las membranas mucosas de la boca y del tracto gastrointestinal, de manera rápida y casi en su totalidad, el tracto gastrointestinal absorbe más del 90% de las sales solubles de Tl (sulfato, acetato y carbonato), en comparación con las menos solubles (ioduro y sulfito) (Del Valls *et al.*, 1999). Se distribuye a través del torrente sanguíneo y se acumula principalmente en el hígado y riñón y en menor

cantidad en paredes intestinales, tejido muscular, huesos, piel, glándulas sudoríparas y sebáceas, uñas pelo y todo el sistema nervioso (Galván-Arzate *et al.*, 2000; Villaverde y Verstraeten, 2003; Tyagi, 2011). En personas que han sufrido envenenamiento muestra mayor concentración en el riñón seguido, en orden decreciente, por los huesos, estómago, intestino, bazo, hígado, músculo, pulmón y cerebro, es eliminado en la orina, saliva, pelo, uñas, leche y lagrimas, parte es descargado por la bilis en el tracto digestivo y consecuentemente eliminado en las heces (EPA, 2009). Se ha determinado la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de varias sales de Tl en mamíferos pequeños como cerdos de guinea, conejos, ratas, ratón y perros, esta se encuentra entre el rango de 15 a 50 mg/kg (IPCS, 1990).

La toxicidad de los compuestos de Tl puede explicarse sobre la base de su afinidad  $\alpha$  amino, -imino y grupos sulfhidrilo (SH) en centros activos enzimáticos y de su similitud química con el potasio que está implicado en muchos procesos celulares y de membrana. Así, los iones de Tl pueden sustituir a los de potasio en la activación de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. Esta sustitución puede permitir al Tl moverse a través de la membrana celular, se acumula en la célula y luego interfiere con la cadena respiratoria mitocondrial (Mulkey y Oehme, 1993).

Se ha planteado que el Tl puede inducir daño toxico mediante distintos mecanismos, como lo son: a ) vía radicales libres que generan distintas toxinas las cuales tienen una acción destructiva sobre la arquitectura celular, lo cual altera los orgánulos, y producen alteración en las membranas y su permeabilidad, b) cambios en el sistema DNA-RNA sintetizador de proteínas o inhibición de la síntesis proteica y c) interferencia con la actividad enzimática, ya que los metales pesados son capaces de modificar la actividad de diversas enzimas al unirse a grupos SH.

Se han realizado una gran variedad de estudios para evaluar los efectos que pueden producir los compuestos de Tl con el objetivo de contribuir a la evaluación de los riesgos a su exposición.

Durante un tratamiento de 8 meses en ratas macho, expuestas a 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-4</sup> M por día de carbonato de talio, Zasukhina *et al.*, (1983), observaron que este es capaz de producir

mutaciones que provocan el aumento de letales dominantes. También se evaluó la actividad mutagénica en cultivos de células embrionarias de ratón CBA y C57B1/6, lo cual dio como resultado un aumento significativo en la ruptura del DNA. Galván-Arzate *et al.*, (2000) observaron el efecto de la aplicación de 0.8 mg/kg y 1.6 mg/ kg de acetato de talio en ratas de manera sub-crónica durante 30 días en la peroxidación lipídica, en diferentes regiones del cerebro. Los resultados sugieren un papel activo de radicales libres y eventos oxidantes que participan en el patrón de toxicidad después de la exposición a las dosis sub-letales, que están asociadas con la susceptibilidad regional del cerebro para este metal.

En otros estudios se observó que la administración de 10 ppm de sulfato de talio a ratas durante 2 meses causó una reducción en el número y motilidad de los espermatozoides, también se observó que en las células de Sertolli co-cultivadas *in vitro* tratadas con 0.09 mg/ml de sulfato de talio causa reducción de la supervivencia y viabilidad celular. Aunque los resultados indican mas un efecto tóxico que un potencial mutagénicos específico (Formigli *et al.*, 1986). Por otra parte Leonard y Gerber, 1997 observaron en células binucleadas de linfocitos humanos cultivados de un individuo que inquirió aproximadamente 0.5 g de sulfato de talio se incrementaron significativamente los micronúcleos (MN), sin cambios en las evaluaciones tanto de intercambio de cromatidas hermanas (ICH) como de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), por lo cual se ha propuesto que el Tl y sus compuestos posiblemente tienen efectos indirectos sobre el material genético, interviniendo con la segregación cromosómica durante la división celular.

A pesar de que se han preparado muchas sales de Tl, pocas tienen importancia comercial, algunas de las más importantes son: hidróxido de talio, sulfato de talio, taliuro de sodio, cloruro de talio, yoduro de talio y acetato de talio. De estas sales la más tóxica es el sulfato de talio y por lo tanto una de mayor interés biológico ya que el ser humano puede estar expuesto a este a través del aire, el agua y los alimentos. Sin embargo, los niveles de este en el suelo (entre 0.3 y 0.7 ppm), en aire y agua (0.013 ppm) son muy bajos. Así como las personas que fuman tienen dos veces más Tl en su cuerpo que los no fumadores ya que el sulfato de Tl es un componente del tabaco, y el humo del cigarrillo es también una fuente de Tl (ATSDR, 1992; Delvalls *et al.*, 1999).

#### **1.4.1 Sulfato de talio**

El sulfato de talio (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), o sulfato talioso, se produce disolviendo Tl en ácido sulfúrico concentrado, en caliente, o neutralizando el hidróxido de talio con ácido sulfúrico diluido, seguido de cristalización. Se encuentra en forma de cristales blancos, es incoloro e inodoro, tiene una densidad relativa de 6.77, punto de fusión 632°C, peso molecular 504.8 y solubilidad en agua de 4.87 g/100 ml a 20°C. Es usado para catalizar ciertas aleaciones de metales, en la manufactura de componentes electrónicos, colorantes, lentes para la óptica, joyería y superconductores; su uso como rodenticida y pesticida ha sido restringido en muchos países, pero aún es utilizado en otros principalmente en vías de desarrollo (ATDSR, 1992; Goyer y Carsksom, 2001).

La acción tóxica del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> está documentada solo en informes de casos de intoxicación aguda no profesional (en muchas ocasiones fatales) y casos de uso homicida o suicida. La intoxicación profesional por Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suele ser resultado de una exposición moderada a largo plazo y provoca síntomas tales como náuseas, dolor abdominal, y pérdida de apetito que son mucho menos acusados que los observados en una intoxicación aguda accidental, suicida u homicida. El curso es generalmente poco notable y se caracteriza por síntomas subjetivos como irritabilidad, dolor de piernas, pérdida de pelo, temblores en las manos, entumecimiento en los pies, depresión y alteraciones en el comportamiento y trastornos nerviosos. Los resultados neurológicos iniciales incluyen cambios en los reflejos de los tendones provocados superficialmente, disminución de la velocidad de los reflejos pupilares, taquicardia e infarto, dificultades arritmias y problemas respiratorios que a menudo culminan en la muerte (ATSDR, 1992; Hirata *et al*, 1998; Pau, 2000; Saha *et al*, 2004; Jha *et al*, 2006; Lu *et al*, 2007; Zhao *et al*, 2008).

En la actualidad las personas están expuestas principalmente al fumar ya que entre los diferentes compuestos que constituyen al tabaco se encuentra el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A pesar de los usos que tiene este metal, los estudios referentes al daño genético son escasos o nulos por ello en el presente estudio se planteó evaluar si el sulfato de talio posee la capacidad de generar efecto genotóxico y dar una visión más amplia de la peligrosidad de este compuesto.

## **1.5 Evaluación de efecto genotóxico**

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas; entra al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien puede ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Se da entonces la interacción con el DNA produciéndose un daño que puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1989).

Dentro de las principales pruebas recomendadas para evaluar el efecto genotóxico se encuentran: ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; pruebas de AMES), ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (células de mamífero; frecuencia de aberraciones cromosómicas), ensayos *in vivo* (medula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN). Las pruebas para evaluar genotoxicidad no solo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un agente al material genético, sino que también, es una herramienta necesaria para determinar el mecanismo de acción (Mavournin, 1990; Müller *et al.*, 1999; Krishna y Hayashi, 2000).

Los bioensayos para evaluar la genotoxicidad ofrecen la ventaja de que un organismo vivo puede transformar un compuesto cualquiera a metabolitos que podrían ser aún más tóxicos que el original. La administración de diferentes fármacos produce daño genético en animales experimentales con resultados consistentes. Asimismo, una sola prueba o modelo en toxicología genética no es suficiente para determinar el potencial genotóxico de un compuesto, por lo que se justifica el empleo del mayor número de ellos para contar con mayores evidencias del resultado obtenido. Las instituciones de salud indican que para proporcionar protección adecuada de salud pública se requieren pruebas en animales de laboratorio y la vigilancia de la población (Gómez-Melda y Zúñiga-González, 2007).

### **1.5.1 Ensayo de micronúcleos**

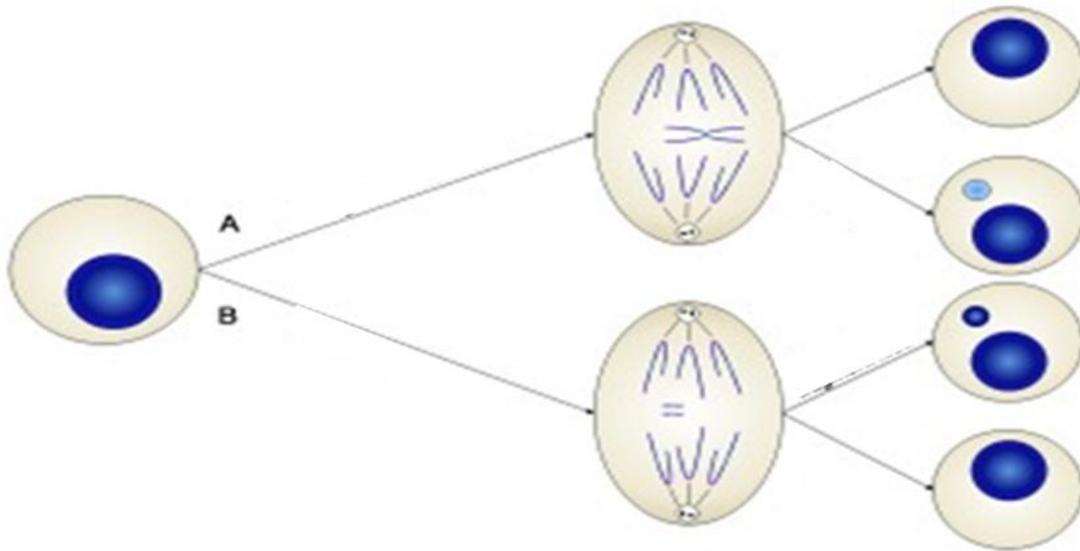
El ensayo de MN, ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la “International Conference on Harmonization of Genotoxicity Guidelines”(ICH), así como por otras agencias reguladoras tales como la “Environmental Protection Agency” (EPA), la “Food

and Drug Administration” y la “International Agency for Research of Cancer” (IARC). El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Müller *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000). El ensayo de MN fue desarrollado por W. Schmid y Boller en 1970, quien originalmente lo propuso para practicarse en la médula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se le utiliza ampliamente.

Durante la división celular, el material genético contenido en el núcleo celular, se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a alteraciones durante la replicación y posterior división del DNA, a roturas cromosómicas y al efecto de radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto no sea equitativo. Al ocurrir esto, el material genético que se desprende y, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primero denominado MN (Zalacain *et al.*, 2005; Fenech, 2006). Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis por lo que se diferencian en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales, fácilmente identificable (Schmid y Von Ledebur, 1973; Venegas *et al.*, 2002; Samanta y Dey, 2010).

Los MN pueden ser formados en el citoplasma mediante de los siguientes eventos (Schmid, 1975):

- 1) Daño a nivel de las proteínas involucradas directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centríolo y centrómero inactivado (daño aneuploidogeno) (Fig. 2A).
- 2) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastogéno) (Fig. 2B).



*Fig.2. Formación de MN, (A) daño aneuploidogénico, (B) daño clastogénico. Tomado y modificado de Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?''.*

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares, por ejemplo: los mieloblastos, mielocitos, médula ósea de ratón (eritrocitos) o eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalacina B, mucosa bucal y nasal. Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito (Mavournin *et al.*, 1990). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos son inductores de daño cromosómico (Krishna y Hayashi, 2000). En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes (EPC) y a los maduros (ENC). Los EPC, todavía contienen RNA, son basófilos y el núcleo principal es expulsado; si un MN se ha formado permanece en el citoplasma anucleado. Los EPC con el tiempo, pierden el RNA y se convierten en ENC, más pequeños que los EPC y acidófilos. Partiendo de esto los eritrocitos se pueden diferenciar entre EPC y ENC utilizando colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA) (Schmid y Von Lederbur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990).

## **1.6 Apoptosis**

El término apoptosis lo emplearon Kerr *et al.*, por primera vez en 1972 para describir una forma común de muerte celular programada en distintos tejidos y tipos celulares, ya que las células que estaban muriendo compartían características morfológicas que eran distintas de las particularidades observadas en las células necróticas. La apoptosis es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. Este evento puede ser desencadenado tanto por estímulos extrínsecos como intrínsecos y conduce a la eliminación de células que se producen en exceso, que se han desarrollado en forma impropia o que acarrean algún daño genético. De ahí que se considere a la muerte celular programada como un proceso fisiológico que contribuye a la construcción y al mantenimiento de los tejidos. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que la definen como tal. La membrana plasmática se altera, el volumen celular se reduce considerablemente y el citoplasma se condensa. El núcleo se reduce y la cromatina se hace más densa y se colapsa dividiéndose al final en varias esferas. A lo largo de la vida de un organismo, la apoptosis participa desde el desarrollo hasta la senescencia. El delicado equilibrio entre proliferación celular y apoptosis asegura un correcto control sobre la homeostasis de los tejidos. Se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental en el desarrollo del cáncer, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis (transición de lesiones pre-neoplásicas a invasoras) y en el fenómeno metastásico (Nagata, 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998; Evan y Littlewood, 1998).

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y desarrollo de la apoptosis son variados, y dependen de un estímulo inicial, por ejemplo la respuesta al estrés celular ocasionado por la exposición a compuestos tóxicos puede seguir dos vías principalmente: una vía extrínseca mediada por receptores de muerte y otra intrínseca o también mitocondrial (Kaufmann, 1998; Robertson y Orrenius, 2000).

### **1.6.1 Vía extrínseca**

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores en la membrana celular en respuesta a señales extracelulares (Cuello *et al.*, 2006). En esta vía, los receptores como TNRF1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos. Esta

unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas (Shen y Pervaiz, 2006).

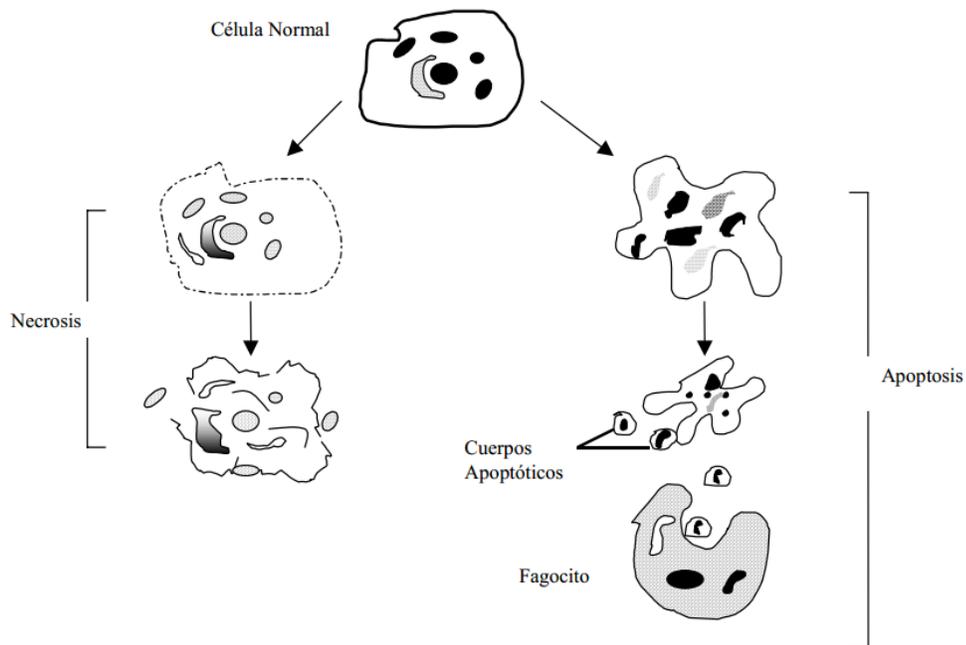
Esta vía se inicia por la estimulación de los receptores de muerte membranales como el receptor Fas y TNFR1. Esta activación se da por la unión del receptor de muerte a su ligando (FasL) y el TNF, respectivamente. Posterior a esta activación, la molécula adaptadora asociada al dominio de muerte de Fas y la procaspasa 8, son reclutadas para formar un complejo señalador de muerte (Oehm *et al.*, 1992; Fulda y Debatin, 2003). La procaspasa 8 pasa a caspasa 8 por este complejo que es capaz de activar directamente a la caspasa efectora 3, para iniciar así la degradación celular (Oehm *et al.*, 1992; Kaufmann *et al.*, 2002; Sheikh y Huang, 2003). O bien puede escindir a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. Bid se traslada del citoplasma a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo C del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (Velázquez *et al.*, 2004).

### **1.6.2 Vía intrínseca**

Esta vía se activa por estrés celular, específicamente por estrés mitocondrial causado por factores tales como daño nuclear o por agentes químicos. En esta ruta, se lleva a cabo la oligomerización y traslación del heterodímero Bak/Bax desde el citoplasma hacia la membrana mitocondrial externa, resultando en la formación de un poro mitocondrial. El punto de control de esta vía es la liberación del citocromo C interactúa con Apaf-1, ATP, y la procaspasa 9 para formar una estructura conocida como apoptosoma. El apoptosoma activa entonces la caspasa 9, que conduce a la actividad de las caspasas 3,6 y 7 estimulando la apoptosis. Tras la activación de la caspasa 3, comienzan los eventos morfológicos de la apoptosis resultando en un rompimiento de las proteínas celulares incluyendo el citoesqueleto y la matriz nuclear, y la activación de poli-ADP-ribosa polimerasa, la cual facilita la degradación nuclear del DNA (Saraste y Pulkki, 1999; Blankenberg, 2008; Circu y Aw, 2010).

### 1.7 Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular alterno a la apoptosis, es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, debido a la acumulación de agua y electrolitos, la ruptura temprana de la membrana plasmática, y la alteración de los organelos celulares, incluyendo las mitocondrias. La formación de cuerpos apoptóticos es ausente y la cromatina se agrupa e manera irregular. El escape del contenido celular induce una respuesta inflamatoria. La morfología exacta de la célula necrótica es muy variable ya que depende de las características del agente causante, sin embargo existen particularidades que distinguen a la célula necrótica de la célula apoptótica Fig. 3 (Allen *et al.*, 1997; Saraste y Pulkki, 1999).



*Fig. 3. Morfología de la necrosis y de la apoptosis a la izquierda el proceso de necrosis muestra la pérdida de integridad de membrana celular, la salida de organelos al espacio extracelular. A la derecha, el proceso de apoptosis muestra integridad de la membrana después de la muerte celular, condensación de la cromatina e integridad de la membrana y citoplasma en los cuerpos apoptóticos, que contienen los organelos. Tomado de Elena 2002*

Existen varios métodos que permiten observar de manera adecuada la diferenciación entre la muerte por apoptosis y necrosis. La valoración de la integridad de la membrana a través de la tinción con colorantes vitales pueden ser específicos si se analizan las características morfológicas de las células directamente. El análisis de la muerte celular puede ser llevado a cabo tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* (Allen *et al.*, 1997).

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de la apoptosis es la tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes NA y bromuro de etidio (BrEt). El colorante NA tiene la capacidad de introducirse a las células, tanto viables, como no viables mostrando una fluorescencia verde al intercalarse dentro de un ácido nucleico de doble cadena (DNA), o bien mostrando una fluorescencia roja-naranja si se une a un ácido nucleico de cadena sencilla (RNA). El BrEt se introduce únicamente a las células no viables debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática, de tal manera que puede intercalarse en el DNA mostrando fluorescencia roja (McGahon *et al.*, 1995; Baskic *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2013)

## **II. Justificación**

En la actualidad las poblaciones humanas están expuestas a diversas fuentes de contaminación física, biológica y química. Dentro de los contaminantes químicos los metales pesados son los de mayor riesgo ya que además de causar severos efectos tóxicos la mayoría son capaces de interactuar con el DNA ocasionando daños y cambios en su estructura. Si el daño no es reparado se altera la integridad del genoma, lo cual altera el funcionamiento celular, además de que el daño al DNA es considerado uno de los principales eventos de iniciación del proceso carcinogénico. A pesar de los usos del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la industria química, metalúrgica, eléctrica, cementera y tabacalera; los estudios sobre los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos de Tl (I) son escasos y poco contundentes y la mayoría se centran su toxicidad. Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ratones de la cepa CD-1, sobre la frecuencia de inducción de MN, las frecuencias de EPC con relación a los ENC, la inducción de apoptosis y la viabilidad celular en ratones hembras y machos de la cepa CD-1, tratados con Tl (I) (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

## **III. Hipótesis**

Se ha observado que la exposición a metales pesados puede inducir alteraciones en el material genético tales como aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas entrecruzamientos entre otras. Particularmente, los compuestos de Tl (I) (Tl<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>COOTl) presentan efectos sobre la segregación cromosómica durante la mitosis, además de aumentar la peroxidación lipídica. Entonces se espera que la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a ratones de la cepa CD-1 sea capaz de inducir efecto genotóxico mediante el incremento de las frecuencias de MN y apoptosis, así como daño citotóxico mediante la modificación de la relación de EPC con relación a los ENC, además de disminuir el número de células viables.

#### **IV. Objetivos**

##### **4.1 General**

- Estudiar el efecto genotóxico y citotóxico del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mediante el análisis de la cinética de MN, la inducción de apoptosis y la viabilidad celular en células de sangre periférica de ratones hembra y macho de la cepa CD-1.

##### **4.2 Particulares**

- a) Establecer la dosis no letal de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ratones hembras y machos de la cepa CD-1 a partir de las dosis reportadas como tóxicas.
- b) Establecer la cinética de inducción de MN del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mediante la evaluación de MN cada 24 horas durante 72 horas en EPC de sangre periférica de ratones de la cepa CD-1.
- c) Evaluar el efecto genotóxico del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mediante el análisis de la frecuencia de MN y de la inducción de apoptosis en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1.
- d) Evaluar el efecto citotóxico inducido por Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mediante el análisis de las frecuencias de EPC en relación con los ENC y de la viabilidad celular en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1.

## **V. Material y método**

### **5.1 Animales**

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa CD-1, de 2 a 3 meses de edad y con un peso entre 35-40 gramos, provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se mantuvieron en cajas de plástico, con alimentación de nutricubos (Purina), libre acceso al agua, en condiciones estériles, a una temperatura y humedad controladas, con fotoperiodo de 12-12 horas de luz-oscuridad. Para los experimentos, los animales fueron divididos en grupos de 5 ratones. Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos con base en los lineamientos de la GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; EPA, 1984; Mavournin *et al.*, 1990; FDA, 2000).

### **5.2 Reactivos**

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, E.U). Naranja de Acridina C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Cl [CAS No. 10127-02-3]; Bromuro de Etidio [CAS No. 1239-45-8]; Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de Sigma-Aldrich E.U [CAS No. 7446-18-6].

### **5.3 Tratamientos**

El Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se preparo en una solución con agua destilada estéril, y se administró inmediatamente en una sola dosis con relación al peso de cada ratón por vía i.p en un volumen de alrededor de 0.25 ml por ratón. Cada grupo se conformo por 5 ratones. Se realizaron los tratamientos administrando Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en diferentes dosis con base en resultados de estudios previos en los que se observó daño tóxico (Galván-Alzarte *et al.*, 2000). Se emplearon tanto ratones hembra como macho de la cepa CD-1.

Los grupos de experimentación fueron administrados con los siguientes tratamientos:

***Hembras***

- a) Grupo Testigo: solo se le administró el vehículo (agua inyectable).
- b) Grupos Tl (I): tratado con una sola dosis de 20, 30, 40, 70 o 100 mg/kg Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

***Machos***

- a) Grupo Testigo: solo se le administró el vehículo (agua inyectable).
- b) Grupos Tl (I): tratados con una sola dosis de 20, 30 o 40 mg/kg Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

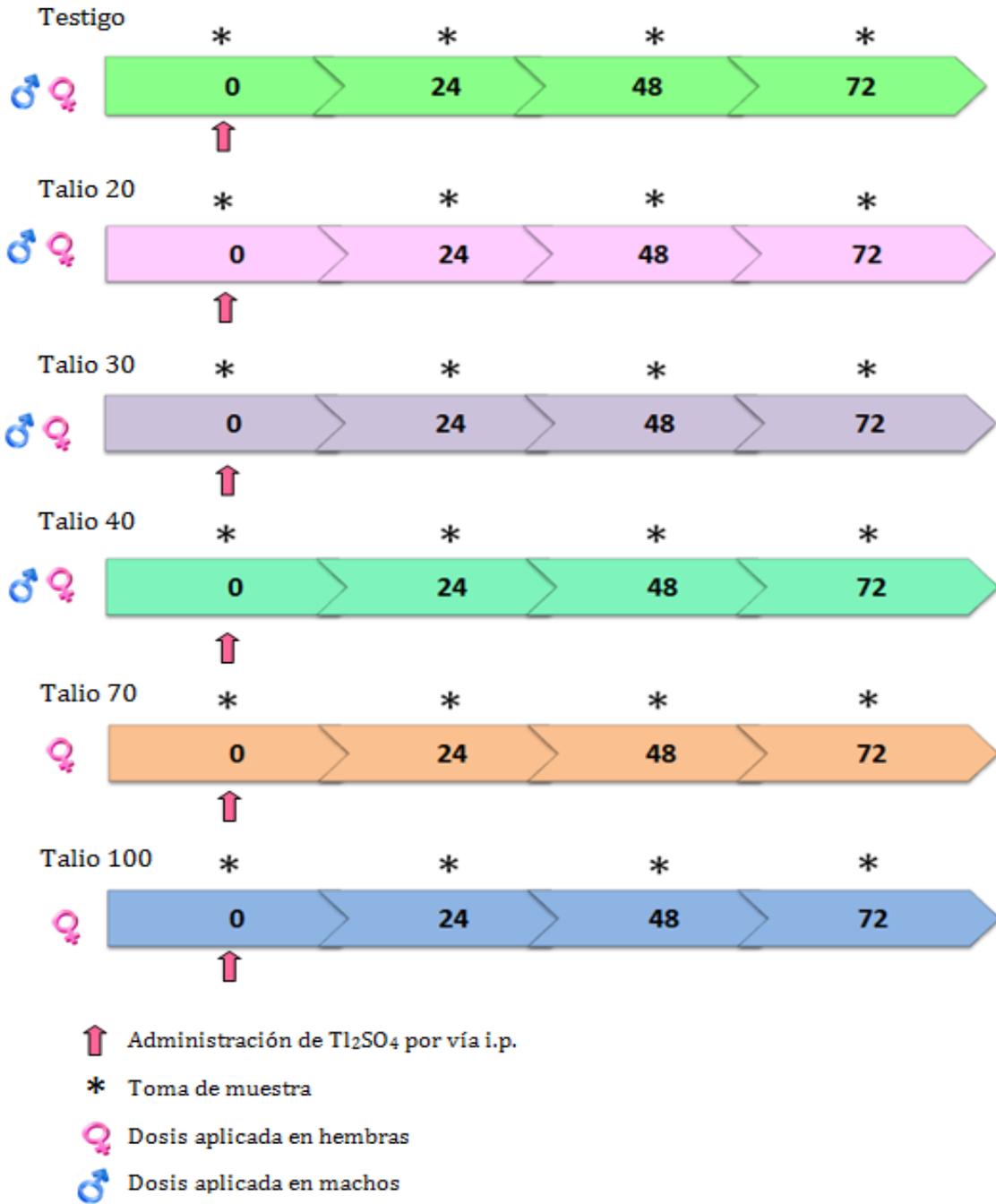
**5.4 Evaluación de la inducción de MN en EPC y de la relación de EPC con respecto a los ENC**

**5.4.1 Tiempos de evaluación**

Una vez seleccionadas las diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, así como las condiciones de trabajo, se administraron de acuerdo a los protocolos. Posteriormente se evaluó el efecto genotóxico mediante el análisis de la frecuencia de MN y la citotoxicidad mediante la frecuencia de EPC con respecto a la de ENC, con muestras obtenidas de sangre periférica.

***Protocolo 1***

A cinco grupos de 5 ratones hembra y tres de ratones macho de la cepa CD-1 se les administraron diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p., considerando la hora de administración como la hora 0. Se empleo un grupo mas como testigo (uno para hembras y uno para machos), por lo que no se administró ningún tratamiento. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica cada 24 horas desde la hora 0 hasta la hora 72 para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad por el método de MN (Fig. 4).



*Fig. 4. Protocolo 1 para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico*

#### **5.4.2 Preparación de laminillas**

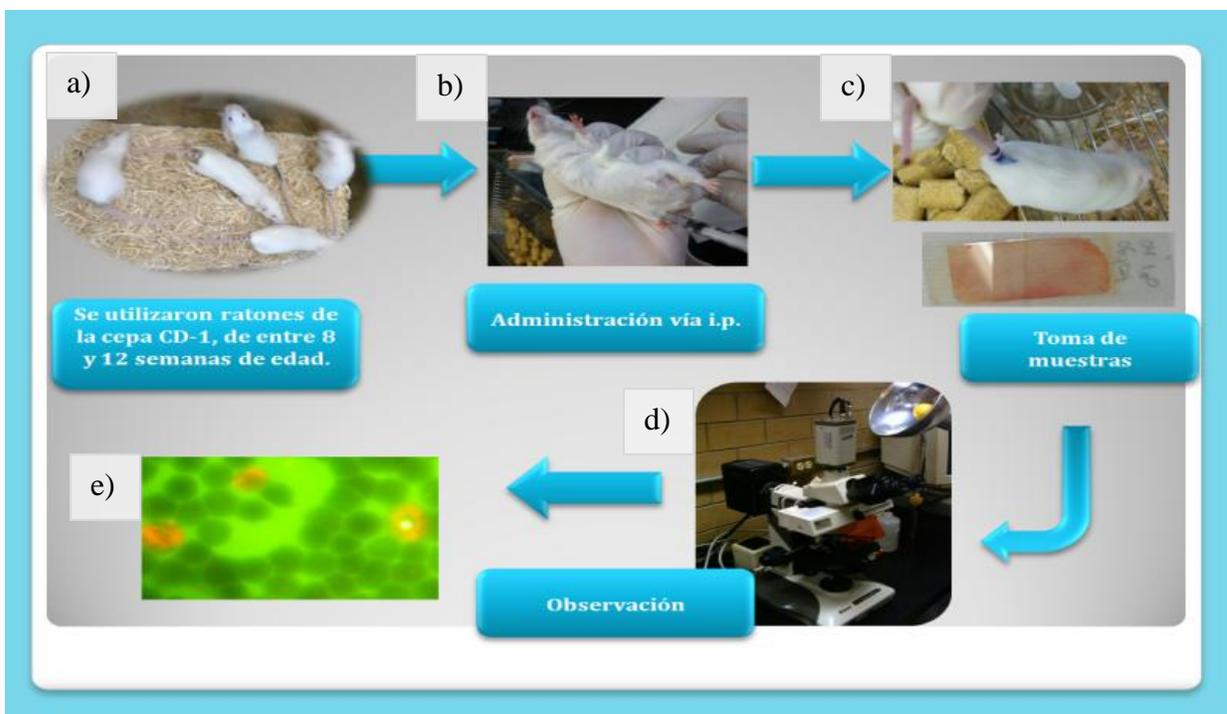
Se preparo una solución de NA en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron 10 µl de esta solución y se colocaron en laminillas limpias precalentado a 70°C aproximadamente, y con ayuda de otra laminilla se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en la oscuridad hasta su uso (Hayashi *et. al.*, 1990).

#### **5.4.3 Toma de muestras**

Después de la administración de los tratamientos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones a los tiempos de evaluación establecidos. Estas fueron obtenidas realizando un corte a la punta de la cola de los ratones con ayuda de tijeras de punta fina. Se puso una gota de sangre en un portaobjetos y después de colocó un cubreobjetos sobre estas y se sellaron con silicón líquido. Se prepararon dos laminillas por ratón. Las preparaciones se depositaron en cajas de plástico y fueron mantenidas en la oscuridad a una temperatura aproximada de 4°C hasta su evaluación. El análisis de las muestras se llevo a cabo después de al menos 24 horas de su preparación, procurando no exceder de 8 días.

#### **5.4.4 Evaluación de muestras**

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla (Olympus Fluoled). La evaluación del efecto genotóxico se realizó mediante el análisis de 2000 EPC por ratón, entre los cuales se cuantificaron los MN-EPC. Y para la evaluación del efecto citotóxico, se analizaron una cantidad de 1000 eritrocitos totales por ratón, entre los cuales se cuantificaron los EPC, con el fin de determinar la relación EPC/ENC.



*Fig. 5. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico a) grupos de 5 ratones; b) administración de tratamientos; c) obtención de muestras y preparación de laminillas; d) observación bajo el microscopio de fluorescencia; e) evaluación del daño genotóxico y citotóxico mediante el método de MN.*

## 5.5 Evaluación de la viabilidad y apoptosis

### 5.5.1 Tiempos de evaluación

Una vez seleccionadas las diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, así como las condiciones de trabajo, se administraron las dosis de acuerdo a los protocolos. Posteriormente se evaluó la apoptosis, necrosis y viabilidad celular a la hora 48.

#### **Protocolo 2**

A cinco grupos de 5 ratones hembra y tres de ratones macho de la cepa CD-1 se les administraron diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p, considerando la hora de administración como la hora 0. Se empleó un grupo más como testigo (uno para hembras y uno para machos),

por lo que no se administró ningún tratamiento. Posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica a la hora 48, para la evaluación de la viabilidad celular, e inducción de apoptosis y necrosis (Fig. 6).

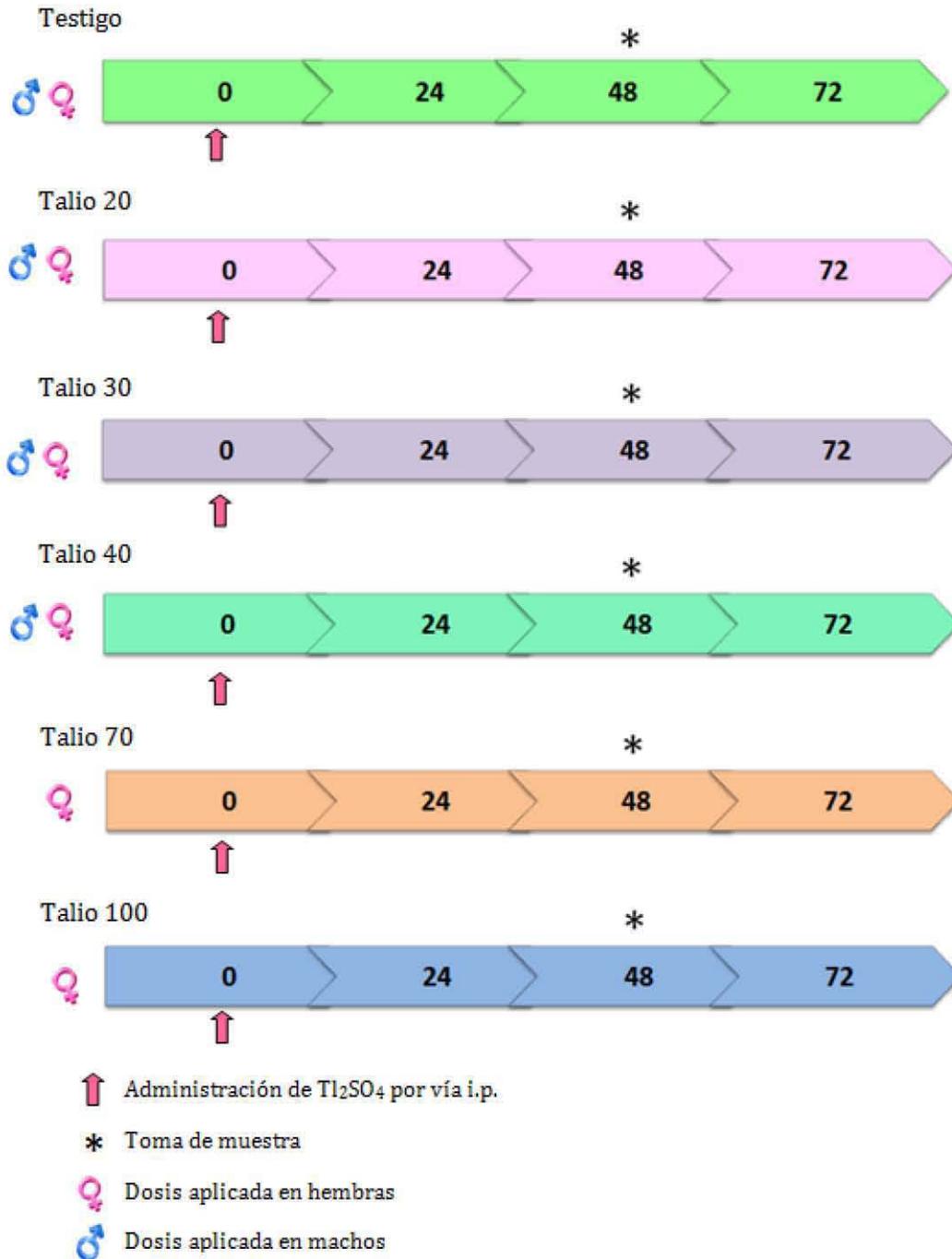


Fig. 6. Protocolo para la administración del tratamiento con diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p. y toma de muestras para viabilidad celular y apoptosis

### **5.5.2 Preparación de colorantes**

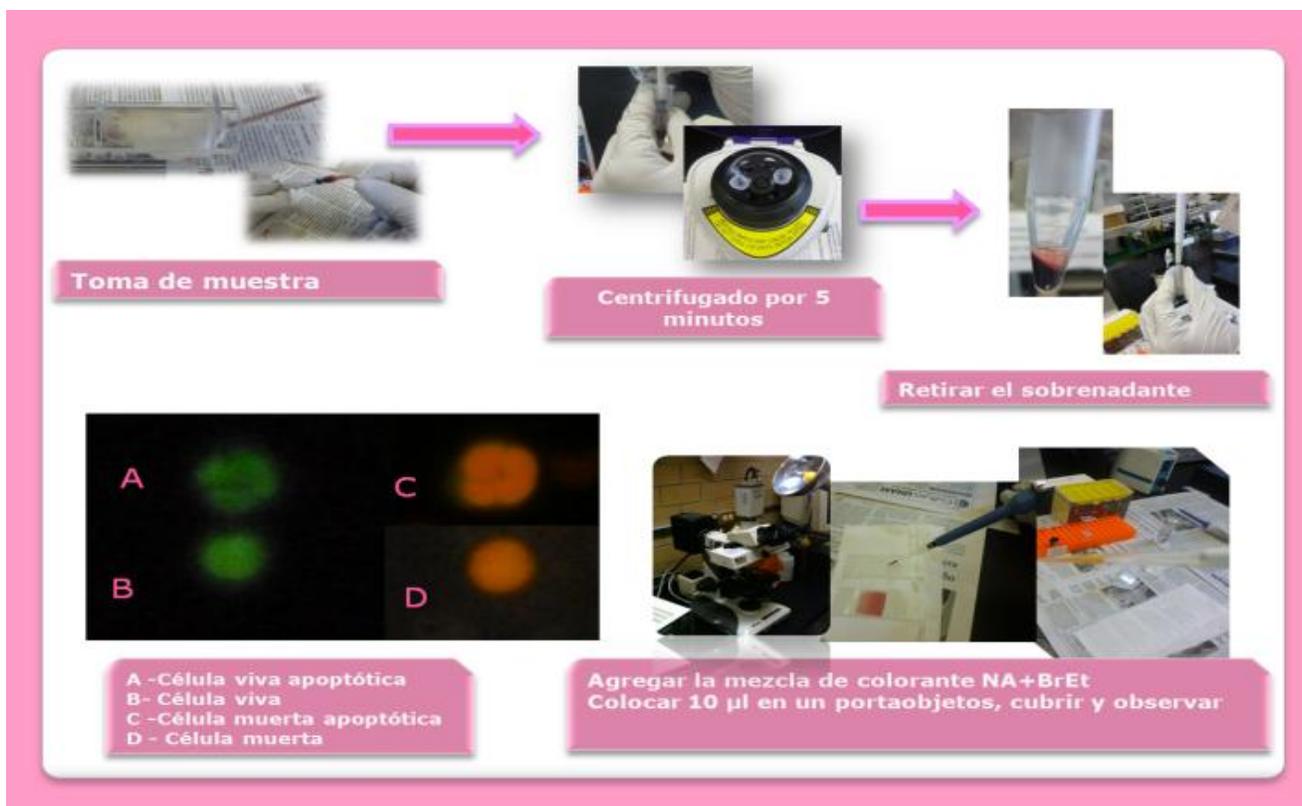
Se preparo una solución con 1:1 de NA/BrEt de acuerdo a la técnica descrita por McGahon *et al.*, (1995) modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013). La mezcla se almaceno en un frasco ámbar en la oscuridad hasta su uso.

### **5.5.3 Toma de muestras**

Después de la administración de los tratamientos establecidos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones únicamente a la hora 48. Las muestras fueron obtenidas realizando un corte a la punta de la cola con la ayuda de tijeras de punta fina. La sangre (100  $\mu$ l) fue extraída directamente con ayuda de una jeringa heparinizada. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 5000 rpm y se les agregó la mezcla de colorantes en una proporción de 1:5. Posteriormente se colocó la muestra teñida sobre laminillas limpias y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones fueron evaluadas inmediatamente después de su elaboración.

### **5.5.4 Evaluación de muestras**

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación de las muestras bajo un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz amarilla (Olympus Fluoled). Se evaluaron 200 células nucleadas por ratón; para la evaluación de la viabilidad se contabilizaron las células viables y no viables, mientras que para el análisis de apoptosis y necrosis se cuantificaron células viables apoptóticas y células no viables apoptóticas. Posteriormente se calcularon valores porcentuales de viabilidad, apoptosis y necrosis de cada grupo estudiado (García-Rodríguez *et al.*, 2013).



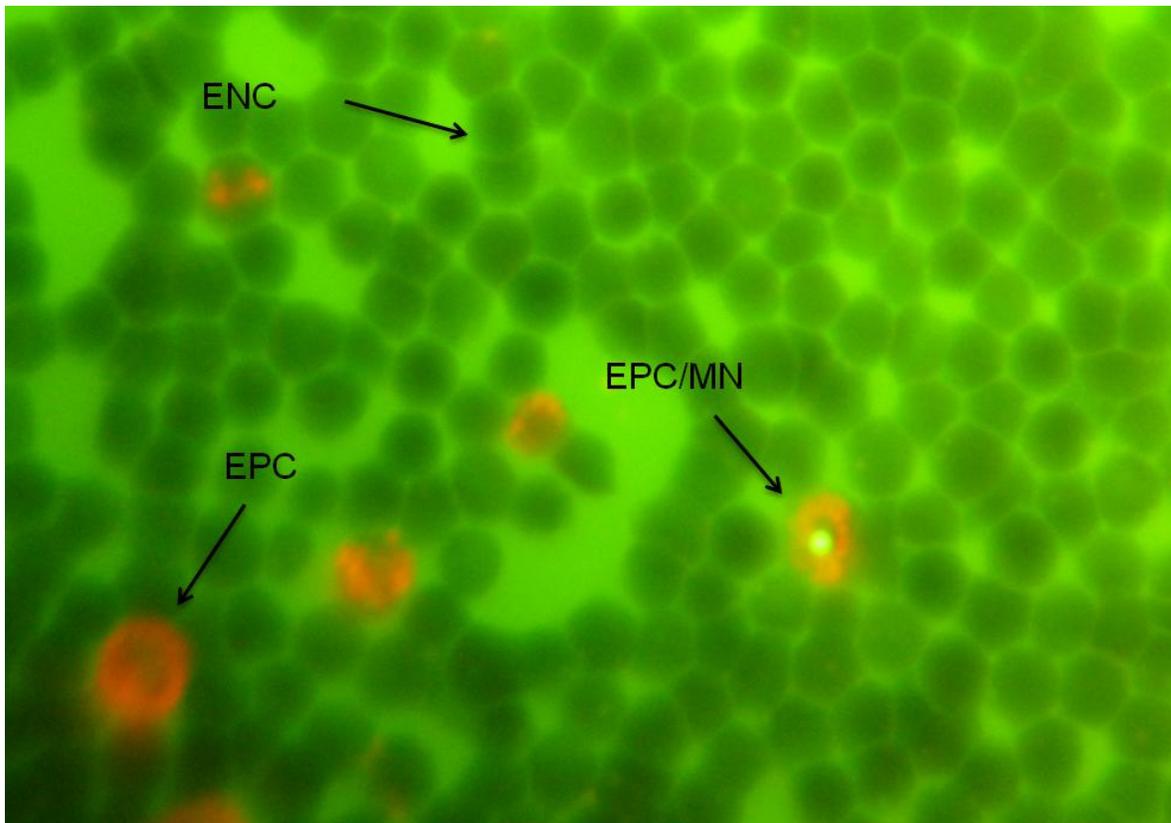
*Fig. 7. Evaluación viabilidad celular y apoptosis.*

## 5.6 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba Tukey para determinar la significancia entre las medias de cada grupo, mediante el paquete estadístico SPSS/PC V19™ y se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés) para descartar la inducción espontánea basal de los grupos (hora 0). Además se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés) lo que permitió descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera producto de la manipulación de los animales durante los experimentos (García-Rodríguez *et al.*, 2000). Los datos obtenidos de los análisis del NIF y DIF y los resultados del ensayo de apoptosis y necrosis se analizaron mediante una prueba chi-cuadrada utilizando el paquete Statistica V6 (Adler *et al.*, 1998).

## VI. Resultados

La tinción obtenida con la técnica de NA desarrollada por Hayashi *et al.*, (1990) permite distinguir fácilmente a los EPC, ya que al contener RNA se tiñen de color naranja fluorescente, mientras que los ENC no se tiñen. Los MN se observan como cuerpos redondos de color verde-amarillo (Fig. 8).



*Fig. 8. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA. Se observan los ENC, EPC y un EPC con un MN.*

### **6.1 Efecto del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ratones hembra de la cepa CD-1**

En el cuadro 1 se muestran los promedios de la inducción de MN evaluados en ratones hembra a las 0, 24, 48 y 72 h después de la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg), por vía i.p. Se observa incremento significativo en los promedios de MN en las dosis de 30, 70 y 100 mg/kg, el cual fue mayor a la hora 24 en comparación con el grupo testigo. Cabe señalar que se registro la muerte de 2 organismos a la hora 72 en el grupo tratado con 70 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la muerte de 4 organismos en el grupo tratado con 100 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Debido a que las frecuencias basales de MN en todos los grupos fueron variables se calculó el NIF. que nos es útil para descartar la inducción espontánea que haya tenido el grupo a la hora 0 ya que no se le ha aplicado ningún tratamiento (García-Rodríguez *et al.*, 2000), y se determina:

$$NIF = \text{valor observado en el grupo A} \text{ a la hora } x_i - \text{valor observado en el grupo A} \text{ a la hora } 0$$

Donde:

A= Grupo; X<sub>i</sub>= Tiempo de evaluación

En la figura 9 se muestra el análisis por tiempo y por grupo del NIF calculado para 10 000 EPC cuando se administraron las diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras el análisis se corroboró el aumento de las frecuencias de MN a la hora 24 los grupos tratados con 70 y 100 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, así como a la hora 48 en el grupo tratado con 20, 30 y 70 mg/kg.

*Cuadro 1. Promedios de las frecuencias de MN en ratones hembra tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Hora de análisis</b>	<b>MN/10 000 células media ± d.e</b>
<b>Testigo</b>	5	0	2.4 ± 0.5
	5	24	2.2 ± 0.4
	5	48	1.4 ± 0.5
	5	72	1.0 ± 0.7
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 mg/kg)</b>	5	0	0.6 ± 0.5
	5	24	2.4 ± 0.8
	5	48	2.8 ± 0.8
	5	72	1.6 ± 0.5
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 mg/kg)</b>	5	0	2.8 ± 0.8
	5	24	3.8 ± 0.4*
	5	48	2.0 ± 0.7
	5	72	0.4 ± 0.5
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 mg/kg )</b>	5	0	2.2 ± 1.7
	5	24	2.0 ± 1.4
	5	48	2.2 ± 1.9
	5	72	2.2 ± 1.6
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (70 mg/kg )</b>	5	0	0.8 ± 1.0
	5	24	7.0 ± 10.1*
	5	48	3.4 ± 1.5
	3	72	6.33 ± 1.5*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mg/kg )</b>	5	0	1.8 ± 1.0
	5	24	6.0 ± 1.2*
	3 <sup>+</sup>	48	5.6 ± 0.5*
	ND <sup>+</sup>	72 <sup>+</sup>	ND

*Significancia estadística con p<0.05; \* vs testigo; <sup>+</sup> muerte; ND no determinado.*

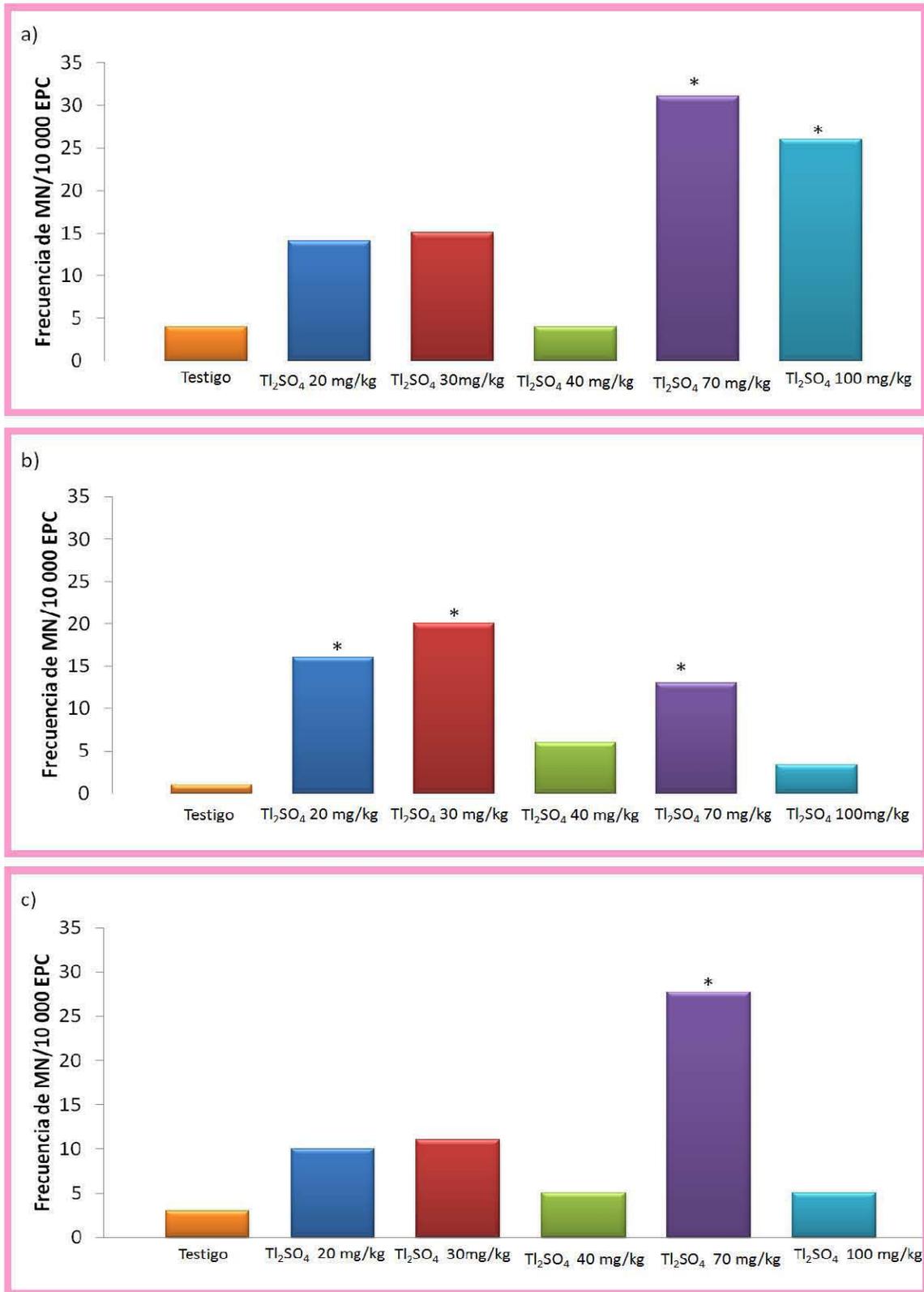


Fig. 9 Análisis del NIF calculado por grupo para 10 000 EPC, en las diferentes horas evaluadas a) hora 24, b) hora 48 y c) hora 72. Estadísticamente significativo con  $p < 0.05$ ; \* vs testigo; † muerte

Con el fin de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento, se calculó el DIF, el análisis consistió en restar los valores obtenidos en todas las horas del grupo testigo a sus correspondientes horas de los grupos tratados, de tal manera que se observaran los MN inducidos únicamente por los tratamientos, y se calcula:

$$DIF = \text{valor observado en el grupo tratado a la hora } x_i - \text{valor observado en el grupo testigo a la hora } x_i$$

Donde:

X<sub>i</sub>= Tiempo de evaluación

En la fig. 10 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF. Se observa que el grupo tratado con 40 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tiene un comportamiento sin variaciones significativas en la frecuencia basal de MN. Mientras que en el grupo tratado con 70 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podemos observar que la mayor inducción de MN es a la hora 24 y en los grupos tratados con 20,30 y 100 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se da en la hora 48.

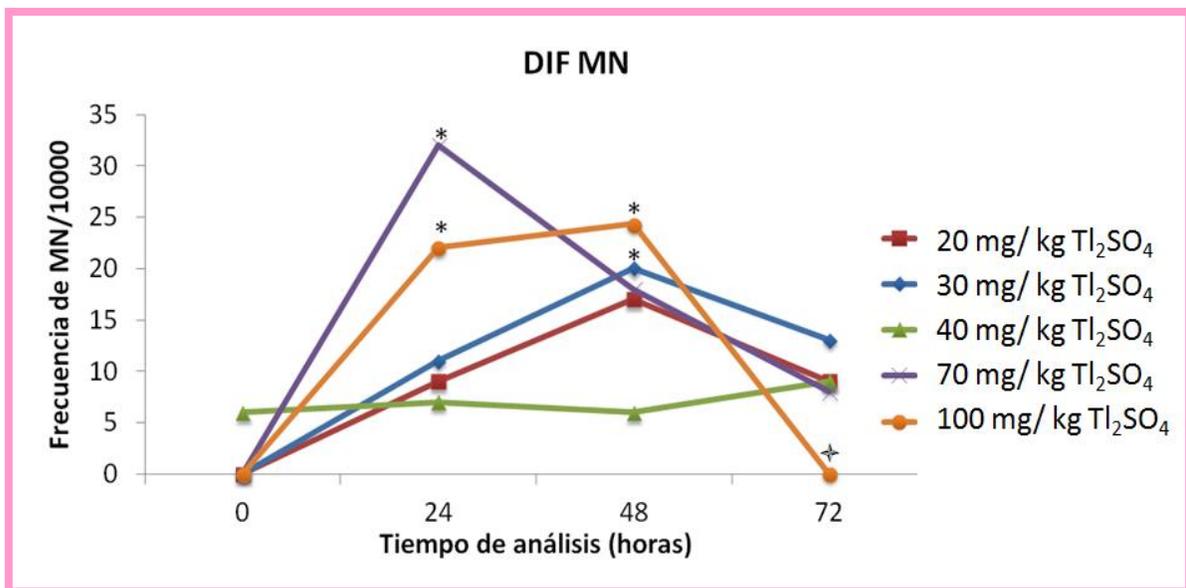


Fig. 10. Análisis del DIF absoluto de MN calculado por tiempo y grupo para 10 000 EPC;\* p<0.05 vs hora 0 de cada tratamiento; † muerte.

## **6.2 Efecto del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ratones macho de la cepa CD-1**

En el cuadro 2 se muestran los promedios de MN evaluados en ratones macho a las 0, 24, 48 y 72 horas tras la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20,30 y 40 mg/kg) por vía i.p. Los resultados muestra incremento significativo en las frecuencias de MN en las dosis de 30 y 40 mg/kg a la hora 48 (alrededor de 2-5 MN), en comparación con el grupo testigo, aunque se registro la muerte de 2 organismos a la hora 72 en el grupo tratado con 30 mg/kg y uno en el grupo tratado con 40 mg/kg murió uno a la hora 24, uno a la hora 48, y todos a la hora 72.

A estos resultados también se les realizo el análisis del NIF calculado para 10 000 EPC, que se muestra en la Fig. 11 donde podemos observar el aumento significativo en la inducción de MN en el grupo tratado con 40 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la hora 48, comparada con el grupo testigo.

*Cuadro 2. Promedios de las frecuencias de MN en ratones macho tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>N</b>	<b>Hora de análisis</b>	<b>MN/2000 células</b>
<b>Testigo</b>	5	0	0.6 ± 0.8
	5	24	1.0 ± 0.7
	5	48	0.8 ± 0.8
	5	72	1.0 ± 0.7
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mg /kg</b>	5	0	0.2 ± 0.4
	5	24	0.8 ± 0.8
	5	48	0.4 ± 0.5
	5	72	1.2 ± 0.8
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 mg /kg</b>	5	0	0.4 ± 0.5
	5	24	2.2 ± 0.8
	5	48	4.4 ± 0.5*
	3 <sup>+</sup>	72	2.0 ± 0.0
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mg /kg</b>	5	0	0.5 ± 0.5
	4 <sup>+</sup>	24	3.2 ± 0.9*
	3 <sup>+</sup>	48	7.5 ± 0.7*
	0	72	ND

*Significancia estadística con p<0.05; \* vs testigo; <sup>+</sup> muerte; ND no determinado.*

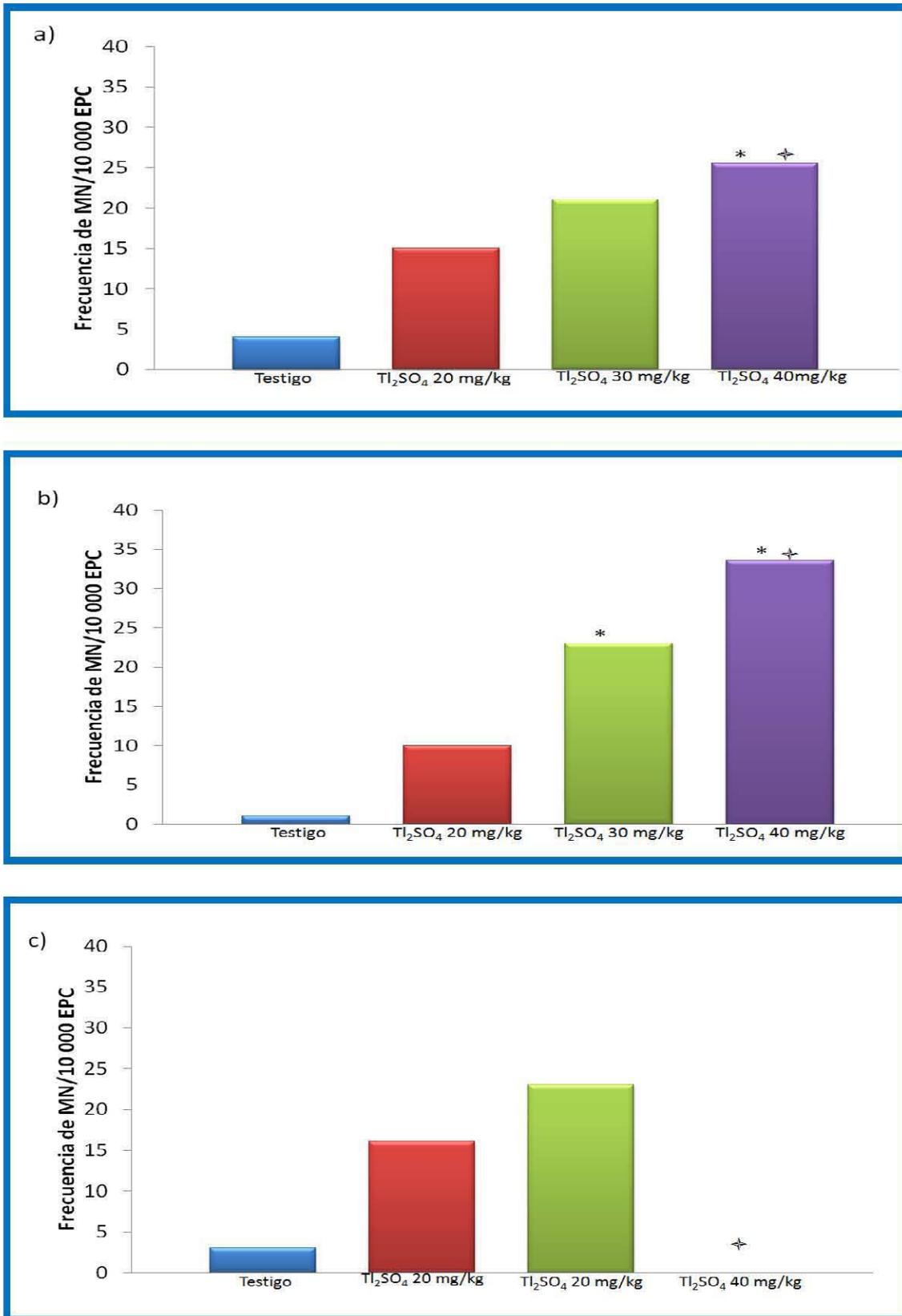


Fig. 11. Análisis del NIF de MN calculado por grupo para 10 000 EPC en los diferentes tiempos de evaluación.

Estadísticamente significativo con: \*  $p < 0.05$  vs testigo.; † muerte.

Al realizar el análisis del DIF (Fig. 12) podemos observar, que el grupo tratado con 20 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tiene un comportamiento sin variaciones significativas en la frecuencia basal de MN, mientras que en los grupos tratados con 30 y 40 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podemos observar que la mayor inducción de MN es en la hora 48.

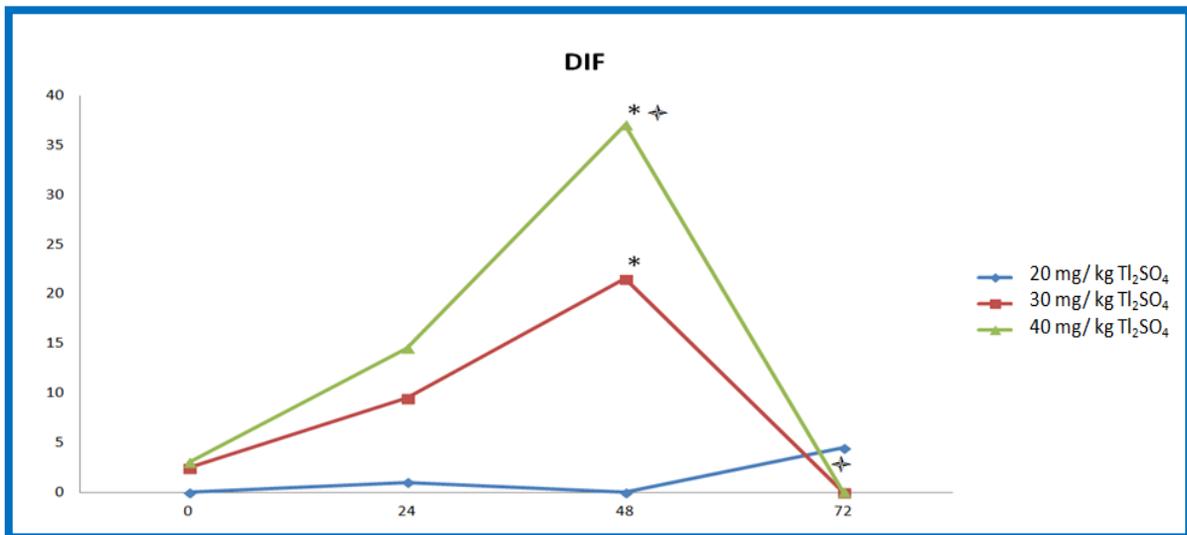


Fig. 12. Análisis del DIF absoluto de MN calculado por tiempo y grupo para 10 000 EPC; \*  $p < 0.05$  vs hora 0 de cada tratamiento; ✦ muerte.

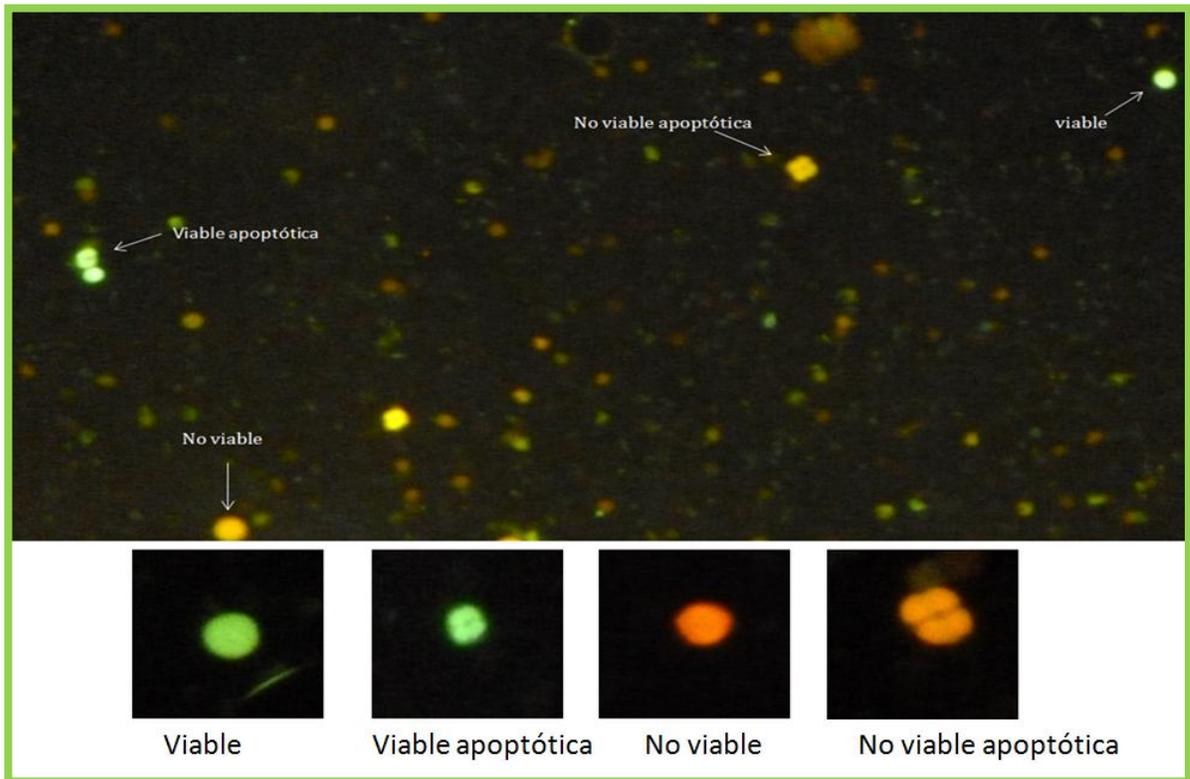
### 6.3 Efecto del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre la apoptosis

La apoptosis fue evaluada directamente en leucocitos de sangre periférica de ratón antes (hora 0) y después (Hora 48) con base en la tinción diferencial NA/BrEt (Fig. 13). A través de este método se pueden distinguir cuatro tipos de células de acuerdo al tipo de emisión fluorescente y al aspecto morfológico del núcleo celular, los cuales son:

- Células viables: con núcleos normales, la cromatina se observa con una fluorescencia verde uniforme, con estructura organizada.
- Células viables apoptóticas: se observa el núcleo teñido de color verde fluorescente; la cromatina se observa condensada.

- c) Células no viables: con núcleos normales, la cromatina se observa con una fluorescencia naranja-rojo, con estructura organizada.
- d) Células no viables apoptóticas: se observa el núcleo teñido naranja-rojo con fragmentos condensados de cromatina.

(McGahon et al., 1995; García-Rodríguez et al., 2013).



*Fig. 13. Leucocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA/BrEt. Se observan las células viables, viables apoptóticas, no viables y no viables apoptóticas*

Se evaluó y calculó el porcentaje de las células viables apoptóticas (con membrana intacta) y no viables apoptóticas (con membrana alterada), observadas en cada grupo tratado para realizar una comparación cuantitativa. Los resultados de la administración de 20, 30, 40, y 70 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en hembras se muestran en la Fig. 14, donde se observa que en los grupos tratados con 40 y 70 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> incrementa significativamente el número de células no viables apoptóticas.

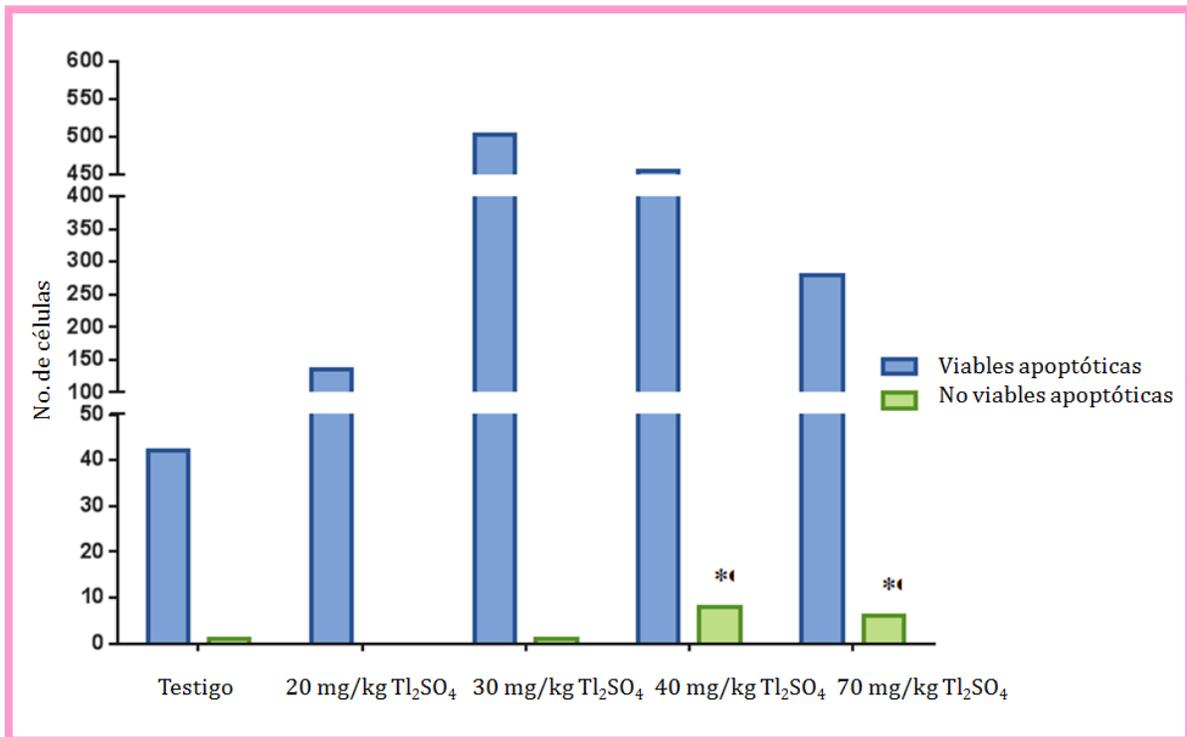
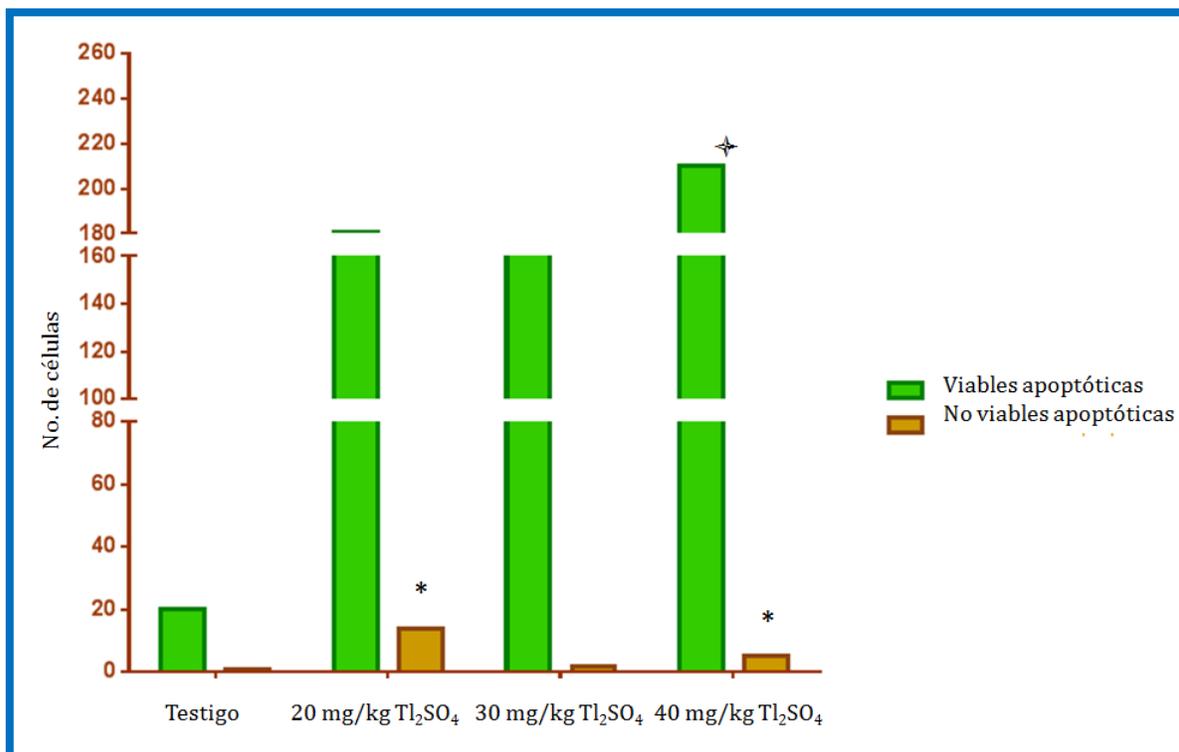


Fig. 14 Análisis de la apoptosis en ratones hembras calculado por grupo para 200 células, en las diferentes horas evaluadas la hora 48. Estadísticamente significativo con  $p < 0.05$ ; \* vs testigo.

En la Fig. 15 se muestran los resultados de las células viables apoptóticas y células no viables apoptóticas para los machos tratados con 20, 30 y 40 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> donde se observa que incrementa significativamente el número de células no viables apoptóticas, en comparación con el grupo testigo.



#### **6.4 Efecto del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre la relación entre EPC/ENC**

En el cuadro 3 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC (1000 células totales) cuando se administran las diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ratones hembra donde se observa la disminución significativa de EPC en los ratones tratados con 30 (a partir de la hora 48), 40, 70 y 100 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en todas las horas evaluadas.

*Cuadro 3. Promedios de las frecuencias de EPC/ENC en ratones hembra tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Hora de análisis</b>	<b>EPC/1000 células</b>
<b>Testigo</b>	5	0	130.2 ± 6.0
	5	24	130.2 ± 7.3
	5	48	131.4 ± 7.4
	5	72	134.4 ± 9.4
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 mg/kg)</b>	5	0	153.3 ± 21.3
	5	24	138.8 ± 16.0
	5	48	115.0 ± 25.9
	5	72	120.4 ± 11.3
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 mg/kg)</b>	5	0	133.0 ± 10.0
	5	24	121.2 ± 3.5
	5	48	89.2 ± 6.9*
	5	72	80.6 ± 23.5*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 mg/kg)</b>	5	0	124.8 ± 3.7
	5	24	83.6 ± 4.3*
	5	48	67.0 ± 11.4*
	5	72	36.4 ± 12.9*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (70 mg/kg)</b>	5	0	102.0 ± 5.4
	5	24	72.8 ± 11.2*
	5	48	56.6 ± 5.0*
	3	72	50.4 ± 12.0*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mg/kg)</b>	5	0	121.8 ± 34.6
	5	24	43.6 ± 17.4*
	3 <sup>+</sup>	48	21.4 ± 8.2*
	ND <sup>+</sup>	72 <sup>+</sup>	ND

*Significancia estadística con  $p < 0.05$ ; \* vs testigo; <sup>+</sup> muerte; ND no determinado.*

En el cuadro 4 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a los ENC (1000 células totales) cuando se administran las diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en machos donde se observa la disminución significativa de EPC en los ratones tratados con 20, 30 y 40 mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en todas las horas evaluadas.

*Cuadro 4. Promedios de las frecuencias de EPC/ENC en ratones macho tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

TRATAMIENTO	N	Hora de análisis	EPC/1000 células
<b>Testigo</b>	5	0	118.2 ± 10.8
	5	24	104.0 ± 9.4
	5	48	106.0 ± 12.8
	5	72	95.4 ± 4.3
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mg /kg</b>	5	0	121.0 ± 20.9
	5	24	107.6 ± 12.3
	5	48	97.2 ± 5.0
	5	72	86.8 ± 11.8*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 mg /kg</b>	5	0	153.0 ± 6.4
	5	24	124.0 ± 13.1
	5	48	94.6 ± 9.3*
	3 <sup>+</sup>	72	31.8 ± 4.2*
<b>Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mg /kg</b>	5	0	109.2 ± 12.6
	4 <sup>+</sup>	24	68.4 ± 9.0*
	3 <sup>+</sup>	48	14.8 ± 7.4*
	0	72	ND

*Significancia estadística con p<0.05; \* vs testigo; <sup>+</sup> muerte; ND no determinado.*

Debido a que los resultados muestran una alta variabilidad en la relación de EPC con respecto a ENC en todos los grupos, se realizó el análisis de la viabilidad celular en leucocitos mediante el método descrito por McGahon *et al.*, (1995), el cual proporciona datos más precisos sobre la toxicidad de los tratamientos.

6.5 Efecto del  $Tl_2SO_4$  sobre la viabilidad celular

En la Fig.16 se muestran los porcentajes de células viables y células no viables, en los grupos de hembras tratados con diferentes dosis de  $Tl_2SO_4$ , donde podemos observar que en el grupo tratado con 70 mg/kg de  $Tl_2SO_4$  el número de células no viables es muy alto en comparación con el testigo mientras que en el grupo tratado con 30 mg/kg de  $Tl_2SO_4$  es casi del 50%.

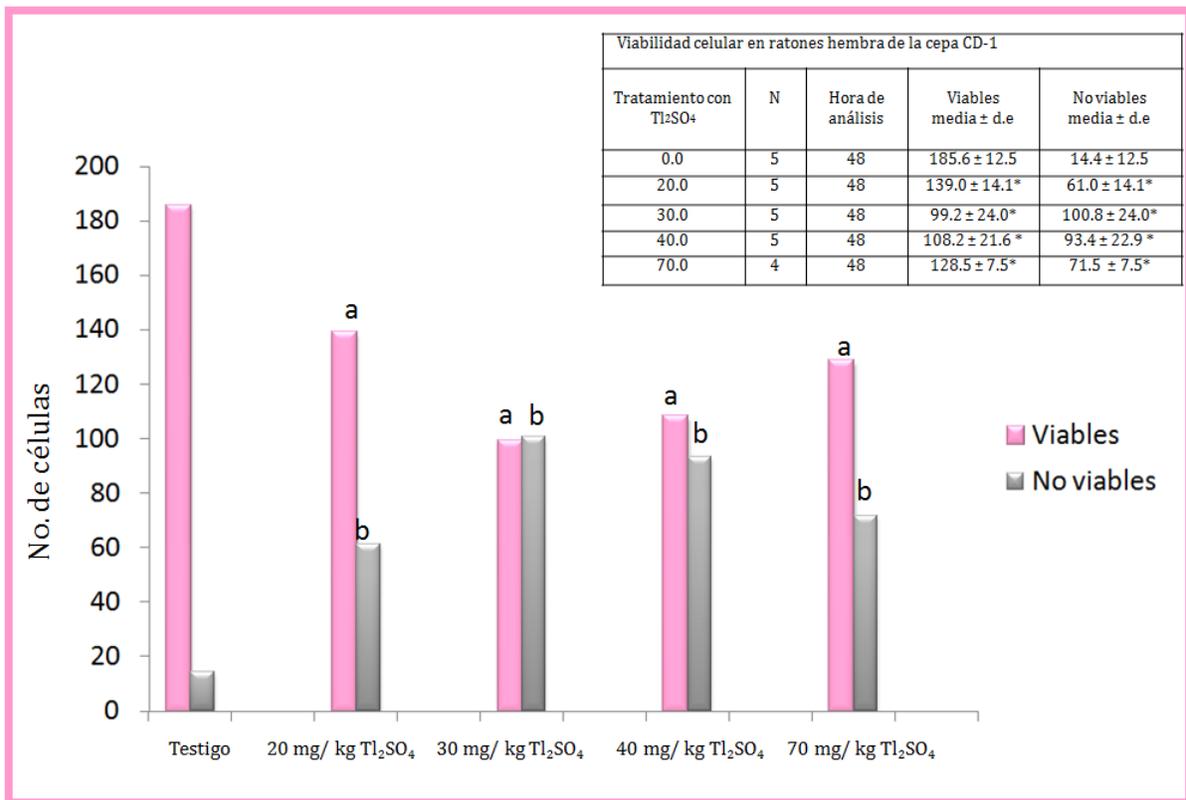
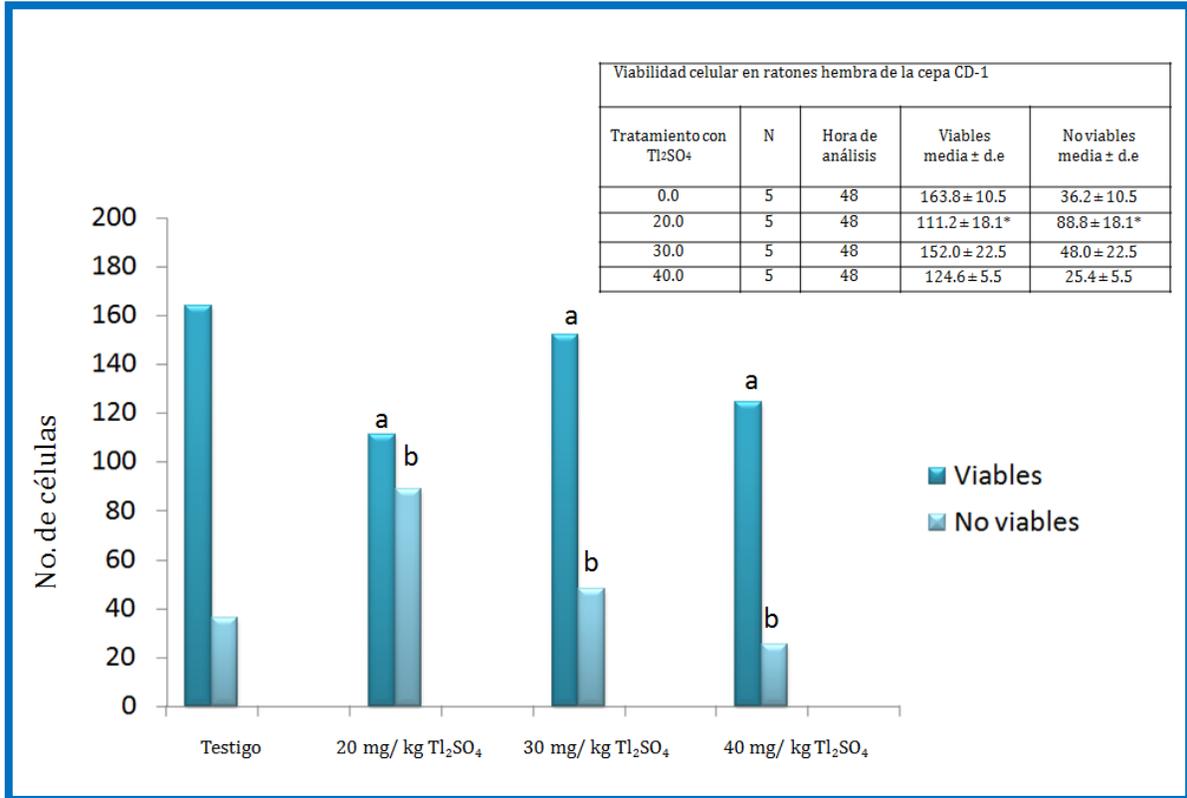


Fig. 16. Viabilidad celular, para 200 células; \*  $p < 0.05$  vs hora 0 de cada tratamiento; ✦ muerte.

a) Viables vs testigo, b) No viables vs testigo

En la figura 17 podemos observar los porcentajes de células viables y células no viables, en los grupos de machos tratados con diferentes dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, donde podemos observar que en el grupo tratado con 20mg/kg de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el número de células no viables es muy alto en comparación con el testigo.



*Fig. 17. Viabilidad celular, para 200 células; \*  $p < 0.05$  vs hora 0 de cada tratamiento; † muerte.  
a Viabiles vs testigo, b No viabiles vs testigo*

## **VII. Discusión**

Diversos estudios muestran que la exposición ocupacional, ambiental o accidental a metales pesados puede inducir efectos sobre la salud humana, esto debido a que pueden interactuar con biomoléculas como el DNA, enzimas, proteínas y lípidos (EPA, 2009; WHO, 1996; Flora *et al.*, 2008). De acuerdo a la EPA (2009) el Tl presenta una toxicidad comparable a la de metales como el plomo, cadmio y mercurio. Sin embargo, la mayoría de los estudios de los compuestos del Tl se centran principalmente en sus efectos tóxico-sistémicos y han sido poco estudiados sus efectos genotóxicos a pesar de que son usados en diferentes industrias como la química, óptica, eléctrica y tabacalera. De ahí que, la presente investigación contribuye a ampliar la información referente a los efectos genotóxicos y citotóxicos que pueden estar asociados con la exposición a compuestos metálicos como los de Tl [I]. Se empleó el ensayo de MN, la evaluación de las frecuencias de EPC con relación a los ENC, la inducción de apoptosis y la viabilidad celular en ratones hembras y machos de la cepa CD-1, tratados con Tl (I) (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Los resultados mostraron que la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a ratones hembras y machos incrementa las frecuencias de MN en todas las horas evaluadas después de los tratamientos, lo cual indica que está induciendo efecto genotóxico. En otros estudios en se ha mostrado que compuestos de Tl (I) como el acetato de Tl, es capaz de de inducir rompimientos de cadena doble del DNA, así como inducir algunos tipos de aberraciones cromosómicas e ICH *in vitro* y reducir el IM (Felipe-Reyes, 2011; Buendía-Valverde, 2013). Particularmente en este estudio se observó que la mayor inducción de MN se presentó a las 48 horas después de la administración del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, esto puede deberse a la distribución y biotransformación del compuesto, ya que en general los agentes químicos presentan su mayor distribución entre las 0 y las 24 horas después de su administración misma que depende de su naturaleza (Hayashi *et al.*, 1990; Heddle *et al.*, 2011). Aunque el incremento de MN observado en los organismos tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue estadísticamente significativo a las 48 horas (7/1000 MN-EPC), esta inducción es baja en comparación con la que presentan otros metales como los compuestos de cromo (VI), que es considerado un claro agente genotóxico y cancerígeno, capaz de inducir hasta 20/1000 MN-EPC (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Organizaciones como la FDA (2000) y la OECD (1997) han propuesto que se considere como un agente genotóxico claro solo aquellos compuestos que incrementan más de 4/1000 MN en EPC, por lo que con base en nuestros resultados podemos sugerir que el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> actúa como un agente genotóxico débil.

Si bien se observó que la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> incrementó las frecuencias de MN tanto en hembras como en machos, el efecto fue más significativo en los machos. Estas diferencias pueden estar relacionadas con factores fisiológicos que tienen influencia sobre la toxicidad de una sustancia, tales como el estado hormonal. Los niveles de estrógenos en los machos son menores que en las hembras, y se ha propuesto que los estrógenos confieren protección a las células dañadas por estrés oxidante. Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para identificar el mecanismo de protección de los estrógenos y se plantea que funcionan como antioxidantes ya que actúan como inactivadores de radicales libres, así como en la quelación y reducción de los iones oxidantes (Bandeau *et al.*, 2005). Por otra parte, en un estudio realizado por Borrás *et al.*, (2003) con ratas hembras y machos, observaron que las hembras presentan una mayor protección al daño oxidante, ya que las mitocondrias de los machos producen 40% más de peróxido que las de las hembras, también se observaron que el daño oxidante en DNA mitocondrial de los machos es 4 veces mayor que en las hembras, debido a la actividad de la Mn-superóxido dismutasa y a la glutatión reductasa.

Existe muy poco acerca de los mecanismos que regulan la genotoxicidad del Tl, diversos autores han discutido sobre el papel de este en la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres que pudieran interactuar con la molécula de DNA y generar daño en su estructura (Galván-Arzate *et al.*, 2000; Tarpey *et al.*, 2004; Hanzel y Verstraeten, 2006). Se han propuesto que los compuestos de Tl [I] atraviesan las membranas biológicas por difusión simple por su semejanza con el potasio y de esta manera se distribuye en el interior de la célula. Se ha observado que el Tl [I] tiene afinidad por los ácidos nucleicos, específicamente por regiones ricas en guanina-timina de los telómeros, también que es capaz de formar ligandos con los grupos SH de las proteínas y alterar la homeostasis del calcio (Ca<sup>2+</sup>) (Mulkey y Oehme, 1993; Ramsden, 2002). Asimismo se ha observado que los compuestos del Tl [I] pueden reaccionar con el glutatión provocando la disminución de la actividad antioxidante (Kiliç y Kutlu, 2010). Estos eventos pueden estar relacionados en parte con los efectos genotóxicos observados en el presente estudio.

Por otra parte, al evaluar la apoptosis en los leucocitos de sangre periférica de los organismos tratados con el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se observó el incremento significativo de las células apoptóticas. La apoptosis y la viabilidad celular se evaluaron mediante la tinción diferencial NA/BE en células nucleadas de sangre periférica modificada por García-Rodríguez, *et al.*, (2013) directamente en

la sangre periférica de los ratones obtenida a las 48 h después de la exposición a los tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que se incrementaron los porcentajes de células apoptóticas en comparación con el grupo testigo, lo que corrobora el daño genético del Tl [I]. En este estudio observamos que el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es capaz de inducir un mayor incremento de la apoptosis en comparación con los compuestos de Cr (VI). La apoptosis, muerte celular programada, también juega un papel fundamental en la eliminación de las células dañadas genéticamente, por ello es de crucial importancia en un número de procesos fisiológicos y patológicos. La apoptosis se acompaña de cambios morfológicos característicos, que incluyen contracción citoplasmática, formación de ampollas en la membrana plasmática, condensación o fragmentación de los núcleos y extensa degradación del DNA cromosómico (White, 1996). En algunos trabajos se ha observado que compuestos como el acetato de Tl, inhiben la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M mediante la supresión de la actividad de CDK a través de la inducción mediada por p53 así como del inhibidor de p21 (Cip1), en células de glioma C6 así como el deterioro de la progresión del ciclo celular puede desencadenar la activación de una vía mitocondrial y desplaza el equilibrio en la familia Bcl-2 hacia los miembros pro-apoptóticos, la promoción de la formación de la apoptosoma y, en consecuencia, la apoptosis (Sancar *et al.*, 2004). Por lo que la apoptosis inducida por Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pudiera eliminar las células micronucleadas durante el proceso de eritropoyesis y por ello se observó una menor inducción de MN en los organismos tratados con este compuesto (García-Rodríguez *et al.*, 2014).

Al evaluar la citotoxicidad mediante las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, en hembras y machos se observó que disminuye significativamente la frecuencia de los EPC con respecto a la de ENC en todos los tratamientos y que el efecto fue más significativo en los machos. Si bien se ha descrito que el daño citotóxico puede determinarse por la disminución de EPC con respecto a los ENC, sin embargo la evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, también pueden activarse los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna y Hayashi, 2000). Por lo que, de manera complementaria a la evaluación de citotoxicidad se realizó un análisis de viabilidad celular, el cual mostró que está disminuye significativamente en todas las dosis utilizadas tanto en machos como en hembras lo que indica un efecto citotóxico importante. A partir de esto podemos argumentar que el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> induce toxicidad celular, estos resultados muestran similitud con algunos estudios *in vitro* en los que células adrenales de rata (PC12) expuestas a nitratos de Tl [I y III] en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM

después de 24 horas el porcentaje de células disminuyó aunque no de manera significativa, sin embargo al incrementar 48 horas el tiempo de exposición las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  inducen muerte celular por apoptosis y disminución de la viabilidad (Hanzel y Verstraeten, 2009). Chia *et al.*, (2005) observaron el mismo efecto en células de glioma en concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$  en tiempos de exposición de 24 horas o más, al igual que Bragardin *et al.*, (2003) con acetato de Tl [I] en líneas celulares JurKat expuestas durante 16 horas en concentraciones de 0.25 a 1mM. Un posible mecanismo por el que se que podría explicar parcialmente la citotoxicidad es que el Tl (I) aumenta la expresión de E2F-1, factor involucrado en la expresión de proteínas de la fase S, así como a E2F-1 en presencia de EGF, afectando diferencialmente la progresión del ciclo celular (Pino y Verstraeten, 2011).

Finalmente se observó que al administrar altas dosis de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a ratones hembras y machos, estos mostraban signos clínicos de toxicidad (pelo erizado, disminución de la movilidad y del apetito), así como la muerte de ratones en las dosis más altas, hembras (70 y 100mg/kg) y machos (30 y 40 mg/kg), se explica por la elevada toxicidad que presenta el compuesto, la cual ya ha sido documentada (EPA, 2009). Esta misma toxicidad generalizada puede estar relacionada con la toxicidad y muerte celular observada mediante la disminución de la proporción de EPC en sangre periférica y con el incremento de células apoptóticas en los ratones tratados con el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **VIII. Conclusiones y comentarios finales**

- La administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p. es capaz de inducir efecto genotóxico en ratones machos de la cepa CD-1, ya que incrementa significativamente las frecuencias de MN.
- La administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p. es capaz de inducir efecto genotóxico en ratones hembras de la cepa CD-1, ya que incrementa significativamente las frecuencias de MN.
- El Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> actúa como un agente genotóxico débil ya que la inducción de MN (7/1000 MN-EPC) es baja en comparación con agentes identificados claramente como genotóxicos y de acuerdo a los lineamientos de la FDA y la OECD se considera como un agente genotóxico claro solo aquellos compuestos que incrementan en más de 4/1000 MN-EPC.
- El efecto genotóxico inducido por el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue más significativo en los machos que en las hembras lo cual puede estar relacionado con las condiciones metabólicas relacionadas con el sexo como lo son factores hormonales.
- El hecho de que la exposición a Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentó una mayor inducción de células apoptóticas, nos permite sugerir que la apoptosis pudiera eliminar las células micronucleadas durante el proceso de eritropoyesis.
- La administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por vía i.p. a ratones macho y hembra disminuye significativamente las frecuencias de EPC con respecto a los ENC, lo que indica un posible efecto citotóxico, que fue corroborado con la disminución de la viabilidad celular.
- La administración por vía intraperitoneal de dosis altas de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> induce muerte de los organismos tanto en hembras como en machos, lo que indica un efecto tóxico sistémico.

## **IX. Referencias bibliográficas**

- Abrevaya X., (2008). ¿Qué es la genotoxicidad? Intra Med. Artículos
- Albert L., (1988). Curso Básico de Toxicología Ambiental. 2° edición- Limusa. México. pp.311.
- Allen R.T., Hunter W.J III., Agrawal D.K., (1997). Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 37: 215-228.
- Ames B., (1989) Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. Environmental and molecular mutagenesis, 14:66-77.
- ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, (1992). Reseña Toxicológica del Talio, Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Arencibia D. y Rosario L., (2009). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos. Revista de Toxicología en línea (RETEL). La Habana, Cuba.
- Ashkenazi A. y Dixit V.M., (1998). Death receptor: signaling and modulation. Science, 281:1305–1308.
- Asler I.D., Bootman J., Favor J., Hook G., Schriever G., Welzl G., Whorton E., Yoshimura I., Hayashi M., (1998). Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. Mutation research.
- Bandeau M., Adlercreutz H., Kaihovaara P., Tikkanen M.J., (2005). Estrogen A-ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. Journal of steroid Biochemistry and molecular Biology, 96: 271-278.
- Baskic D., Popovic S., Ristic P., Arsenijevic N.N., (2006). Analysis of cyclohexamide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. Cell Biology international, 30:924-932.
- Beltrami C., (2001). La contaminación: El equilibrio en peligro, Ed. Longseller, 70-74.
- Beyersmann D. y Hartwig A., (1994). Genotoxic effects of metal compounds, Archives of Toxicology Supplement 16: 192-198.
- Buendía-Valverde M.L., (2013). Evaluación in vivo del efecto genotóxico inducido por exposición al acetate de talio (CH<sub>3</sub>COOTl) en ratón hembra CD-1 mediante la prueba de aberraciones cromosómicas. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- Blankenberg F.C., (2008). *In vivo* Detection of apoptosis. Journal Nuc Med., 5 (2):116-126.

- Bragadin M., Toninello A., Bindoli A., Rigobello M.P., Canton M. (2003). Thallium induces apoptosis in Jukat cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1010, 283-291.
- Borras C., Satre J., García-Sala D., Lloret A., Pallardo F.V., Viña J., (2003). Mitochondria from females exhibit higer anitoxidat gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*, 34:546-552
- Carson B.L, Ellis H.V., McCann J.L., (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans including feasibility and need. *Publicaciones Lewis. Londres*, 243-255.
- Clarkson W.T., Friberg L., Norberg F.G., Sarger R.P., (1988). *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Ed. Plenum Press., New York, 369-382.
- CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment. Summary of existing Canadian environmental quality guidelines. (2003). Available at <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/215/>
- Chia F., Chen S., Ang C.S., Shih M., Lee H., Wu H., (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Annals New York Academy of Sciences*, 1042:523-530.
- Circu M.L., y Aw T.Y., (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radicals, Biology and Medicine*, 48(6):749-762
- Cuello F., Kato C., Sadarangani K., Saenz S., Gejman E., Owen G., y Lipkowits S., (2006). Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroidales ovaricas en la apoptosis inducidas por el ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos. *Universidad de chile*, 31 (1):5-15.
- Cvjetko P., Cvjetko I., Pavlica M., (2010), Thallium toxicity in humans. *Arhv za Higijenu Rada Toksikologiju* 2010 (61), 111-119.
- Delvals T. A., Saenz V., Arias A. M., Blasco J. (1999). Thallium in the marine environment: first ecotoxicological assessments in the Guadalquivir estuary and its potential adverse effect on the Doñana European natural reserve after the Aznalcollar mining spill. *Cienc Mar* 25(2), 161-75.
- Elena G.A., (2002). Mecanismos de muerte celular apoptosis y necrosis. *Rev. Arg.* 6(60):391-401
- EPA: Enviromental ProtectionAgency, (1998). Oppts harmonized test guidelines. En linea:[<http://www.regulations.gov/oldLinks.jsp?url=contentStreamer?disposition=attachment&objectid=09000064809bc908&contentType=pdf>]
- EPA: Enviromental ProtectionAgency, (1984). Health Assessment Document for Chromium. Enviromental Assessment and criteria Office. Research Triangle Park, NW.

- EPA: Environmental Protection Agency., (2009) Toxicological review of thallium and compounds. EUA; En línea: [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris)
- Evan G. y Littlewood T., (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281, 1317–1322.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. y Aykin-Burns N., (2001). Toxic metals and oxidative stress part. I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics Medicinal Chemistry* 1: 529-539.
- FDA. (2000). Food and Drug Administration: guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA.
- Felipe-Reyes M. (2011). Valoración de la toxicidad de acetate de talio (CH<sub>3</sub>COOTl) *in vitro* mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- Fenech M., (2006) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay involves into a –cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, 600, 58-66.
- Flora J.S., Mital M., Mheta A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal Medical Research*, 128: 501-523.
- Formigli L., Scelsi R., Poggi P., Gregotti C., Di Nucci A., Sabioni E., Gottland L., Manzo L., (1986) Thallium-induced testicular injury in the rat, *Environmental Research* 40, 531–539.
- Fulda S., y Debatin K.M., Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. (2003). *Cancer Letters* 197(1-2): 131-135.
- Galván-Arzate S, Santamaría A., (1998). Thallium toxicity. *Toxicology Letters*, 99:1-13.
- Galván-Arzate S., Martínez A., Medina E., Santamaría A., Ríos C.; (2000) Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions; *Toxicology Letters* 116, 37-43.
- Galván-Arzate S., Pedraza-Chaverri J., Medina-Campos O.N., Maldonado P.D., Vazquez-Roman B., Rios C., Santamaria 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.
- García I., y Dorronsoro C., (2004). Dinámica de Metales Pesados en Suelos. En: Tema 15. Contaminación por Metales Pesados. Apuntes. Universidad de Granada España. Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm>

- García-Rodríguez M. C., Altamirano-Lozano M. A., (2000) Effect of chloropyllin on the MN-PCE induction in peripheral blood of mice exposed to chromium trioxide *in vivo*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(31).
- García-Rodríguez M. C., López-Santiago V., Altamirano-Lozano M. A., (2001) Effect of chloropyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. Mutation Research, 496:146-151.
- García-Rodríguez M. C, Carvente-Júarez M. M., Altamirano-Lozano M. A. (2013). Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 1-9. DOI:10.1155/2013/486419.
- García-Rodríguez, M. C., García-Cárdenas, G. P., Montañó-Rodríguez, A. R. y Altamirano-Lozano, M. A. 2014. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. Acta Universitaria. En prensa.
- Gómez-Meda B. C. y Zúñiga-González G. M., (2001) Genotóxicidad y potencial teratógeno., revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana, 20 (3).
- Gil H.F., (2005), Toxicología industrial (III) toxicidad de los metales pesados. En: Tratado de medicina del trabajo. Mansson. Capitulo 40; 1060.
- Goyer R. A., y Clarsksom W. T., (2001) Toxic effects of metals. Toxicology, 811-67.
- Hanzel C.E. y Verstraeten S.V., (2006) Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. Toxicology Applied Pharmacology, 216;485-492.
- Hanzel C.E. y Verstraeten S.V., (2009). Tl (I) and Tl (III) Activate both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. Toxicology and Applied Pharmacology, 236: 59-70.
- Hayashi M., Takeshi M., Yukio K., Toshio S., Motoi I., (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research Letters, volumen 245 (4), 245-249.
- Harwing A., (1995). Current aspects in metal genotoxicity; Biometals 8, 3-11.
- Hayashi M., MacGregor J., Gatehouse D., Adler I., Blaker D., Dertinger S., Krishna G., Morita T., Ruso A., Suto S., (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II: Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing and automated scoring. Environmental Molecular Mutagenesis 35:234-252.

- Heddle J.A., Hite M., Mavourin K., MacGregor J.T., Salamone M.F., (1983). The induction of the micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox. Program. *Mutation Research* 123:61-118.
- Higueras, P., R. Oyarzun y H. Maturana (2010). Minería y toxicología. Disponible en: <http://www.uclm.es/users/higueras/mam/Mineria Toxicidad4.htm>
- Houge C.G., (1984). The effect of common exposures on reproductive outcomes. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 4, 45-57.
- IPCS, International Programmed on Chemical Safety. (1990). Thallium URL <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim525.htm>
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (2014) En línea [[http://www.iupac.org/](http://http://www.iupac.org/)]
- Kaufmann S., (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted rugs: more than answers. *Biochimica Biophysica Acta*, 1400, 195-211.
- Kaufmann M., Bozic D., Briand C., Bodmer J.L., Zerbe O., Kohl A., Tschopp J.,y Gütter M.G., (2002). Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling. *FEBS Letters*, 527(1-3):250-254.
- Kerr J.F.R., y Wyllie A.H., Currie A.R., (1993). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
- Kiliç G.A. y Kutlu M. (2010). Effects of exogenous metallothionein against thallium-induced oxidative stress in rat liver. *Food Chemistry Toxicology* 48:980-987.
- Krishna G. y Hayashi M., (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation; *Mutation research* 455, 155-166.
- Leonard A. y Gerber G.B, (1997) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation research* 387: 47-53.
- Martí M., Desoille H., (1993). Talio. En: *Medicina del trabajo*. 2º edición Mansson. Capitulo 31: 1050.
- Mavourin K H., Blakey DH., Cimino MC., Salamone MF. Y Heddle JA., (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S., Environmental Protection Agency Gene-Tox., *Mutation research* 239, 29-80.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Manhboubi A, Shi Y, Moguil RJ, Nishioka WK, Green DR., 1995., The End of the (Cell) Line: Methods for the study of Apoptosis in vitro, en: *Methods in cell Biology*, 46:153-185.

- Mulkey J. P., y Oehme F. W., (1993) A review of thallium toxicity. *Human Toxicology* 35(5):445-453.
- MülleL., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T. y Tweats D., (1999). ICH harmonizad guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation research*, 436:1995-225.
- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Toxicology* 36 (7):37-40
- Navarro-Aviño J. P., Aguilar A. I., y López J. R., (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2):10-25.
- Newman M. e Intoch A., (1991). *Metal Ecotoxicology*. Ed. Lewis Publishers. pp. 395.
- OEHHA; Office of Environmental Health Hazard Assessment (2009) Responses to comments on the technical support document public health goal for thallium in drinking wáter en línea: [<http://www.oehha.ca.gov/water/phg/pdf/thalirs.pdf>].
- OECD, 1997. Guideline for the testing of chemicals, mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline 474. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>
- Ouameur AA, Nafisi s, Mohajerani N., tajmir-Riahi HA., (2003). Thallium-DNA complexes in aqueous solution. Majoror minor Groove binding *Journal of Biomolecular structure y dynamics* 20(4):561-565.
- Oehm A., Behrmann S.I., Werner F., Pawlitan M., Maier G., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Bernhard C., Trauth S., Ponsting H., y Krammer P., (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with thw Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry* 267(15):10709-10715.
- Pino M.T.L., Verstraeten S.V., (2011). Efectos del talio sobre la proliferación de las células PC12 inducida por el factor de crecimiento epidérmico. *Acta Toxicologia Argentina*, 89.
- Radic S., Cvjetko P., Glavas K., Roje V., Pevalek-Kozlina B., Pavlica M., (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad vean (*Vicia faba L.*) seedlings induced by thallium. *Enviromental Toxicology Chemistry* 28,189-196.
- Ramsden D. Thallium. *Molecular Death* 2002;304-11.
- Rao C.R., Ruiz-Cacho M.J., Sahuquillo A., Lopez-Sanchez J.F., (2008). Assesment of extractans for determination of thallium in an accidentally polluted soil. *Earth and enviromental science* 81:334-338.

- Repetto G., Del Peso A., (2001), Gallium, indium, and thallium. En: Patty's Toxicology. Bingham E, Crhrssen B, Powell C. (eds.) 5 edición. Wiley-Intersciennce Publication. Nueva York; 486-487.
- Repetto G., Del Peso A., Repetto M., (1998) Human thallium toxicity. En: Nriagu J. Thallium in the environment. Advances in environmental Science and Technology. USA, 167-199.
- Roberton J. y Orrenuis S., (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. Clinical Review toxicology, 30:609-627.
- Samanta S., Dey P., (2010) Micronucleus and its applications. Diagnostic Cytopathology. Mutation Research 40(5):15-20.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kacmaz K., Linn S., (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA perair and the DNA damagecheckpoints. Annual Reviews of Biochemistry, 73:39-85.
- Schmid W. y Von Ledenbur M., (1973). The micronucleus test assay methodological aspects. Mutation Research, 45:528-537.
- Sheikh M.S., y Huang Y., (2003). Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. Cell Cycle, 2(6):550-552.
- Shen H. y Pervaizs S., ( 2006). TNF receptor superfamily- induced cell death: redox-dependent execution faseb. Journal, 20(10):1589-1598.
- Saraste A., y Pulkki K.,(1999). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. cardiovascular research, 45:528-537.
- Singh J. y Snow E.T., (1998). Chromium (III) decreases the fidelity of human DNA polymerase beta. Biochemistry 37:9371-9378.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B., (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology 286:431-444.
- Teaf C.M, Middendorf P.J., (2000). Mutagenesis and Genetic Toxicology, en: Williams P, James P, Roberts SM., Principles of Toxicology. Envoromental and industrial Aplications. 2° Ed. New York, USA, 239-264.
- Tyagi R., Rana P., Raza A., Bhatnagar D., Devi M., Chaturvedi S., Tripathi R., Khushu S., (2011). Study of acute biochemical effects of thallium toxicity in mouse urine by NMR spectroscopy. Journal of Applied Toxicology, 31:663-670.
- UNEP: United Nations Environment Programme, (2010). Harmful substances and hazardous waste.

- USGG Mineral Information. Thallium. Statistics and information. Mineral Commodity Summaries 2006. Available at <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/thallium>.
- USCHPPM, US Army for Health Promotion and Preventive Medicine. (2007), Wildlife Toxicity Assesment for Thallium. Document No: 37-EJ1138-010, EUA.
- Valko M., Morris H., y Cronin M.T., (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemisty 12:1161-1208.
- Vaisman A., Warren M.W., y Chaney S.G., (2001). The effect of DNA structure on the catalytic efficiency and fidelity of human DNA polymerase beta on templates with platinum-DNA adducts. Journal Biology Chemmistry 276: 18999-19005.
- Velázquez M., Andrade M., Lagunas M., y ZajglaM., (2004). SMAC/Diablo y su papel en la regulacion de la apoptosis. Revista de Educación bioquímica, 23(2):64-70.
- Venegas W., Poblete S., Weigert G., Márquez C. y Martínez V., (2002) Efectos Tóxicos y Genotóxicos de Agentes Químicos y Físicos, Seminario Internacional Contaminación Ambiental en Chile, Universidad de Concepción.
- Villaverde M., Verstraeten S., (2003), Effects of thallium (I) and thallium (III) on liposome membrane physical properties. Archives of Biochemistry and Biophysics, 417: 235-243.
- Vernugopal B. y Luckey T.D.,(1978). Metal toxicity in mammals.2 chemical tocity of metals and metalloids. Departamento of Biochemistry. University of Missouri, Columbia. Plenum Press. Nueva York; 122-127.
- Wedrychowski A., Schmidt W.N., y Hnilica L.S., (1986). The *in vivo* cross-linking of proteins and DNA by heavy metals Journal Biol Chem 261: 3370-3376
- White, E. (1996). Life, death and pursuit of apoptosis. Genes and Development, 10, 1-5.
- Zasukhina G. D., Vasilyeva I. M., Sdirkova N. I., Krasovsky G. N., Vasyukovich L. Y., Kenesariiev U. I., Butenko P. G., (1983) Mutagenic effect of thallium and mercury salts on rodent cells with different repair activities, Mutation Research 124, 163-173.
- Zalacaín M., Sierrasesúmaga L., Patiño A., (2005) El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana, 28(2).
- Zúñiga B. F., (1999) Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados, ediciones de la universidad autónoma de Yucatán., Yucatán, México.

## **X. Anexos**

El presente trabajo fue presentado de manera parcial en los siguientes eventos académicos:

- i. XI Foro de investigación escolar. Carrera de Biología. FES Zaragoza, UNAM.**  
Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 30 al 31 de enero y 1 de febrero de 2013  
Título del trabajo: ESTUDIO *in vivo* DE LA CINÉTICA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON SULFATO DE TALIO (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).  
Autores: García-Cárdenas, Graciela Pilar; Altamirano-Lozano, Mario Agustín y García-Rodríguez, María del Carmen.
- ii. XVIII Simposio del departamento de ciencias de la salud, Universidad Autónoma de México, Iztapalapa.**  
Iztapalapa, México D.F. Celebrado del 28 al 30 de agosto de 2013  
Título del trabajo: EFECTO GENOTÓXICO DEL SULFATO DE TALIO EVALUADO MEDIANTE LA CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES DE LA CEPA CD-1.  
Autores: García-Cárdenas, Graciela Pilar; Altamirano-Lozano, Mario Agustín y García-Rodríguez, María del Carmen.
- iii. IX Congreso Nacional de Toxicología Ambiental.**  
Nuevo Vallarta, Nayarit. Celebrado del 5 al 8 de Noviembre de 2013  
Titulo del trabajo: Estudio del daño genotóxico y citotóxico del sulfato de talio evaluados mediante la inducción de micronúcleos y de apoptosis en sangre periférica de ratón.  
Autores: Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P y García Rodríguez MC.
- iv. Congreso Nacional de Genética 2013 de la sociedad mexicana de genética.**  
Manzanillo, Colima. Celebrado del 2 al 4 de octubre de 2013  
Titulo del trabajo: Estudio de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica de ratón CD-1 tratados con trióxido de cromo, sulfato de talio y pentóxido de vanadio *in vivo*.  
Autores: Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P y García Rodríguez MC.

**v. Reunión de ciencias medicas, universidad de Guanajuato.**

León Guanajuato. Celebrado del 2 al 4 de abril de 2014

Titulo del trabajo: Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular

Autores: M. C. García-Rodríguez, G. P. García-Cárdenas, A. R. Montaña-Rodríguez, M. A. Altamirano-Lozano.



XI Foro de Investigación Escolar en Biología

Solicitud de registro de trabajo

30, 31 de enero y 1 de febrero de 2013



**Título:** (Mayúsculas)

**ESTUDIO *in vivo* DE LA CINÉTICA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON SULFATO DE TALIO (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

**Autores:** (sepárelos con una coma e indique con superíndice 1 si es alumno, con 2 si es docente)

García-Cárdenas G. P.<sup>1</sup>, Altamirano-Lozano M. A.<sup>2</sup> y García-Rodríguez M. C.<sup>2</sup>

**Modalidad      Ciclo**

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

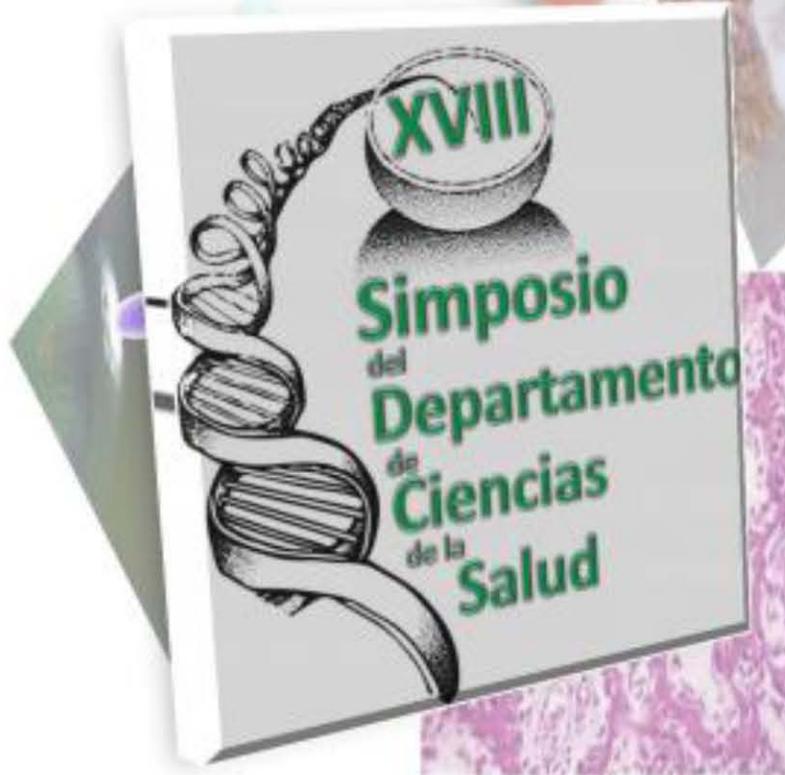
**Resumen:**

(Máximo 300 palabras, Times New Roman 12 pts., interlineado sencillo, renglón seguido, sin sangría y justificado)

El sulfato de talio Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es un metal pesado algunas investigaciones sugieren que el talio es capaz de provocar toxicidad a través de la inducción de estrés oxidativo, lo cual induce daño al ADN. La fuente principal de exposición al talio es el consumo de alimentos contaminados, y actualmente el fumar cigarrillos. En este estudio se investigaron los efectos de la administración de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a ratones de la cepa CD-1 por vía intraperitoneal (i.p.). Se trataron grupos de 5 ratones vía i.p. con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. El daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de micronúcleos (MN) utilizando la técnica de naranja de acridina en eritrocitos policromáticos (EPC). Los resultados muestran que la administración sola de Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una dosis de 30mg/kg de peso en hembras induce un incremento en la frecuencia de MN a las 48 horas, que resultó estadísticamente significativo. Cuando se administró Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a machos la dosis de 30 mg/kg indujo muerte. En base a los resultados podemos concluir que efecto del Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no es genotóxico sino tóxico y es mayor en los machos que en las hembras, lo cual puede estar relacionado con diferencias conductuales y del metabolismo asociado con factores hormonales.

**Palabras clave:** (3-5 palabras)

Sulfato de talio, micronúcleos, genotoxicidad.



**28-30 de Agosto de 2013**

**EFFECTO GENOTÓXICO DEL SULFATO DE TALIO ( $Tl_2SO_4$ ) EVALUADO MEDIANTE LA CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES DE LA CEPA CD-1**

García-Cárdenas Graciela Pilar,  
Altamirano-Lozano Mario Agustín,  
García-Rodríguez María del Carmen.\*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.  
\*carmen.garcia@unam.mx

El talio (Tl) es un metal que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Dentro de sus compuestos el sulfato de talio ( $Tl_2SO_4$ ) es de particular importancia ya que se produce al quemar carbón y en las en las industrias fundidoras, aunque estudios recientes han mostrado que también podemos estar expuestos a estos compuestos mediante el consumo de cigarrillos. Existen varios estudios sobre los efectos tóxicos del  $Tl_2SO_4$ , sin embargo no existen evidencias claras sobre sus efectos genotóxicos. En este trabajo se estudio el efecto genotóxico de  $Tl_2SO_4$ , mediante la evaluación de la cinética de las frecuencias de micronúcleos (MN) en ratones tratados con diferentes dosis de  $Tl_2SO_4$ . Grupos de cinco ratones hembra de la cepa CD-1 fueron tratados con dosis de 20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg de  $Tl_2SO_4$  por vía intraperitoneal. El daño genotóxico se evaluó mediante el análisis de la inducción de MN en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica. Las muestras fueron tomadas de la vena caudal antes del tratamiento (hora 0) y a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Los resultados muestran que hay un incremento de MN para todas las dosis de  $Tl_2SO_4$  administradas a partir de la hora 24 en comparación con el grupo

testigo. Como se observa en la figura no se presentó un comportamiento dosis-respuesta. Las dosis de 70 y 100 mg/kg presentan su mayor efecto a las 24 horas, mientras que la de 70 mg/kg presenta dos picos de inducción a las 24 y 72 horas. Los incrementos observados de MN son bajos en comparación con agentes identificados claramente como genotóxicos por lo que podemos sugerir con base en este ensayo que el  $Tl_2SO_4$  es un agente genotóxico débil. Se sugiere emplear otros ensayos y protocolos que nos permitan evaluar el efecto genotóxico del  $Tl_2SO_4$  de una forma más consistente.

**Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.**

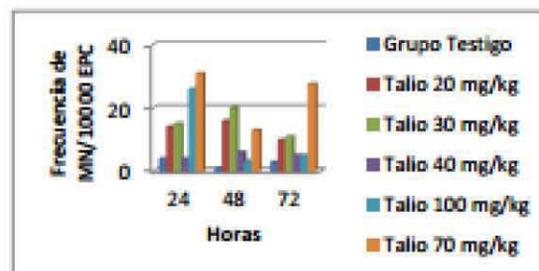
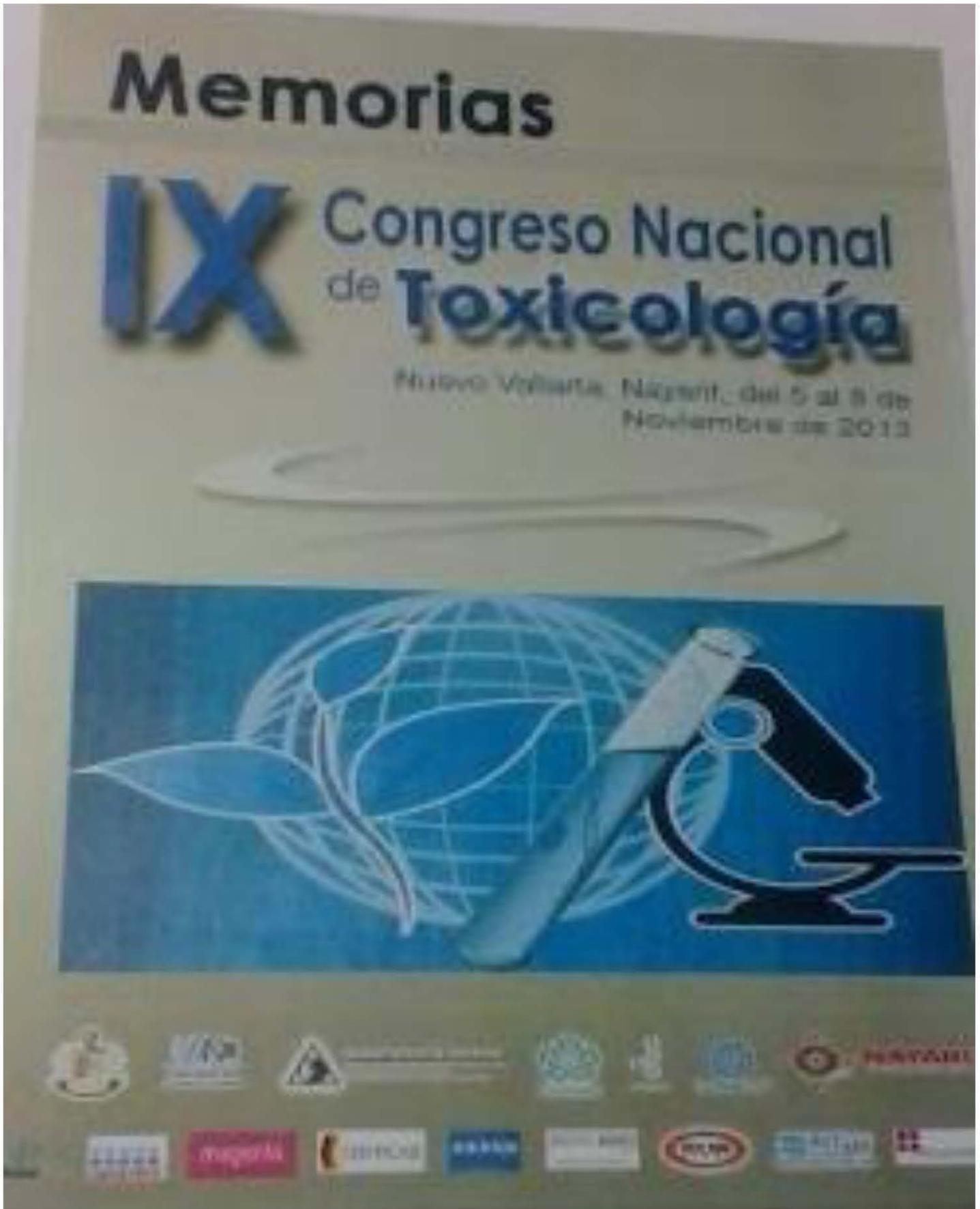


Fig. Cinética de las frecuencias de MN en ratones tratados con diferentes dosis de  $Tl_2SO_4$  por vía intraperitoneal



*IX Congreso Nacional de Toxicología*

**ESTUDIO DEL DAÑO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO DEL SULFATO DE TALIO  
EVALUADOS MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS Y DE APOPTOSIS  
EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN**

Altamirano-Lozano M.A., García-Cárdenas G.P., García-Rodríguez M.C.\*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zedillo, UNAM, México D.F. \*Correo-e: carmen.garcia@unam.mx; Tel: 56230772

En el presente estudio se evaluó el daño genotóxico y citotóxico del sulfato de talio ( $Tl_2SO_4$ ) en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1. Grupos de cinco ratones hembra fueron tratados con 20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg de  $Tl_2SO_4$  por vía intraperitoneal. El daño genotóxico se evaluó mediante la cinética de las frecuencias de micronúcleos (MN) y de la inducción de apoptosis, mientras que el daño citotóxico se evaluó mediante la viabilidad celular y la relación entre la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos, a partir de muestras de la vena caudal tomadas a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos. Para la prueba de MN se utilizó la tinción con naranja de acridina y para la de apoptosis la de naranja de acridina-bromuro de etidio. Los resultados mostraron un incremento significativo en las frecuencias de MN solo en la dosis de 70 mg/kg. Los incrementos de MN fueron bajos (4 MN) en comparación con agentes identificados claramente como genotóxicos. En las muestras que se evaluó apoptosis no se observaron incrementos significativos en el número de células apoptóticas, pero sí en el de células necróticas. Al evaluar la viabilidad celular se observó una disminución significativa en las células vivas y en las frecuencias de EPC. Con base en estos resultados se puede sugerir que el  $Tl_2SO_4$  es un agente genotóxico débil, que no induce actividad apoptótica. Sin embargo, se corrobora su efecto tóxico ya que se observó un claro efecto citotóxico. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.

**REVista INTERNacional  
de  
CONTAMinación  
AMBIEntal**

**volumen 29, suplemento 4, 2013**

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

**MEMORIAS**

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013**

**A 100 años de la creación del Primer Mapa Genético de un Cromosoma  
A 10 años de la culminación del Proyecto Genoma Humano**

**SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA**

**Editores**

**JUANA SÁNCHEZ-ALARCÓN  
RAFAEL VALENCIA-QUINTANA  
SANDRA GÓMEZ-ARROYO  
RAFAEL VILLALOBOS-PIETRINI  
CLAUDIO AMESCUA-GARCÍA**

**ESTUDIO DE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN CD-1 TRATADOS CON TRIÓXIDO DE CROMO, SULFATO DE TALIO Y PENTÓXIDO DE VANADIO *IN VIVO***

Altamirano-Lozano MA, Montaña-Rodríguez AR, García-Cárdenas GP, Peralta-García P y García-Rodríguez MC\*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D.F. Tel. 56230772

carmen.garcia@unam.mx;

La contaminación ambiental por metales pesados potencialmente tóxicos, constituye en la actualidad una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud humana. Se ha observado que una de las vías de inducción de daño genotóxico es mediante el estrés oxidante. Compuestos metálicos como los del cromo hexavalente (Cr [VI]) al atravesar la membrana celular son capaces de reducirse a Cr [III] y producir radicales libres que pueden interactuar y dañar biomoléculas como las proteínas, los lípidos y al ADN. Mientras que, los compuestos metálicos del talio monovalente (Tl [I]) y del vanadio pentavalente (V [V]) aunque han mostrado efectos tóxicos y citotóxicos, existen pocas evidencias *in vivo* de sus efectos sobre el ADN y de la posible vía de inducción de daño. En el presente estudio se evaluaron los efectos genotóxicos de compuestos del Cr [VI], Tl [I] y V [V], para lo cual se analizaron las frecuencias de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica de ratón (CD-1). Grupos de cinco ratones fueron tratados con CrO<sub>3</sub> (20 mg/kg), Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20, 30, 40, 70 y 100 mg/kg) y V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (10, 20, 25, 40 y 50 mg/kg). Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN del grupo tratado con CrO<sub>3</sub>, lo que corroboró su daño genotóxico *in vivo*. Sin embargo, los incrementos de MN observados en los grupos tratados con Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no fueron significativos al compararse con el grupo testigo, salvo en las dosis muy altas que indujeron letalidad en los organismos, lo que sugiere un bajo potencial genotóxico *in vivo* bajo nuestras condiciones de trabajo. Particularmente el Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentó una disminución significativa en las frecuencias de EPC, lo que corrobora su efecto citotóxico. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA, PAPIIT-IN217712.

## XIV Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Departamento de Ciencias Médicas, División Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León.

**XIV** Reunión Internacional de Ciencias Médicas

2-4 de abril 2014

Auditorio del Departamento de Estudios Culturales del Campus León, de la Universidad de Guanajuato.

MEMORIAS

info@reunioncienciasmedicasugto.org.mx | www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx | @reunionciencias

The poster features a central collage of images in hexagonal frames: a stethoscope, a runner, a neuron, a person with a microscope, a doctor examining a patient, a hand holding a pipette, a chromosome, and a glowing cell. The University of Guanajuato logo is in the top left.

6. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular

Dra. Ma. del Carmen García-Rodríguez, Biol. Pilar García-Cárdenas, Biol. Ana Montañó-Rodríguez, Dr. Mario Altamirano-Lozano. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM. Email: carmen.garcia@unam.mx

La genotoxicidad y citotoxicidad fueron evaluadas en sangre periférica de ratones expuestos a metales pesados (Cr [VI] y Tl [I]).

Grupos de cinco ratones (CD-1) fueron tratados por vía intraperitoneal con 20 mg/kg de  $CrO_3$  o con 30 mg/kg de  $Tl_2SO_4$ . El daño genético se evaluó mediante la cinética de micronúcleos (MN) y la inducción de apoptosis, mientras que la toxicidad celular con la viabilidad y la relación entre eritrocitos policromáticos y normocromáticos (EPC/ENC). Las muestras se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 h después de los tratamientos.

Los resultados muestran un incremento significativo de MN, células apoptóticas y no-viables con ambos tratamientos. Particularmente, se presentó toxicidad celular y generalizada en los ratones expuestos al  $Tl_2SO_4$ , ya que dos organismos murieron a las 72 h.

Con base en estos resultados se puede sugerir que la exposición a estos metales representa un riesgo genético y citotóxico.

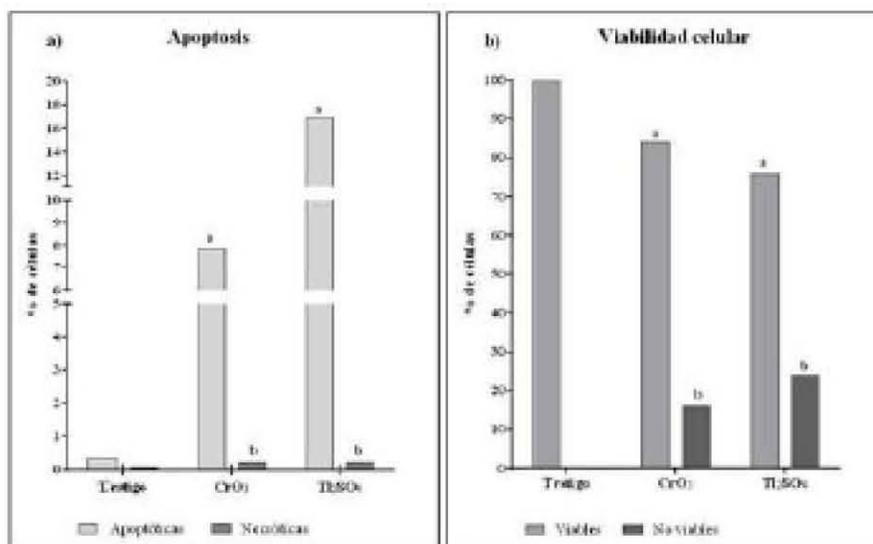


Figura 1. Evaluaciones en células nucleadas de sangre periférica de ratones tratados con 20 mg/ kg de  $CrO_3$  y 30 mg/kg de  $Tl_2SO_4$ . a) Porcentaje de células viables y no viables. b) Porcentaje de células apoptóticas y necróticas.