



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Biología

TESIS

Evaluación del daño al ADN en células de diferentes tejidos y órganos de ratones CD-1 tratados subcrónicamente con talio.

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

Presenta

Guzmán Cruz Yamile



Director: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Asesor: Dra. Lucila Álvarez Barrera

México D.F. Abril 2015



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.

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UIGTA) L5PA, UMIE-Zaragoza, cuyo responsable de la unidad es el Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano. Unidad ubicada en la FES Zaragoza Campo II, UNAM. Durante el desarrollo de ésta investigación se contó con el apoyo DGAPA-UNAM, proyecto PAPIIT IA201312.

Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a mi director de tesis el Dr. Juan José Rodríguez Mercado por la confianza, por el conocimiento aportado que permitió adentrarme a la investigación, por la paciencia y porque con mi estancia en el laboratorio da comienzo uno de los aspectos más satisfactorios de mi vida.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por la disciplina, todos los consejos y aportaciones hechas en mi desarrollo como alumna. Gracias.

Al M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava por la enseñanza, apoyo y todas las experiencias compartidas durante el desarrollo de esta tesis, porque entre sus pláticas encontré respuestas y lecciones.

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano por la oportunidad de ser parte de su unidad de investigación.

Al equipo talio por la complicidad en este trabajo y a los compañeros de laboratorio por las buenas risas, que es la parte más bonita. Al próximo M. en C. Heriberto Hernández De la Cruz por todo el aprendizaje y apoyo brindado, mil gracias. A Jocelyn Dafne Rodríguez Espitia por su compromiso puesto en el laboratorio y la gran amistad que me llevo, a Lilia Nava Valencia, mi incondicional por ir de la mano conmigo.

A mis padres Guillermina y Eloy por el enorme amor, por dar soporte a mis pasos, aceptar mis decisiones rebasando prejuicios, porque gracias a su esfuerzo he tenido las oportunidades suficientes para dirigir mi vida.

A mi hermana Hilda por TODO el apoyo y motivación dada a mi vida, por ser incondicional y un gran ejemplo en casa.

A mi hermana Arellí por la constante complicidad porque sin decir nada sentimos mucho, por saber comportarse a la altura de mi vida.

A mi hermana Stephanie por la madurez que dio a mi vida, porque por más insignificante que parezca nuestra interacción diaria al finalizar el día es lo más relevante con lo que me puedo ir a la cama y sonreír de verdad. Siempre sabremos como querernos.

A mi abuela Margarita porque simplemente mi felicidad siempre fue su felicidad.

A mis amigos biólogos que son a los que pertenece esta etapa, porque inicié y finalice con ustedes Cynthia, Patricia, Jesús lo mejor les espera en esta recta final, y a Noé sólo finalice pero mil gracias por los ánimos, tú ya eres otro nivel. Muy especialmente a Carlos, a Javi y a Tapia por el gran interés y sinceridad puesta en nuestra amistad, por saber estar, no exigir, mantener y siempre quedarse, nada cuesta cuando son ustedes los quiero mucho.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Talio.....	3
2.1.1 Historia.....	3
2.1.2 Propiedades.....	3
2.1.3 El Tl en la naturaleza y como problema ambiental.....	5
2.1.4 Usos.....	5
2.1.5 Toxicocinética.....	6
2.1.6 Mecanismo de acción.....	8
2.1.7 Toxicidad y genotoxicidad del Tl.....	9
2.2 Viabilidad celular.....	10
2.3 Electroforesis unicelular en gel.....	11
2.4 El ratón como modelo biológico.....	12
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
IV. HIPÓTESIS.....	14
V. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	16
6.1 Compuestos químicos.....	16
6.2 Animales y tratamientos.....	16
6.3 Extracción de órganos.....	16
6.4 Evaluación de viabilidad.....	17
6.5 Electroforesis unicelular en gel.....	18
6.6 Análisis estadístico.....	19
VII. RESULTADOS.....	21
7.1 Peso de animales.....	21

	7.2 Análisis de viabilidad celular.....	21
	7.3 Análisis del daño al ADN.....	21
	7.4 Relación entre tratamiento de 10 días y 60 días.....	22
VIII.	DISCUSIÓN.....	33
	8.1 Peso de Animales.....	33
	8.2 Viabilidad Celular.....	34
	8.3 Daño al ADN.....	35
IX.	CONCLUSIONES.....	41
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
XI.	ANEXO.....	54

FIGURAS

	Pág.
Fig. I. Cinética del TI en mamífero. La ruta de acceso puede ser a través de la respiración, la alimentación, y la piel, en el caso de individuos con exposición ocupacional la absorción es al contacto con la ropa o instrumentos de trabajo. Una vez dentro el TI se distribuye por la circulación sistemática a todo el cuerpo siendo capaz de atravesar membranas biológicas y se excreta por los fluidos corporales, el cabello, las uñas o las heces. El TI acumulado en los órganos y tejidos puede regresar gradualmente al torrente sanguíneo (tomado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).	7
Fig. II. Microfotografías de linfocitos humanos procesados con el ensayo cometa. En A el ADN de células no tratadas y en B célula que presenta aumento de la migración del ADN después del tratamiento con un mutágeno (tomado de Speit y Rothfuss 2012).	12
Fig. III. Células de testículo de ratón teñidas con colorantes fluorescentes (Br-Et y CFDA). En color verde células viables y en rojo células no viables.	17
Fig. IV. Células de cerebro de ratón tratadas con acetato de talio(I), ensayo cometa.	19
Fig V. Procedimiento experimental para la evaluación de daño al ADN con la prueba de EUG.	20
Fig. VI. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En A células de sangre y B células de hígado de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En A' y B' células de sangre e hígado respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo).	29

Fig. VII. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **C** células de riñón y **D** células de corazón de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **C'** y **D'** células riñón y corazón respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo). 30

Fig. VIII. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **E** células de pulmón, **F** células de cerebro de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **E'** y **F'** células de pulmón y cerebro respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo). 31

Fig. IX. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **G** células de testículo de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **G'** células de testículo de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo). 32

Fig. X. Ratones tratados 60 días con acetato de talio(I). 34

CUADROS

	Pág.
Cuadro I. Propiedades fisicoquímicas del Tl y sus compuestos.....	4
Cuadro II. Pesos de los ratones del grupo control y de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 o 60 días.....	23
Cuadro III. Viabilidad celular de órganos de ratón del grupo control y de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 o 60 días.....	24
Cuadro IV. Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados ^a y no tratados con acetato de talio (CH ₃ COOTl) durante 10 días.....	25
Cuadro V. Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados ^a y no tratados con acetato de talio (CH ₃ COOTl) durante 60 días.....	27

RESUMEN

Entre los metales considerados peligrosos por su elevada toxicidad se encuentra el talio (Tl), el cual cruza las membranas biológicas por los canales que utilizan los cationes esenciales, en los mamíferos es transportado por el torrente sanguíneo y almacenado en los distintos tejidos y órganos del cuerpo. Uno de los compuestos más utilizados en la elaboración de productos de uso común e industrial, es el acetato de talio(I). Se sabe que la exposición a Tl produce envenenamiento por intoxicación y muerte, sin embargo se conoce poco acerca de sus efectos a nivel celular y genético. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el daño al ADN inducido por el acetato de talio(I) en diferentes órganos de ratones CD-1 expuestos vía intraperitoneal durante 10 o 60 días a fracciones 1/32, 1/16 y 1/8 de la dosis letal media (DL₅₀), que para ratón es de 37 mg/Kg. Se trabajaron grupos de 5 animales que al término del tratamiento se sacrificaron para obtener las muestras celulares de distintos tejidos. Se evaluó la viabilidad celular con una técnica de colorantes fluorescentes y el daño al ADN mediante el ensayo cometa.

Los resultados encontrados no mostraron diferencia en el peso de los animales antes y después del tratamiento. Respecto a la viabilidad celular evaluada en cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, sangre y testículo, en promedio fue mayor al 92% tanto en grupos tratados como en el testigo, sin embargo se encontró incremento en el daño al ADN en células de hígado > riñón > cerebro, testículo > pulmón > sangre > corazón. El hígado fue el órgano con los valores más altos en la longitud del cometa: en la dosis de 1/32 la longitud promedio fue de 113.2 ± 8.58 a 10 días y 117.46 ± 9.91 a 60 días, contra 44.67 ± 1.74 y 45.33 ± 1.88 de su grupo testigo, respectivamente; en tanto que las células de corazón fueron las menos afectadas, en la dosis de 1/16 a 60 días la longitud promedio del cometa no fue estadísticamente significativa 48.25 ± 2.05 contra 44.04 ± 1.64 del grupo testigo. Los datos no muestran relación dosis efecto ni tampoco relación dependiente al tiempo; tanto a 10 días como a 60 días se presentó un efecto mayor en la dosis más baja. En conclusión, el acetato de talio(I) con tratamientos sub-crónicos no produce toxicidad celular, pero es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali *in vivo*, así como lesiones relacionadas con la formación de daño cromosómico observadas en otros estudios, colocando al talio como un agente genotóxico.

ABREVIATURAS

AC	aberraciones cromosómicas
ACE	aberraciones cromosómicas estructurales
ACN	aberraciones cromosómicas numéricas
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
AS	asociaciones de satélites
Br-Et	bromuro de etidio
CFDA	5-6 diacetato de carboxifluoresceína
DE	desviación estándar
DMSO	dimetilsulfoxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección al Ambiente, de sus siglas en inglés Environmental Protection Agency.
EUG	electroforesis unicelular en gel
ICH	intercambio de cromátidas hermanas
im	intramuscular
IMg	índice de migración
ip	intraperitoneal
iv	intravenosa
DI ₅₀	dosis letal media
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
MN	micronúcleo(s)
NaCl	cloruro de sodio
SAF/PBS	solución amortiguadora de fosfatos
pH	potencial de hidrógeno
μL	microlitro
NaOH	hidróxido de sodio
TI	talio
Tris	trisma base

I. INTRODUCCIÓN

La Toxicología como ciencia estudia el efecto adverso de los agentes químicos, físicos o biológicos, así como su diagnóstico clínico y remedios. Dentro de sus ocupaciones busca encontrar las explicaciones moleculares de cómo los agentes, por ejemplo los xenobióticos, entran al organismo, se distribuyen, biotransforman y excretan (toxicocinética), al igual de cómo la sustancia original o sus metabolitos inducen sus efectos (toxicodinámica) y finalmente cómo el cuerpo, los tejidos, órganos y las células reaccionan frente al ataque, sea con respuestas que pueden ser adaptativas, de tolerancia o reparación, entre otras (Repetto y Repetto 2009).

La química, la bioquímica y la biología molecular son las principales herramientas de la toxicología, para el desarrollo de metodologías para su estudio, la química proporciona métodos analíticos para tóxicos y sus metabolitos, la bioquímica aporta métodos para la investigación de metabolismo y modos de acción tóxica y, la biología molecular provee métodos para el estudio de la función de los genes y la expresión génica (Repetto y Repetto 2009, Smart y Hodgson 2008).

La **toxicología genética** es una rama de la toxicología que evalúa los efectos de los diversos agentes químicos o físicos en el material genético (ADN y ARN) de las células. Se considera su inicio en 1927 cuando Muller indujo mutaciones en *Drosophila Melanogaster* por exposición a radiación. En 1938 Karl Sax amplió las observaciones, mostrando que los rayos X podrían inducir alteraciones cromosómicas en las células de polen de plantas (revisado en: Smart y Hodgson 2008).

Existen pruebas para la evaluación y estimación del daño que puede producir un agente al material genético, los ensayos más utilizados son las mutaciones en *locus* específicos, las aberraciones cromosómicas (AC), los micronúcleos (MN), los intercambio de cromátidas hermanas (ICH), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la **electroforesis unicelular en gel** (EUG), entre otras (Albertini *et al* 2000, Tice *et al* 2000).

Diversos agentes químicos que en su estructura tienen metales muestran propiedades tóxicas, se sabe que estos elementos son componentes naturales de la corteza terrestre, en las últimas décadas su abundancia en el ambiente ha aumentado debido a la intensa actividad industrial y diversos procesos naturales como las erupciones volcánicas, por la erosión de formaciones rocosas, encontrándose en suelo, aire, agua, teniendo efectos negativos para el ambiente y para la salud humana. Una vez liberados al ambiente pueden permanecer por tiempo indefinido, entrando en contacto con los seres vivos, al no ser

biológicamente degradables tienden a acumularse en los organismos (Babula *et al* 2008, Fu y Wang 2011).

Los metales junto con los metaloides constituyen el 85% de los elementos de la tabla periódica. Dentro de este grupo se encuentran los denominados metales pesados, los cuales tienen propiedades en común, densidad mayor de 5 g/cm³, se acumulan en los organismos y son considerados peligrosos, entre los que se encuentra mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb), cromo (Cr), zinc (Zn), cobre (Cu), vanadio (V) y **talio** (Tl) (Budavari 1989, Galván-Arzate y Santamaría 1998, Navarro-Aviñón *et al* 2007, Yokel *et al* 2006).

Se conoce que el hierro (Fe), calcio (Ca), Cu y Zn, por mencionar algunos, son esenciales para los seres vivos ya que intervienen en procesos bioquímicos y fisiológicos. En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y están involucrados en la transducción de señales. Sin embargo, otros como el arsénico (As), Cd, Cr, Hg, Pb y Tl en el ambiente y en los organismos se pueden encontrar en concentraciones no habituales, sin tener funciones biológicas reconocidas, por lo que no son considerados esenciales (Altamirano-Lozano *et al* 1999, Florea y Büsselberg 2005, Ferré *et al* 2007, Wei *et al* 2009). Esto provoca en los organismos mal funcionamiento de los procesos celulares, conduciendo a efectos tóxicos, genotóxicos y carcinógenos, que finalmente se reflejan en deterioros de la calidad de vida y sobre la salud (Rojas *et al* 1999, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Rana 2008).

Entre los elementos considerados peligrosos por su elevada toxicidad, se encuentra el Tl, el cual puede ser confundido por los sistemas biológicos con cationes esenciales como el potasio (K⁺) y sodio (Na⁺), es por esto que deben conocerse cuales son los efectos del Tl en el material genético, utilizando las pruebas desarrolladas en toxicología (US EPA 2009, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

II.MARCO TEÓRICO

2.1 Talio

2.1.1 Historia

El Tl fue descubierto por William Crookes en 1861, quien lo nombro así del latín *thallos* palabra que es frecuentemente usada para expresar el verde hermoso de la vegetación joven (Pau 2000).

Desde inicios del siglo pasado se empleó contra la sífilis, la tuberculosis, para tratar la tiña del cuero cabelludo, en el control de parásitos de la piel y como cosmético depilatorio (crema “koreima”), no obstante, estos usos se descontinuaron por la toxicidad que se manifestaba en las personas (Léonard y Gerber 1997, Insley *et al* 1986, Rusyniak *et al* 2002).

2.1.2 Propiedades

El Tl es un metal pesado de color blanco-azulado, es considerado altamente peligroso por ser muy tóxico debido a sus propiedades fisicoquímicas. Se encuentra dentro del grupo IIIA y en el periodo seis en la tabla periódica. Tiene número atómico 81, peso atómico 204.38 g/mol, densidad 11.85 g/cm³, punto de fusión 303.5°C y punto de ebullición 1457°C. El Tl se presenta en tres estados de oxidación (Tl⁺, Tl²⁺, Tl³⁺). El Tl⁺ es más estable que Tl³⁺, mientras que el estado Tl²⁺ es únicamente transitorio. Las formas principales en que se encuentra en el ambiente son los cationes talioso (Tl⁺) y tálico (Tl³⁺). La electronegatividad para el Tl es de 2.04, su radio atómico es de 171 pm y su radio iónico es de 150 pm para Tl⁺ y 89 pm para Tl³⁺ (Budavari *et al* 1996, Léonard y Gerber 1997, Frattini 2005).

Este metal puede formar diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos con ambos estados de oxidación, considerándose todos estos compuestos muy tóxicos. Las formas más comunes de Tl⁺ son **acetato de talio**, carbonato de talio y sulfato de talio, también encontramos a los haluros, nitratos de talio y selenito de talio, en tanto que para el Tl³⁺ existen compuestos como tricloruro, nitratos y óxidos de talio(III) Cuadro I (Fergusson 1990, Frattini 2005, Pau 2000, US EPA 2009, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

Cuadro I. Propiedades fisicoquímicas del Tl y sus compuestos.

Nombre (Formula química)	Peso molecular g/mol (%Tl)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Densidad (g/cm ³)	Registro CAS	Solubilidad	Forma física
Talio (Tl)	204.38	303.5	1457 -1473	11.85	7440-28-0	Insoluble en agua; soluble en ácidos (HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , HCl)	Sólido de color gris azulado, inodoro
Acetato de talio(I) (TlC ₂ H ₃ O ₂)	263.43 (77.59)	131	Sin dato	3.68	563-68-8	Soluble en agua, alcohol y cloroformo	En cristales blancos, deliquescente
Carbonato de talio(I) (Tl ₂ CO ₃)	468.78 (87.20)	273	Sin dato	7.11	6533-73-9	Soluble en agua; insoluble en alcohol y éter	Sólido cristalino, de incoloro a blanco, inodoro
Cloruro de talio(I) (TlCl)	239.84 (85.22)	430	720	7.00	7791-12-0	Soluble en agua; insoluble en alcohol o acetona	Polvo cristalino blanco que va a púrpura cuando se expone a la luz, inodoro, se descompone en ácido
Nitrato de talio(I) (TlNO ₃)	266.39 (76.72)	206	430	5.55	10102-45-1	Soluble en agua fría (100g/L); insoluble en alcohol	Sólido cristalino incoloro
Oxido de talio(III) (Tl ₂ O ₃)	456.76 (89.49)	717	875	10.18	1314-32-5	Soluble en ácidos; insoluble en agua	Polvo negro, inodoro
Selenito de talio(I) (Tl ₂ SeO ₃)	535.72 (76.30)	340	Se descompone	Sin dato	12039-52-0	Ligeramente soluble en agua	Color gris metálico; se descompone en el humo de talio y selenio
Sulfato de talio(I) (Tl ₂ SO ₄)	504.82 (80.97)	632	Se descompone	6.77	7446-18-6	Soluble en agua (48.7 y 191.4 g/L a 20°C y 100°C)	Prisma cristalino, incoloro e inodoro

CAS del inglés Chemical Abstract Service: que es el número de identificación de productos químicos. Tomado de US EPA (2009) y Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano (2013).

2.1.3 El Tl en la naturaleza y como problema ambiental

El Tl es el sesenta y cuatro elemento más abundante en la corteza terrestre, se libera de forma natural por la erosión de rocas y suelo (Léonard y Gerber 1997, Anderson *et al* 1999). Entre los principales minerales que contienen este elemento se encuentra la crooksita (Cu,Tl,Ag)₂, la lorandita (TlAsS₂), y la hutchinsonita (Tl,Cu,Ag)₂S (Léonard y Gerber 1997).

En la corteza continental su cantidad es de 0.49 ppm y en la corteza oceánica de 0.013 ppm. En aire no contaminado las concentraciones de Tl son generalmente menores de 1 ng/m³, en el agua continental menos de 1 µg/L y en agua oceánica se encuentra en niveles aproximadamente de 10-20 ng/L, mientras que en el suelo las concentraciones aceptadas son de 0.1 a 1 mg/kg (Léonard y Gerber 1997, Griepink *et al* 1988, Rao *et al* 2008).

En agua para beber el nivel máximo permisible es de 2 µg/L, la cantidad aceptada en suelos de cultivo es de 1 mg/kg (WHO 1996) y su valor recomendado para la exposición laboral es de 0.1 mg/m³ en un plazo de 8 horas al día (Léonard y Gerber 1997, US EPA 2009). En cambio los niveles de Tl en el aire de zonas industriales se encuentran en valores de 58 ng/m³ que rebasan los registrados en aire no contaminado, mientras que en suelos de los alrededores de fábricas cementeras y refinerías las cantidades alcanzan valores de 21 mg/kg (WHO 1996, Rao *et al* 2008).

El contenido de Tl en los alimentos generalmente es bajo y depende de los niveles en el suelo, se han encontrado concentraciones menores de 100 µg/kg peso húmedo; en frutas y verduras se ha reportado niveles de 50 a 100 µg/kg. Sin embargo, en lugares contaminados las cantidades de Tl son mayores a 45200 µg/kg (Léonard y Gerber 1997, Kazantzis 2000, Maluszyński 2009).

Aproximadamente no más de 15 toneladas de Tl son producidas anualmente en todo el mundo, por las altas concentraciones emitidas por la industria cementera, eléctrica y metalúrgica en la actualidad es considerado contaminante ambiental y un problema ecológico (IPCS 1996, Kazantzis 2000, Pacyna y Pacyna 2001, Peter y Viraraghavan 2005, Yildirim *et al* 2005).

2.1.4 Usos

En los últimos años la concentración de Tl en la atmósfera se ha incrementado como consecuencia de las actividades industriales, sus aplicaciones farmacéuticas y tecnológicas, por ser utilizado en diversos procesos químicos y en la elaboración de varios productos de uso cotidiano (Nriagu y Pacyna 1998, IPCS 1996, US EPA 2009). Por ejemplo, el óxido de talio(I) es utilizado en la joyería, el cromato de talio(I) para

colorantes y pigmentos, el nitrato de talio(I) para la fabricación de pirotecnia, el sulfato de talio(I) en pesticidas, el acetato de talio(I) en productos para la depilación, y el cloruro de talio(I) como catalizador en la cloración y cámaras de bronceado (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Kazantzis 2000, Gil-Hernández 2005).

Otros usos son como isótopos sintéticos (191-202, 204, 206-210), donde el ^{201}Tl se emplea en biomedicina para la obtención de imágenes de órganos, entre otras aplicaciones (Léonard y Gerber 1997, Frattini 2005).

Por sus emisiones al ambiente, incremento en el suelo, agua, aire y alimentos, así como por sus amplios usos y su elevada toxicidad, el Tl ha sido clasificado por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos y otras agencias mundiales, como contaminante ambiental (US EPA 2009). Del mismo modo, es considerado peligroso y de alto riesgo para cualquier ser vivo, ya que el contacto con Tl de forma aguda, subcrónica o crónica, produce efectos irreversibles sobre la salud (US EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010).

Generalmente los estudios acerca de la toxicidad del Tl en humanos son casos clínicos que ocurrieron por ingestión accidental, envenenamiento e intento suicida (WHO 1996, US EPA 2009). Se ha logrado conocer que la intoxicación aguda produce síntomas como taquicardia, hipertensión y dermatitis, problemas digestivos como náuseas, diarrea, dolor abdominal, falta de apetito; o efectos al sistema nervioso central y periférico con síntomas como dolor en las extremidades, temblor, debilidad, insomnio, convulsiones, ataxia, ansiedad, pérdida de memoria y en casos extremos la muerte (Repetto y del Peso 2001, US EPA 2009, Pourahmad *et al* 2010).

Cuando ocurre intoxicación crónica con Tl los síntomas son diversos, hay dolor abdominal, diarrea, entumecimiento en manos y pies, ardor, parálisis parcial, alopecia y rayas blancas en las uñas (llamadas líneas de Mess), estas últimas son señales típicas de intoxicación por Tl (Cvjetko *et al* 2010), también se presenta deterioro visual, convulsiones, alucinaciones, en muchos casos insuficiencia cardíaca y renal, que provocan la muerte (Repetto y del Peso 2001, Ramsed 2007).

2.1.5 Toxicocinética

La principal vía de absorción reportada es a través del sistema respiratorio en forma de polvo, aunque se sabe que algunas partículas pueden ser absorbidas por la piel (Gil-Hernández 2005, US EPA 2009). En animales de experimentación, se ha observado que cuando se administra por vía oral o por vía intraperitoneal (ip) su absorción es rápida y completa (Achenbach *et al* 1980, RAIS 1994, US EPA 2009).

En general en mamíferos el TI entra por inhalación, ingesta de alimentos y agua o contacto con la piel por exposición al aire contaminado, es distribuido por el torrente sanguíneo y es capaz de cruzar la placenta, la barrera hematoencefálica y hematogonadal, acumulándose en los tejidos y órganos como el hígado, cerebro, corazón, riñón, tiroides, páncreas y gónadas, sitios en los cuales causa daños (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Harris y Messori 2002, Lu *et al* 2007). La principal vía de eliminación es por la orina y las heces, también en el cabello, las uñas, el sudor, la saliva, las lágrimas y la leche materna (Fig. 1) (Galván-Arzate *et al* 2000, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).



Fig. 1. Cinética del TI en mamífero. La ruta de acceso puede ser a través de la respiración, la alimentación, y la piel, en el caso de individuos con exposición ocupacional la absorción es al contacto con la ropa o instrumentos de trabajo. Una vez dentro el TI se distribuye por la circulación sistemática a todo el cuerpo siendo capaz de atravesar membranas biológicas y se excreta por los fluidos corporales, el cabello, las uñas o las heces. El TI acumulado en los órganos y tejidos puede regresar gradualmente al torrente sanguíneo (tomado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

Las concentraciones normales de Tl en orina van de 0.2 a 0.4 $\mu\text{g/L}$ y en individuos expuestos las concentraciones aumentan considerablemente dependiendo del tiempo y la vía de exposición (Richelmi *et al* 1980, RAIS 1994, US EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010, Tyagi *et al* 2011, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013), en 2007 Lench y Sadlik reportaron casos de intoxicación con Tl en jóvenes de 15 años expuestos vía gastrointestinal en una dosis no específica, sus niveles encontrados de Tl en orina fueron de 200 a 500 $\mu\text{g/L}$.

En sangre las cantidades aceptables y normales de Tl deben ser menores a 2 $\mu\text{g/L}$, las que rebasan los 100 $\mu\text{g/L}$ son consideradas como tóxicas y peligrosas (Moore *et al* 1993). Se conoce que la vida media de eliminación de Tl depende de la dosis, la vía y el tiempo de exposición; por ejemplo en una exposición aguda de única dosis, el Tl es eliminado de 2 a 95 días después. Siendo su eliminación lenta, el Tl tiende a acumularse en las células, de ahí que varios mecanismos y modo de acción se han propuesto para explicar la alta toxicidad de este metal (Repetto y del Peso 1998, Lu *et al* 2007).

2.1.6 Mecanismos de acción del Tl

Se sabe que el Tl atraviesa la membrana celular por los canales de K^+ e interfiere con el metabolismo de cationes esenciales (Na^+ y K^+), una vez dentro de la célula tiene gran afinidad por los grupos sulfhídrico de los aminoácidos de proteínas y enzimas, se conoce que afecta la función de los ribosomas y la síntesis de proteínas (Hultin y Näslund 1974, Repetto *et al* 1994, US EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010).

El Tl presenta un radio iónico similar al del K^+ , de 149 pm y 138 pm respectivamente, esta peculiaridad ocasiona que pueda ser confundido con el K^+ en diversos procesos biológicos como la activación de ATP-asas de Na^+ y K^+ , lo que a su vez le permite moverse a través de las membranas celulares, acumularse en la célula y afectar la cadena respiratoria en la mitocondria (Douglas *et al* 1990, Léonard y Gerber 1997, Del Valls *et al* 1999). Su afinidad por grupos amino-sulfhidrilo de las enzimas provoca disminución de la actividad enzimática de glutatión (GHS) lo cual conduce a estrés oxidante en las células (Villaverde *et al* 2004, US EPA 2009). Además, tiene la capacidad de bloquear la formación de numerosos enlaces disulfuro entre residuos de cisteína de la queratina, provocando crecimiento anormal del cabello y alopecia (Nriagu y Pacyna 1998).

El Tl no se encuentra dentro de la lista de agentes carcinógenos, debido principalmente a la falta de estudios relevantes y a que los datos de sus efectos genotóxicos tanto en humanos como en animales son escasos y poco contundentes (Repetto y del Peso 2001, US EPA 2009).

2.1.7 Toxicidad y genotoxicidad del Tl

A pesar de su alta toxicidad, en la actualidad se conoce poco acerca de los efectos de toxicidad celular y sobre el material genético que pueda ejercer el Tl y sus compuestos, esto debido principalmente a que los estudios relacionados con este tema son poco concluyentes (Repetto y del Peso 2001, Cvjetko *et al* 2010, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

Estudios en el que utilizaron bacterias como modelo de prueba, reportan que el nitrato talio(I) en concentraciones de 0.001 M (266.39 µg/mL) inhibe el crecimiento pero no induce efectos mutágenos en *Bacillus subtilis* (Rec⁺ y Rec⁻) cepas H17 y M45, pero si incrementó la recombinación genética en las cepas TA98, TA100, TA1535, TA1537 o TA1538 de *Salmonella typhimurium*, efectos similares se encontraron en varias cepas de *Escherichia coli* (Kada *et al* 1980, Kanematsu *et al* 1980).

En plantas de haba (*Vicia faba*) expuesta a concentraciones 0.5, 1, 5 y 10 µg/mL de acetato de talio(I) durante 7 horas, y lenteja acuática (*Lemna minor*) expuesta a 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 µM del mismo compuesto durante 1, 4, 7 y 14 días, se observó daño al ADN y estrés oxidante (Babić *et al* 2009).

Utilizando células de mamíferos, en cultivos de sangre periférica humana aplicando sulfato de talio(I) en concentraciones de 0.1 a 10 µM (0.05-5.04 µg/mL) no indujo micronúcleos (MN) y no modificó la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en medula ósea de hámster Chino al administrar cloruro de talio(I) vía oral 5 o 10 mg/kg durante 24 h (PHG 1999, Migliore *et al* 1999).

La genotoxicidad en humanos causada por la exposición a Tl se limita a dos estudios, Hantson *et al* (1997), al analizar linfocitos de un paciente de 48 años de sexo masculino que ingirió veneno a base de sulfato de talio(I), ellos encontraron aumento en la frecuencia de MN pero no encontraron aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) ni tampoco ICH, en los días 1 y 15 después de la ingesta. Por otro lado, Nikiforov *et al* (1999) encontraron alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre de 13 personas expuestas accidentalmente a venenos con Tl, no encontraron ningún cambio en frecuencia de MN en células binucleadas.

Debido a lo anterior y a la escasa información que se tiene de los efecto de Tl, en particular el daño citotóxico y genotóxico, en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UIGTA), laboratorio 5 planta alta de la UMIEZ, FES-Zaragoza Campo II de la UNAM se realizan diferentes estudios que tienen como finalidad conocer los efectos del Tl sobre la integridad de las células y del material genético, en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* en células de sangre periférica humana, expuestos a concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL de acetato de

talio(I), redujo el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) y ACE en concentraciones menores de 10 µg/mL, e indujo daño al ADN evaluado con la técnica de electroforesis unicelular en gel pH 12.1 y pH >13. Por otro lado, en el mismo sistema de prueba, el sulfato de talio(I) y cloruro de talio(III) en concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL disminuyó el IM e incrementó las ACE. En modelo *in vivo*, de células de médula ósea de ratón hembra expuesto vía intraperitoneal a diferentes dosis de acetato de talio(I), este compuesto es capaz de producir los mismos efectos observados *in vitro* (Mosqueda-Tapia 2012, Buendía-Valverde 2013, Rodríguez-Mercado *et al* 2013).

2.2 Viabilidad Celular

La detección de la viabilidad y proliferación celular son importantes biomarcadores en toxicología y se emplean durante la evaluación de los efectos tóxicos provocados por sustancias químicas, drogas, así como para el estudio de nuevos compuestos que se proponen de uso común. La necesidad de una prueba confiable, fácil de manejar y rápida, ha llevado al desarrollo de varios ensayos que ahora se utilizan habitualmente, y que están disponibles para detectar los efectos citotóxicos de los sistemas celulares *in vitro* e *in vivo* (Garner *et al* 1997).

Se han desarrollado recientemente técnicas específicas de tinción, que permiten la evaluación de la integridad, viabilidad y funcionalidad celular a través de la utilización de marcadores fluorescentes excitados por una luz de apropiada longitud de onda, son indicadores con mayor sensibilidad del daño en la célula (Harrison y Vickers 1990).

El estudio de la viabilidad celular se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de la célula, mediante el uso de dos fluorocromos combinados, por ejemplo el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, de sus siglas en inglés) y el bromuro de etidio (Br-Et); donde el CFDA es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables y el Br-Et es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o destruidas, permitiendo identificar a las no viables o en proceso de muerte (Garner *et al* 1997).

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas, como el CFDA (Garner *et al* 1988, Harrison y Vickers 1990), que en el interior de la célula, debido a la acción de esterasas intracelulares, se convierten en carboxifluoresceína, molécula que al ser excitada a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas (Garner *et al* 1986).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Br-Et (Evenson *et al* 1982), este compuesto entra en células con la membrana plasmática dañada, se une al ADN del núcleo y al ser excitado por la longitud de onda apropiada emite fluorescencia en tonalidades de rojo.

2.3 Electroforesis unicelular en gel

La electroforesis unicelular en gel (EUG) a pH >13 o también llamado ensayo cometa, fue propuesta por Singh *et al* en 1988. Es una prueba que combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar rompimiento de cadena sencilla del ADN, sitios sensibles al álcali, entrecruzamiento, entre otro tipo de daños.

Comparado con otras pruebas genotóxicas la metodología de EUG tiene ciertas ventajas en las que se incluyen:

- a) Colección de datos a nivel de la célula individual.
- b) Ajuste a distintos tipos de análisis estadísticos.
- c) El uso de un número pequeño de células por muestra (menor a 10 000).
- d) Alta sensibilidad para detectar daño al ADN.
- e) Factible de usar en todas las poblaciones de células eucariontes.
- f) Es rápida y altamente reproducible.

La EUG es ampliamente recomendada para investigar la genotoxicidad de metales, de químicos industriales, agroquímicos y fármacos, entre otros agentes (Altamirano-Lozano *et al* 1996 y 1999, Tice *et al* 1999 y 2000, Rodríguez-Mercado *et al* 2003, Collins 2004).

Igualmente es útil en la evaluación de riesgos por contaminación ambiental, como biomonitor humano y en la epidemiología molecular, además de que permite proporcionar respuestas a preguntas acerca de los niveles de daño al ADN en las células normales, la variación en la capacidad de reparación de ADN dentro de poblaciones humanas y la regulación de la reparación del ADN en el nivel molecular dentro del núcleo (Collins 2004).

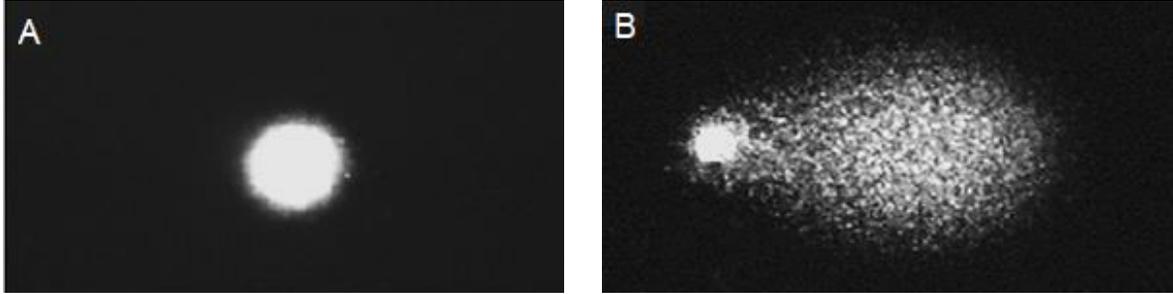


Fig. II. Microfotografías de linfocitos humanos procesados con el ensayo cometa. En **A** el ADN de células no tratadas y en **B** célula que presenta aumento de la migración del ADN después del tratamiento con un mutágeno (tomado de Speit y Rothfuss 2012).

Esta técnica se basa en la migración del ADN de núcleos de células suspendidas en agarosa bajo condiciones de electroforesis. Bajo el microscopio, se ve una célula que tiene apariencia de cometa, con una cabeza (la región nuclear) y su cola (la cual contiene el ADN fragmentado) que migra hacia el ánodo. La migración del ADN, depende de varios parámetros como la concentración de agarosa en el gel, el pH, la temperatura, duración de desenrollamiento del ADN, del voltaje, del amperaje y el tiempo de electroforesis. A un pH >13 la prueba puede detectar rompimientos de cadena sencilla, sitios sensibles al álcali que son expresados como rompimientos de cadena sencilla y sitios donde ocurre reparación. Además es ampliamente recomendada en evaluaciones *in vivo*, debido a que se puede detectar el daño inducido en cualquier tejido (Fig. II) (Singh *et al* 1988, Hartmann *et al* 2003, Collins 2004, Speit y Rothfuss 2012).

2.4 El ratón como modelo biológico

Mus musculus es el nombre científico del roedor comúnmente llamado ratón de laboratorio. Dentro de las características que presenta encontramos que es un mamífero pequeño, de manejo sencillo económico, fácil de alojar y con rápida reproducción. A través de cruzamientos selectivos se han creado cepas para la investigación científica, siendo uno de los organismos más utilizados para este fin con 60 a 80%, en relación a otros modelos; actualmente existen más de 120 cepas consanguíneas. Debido a los conocimientos que se tiene de su fisiología nos permite elucidar el mecanismo de acción de los agentes químicos (Andress *et al* 1992).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Tl es un metal altamente tóxico para los organismos, en las últimas décadas ha aumentado su concentración en el ambiente debido a sus múltiples usos en la industria, la agricultura y la medicina, por lo que el humano y todos los seres vivos están expuestos a este metal.

Se ha reportado como un elemento dañino para la salud, debido a su similitud con cationes esenciales como el potasio, es capaz de atravesar las membranas biológicas e interactuar con biomoléculas alterando diversos procesos celulares. Sin embargo, se conoce poco acerca de su toxicidad por exposición continua, a corto y mediano plazo en los sistemas *in vivo*, además de que no se sabe con exactitud el modo de acción y el daño que el Tl es capaz de producir sobre el material genético.

Dentro de los estudios realizados con Tl *in vitro* se reporta a sus compuestos como agentes genotóxicos, debido a que interfieren en el proceso de división celular e induce daño sobre el material genético, ya que se modifica el IM e incrementan la frecuencia de ACN y ACE, sin embargo no se conoce del todo si estos efectos pueden ser inducidos al emplear un organismo completo, por lo anterior en este estudio se evalúa la toxicidad celular y el daño al ADN de diferentes tejidos y órganos de ratón de la cepa CD-1 tratados sub-crónicamente con acetato de talio(I).

IV. HIPÓTESIS

El Tl por su radio iónico similar a cationes esenciales como el K^+ es capaz de atravesar membranas biológicas, interaccionar con biomoléculas, provocar alteraciones a nivel celular y tisular. Lo anterior lleva a pensar que si administramos subdosis de la DI_{50} de acetato de talio(I) a ratones, este metal podrá inducir toxicidad celular y genética en los diferentes tejidos y órganos, lo cual dependerá del tiempo de exposición y la dosis administrada.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico en las células de diferentes tejidos y órganos de ratones machos de la cepa CD-1 tratados durante 10 o 60 días con 1/8, 1/16 y 1/32 de la DI_{50} de acetato de talio(I), que es de 37 mg/kg.

5.2 Objetivos Particulares

- I. Obtener células de muestras de sangre, hígado, riñón, corazón, pulmón, testículo y cerebro de los ratones tratados sub-crónicamente con acetato de talio(I).
- II. Evaluar la viabilidad celular de muestras de los distintos tejidos y órganos de ratones machos de la cepa CD-1 tratados con acetato de talio(I).
- III. Estimar el daño al ADN de las células de los distintos tejidos y órganos de ratones machos de la cepa CD-1 tratados con acetato de talio(I).
- IV. Establecer la relación dosis-efecto a 10 o 60 días por la exposición con talio.
- V. Establecer la relación entre la dosis y el tiempo de exposición entre los resultados de 10 y 60 días.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Compuestos químicos

La agarosa, la solución amortiguadora de fosfatos (libre de calcio y magnesio), los reactivos cloruro de sodio (NaCl), etilendiamintetracetato de sodio (EDTA-Na₂), trizma base (Tris), tritón X-100, dimetilsulfoxido (DMSO), hidróxido de sodio (NaOH), Br-Et y CFDA utilizados fueron de Sigma St. Louis MO, EUA. El acetato de talio(I) (CH₃COOTl, CAS 563-68-8) marca alemana Riedel-deHaën. El etanol absoluto por JT Baker, México y la Heparina por industrias farmacéutica Pisa, México.

6.2 Animales y tratamientos

Se trabajó con 40 ratones macho de la cepa CD-1, con al menos 2.5 meses de edad y con pesos entre 30 a 35 g, los cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos de luz y oscuridad 12:12 h y alimentación *ad libitum*. Los ratones se trataron vía ip con diferentes subdosis de la DI₅₀ acetato de talio(I) cada tercer día durante 10 días o durante 60 días. Los animales fueron pesados antes y después del tratamiento en una balanza digital *Scout*[®] de *OHAUS*. Se formaron ocho grupos de 5 animales: dos grupo testigo (uno para 10 días y otro para 60 días) y seis grupos tratados con acetato de talio(I). De los grupos tratados con Tl, a dos se les administró 1/32, otros dos 1/16 y dos más con 1/8 de la DI₅₀, respectivamente.

6.3 Extracción de órganos

Al término de cada uno de los tratamientos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se obtuvieron las muestras sanguíneas con una jeringa heparinizada por punción sanguínea y se extrajo el hígado, corazón y cerebro, así como los riñones, pulmones y testículos. Los órganos se pesaron inmediatamente después de su extracción y se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos para retirar el exceso de sangre, se colocaron en 3 mL de solución salina y se maceraron para separar las células. De cada uno de los tejidos, de la suspensión de medio con células se tomaron alícuotas que se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min. Al finalizar, del concentrado celular se tomó una alícuota de 20 µL para evaluar la viabilidad celular y 20 µL para preparar las laminillas para la técnica de electroforesis unicelular en gel “ensayo cometa”.

6.4 Evaluación de viabilidad

La evaluación de la viabilidad se determinó utilizando CFDA y Br-Et de acuerdo con la técnica descrita por Strauss (1991). A continuación se describe a manera de resumen la metodología: se preparó una solución de Br-Et disolviendo 50 mg en 1 mL de etanol al 100% y se aforo a 50 ml con solución salina. La solución de CFDA se preparó disolviendo 3 mg del compuesto en 1 mL de acetona y después se añadieron 84 μL de esta última en 2 mL de solución salina (concentración final de 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se protegió de la luz. Ambos colorantes se mezclaron en una proporción 1:1, se agregaron 20 μL de solución de tinción a los 20 μL de células. Después de 10 min a 37°C las células fueron lavadas con 1 mL en solución salina y centrifugadas a 3000 revoluciones por 3 min, repitiendo este paso dos veces más. El botón celular se colocó en un portaobjetos y se evaluó la viabilidad de cada una de las muestras al microscopio de fluorescencia a 40x. Se analizaron 100 células por cada muestra, distinguiendo las viables que tiñen de verde el citoplasma y de las no viables que tiñen su núcleo de rojo (Fig. III).

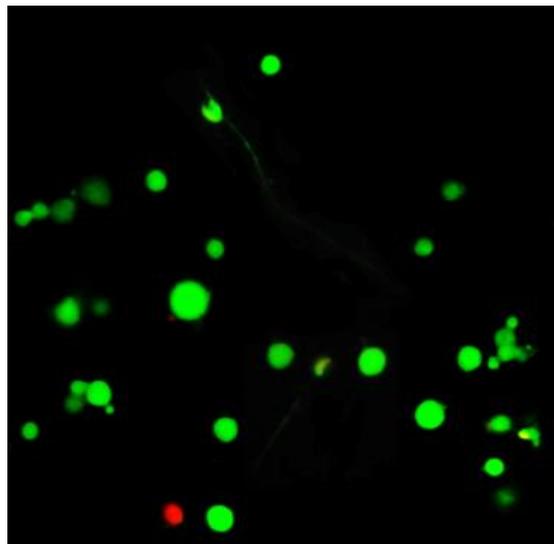


Fig. III. Células de testículo de ratón teñidas con colorantes fluorescentes (Br-Et y CFDA). En color verde células viables y en rojo células no viables.

6.5 Electroforesis unicelular en gel (EUG)

Las laminillas para la EUG se prepararon de la siguiente manera, se colocó una capa de agarosa al 1% (500 mg en 50 mL de solución salina) seguida de una segunda capa en la cual se mezcló 20 μ L de la suspensión celular con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (250 mg en 50 ml de PBS) a 37°C y una tercera capa de agarosa de 75 μ L de bajo punto de fusión se colocó para cubrir las preparaciones. Las laminillas se mantuvieron en frío a 4°C para la solidificación de cada capa de agarosa. Posteriormente las laminillas se colocaron por al menos 1 h en solución de lisis fría (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10, con Triton X-100 al 1% y DMSO al 10%) y preparada al momento. Después, las laminillas se acomodaron en la cámara horizontal de electroforesis, donde el ADN se dejó desenrollar por 20 min en solución amortiguadora (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM), para posteriormente llevarse a cabo la electroforesis a temperatura ambiente por 20 min a 25 voltios y 300 miliamperios. Todo lo anterior se efectuó en oscuridad, o con ayuda de luz amarilla para evitar dañar el ADN. A continuación, las preparaciones se colocaron durante 5 min en solución de Tris (0.4 M a pH 7.5) para neutralizar las condiciones alcalinas. Por último, las laminillas se deshidrataron en etanol al 70% durante 5 min, completando su secado al aire (Tice *et al* 1999, Rojas *et al* 1999).

Para su análisis, las preparaciones fueron teñidas con 75 μ L de Br-Et (de una solución de 20 μ g/mL). La migración del ADN (longitud total del cometa) fue medida con una escala ocular adaptada al microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 equipado con filtro G-2A. Se evaluaron 100 células por cada órgano de cada ratón (Fig. IV y V) (Tice *et al* 1996, Rodríguez-Mercado *et al* 2003). Al mismo tiempo las células se clasificaron en cinco categorías en función del valor promedio del núcleo (r =medición de la cola/medición de la cabeza) de la siguiente manera (A) núcleo intacto, sin daño; (B) $r \leq 1$, daño bajo; (C) $1 < r \leq 2$, daño medio; (D) $r > 2$, daño alto; y (E) núcleos donde todo el ADN migró fuera de la región de la cabeza, daño severo (llamada también nube). Los resultados fueron expresados como “índice de migración” (IMg), calculándose de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IMg} = [(A)1 + (B)2 + (C)3 + (D)4 + (E)5 / \text{total de células analizadas}] \times 100$$

Donde A, B, C, D y E son el porcentaje de células en cada categoría, así como los números (1-5) son unidades arbitrarias representando cada categoría de daño al ADN: entre 1 (en buen estado, sin daño,) y 5 (el máximo daño, daño severo). El IMg cuenta todas las células dañadas, incluyendo las nubes, que varios estudios las excluyen del análisis (Rodríguez-Mercado *et al* 2011).

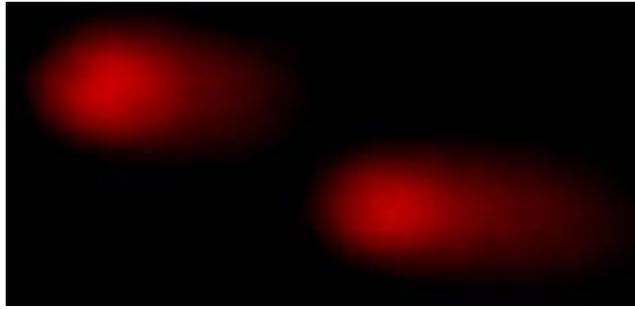


Fig. IV. Células de cerebro de ratón tratadas con acetato de talio(I), ensayo cometa.

6.6 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. La viabilidad celular se analizó con la prueba *t de Student* y el efecto del tratamiento sobre la migración del ADN fue analizado utilizando la prueba de *ANDEVA-Dunnnett* y se utilizó la prueba X^2 para determinar las diferencias en el nivel de daño de los cometas (IMg).

Obtención de las muestras de:

- ✓ Sangre
- ✓ Hígado
- ✓ Riñón
- ✓ Corazón
- ✓ Pulmón
- ✓ Testículo
- ✓ Cerebro



VIABILIDAD CELULAR

20 μ L de células de cada órgano teñidas con Br-Et y CFDA

Evaluados en microscopio de fluorescencia a 40x



ENSAYO COMETA

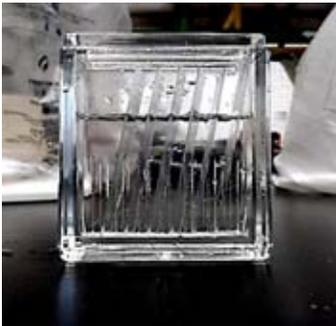
20 μ L de suspensión celular con 75 μ L de agarosa de BPF al 0.5%

1. Preparación de laminillas



2. Lisis

NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10, con Triton X-100 al 1% y DMSO al 10%



3. Electroforesis a pH >13

20 min en solución amortiguadora (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM)

20 min a 25 V y 300 mA



4. Neutralización/Deshidratación

Durante 5 min en Tris (0.4 M a pH 7.5)/ Durante 5 min en alcohol al 70%



5. Tinción/Evaluación al microscopio

Tinción con 75 μ L de Br-Et/Evaluación 100 células de cada órgano por ratón



Fig V. Procedimiento experimental para la evaluación de daño al ADN con la prueba de EUG

VII. RESULTADOS

7.1 Peso de animales

En el **Cuadro II** se muestra el registro del peso de los animales tanto del grupo no tratado como de los tres grupos a los que se les administro vía ip (cada tercer día) 1/32, 1/16 y 1/8 de la DI_{50} de acetato de talio(I) durante 10 días y durante 60 días. Se comparó el peso de los animales tratados con talio y contra el grupo testigo. De manera general, los resultados no muestran cambios considerables en este parámetro a lo largo del tratamiento.

7.2 Análisis de viabilidad celular

En el **Cuadro III** se observan las evaluaciones de la prueba de viabilidad celular de los tejidos y órganos de los grupos de ratones tratados y no tratados con el compuesto de talio, a 10 o 60 días.

De manera general, la viabilidad en el protocolo a 10 días fue mayor del 92% en los tejidos evaluados de los ratones tratados con TI, comparados con 97% del grupo testigo. En ningún caso se observaron diferencias estadísticas.

Para el caso de los tratamientos a 60 días el análisis de viabilidad celular tampoco muestra diferencias estadísticas. Por ejemplo, en el caso del riñón del grupo testigo es de 96.6% comparada con 95.6% del grupo tratado con 1/32 de la DI_{50} de acetato de talio(I).

7.3 Análisis del daño al ADN

En los **Cuadros IV y V**, se muestra los resultados de las evaluaciones del daño al ADN en células de los distintos órganos de los ratones tratados y no tratados con acetato de talio(I) durante 10 o 60 días, respectivamente. La longitud total del cometa es la medida que involucra al núcleo más la longitud del ADN que migró y formó la cola del cometa, mientras que el índice de migración (IMg) es el porcentaje de los núcleos clasificados en las cinco categorías de daño.

Los resultados evaluados durante 10 días por la prueba de electroforesis unicelular en gel muestran diferencias estadísticas entre los grupos tratados con TI con respecto al grupo testigo. Los datos de longitud del cometa mostraron diferencias significativas en todos los órganos, siendo hígado y riñón los órganos más afectados con longitudes de 113.26 ± 8.58 y 102.81 ± 10.08 contra 44.67 ± 1.74 y 45.04 ± 1.45 de sus testigos en la dosis de 1/32, respectivamente. El órgano que mostró menos

daño es el corazón, por ejemplo la longitud del cometa en 1/32, 1/16 y 1/8 fueron 54.30 ± 5.01 , 49.66 ± 2.59 y 51.68 ± 3.25 respectivamente, contra 43.40 ± 1.47 del grupo testigo. De manera general en el **Cuadro IV** se aprecia que en la evaluación tanto de longitud del cometa como el IMg el órgano más dañado fue hígado, seguido de riñón, testículo, cerebro, pulmón, sangre y corazón. Además, los datos obtenidos no muestran un comportamiento dosis respuesta.

Para el caso del tratamiento a 60 días, en el **Cuadro V** se observa que la administración ip de la sal de TI induce daño en todos los órganos analizados de los ratones CD-1. Sin embargo, al igual que en los tratamientos a 10 días el corazón fue el órgano en el que se encontró menos daño genético. En este periodo de exposición, el órgano que presentó el valor más alto de daño fue el riñón, seguido del hígado, testículo, cerebro, pulmón, sangre y corazón; todos con diferencias estadísticas importantes.

7.4. Relación entre tratamiento de 10 días y 60 días

La viabilidad celular no muestra diferencias entre los resultados de los órganos expuestos a 10 o 60 días, en ambas exposiciones los datos se mantuvieron por arriba del 92% que en base a la literatura es requisito para llevar a cabo la prueba de detección de daño al ADN con la prueba de electroforesis unicelular en gel.

Los resultados de la estimación del daño al ADN en ambos periodos de exposición, muestran que el acetato de talio(I) en este parámetro no se encontró una relación dosis efecto o tiempo dependiente, donde la dosis de 1/32 de la DI_{50} es la que presenta los valores más altos. El efecto en los órganos tanto en 10 días como en 60 días, mostro un patrón similar, donde el daño al ADN evaluado por la longitud del cometa y por el IMg muestran que el hígado es el órgano más afectado y en orden descendiente: riñón > testículo > cerebro > pulmón > sangre > corazón (Fig. VI, VII, VIII y IX).

Cuadro II. Pesos de los ratones del grupo control y de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 o 60 días.

Animales	Grupo testigo	Tratamientos con acetato de talio(I) ^a		
		1/32 de DI ₅₀	1/16 de DI ₅₀	1/8 de DI ₅₀
Tratamiento 10 días				
Ratón 1	41.72 ± 0.29	42.74 ± 0.63	40.44 ± 0.32	39.38 ± 1.30
Ratón 2	41.00 ± 0.72	42.00 ± 0.50	39.88 ± 0.52	42.52 ± 1.83
Ratón 3	48.38 ± 0.52	37.02 ± 1.43	42.28 ± 0.70	40.16 ± 0.86
Ratón 4	45.92 ± 0.90	45.26 ± 2.02	41.86 ± 0.64	42.68 ± 1.18
Ratón 5	47.86 ± 0.32	41.64 ± 0.43	40.76 ± 0.53	39.20 ± 0.83
<i>Promedio</i>	44.97 ± 3.43	41.73 ± 2.98	41.04 ± 0.99	40.78 ± 1.69
Tratamiento 60 días				
Ratón 1	48.26 ± 0.92	41.38 ± 0.42	42.33 ± 2.09	41.57 ± 1.71
Ratón 2	40.87 ± 0.62	40.78 ± 0.83	50.91 ± 3.03	36.48 ± 1.54
Ratón 3	44.21 ± 1.40	43.29 ± 0.84	41.77 ± 1.28	33.25 ± 1.86
Ratón 4	31.17 ± 1.22	47.11 ± 0.80	54.56 ± 1.74	37.32 ± 0.64
Ratón 5	37.08 ± 1.59	42.03 ± 0.76	29.42 ± 2.24	33.45 ± 1.69
<i>Promedio</i>	40.16 ± 6.56	42.92 ± 2.52	43.80 ± 9.73	36.41 ± 3.39

^a Los animales fueron pesados y tratados cada tercer día. Cinco administraciones a 10 días y treinta a 60 días de la DI₅₀ por ratón y por cada tratamiento.

Cuadro III. Viabilidad celular de órganos de ratón del grupo control y de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 o 60 días.

Órgano	Grupo Testigo	Tratamientos con acetato de talio(I)		
		1/32 de DI ₅₀	1/16 de DI ₅₀	1/8 de DI ₅₀
Tratamiento 10 días				
Sangre	98.00 ± 1.58	98.80 ± 0.83	97.80 ± 0.83	93.00 ± 2.23
Hígado	96.40 ± 1.14	97.20 ± 1.64	94.40 ± 1.34	93.20 ± 1.48
Riñón	97.40 ± 0.89	96.80 ± 2.28	95.20 ± 1.30	92.00 ± 2.54
Corazón	99.40 ± 0.89	99.80 ± 0.44	99.80 ± 0.44	99.20 ± 0.44
Pulmón	98.80 ± 0.83	98.40 ± 1.14	99.20 ± 0.44	98.40 ± 0.54
Cerebro	99.40 ± 0.54	99.20 ± 0.44	99.00 ± 1.00	96.20 ± 1.78
Testículo	98.00 ± 1.41	99.80 ± 0.44	98.20 ± 1.09	97.00 ± 1.58
Tratamiento 60 días				
Sangre	98.60 ± 0.54	97.80 ± 0.83	99.25 ± 1.50	98.60 ± 1.14
Hígado	96.80 ± 0.44	96.40 ± 0.54	97.00 ± 0.81	98.40 ± 1.14
Riñón	96.60 ± 0.54	95.60 ± 0.54	96.50 ± 1.29	98.20 ± 0.44
Corazón	99.00 ± 1.00	99.00 ± 0.70	99.50 ± 0.57	99.00 ± 0.70
Pulmón	98.40 ± 0.89	98.40 ± 0.89	98.75 ± 0.50	99.20 ± 0.83
Cerebro	98.00 ± 1.00	98.00 ± 1.00	98.00 ± 1.82	99.00 ± 0.70
Testículo	97.60 ± 0.89	96.60 ± 0.89	97.00 ± 1.41	98.80 ± 0.83

Cuadro IV. Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados^a y no tratados con acetato de talio (CH₃COOTI) durante 10 días.

Grupo	Longitud total del cometa ± DE	Categorías de daño al ADN en %				IMg
		Bajo	Medio	Alto	Severo	
Testigo						
Sangre	44.66 ± 1.34	97.20 ± 8.31	2.80 ± 0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.02 ± 0.09
Hígado	44.67 ± 1.74	92.60 ± 9.52	7.40 ± 2.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.07 ± 0.13
Riñón	45.04 ± 1.45	93.20 ± 6.68	6.80 ± 1.92	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.06 ± 0.10
Corazón	43.40 ± 1.47	97.60 ± 3.36	2.40 ± 1.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.02 ± 0.05
Pulmón	43.38 ± 1.52	99.00 ± 3.67	1.00 ± 0.70	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.01 ± 0.05
Cerebro	44.96 ± 1.52	99.40 ± 1.81	0.60 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.02
Testículo:						
Células chicas	43.33 ± 5.19	87.60 ± 1.87	13.20 ± 1.30	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.14 ± 0.04
Células grandes	58.74 ± 9.40	62.20 ± 0.44	37.80 ± 1.30	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.37 ± 0.03
1/32 de DI₅₀ de CH₃COOTI						
Sangre	70.60 ± 4.78**	0.00 ± 0.00	85.40 ± 2.50	10.40 ± 2.30	4.20 ± 1.09	3.18 ± 0.16**
Hígado	113.26 ± 8.58**	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.44	95.00 ± 2.73	4.80 ± 0.83	4.04 ± 0.12**
Riñón	102.81 ± 10.08**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	93.80 ± 1.48	6.20 ± 1.30	4.06 ± 0.09**
Corazón	54.30 ± 5.01*	19.20 ± 0.83	77.80 ± 1.30	0.80 ± 0.83	2.20 ± 0.44	2.86 ± 0.07*
Pulmón	59.72 ± 4.49*	2.20 ± 1.92	94.20 ± 1.78	0.00 ± 0.00	3.60 ± 0.54	3.12 ± 0.07**
Cerebro	84.62 ± 9.98**	0.00 ± 0.00	7.60 ± 0.89	88.60 ± 1.81	3.80 ± 0.44	3.96 ± 0.08**
Testículo:						
Células chicas	60.38 ± 11.26**	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.70	86.60 ± 1.34	12.40 ± 1.14	4.11 ± 0.09**
Células grandes	77.02 ± 13.40**	0.00 ± 0.00	16.00 ± 1.58	72.40 ± 2.19	11.60 ± 1.14	3.95 ± 0.14**
1/16 de DI₅₀ de CH₃COOTI						
Sangre	67.52 ± 4.77**	0.00 ± 0.00	92.40 ± 3.04	4.20 ± 0.83	3.40 ± 1.14	3.11 ± 0.13**
Hígado	86.24 ± 9.63**	0.00 ± 0.00	11.80 ± 0.83	85.80 ± 2.16	2.40 ± 0.54	3.90 ± 0.10**
Riñón	89.24 ± 9.27**	0.00 ± 0.00	5.20 ± 2.68	89.60 ± 0.89	5.20 ± 0.44	4.00 ± 0.09**
Corazón	49.66 ± 2.59*	46.20 ± 1.09	52.20 ± 2.68	0.20 ± 0.44	1.40 ± 0.54	2.56 ± 0.09*
Pulmón	53.67 ± 3.05*	18.00 ± 1.00	80.00 ± 2.91	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.70	2.86 ± 0.09**
Cerebro	71.14 ± 7.75**	0.00 ± 0.00	49.40 ± 1.14	46.60 ± 0.89	4.00 ± 0.70	3.54 ± 0.07**
Testículo:						
Células chicas	55.87 ± 13.25*	0.80 ± 0.83	4.40 ± 1.30	84.69 ± 0.89	10.20 ± 1.09	4.04 ± 0.10**
Células grandes	73.10 ± 18.69**	25.00 ± 1.00	12.80 ± 1.09	51.00 ± 1.00	11.20 ± 0.54	3.48 ± 0.08**

Continuación del cuadro IV ...

1/8 de DI₅₀ de CH₃COOTI

Sangre	67.58 ± 3.78**	0.00 ± 0.00	95.00 ± 3.60	2.80 ± 1.30	2.20 ± 1.30	3.07 ± 0.16**
Hígado	88.96 ± 7.80**	0.00 ± 0.00	3.00 ± 0.70	94.00 ± 1.22	3.00 ± 1.22	4.00 ± 0.09**
Riñón	88.04 ± 8.97**	0.20 ± 0.44	8.00 ± 0.70	88.00 ± 1.22	3.80 ± 0.83	3.95 ± 0.08**
Corazón	51.68 ± 3.25*	0.00 ± 0.00	60.60 ± 3.71	38.60 ± 0.54	0.80 ± 0.83	3.40 ± 0.12**
Pulmón	57.24 ± 2.79*	0.60 ± 0.89	97.60 ± 1.34	0.00 ± 0.00	1.80 ± 0.83	3.03 ± 0.06**
Cerebro	80.36 ± 10.17**	0.00 ± 0.00	12.40 ± 2.07	85.60 ± 1.14	2.00 ± 0.70	3.89 ± 0.10**
Testículo:						
Células chicas	53.94 ± 13.74*	13.20 ± 0.83	16.40 ± 0.54	64.40 ± 1.14	6.00 ± 1.87	3.63 ± 0.12**
Células grandes	70.97 ± 18.41**	3.20 ± 0.44	19.00 ± 1.58	69.00 ± 1.87	8.80 ± 0.83	3.83 ± 0.12**

Testigo positivo (200 µM de H₂O₂)

	123.90 ± 14.21**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	93.80 ± 1.48	6.20 ± 0.83	4.06 ± 0.06**
--	------------------	-------------	-------------	--------------	-------------	---------------

^a Los animales fueron pesados y tratados cada tercer día. Cinco administraciones de la DI₅₀ por ratón de cada tratamiento. DE, desviación estándar.

IMg, índice de migración.

* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con en el grupo testigo.

Cuadro V. Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados^a y no tratados con acetato de talio (CH₃COOTl) durante 60 días.

Grupo	Longitud total del cometa ± DE	Categorías de daño al ADN en %				IMg
		Bajo	Medio	Alto	Severo	
Testigo						
Sangre	44.42 ± 2.17	98.8 ± 1.64	1.20 ± 0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.01 ± 0.03
Hígado	45.33 ± 1.88	90.80 ± 4.86	9.20 ± 1.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.09 ± 0.07
Riñón	44.74 ± 2.43	93.20 ± 4.38	6.80 ± 1.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.06 ± 0.06
Corazón	44.04 ± 1.64	95.20 ± 2.16	4.80 ± 0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.04 ± 0.03
Pulmón	44.05 ± 1.69	96.00 ± 2.23	3.80 ± 0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.04 ± 0.03
Cerebro	44.87 ± 1.95	95.80 ± 2.16	4.20 ± 1.30	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.04 ± 0.04
Testículo:						
Células chicas	43.24 ± 4.39	52.40 ± 1.14	47.60 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.47 ± 0.02
Células grandes	62.16 ± 5.61	66.80 ± 1.30	33.20 ± 0.44	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.33 ± 0.02
1/32 de DI₅₀ de CH₃COOTl						
Sangre	74.85 ± 4.91**	0.00 ± 0.00	59.20 ± 0.83	36.60 ± 0.54	5.20 ± 0.44	3.45 ± 0.05**
Hígado	117.46 ± 9.91**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	92.60 ± 1.51	7.40 ± 1.51	4.07 ± 0.10**
Riñón	109.78 ± 11.41**	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.44	89.40 ± 0.54	10.40 ± 0.89	4.10 ± 0.06**
Corazón	55.64 ± 4.79*	14.40 ± 2.70	80.20 ± 2.86	2.60 ± 0.89	2.40 ± 0.54	2.92 ± 0.13*
Pulmón	79.74 ± 6.52**	0.00 ± 0.00	33.40 ± 1.67	63.80 ± 1.92	2.80 ± 0.54	3.69 ± 0.11**
Cerebro	93.45 ± 13.78**	0.00 ± 0.00	4.20 ± 0.44	90.20 ± 0.44	5.60 ± 0.89	4.01 ± 0.05**
Testículo:						
Células chicas	81.21 ± 6.52**	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.44	93.00 ± 1.22	6.60 ± 0.54	4.06 ± 0.06**
Células grandes	92.00 ± 7.46**	0.00 ± 0.00	60.40 ± 0.89	31.80 ± 0.83	7.80 ± 0.44	3.47 ± 0.06**
1/16 de DI₅₀ de CH₃COOTl						
Sangre	70.83 ± 4.54**	0.00 ± 0.00	84.50 ± 1.50	12.00 ± 1.41	3.50 ± 0.57	3.19 ± 0.09**
Hígado	90.95 ± 10.98**	0.00 ± 0.00	4.50 ± 0.57	92.00 ± 2.16	3.50 ± 1.00	3.99 ± 0.11**
Riñón	94.26 ± 9.58**	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.81	91.50 ± 1.29	6.50 ± 0.57	4.04 ± 0.07**
Corazón	48.25 ± 2.05	79.75 ± 1.70	18.25 ± 1.25	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.81	2.24 ± 0.07
Pulmón	73.69 ± 4.88**	0.00 ± 0.00	69.75 ± 1.70	27.75 ± 0.95	2.50 ± 1.29	3.32 ± 0.11**
Cerebro	77.41 ± 8.96**	0.00 ± 0.00	17.50 ± 1.91	78.25 ± 1.70	4.25 ± 0.95	3.86 ± 0.12**

continuación del cuadro V ...

Testículo:

Células chicas	65.26 ± 9.94**	0.50 ± 0.57	51.50 ± 0.57	41.25 ± 0.95	6.75 ± 0.95	3.54 ± 0.08**
Células grandes	81.98 ± 7.91**	1.00 ± 0.00	86.00 ± 0.81	7.75 ± 0.50	5.25 ± 0.50	3.17 ± 0.05**

1/8 de DI₅₀ de CH₃COOTI

Sangre	73.40 ± 4.15**	0.00 ± 0.00	74.60 ± 1.14	22.60 ± 1.94	2.80 ± 0.44	3.28 ± 0.09**
Hígado	95.52 ± 12.92**	0.00 ± 0.00	5.80 ± 0.83	88.60 ± 1.67	5.60 ± 0.89	3.99 ± 0.10**
Riñón	91.74 ± 11.95**	0.00 ± 0.00	3.40 ± 1.51	91.20 ± 1.30	5.40 ± 0.89	4.02 ± 0.10**
Corazón	51.67 ± 3.69*	27.40 ± 2.07	70.60 ± 1.94	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.70	2.76 ± 0.08*
Pulmón	75.57 ± 4.34**	0.00 ± 0.00	35.60 ± 1.14	61.80 ± 2.16	2.80 ± 0.83	3.67 ± 0.12**
Cerebro	86.28 ± 8.76**	0.00 ± 0.00	8.60 ± 0.89	88.60 ± 1.14	2.80 ± 1.09	3.94 ± 0.09**
Testículo:						
Células chicas	54.28 ± 5.55*	0.80 ± 0.44	90.40 ± 1.14	4.80 ± 0.44	4.00 ± 0.00	3.12 ± 0.04**
Células grandes	70.01 ± 6.47*	16.20 ± 1.09	79.60 ± 0.89	0.4 ± 0.54	4.00 ± 1.58	2.91 ± 0.10*

Testigo positivo (200 µM de H₂O₂)

	123.80 ± 11.96**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	91.40 ± 1.14	8.60 ± 0.89	4.08 ± 0.06**
--	------------------	-------------	-------------	--------------	-------------	---------------

^a Los animales fueron pesados y tratados cada tercer día. Treinta administraciones de la DI₅₀ por ratón de cada tratamiento. DE, desviación estándar.

IMg, índice de migración.

* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con el grupo testigo.

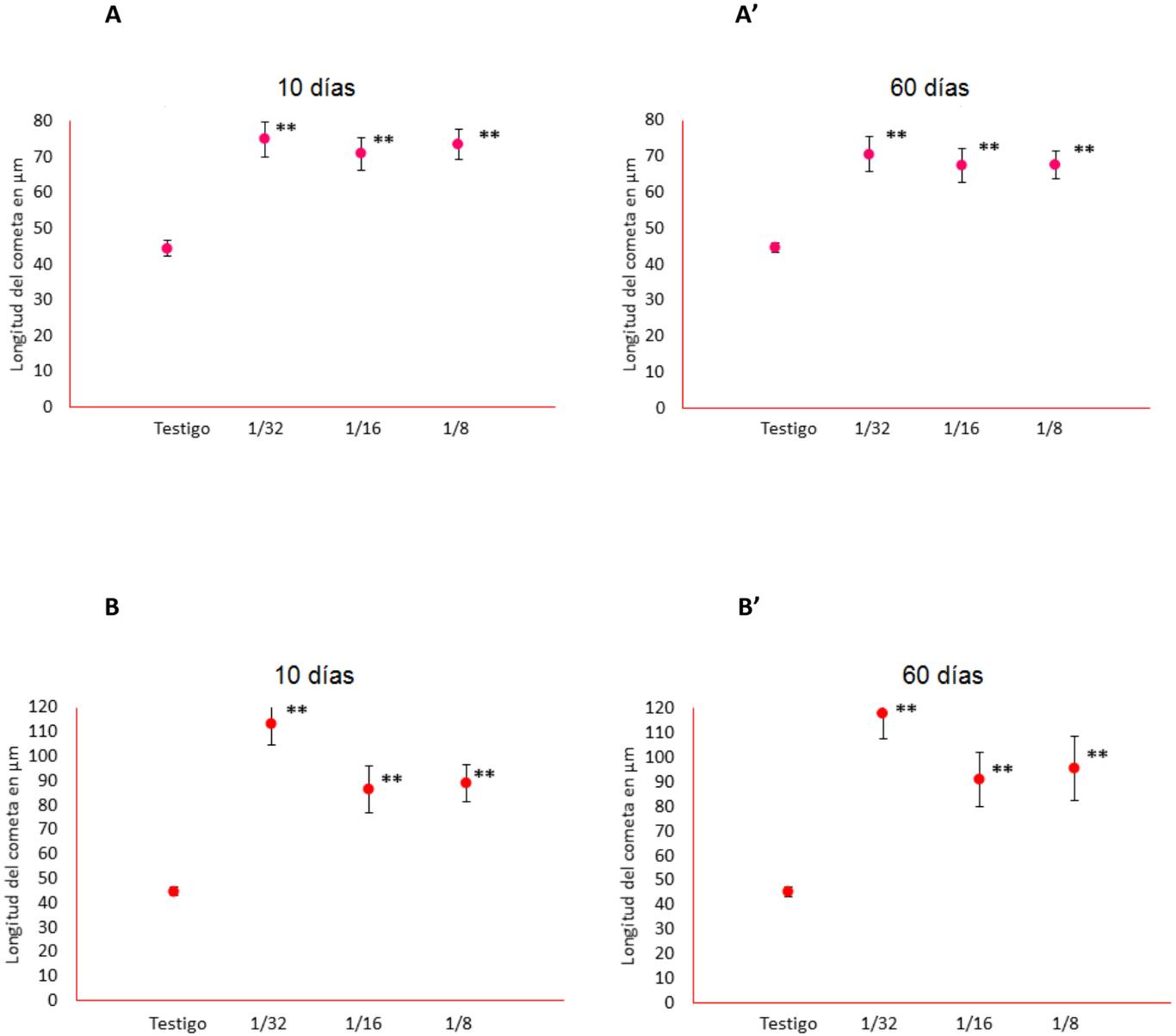


Fig. VI. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **A** células de sangre y **B** células de hígado de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **A'** y **B'** células de sangre e hígado respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo).

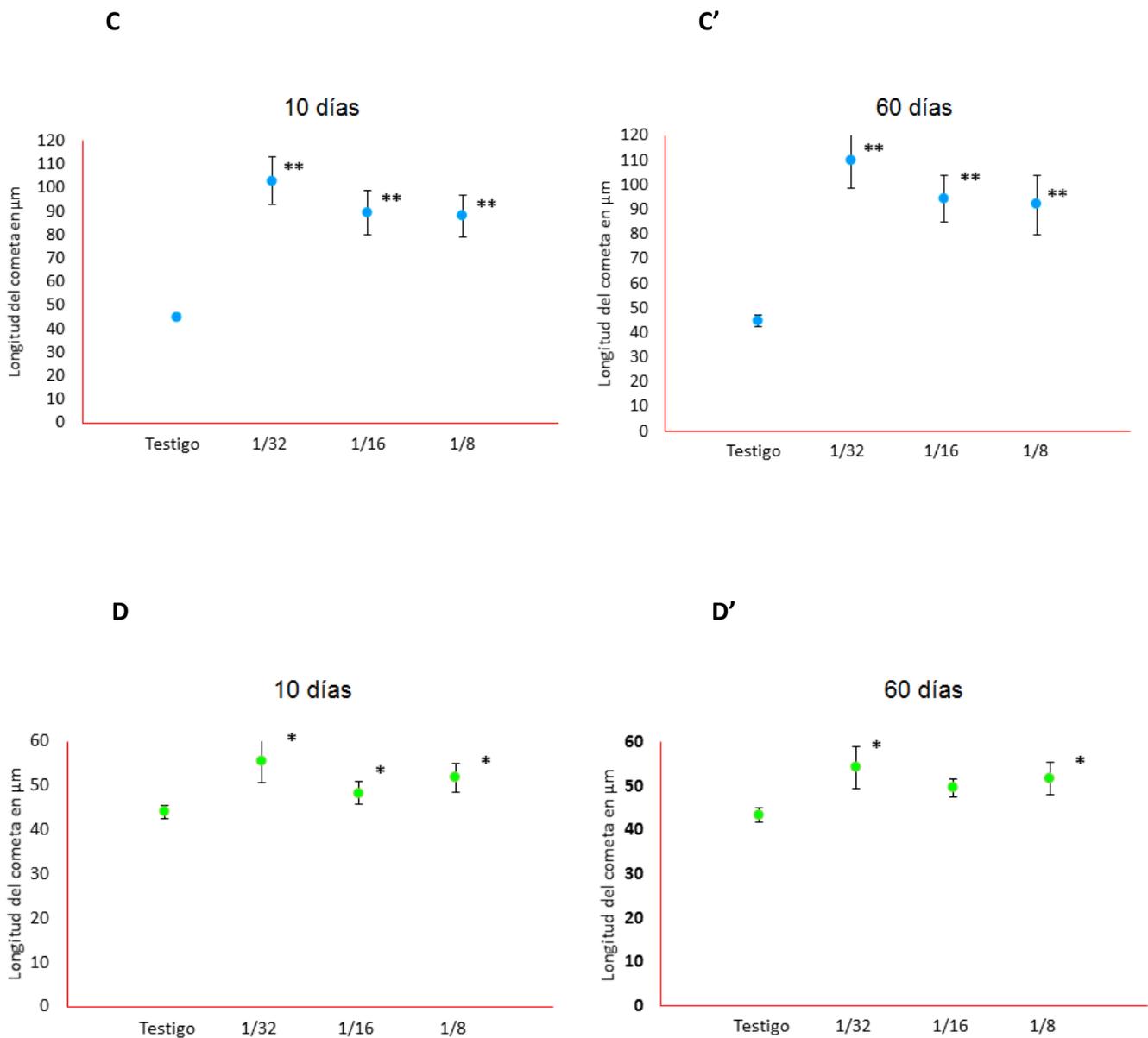


Fig. VII. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **C** células de riñón y **D** células de corazón de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **C'** y **D'** células riñón y corazón respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo).

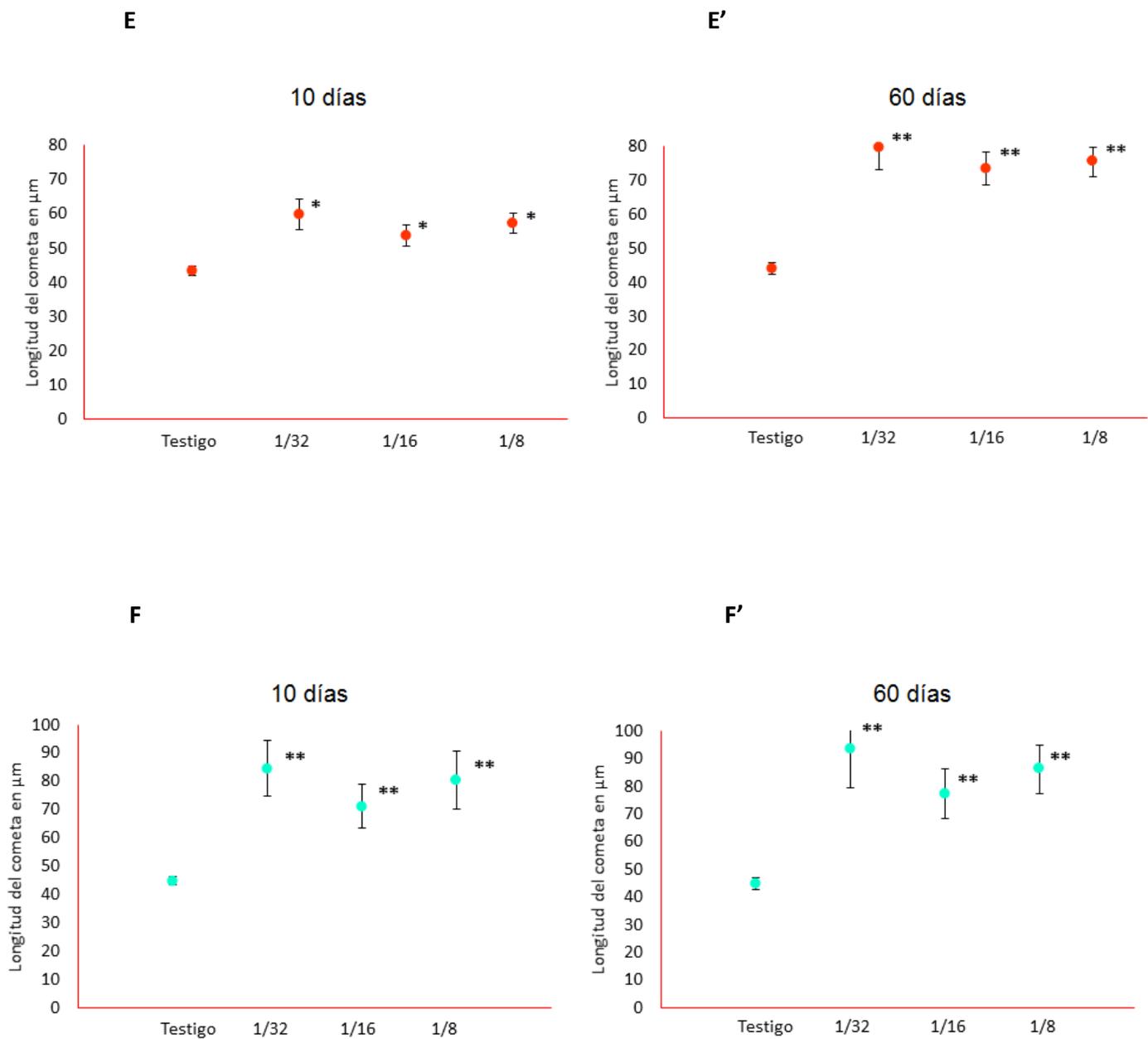


Fig. VIII. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **E** células de pulmón, **F** células de cerebro de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **E'** y **F'** células de pulmón y cerebro respectivamente de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo).

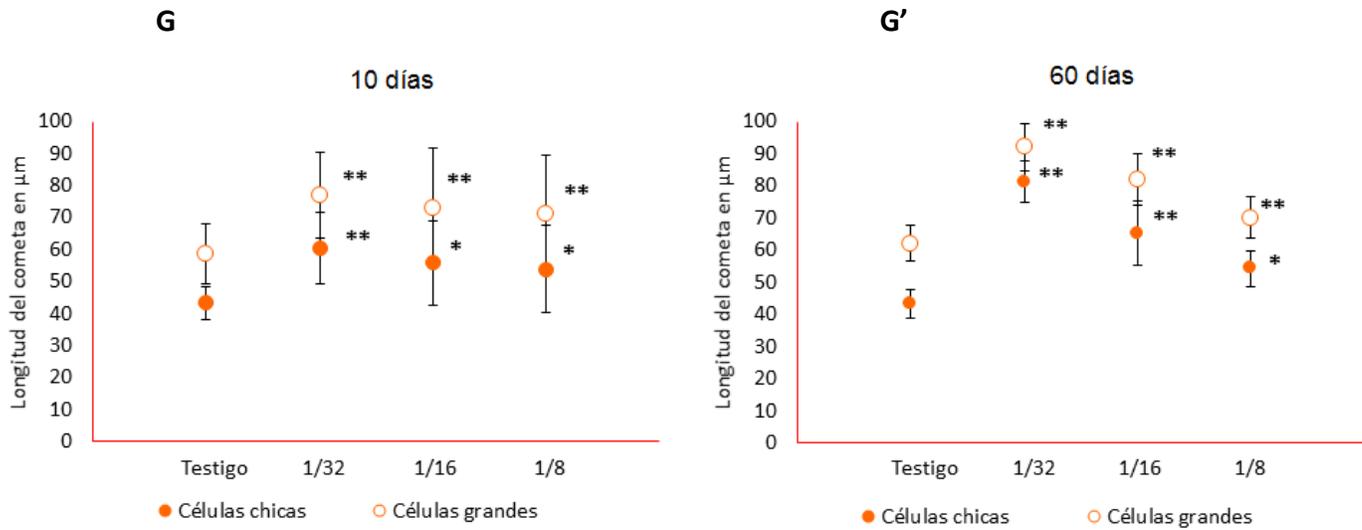


Fig. IX. Estimación del daño al ADN medido por la longitud del cometa. En **G** células de testículo de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días. En **G'** células de testículo de los ratones tratados durante 60 días (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, comparado con su testigo).

VIII. DISCUSIÓN

Algunos metales son considerados contaminantes, la exposición ocupacional, ambiental o accidental pueden tener efectos nocivos sobre los humanos, debido a que interactúan con biomoléculas como el ADN, las enzimas, las proteínas y los lípidos (US EPA 2009, WHO 1996, Flora *et al* 2008). Se sabe que la exposición a los metales y sus compuestos puede ocasionar bioacumulación y causar toxicidad, dañar los tejidos, los órganos, a la célula o al material genético (Conte *et al* 1998, Valko *et al* 2005, Coelho *et al* 2013).

La exposición a Tl causada por intoxicación aguda o crónica altera muchos procesos biológicos (Verstraeten 2006). En mamíferos se acumula en tejidos y en órganos blanco como el riñón, hígado, cerebro, testículo, músculo, corazón, hueso y cuero cabelludo, donde se conserva durante largos períodos de tiempo (Repetto y del Peso 2012, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013). No obstante, existe poca información respecto a los posibles efectos citotóxicos, mutagénicos, genotóxicos incluso carcinogénicos de este elemento.

8.1 Peso de Animales

Generalmente se conoce que el peso del organismo es uno de los indicadores biológicos de toxicidad más sensibles, ha sido tradicionalmente utilizado como un criterio en los experimentos toxicológicos como una de las respuestas del organismo completo al compuesto (Feron *et al* 1973, Valko *et al* 2005, Nava-Ruíz y Méndez-Armenta 2011). Se ha observado en estudios que los compuestos de Tl pueden causar diversos síntomas derivados de sus efectos sobre sistema nervioso hasta la muerte (Garrett y Lewtas 1983, NJDHSS 2000). Los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron cambios en los pesos de los ratones tratados con acetato de talio(I). Por lo cual, la dosis y el tiempo de tratamiento no produjeron toxicidad que comprometiera al organismo ni a los órganos. Sin embargo, se observaron algunos cambios que también son indicadores de toxicidad en el organismo, los animales a lo largo de los tratamientos presentaron pérdida de pelo, baja movilidad, síntomas que fueron más visibles conforme el tratamiento transcurría, además de orejas blanquecinas a pálidas, en vez de un color rosado (Fig. X).



Fig. X. Ratones tratados 60 días con acetato de talio(I).

8.2 Viabilidad Celular

Otro de los indicadores de toxicidad en los órganos y tejidos de los organismos expuestos a agentes químicos es la viabilidad celular. El uso de los colorantes fluorescentes, CFDA y Br-Et permiten medir alteraciones en la permeabilidad de la membrana y al mismo tiempo la actividad del metabolismo en la célula, donde las células viables se tiñen de color verde fluorescente, mientras que los núcleos teñidos de color rojo indican que las células tienen huecos o discontinuidades en su membrana celular lo cual les conduce a la muerte (Hartmann y Speit 1997, Henderson *et al* 1998). Esta prueba es recomendable a la par de la electroforesis unicelular en gel para evitar falsos positivos (Hartmann y Speit 1997, Henderson *et al* 1998). Es recomendable valores de viabilidad mayores al 80%, esto es para evitar resultados erróneos debidos a los rompimientos en ADN generados por los procesos que conducen a la muerte de la célula (Tice *et al* 2000), además de que los datos de viabilidad deben ser reproducibles y confiables.

En este estudio, la evaluación mediante la tinción de colorantes fluorescentes de las células de sangre, hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro y testículo, de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 y 60 días, respectivamente, no mostró alteraciones en la permeabilidad celular, la viabilidad siempre fue mayor al 92%, lo cual es indicativo de que el tratamiento con acetato de talio(I) en las dosis administradas no induce toxicidad celular, datos que respaldan a los obtenidos en el peso de los organismos y de sus tejidos, en los cuales tampoco se observaron cambios significativos.

8.3 Daño al ADN

El daño al ADN puede ser producido por una gran variedad de agentes, los tipos de daños son tan diversos como los agentes que los causan (Taylor 1994, Lindahl y Wood 1999). El ensayo cometa se ha consolidado como una de las pruebas eficientes para medir el daño al ADN en prácticamente cualquier tipo de célula, es una metodología muy útil debido a sus ventajas como la detección de bajos niveles de daño, requiere un pequeño número de muestra, además de que es versátil y rápida (Rojas *et al* 1999, Collins 2004). Detecta daño primario sobre la molécula de ADN, entre las lesiones que detecta encontramos rompimientos de cadena sencilla, sitios sensibles al álcali y sitios de reparación por escisión incompleta (Singh 2000, Fairbairn *et al* 1995). Por lo anterior, la longitud de la migración del ADN se interpreta como producto de estas lesiones en los distintos tejidos y órganos de los ratones tratados con acetato de talio(I).

Los resultados del ensayo cometa *in vivo* contribuyen a la identificación de un agente como genotóxico o potencialmente mutagénico, donde una respuesta de relación dosis efecto o respuesta dependiente del tiempo son importantes para determinar la acción de la sustancia en el organismo. Por lo anterior, varios autores la consideran como una prueba que detecta el daño del ADN que puede dar lugar a mutaciones (Tice *et al* 2000, Brendler-Schwaab *et al* 2005).

En base a los estudios de genotoxicidad se sabe que las pruebas *in vivo* reflejan la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto (Sasaki *et al* 2002). La toxicidad puede ser influenciada por la velocidad con la que la sustancia entra en el organismo, los órganos y las células con los que tiene contacto y las interacciones con los mismos y sus componentes, por lo que la respuesta o el efecto está determinada por la dosis administrada del acetato de talio(I), las propiedades intrínsecas del químico, el tiempo de exposición y las características del tejido analizado.

De acuerdo con la US EPA (2009) el TI presenta una toxicidad comparable a la de metales como plomo, cadmio y mercurio, no obstante la mayoría de los estudios se centran en los efectos de toxicidad general o sistémica y han sido poco estudiados sus efectos genotóxicos, por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó la prueba de ensayo cometa para evaluar el efecto del acetato de talio(I) en sangre, hígado, riñón, corazón, testículo, pulmón y cerebro de ratón.

En este estudio se observó que el compuesto de TI, induce daño al ADN incrementando la longitud de los cometas en todos los tejidos y órganos evaluados,

siendo en el siguiente orden el hígado, riñón, cerebro y testículo, los órganos más afectados tanto a 10 como a 60 días. Esto ocurrió en todos los grupos tratados con las diferentes dosis, sin embargo el efecto sobre la evaluación de daño por TI no mostro una relación dosis- o tiempo-dependiente.

Estudios con agentes genotóxicos en células somáticas y germinales han mostrado que cuando existe presencia de altos niveles de rompimientos en la cadena de ADN, se observa mayor aumento e intensidad de la longitud de la cola (Simon y Carrell 2013), se sabe que estos rompimientos están relacionados con daño cromosómico, el cual se considera importante porque está involucrado en la formación de ACE (Evans 1984, Güerci *et al* 2000, Natarajan 2002, Obe *et al* 2002).

El TI no es un constituyente normal en los tejidos animales, sin embargo es absorbido a través de la piel y del tracto gastrointestinal. Para la mayoría de los animales es letal en dosis de 10 a 30 mg/kg, tiende a reaccionar con los grupos sulfhídricos de proteínas y otras biomoléculas (Aoyama *et al* 1986), pero el mecanismo preciso por el cual induce toxicidad aún no se ha descrito por completo. Un aspecto importante, en su letalidad, es su lenta y baja tasa de eliminación, situación que propicia su acumulación en hígado, riñón y cerebro, lo que puede explicar que estos órganos presenten mayor daño al ADN al evaluar EUG (Klassen *et al* 1996, Harris y Messori 2002).

Nakamura y colaboradores (1983) encontraron que la distribución de los iones de Tl^+ en los órganos de ratas adultas está relacionada con la actividad ATPasa dependiente de Na^+/K^+ en los tejidos, los iones de Tl^+ son confundidos con el K^+ , debido a la similitud de su carga y radio iónico (Britten y Blank 1968, Maluszynski 2009), por lo que es posible que el metal sea transferido por el mecanismo responsable de transporte de potasio, siendo incapaz la membrana celular de identificar entre el K^+ , y el TI (Mulkey y Oehme 1993). Esta característica en nuestro modelo *in vivo* posiblemente permite al TI ser absorbido fácilmente por las células de peritoneo, llegar al torrente sanguíneo, distribuirse en tejidos y órganos, tal como se observó al administrar al acetato de talio(I) en este estudio y otros compuestos del metal vía ip y oral en distintos modelos murinos (US EPA 2009).

Los canales de potasio en la membrana celular se caracterizan por su alta selectividad para K^+ y algunos otros cationes, tales como Tl^+ y Rb^+ , permitiendo la salida de K^+ , resultando en un exceso de cargas negativas y un potencial negativo interno en las células. Hagiwara y colaboradores (1972) calcularon la permeabilidad de un número de cationes monovalentes desde su eficacia para despolarizar los axones. Ellos encontraron que la proporción de permeabilidad fue de 0.18, 0.25,

0.71, 1.82 y 1.0 para Cs^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Tl^+ y K^+ , respectivamente (Brismar 1998); lo cual indica que el Tl es más permeable a las membranas biológicas sobre el mismo potasio.

La intoxicación por Tl inhibe ciertas enzimas, coenzimas y proteínas estructurales provocando alteraciones metabólicas, lo que ayuda a explicar los cambios en la estructura y la funcionalidad observados en las células, tejidos y órganos, que se traducen en anomalías físicas, neurológicas y psiquiátricas encontradas en los pacientes intoxicados (Prick 1979, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013), así como en los animales expuestos a acetato de talio(I) en este estudio.

Los estudios de genotoxicidad del Tl empleando sistemas biológicos de prueba son escasos y poco contundentes (Léonard y Gerber 1997, Cvjetko *et al* 2010). Los intentos de estimar el daño en cromosomas con la prueba ACE, ICH y MN han arrojado resultados contradictorios, tanto *in vivo* e *in vitro*, pues el cloruro de talio(III) no modifica la frecuencia de ICH en células de médula ósea de hámster tratados por 24 h (revisado en PHG 1999), ni tampoco ICH o induce ACE en cultivos de linfocitos de una persona intoxicada con 200 mg de un veneno que contenía sulfato de talio(I) (Hantson *et al* 1997). Estas pruebas no revelaron efectos genotóxicos por la exposición a Tl, sin embargo, en este estudio se encontró evidencia de genotoxicidad al analizar el número de células con daño y la longitud del cometa.

Los resultados aquí presentados junto con algunos estudios efectuados en el laboratorio donde se realizó el presente estudio, usando el modelo *in vitro* de células de sangre periférica humana, se encontró que el acetato de talio(I) induce daño primario al ADN, además este y otros compuestos utilizados (sulfato de talio y tricloruro de talio) incrementaron la frecuencia de células con ACE (Felipe-Reyes 2011, Hernández-de la Cruz 2011, Jaramillo-Cruz 2011, Mosqueda-Tapia 2012), de igual manera se ha observado *in vivo* que este compuesto (acetato de talio) induce ACE en médula ósea de ratón (Buendía-Valverde 2013), así como MN y apoptosis tanto en machos y hembras (García-Cárdenas 2014), confirmando que el talio(I) induce genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.

Otros estudios que respaldan el de daño al ADN en los tejidos de los ratones expuestos al acetato de talio(I) son los realizados por Zasukhina y colaboradores (1983) y otros autores (PHG 1999), los cuales encontraron que el carbonato de talio(I) induce rompimientos en el ADN en células embrionarias de ratón C57BL/6 y de rata CBA, efecto que también se ha observado en células de plantas expuestas al acetato de talio(I) (Babić *et al* 2009).

Dos de los órganos más afectados por exposición al Tl son el hígado y los riñones. Herman y Bensch (1967) observaron en ratas expuestas a acetato de talio(I) vía ip que induce cambios degenerativos severos en la mitocondria de las células tubulares renales y en los hepatocitos. Por otro lado, se conoce que el sulfato de talio(I) administrado ip en ratón y rata disminuye la actividad de las ATPasa de Na^+/K^+ en hígado y riñón (Mourelle *et al* 1988, Yoshida *et al* 1997), además de que en riñón aumentan la peroxidación de lípidos debido a que modifica los niveles de glutatión y baja la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Aoyama *et al* 1988). Lo anterior, sustenta la sensibilidad de estos órganos a las perturbaciones que puede ocasionar el Tl en el metabolismo de la célula, y en particular los efectos de peroxidación pueden estar asociados al daño al ADN en hígado y riñón encontrados en las evaluaciones de este estudio.

Se conoce que el cerebro es sensible a los efectos del níquel y del cobalto, ambos metales aumentan la peroxidación de lípidos (Hasan y Ali 1981). Otros metales, tales como aluminio, cobre, plomo, manganeso, mercurio y propio Tl, son conocidos como neurotóxicos por afectar el sistema nervioso central y periférico. La manera cómo actúan es variada, no obstante un mecanismo es la perturbación de neurotransmisores encargados de estimular la supervivencia, el crecimiento o la diferenciación. Se sabe que el sistema nervioso es más sensible a la exposición a dosis bajas de agentes tóxicos como los metales, lo que coloca al cerebro como un órgano crítico entre los diversos órganos blancos y sobre el cual es importante determinar los efectos no únicamente a nivel de órgano sino a nivel celular y de ADN.

Por otra parte Galván-Arzate y Ríos (1994) cuantificaron la acumulación de Tl en cerebro de ratas de 1, 5, 7, 15 y 20 días de edad, después de una exposición aguda, encontraron bajas cantidades del metal. Varios autores concuerdan con que Tl se acumula en el cerebro después de su administración ya sea vía ip, iv o ig, debido a que cruza la membranas celulares y la barrera hematoencefálica por mimetizar al potasio (Aoyama *et al* 1988, Galván-Arzate y Santamaría 1998). Esto coincide con nuestros resultados, puesto que al ser el cerebro el tercer órgano con mayor daño se podría pensar el Tl entra y se acumula en las células neurales mediante este mecanismo, tanto en la exposición de 10 días como la de 60 días.

Aparte de ser neurotóxico, en diferentes estudios se ha reportado que el Tl provoca efectos perjudiciales en el sistema reproductivo (Montoya-Cabrera *et al* 1991, Romero *et al* 1988, Rangel-Guerra *et al* 1990, Nikiforov *et al* 1999, US EPA 2009), no obstante sus efectos sobre este tema tampoco están del todo claros.

Revisiones sugieren que la exposición a Tl en ratas y ratones puede afectar el sistema reproductor de los machos, principalmente la función testicular y a los espermatozoides (US EPA 2009). Gregotti y colaboradores (1992) al realizar cultivos *in vitro* de células de Sertoli y células espermáticas de ratas tratadas con sulfato de talio(I) observaron efectos en la espermatogénesis con comportamiento dependiente de la dosis y del tiempo de exposición.

El daño al ADN producido en testículo por el acetato de talio(I) tanto a 10 como a 60 días, puede estar relacionado con el procesos de espermatogénesis, ya que una exposición corta afecta a las células espermáticas que carecen de mecanismos de reparación (Haines *et al* 2001), mientras que una exposición más larga (60 días) afecta todas las etapas de la espermatogénesis, perturbando procesos como la producción de células germinales y división celular.

En células testiculares el daño que se produce al ADN es de gran importancia debido a que estas células llevan la mitad de la carga genética necesaria para el desarrollo de un nuevo organismo, el daño puede causar mutaciones al ADN que al no poder ser reparadas deriva en problemas de infertilidad, o que puede conllevar a problemas en el desarrollo embrionario.

Es importante resaltar que a pesar de que en este estudio no se observó efecto dosis dependiente, los grupos tratados muestran que el Tl induce rompimientos de cadena del ADN en células de sangre, hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro y testículo. Sin embargo corazón es el órgano menos afectado, y en la concentración más alta administrada a ratones de este metal no presenta cambios estadísticamente significativos con respecto al grupo testigo. Este comportamiento puede deberse por una parte a que las células sólo permiten que cierta cantidad del metal cruce al citoplasma y por otra parte a que el metabolismo de la célula desencadene procesos de desintoxicación y eliminación de Tl, o ambas a la vez.

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan la genotoxicidad del Tl, diversos autores han escrito sobre el papel de este en la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libre que pudieran interactuar con la molécula de ADN y generar daño en su estructura (Galván-Arzate *et al* 2000, Tarpey *et al* 2004, Hanzel y Verstraeten 2006).

Varios metales, son genotóxicos, debido a que pueden inducir rompimientos de cadena sencilla y doble en el ADN (Beyersmann y Hartwig 2008, Rodríguez-Mercado *et al* 2010). Se ha propuesto que el daño al ADN puede originarse cuando el mecanismo de control antioxidante es rebasado por las especies reactivas, esto

puede ocasionar que se incremente el potencial de daño hacia las biomoléculas, no sólo en el ADN sino en los lípidos y las proteínas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Mateos-Nava 2012). Se ha observado que el TI tiene afinidad por los ácidos nucleicos, específicamente por regiones ricas en guanina-timina de los telómeros, también que es capaz de unirse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas y así como de alterar la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) (Mulkey y Ohme 1993, Ramsed 2007).

Se ha descrito que el TI debido a la alta afinidad por los grupos sulfhidrilo (Aoyama 1988) causa el agotamiento del glutatión, enzima que pertenece a los sistemas de defensa del organismo y que se encarga de proteger a los órganos del exceso de radicales libres (Hasan y Ali 1981). Estos efectos pueden estar relacionados con el efecto genotóxico observado en el presente estudio.

Finalmente, el estrés oxidante es uno de los mecanismos de toxicidad del TI, si especies reactivas de oxígeno y otros radicales se producen por la administración de acetato de talio(I) a los ratones, estos podrían reaccionar con la molécula de ADN provocando el daño primario observado en los distintos tejidos.

IX. CONCLUSIONES

- El acetato de talio(I) no modificó el peso del organismo ni el peso de los órganos del ratón, indicando que no hay una toxicidad acentuada sobre el organismo expuestos vía ip a dosis de 1/32, 1/16 y 1/8 durante 10 días y 60 días.
- La evaluación de la viabilidad celular en los órganos de los animales expuestos a acetato de talio(I) fue mayor al 92% lo cual indica que no hay toxicidad celular. Estos datos concuerda con los resultados del peso en los que no se encontraron cambios significativos en las dosis administradas y tiempos de tratamiento.
- Se observó que el TI indujo daño al ADN en los diferentes tejidos como rompimientos de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali, debido a la administración del compuesto y no por un efecto citotóxico.
- El acetato de talio(I) es un agente genotóxico, ya que produjo daño al ADN evidenciado por el incremento en la longitud del cometa en todos los órganos tratados durante 10 y 60 días. Siendo el hígado, riñón y testículo los que presentaron mayor efecto.
- No se encontró relación dosis-efecto, ni relación tiempo-dependiente.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoyama H, Yoshida M, Yamamura Y. 1986. Acute poisoning by intentional ingestion of thallos malonate. *Human Toxicology* 5(6):389-392.

Aoyama H, Yoshida M, Yamamura Y. 1988. Induction of lipid peroxidation in tissues of thallos malonate-treated hamster. *Toxicology* 53(1):11-18.

Achenbach C, Hauswirth O, Heindrichs C, Ziskoven R, Köhler F, Bahr U, Heindrichs A, Schulten HR. 1980. Quantitative measure of time-dependent thallium distribution in organs of mice by field desorption mass spectrometry. *Journal Toxicology Environmental Health* 6(3):519-528.

Albertini R J, Anderson D, Douglas G, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan A, Norppa H, Shuker D, Tice R, Waters M, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463(2):111-172.

Altamirano-Lozano M, Álvarez-barrera L, Basurto-alcántara F, Valverde M, Rojas E. 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 16(1):7-17.

Altamirano-Lozano M, Valverde M, Álvarez-Barrera L, Molina B, Rojas E. 1999. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in Several Mouse Tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 19(4):243-255.

Anderson CWN, Brooks RR, Chiarucci A, La Coste CJ, Leblanc M, Robinson BH, Simcock R, Stewart RB. 1999. Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67(1):407-415.

Andress Jm, Frith CH, Good man DG, Boysen BG, Cook CS. 1992. The mouse. En: Cox GS y Chengelis, C.P. (Eds.) *Animal models in toxicology*. New Cork: Marcel Dekker. Páginas: 165-249.

Babić M, Radic S, Cvjetko P, Roje V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M. 2009. Antioxidative response of *Lemma minor* plants exposed to thallium (I)-acetate. *Aquatic Botany* 91(3):166-172.

Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. 2008. Uncommon heavy metals. Metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6(1):189-213.

Beyersmann D, Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archive für Toxikologie* 82(8):493-512.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. 2005. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20(4):245-254.

Brismar T, Collins PV, Kesselberg M. 1989. Thallium-201 uptake relates to membrane potential and potassium permeability in human glioma cells. *Brain Research* 500(1-2):30-36.

Britten JS, Blank M. 1968. Thallium activation of the (Na⁺-K⁺)-activated ATPase of rabbit kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 159(1):160-166.

Budavari S. 1989. The Merck Index an encyclopedia of chemicals drugs, and biological. Séptima Edición. Merck y Co Inc. Rahway. NJ, EUA.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF. 1996. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ, EUA.

Buendía-Valverde ML. 2013. Evaluación *in vivo* del efecto genotóxico inducido por exposición al acetato de talio (CH₃COOTl) en ratón hembra CD-1 mediante la prueba de aberraciones cromosómicas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, DF.

Coelho P, García-Lestón J, Costa S, Costa C, Silva S, Dall'Armi V, Zoffoli R, Bonassi S, de Lima JP, Gaspar JF, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP. 2013. Genotoxic effect of exposure to metal(loid)s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portugal. *Environment International* 60(1):163–170.

Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26(3):249-261.

Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarini A, Regina G, Maestri E, Marmiroli N. 1998. DNA Fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* 37(14-15):2739-2749.

Cvjetko P, Cvjetko L, Pavlica M. 2010. Thallium toxicity in humans. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 61(1):111-119.

Del Valls TA, Sáenz V, Arias AM, 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 aznalcóllar mining spill. *Ciencias Marinas* 25(2):161-175.

Douglas KT, Bunni MA, Baidur SR. 1990. Thallium in Biochemistry. *International Journal of Biochemistry* 22(5):429-438.

Evans HF. 1984. Handbook of mutagenicity test procedures; Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Segunda Edición. Kilbey BJ, Egator MI, Nicolas W, Ramel C (Eds.). Capítulo 18, 406-427.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to sperm motility. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30(3):279-280.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339(1):37-59.

Felipe-Reyes M. 2011. Valoración de la toxicidad de acetato de talio (CH₃COOTl) *in vitro* mediante tinción diferencial de cromátidas hermanas. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.

Fergusson JE. 1990. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon. Oxford, UK.

Feron VJ, de Groot AP, Spanjers MT, Til HP. 1973. An evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation. *Food and Cosmetics Toxicology* 11(1):85-94.

Ferré N, Schuhmacher M, Loobet J, Domingo J. 2007. Metales pesados y salud. Mapfre Seguridad Barcelona, España. 108:50-52.

Flora SJ, Mittal M, Mehta A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal Medical Research.* 128(4):501-523.

Florea AM, Büsselberg D. 2005. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals* 19(4):419-427.

Frattini P. 2005. Thallium properties and behavior: a literature study. Geological Survey of Finland (Geologian Tutkimuskeskus, GTK). [4 de abril 2014] En línea: http://arkisto.gtk.fi/s41/S41_0000_2005_2.pdf.

Fu F, Wang Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92(3):407-418.

Galván-Arzate S, Santamaría A. 1998. Thallium toxicity. *Toxicology Letters* 99(1):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(1-2):37-43.

Galván-Arzate S, Ríos C. 1994. Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology* 90(1-2):63-69.

García-Cárdenas GP. 2014. 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. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction* 34(1):127-138.

Garner DL, Johnson LA, Allen CH. 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology* 30(2):369-378.

Garner DL, Thomas CA, Joerg, HW, DeJarnette JM, Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine sperm. *Biology of Reproduction* 57(6):1401-1406.

Garrett NE, Lewtas J. 1983. Cellular toxicity in Chinese hamster ovary cell cultures. Analysis of cytotoxicity endpoints for twenty-nine priority pollutants. *Environmental Research* 32(2):455-465.

Gil-Hernández F. 2005. Toxicología industrial (III) toxicidad de los metales pesados. En: Tratado de medicina del trabajo. Elsevier-Masson. Barcelona. Capítulo 40; 1060.

Gregotti C, Di-Nucci A, Costa LC, Manzo L, Scelsi R, Berte F, Faustman EM. 1992. Effects of thallium on primary cultures of testicular cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 36(1): 59-69.

Griepink B, Sanger M, Tölg G. 1988. Determination of traces of thallium in various matrices. *Pure and Applied Chemistry* 60(9):1425-1436.

Güerci A, Seoane A, Dulout FN. 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 cells. *Mutation Research* 469(1):35-40.

Hagiwara S1, Eaton DC, Stuart AE, Rosenthal NP. 1972 Cation selectivity of the resting membrane of squid axon. *The Journal of Membrane Biology* 9(1):373-84.

Hantson P, Desoir R, Léonard ED, Crutzen-Faty MC. 1997. Cytogenetic observations following thallium poisoning. *Journal Toxicology Environmental Health* 50(2):97-100.

Hanzel CE y Verstraeten SV. 2006. Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicology Applied Pharmacology* 216(3):485-492.

Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, Morris ID. 2001. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic or X-irradiation of spermatogonia. *Mutation research* 495:21-32.

Harris WR, Messori L. 2002. A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III) and thallium(III) binding to human serum transferrin. *Coordination Chemistry Reviews* 228(2):237-262.

Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* 88(1):343-352.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Bendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18(1):45-51.

Hartmann A, Speit G. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters* 90(2-3):183-188.

Hasan M, Ali F. 1981. Effects of thallium, nickel and cobalt administration on the lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Journal of Applied Toxicology* 57(1):8-13.

Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13(1):89-94.

Herman MM, Bensch KG. 1967. Light and electron microscopic studies of acute and chronic thallium intoxication in rats. *Journal of Applied Pharmacology* 10(2):199-222.

Hernández-de la Cruz H. 2011. Evaluación del daño cromosómico e índice mitótico en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Hultin T, Näslund PH. 1974. Effects of thallium(I) on the structure and functions of mammalian ribosomes. *Chemico-Biological Interactions* 8(5):315-328.

Jaramillo-Cruz E. 2011. Evaluación del daño al ADN en leucocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Klassen CD, Amdur M, Doull J. 1996. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5^{ta} edición. Nueva York: McGraw-Hill. Páginas: 374, 491, 504, 505, 566, 626.

Insley BM, Grufferman S, Ayliffe HE. 1986. Thallium poisoning in cocaine abusers. *The American Journal of Emergency Medicine* 4(6):545-548.

IPCS, International Programme on Chemical Safety. 1996. Thallium Environmental health criteria. Vol. 182. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Kada T, Hirano K, Shirasu Y. 1980. Screening of environmental chemical mutagens by the Rec-assay system with *Bacillus subtilis*. In: deSerres, FJ Hollaender, A. (Eds.) Chemical mutagens: principles and methods for their detection. Nueva York. Páginas: 149-173.

Kanematsu N, Hara M, Kada T. 1980. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Research* 77(2):109-116.

Kazantzis G. 2000. Thallium in the environment and health effects. *Environmental Geochemistry and Health* 22(4):275-280.

Lench T, Sadlik K. 2007. Thallium intoxication in humans. *Toxicology Letters* 17(1):2-85.

Léonard A, Gerber GB. 1997. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research* 387(1):47-53.

Lindahl T, Wood RD. 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286(5446):1897-905.

Lu CI, Huang CC, Chang YC, Tsai YT, Kuo HC, Chuang YH, Shih TS. 2007. Short-term thallium intoxication: dermatological findings correlated with thallium concentration. *Archives of Dermatology* 143(1):93-98.

Mateos-Nava RA. 2012. Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y CDK de la fase G1 en linfocitos humanos tratados in vitro. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. FES Zaragoza, UNAM.

Maluszyński MJ. 2009. Thallium in environment. Institute of Environment Protection, Poland. *Environmental Protect Nat Research* 40(1):31-38.

Migliore L, Cocchi L, Nesti C, Sabbioni E. 1999. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34(4):279-284.

Montoya-Cabrera MA, Saucedo-García JM, Escalante-Galindo P y López-Morales E. 1991. Intoxicación por talio que simulo lupus eritematoso sistémico en un niño. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gaceta Médica Mexicana* 127(4):333-336.

Moore D, House I, Dixon A. 1993. Thallium poisoning. Diagnosis may be elusive but alopecia is the clue. *British Medical Journal* 306(6891):1527-1529.

Mosqueda-Tapia G. 2012. Análisis citogenético en linfocitos humanos de sangre periférica tratados in vitro con sulfato de talio (Tl₂SO₄) y tricloruro de talio (TlCl₃). Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Mourelle M, Favari L, Amezcua JL. 1988. Protection against thallium hepatotoxicity by silymarin. *Journal of Applied Toxicology* 8(5):351 - 354.

Mulkey JP, Oehme FW. 1993. A review of thallium toxicity. *Veterinary Human Toxicology* 35(5):445-454.

Navarro-Aviñón JP, Aguilar IA, López-Moya JR. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16(2):10-25.

Nriagu JO, Pacyna JM. 1998. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature* 333(1):134-139.

Nakamura K, Nishiguchi I, Takagi Y, Kubo A, Hashimoto S, Takami H. 1983. Accumulation mechanism of ²⁰¹Tl--K-contents and Na⁺, K⁺-ATPase activities of tissues. *Radioisotopes* 32(12):626-628.

Natarajan AT. 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research* 504(1-2):3-16.

Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias* 16(3):140-146.

NJDHSS, New Jersey Department of Health and Senior Services. 2000. Thallium acetate. RTK. CAS. 563-68p. www.nj.gov/heath/.

Nikiforov A, Slozina N, Neronova E, Kharchenko T, Sosukin A, Scherbak S, Sarana A, Onikienko S. 1999. Cytogenetic investigation of thallium poisoned people: pilot study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* 58(8):465-468.

Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martinez-Lopez, Folle GA, Drets ME. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research* 504(1-2):17-36.

Prick JJ. 1979 Thallium poisoning. In: Handbook of clinical Neurology. Vol 36 Páginas: 239-278.

Pacyna JM, Pacyna EG. 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews* 9(4):269-298.

Pau PW. 2000. Management of thallium poisoning. *Hong Kong Medical Journal* 6(3):316-318.

Peter AL, Viraraghavan T. 2005. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31(4):493-501.

PHG, Public Health Goal. 1999. Thallium in drinking water. Office of Environmental Health Assessment. California Environmental Protection Agency. EUA.

Pourahmad J, Eskandari MR, Daraei B. 2010. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for thallium(I) and thallium(III). *Environmental Toxicology* 25(5):456-467.

RAIS, Risk Assessment Information System. 1994. Toxicity Summary for thallium. [Ref. de 4 de abril del 2014] En línea: http://rais.ornl.gov/tox/profiles/thallium_c_V1.html.

Ramsed DB. 2007. Thallium. En: Waring RH. Steventon GB y Mitchell SC (Eds.) *Molecules of death*. 2da. Edición Imperial College Press, UK. Páginas: 415-422.

Rana SV. 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22(4):262-284.

Rangel-Guerra R, Martínez-Héctor R y Villarreal-héctor J. 1990. Intoxicación por talio, experiencia con 50 pacientes. Hospital Universitario. Universidad de Nuevo León. Servicio de Neurología. *Gaceta Médica de México* 12(6):487-495.

Rao CR, Ruíz-Cancho MJ, Sahuquillo A, López-Sánchez JF. 2008. Assessment of extractants for determination of thallium in accidentally pollute soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81(4):334-338.

Repetto G, del Peso A. 1998. Human thallium toxicity. En: Nriagu JO (Ed.) *Thallium in the environment*. Vol. 29. John Wiley and Sons, Inc. EUA. Páginas: 167-199.

Repetto G, del Peso A. 2001. Gallium, indium, and thallium. En: Bingham E, Cohn B, Powell CH. (Eds.) *Patty's toxicology*, Vol 2. Quinta Edición. John Wiley & Sons EUA. Páginas: 417-565.

Repetto G, del Peso A. 2012. Gallium, indium and thallium. En: Bingham E, Cohn B (Eds). *Patty's toxicology*, Vol 1. Sexta Edición. John Wiley & Sons EUA. Páginas: 257-353.

Repetto G, Sanza P, Repetto M. 1994. *In vitro* effects of thallium on mouse neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro* 8(4):609-611.

Repetto M, Repetto G. 2009. *Toxicología Fundamental*. Cuarta Edición. Ediciones Díaz de Santos 620 págs.

Richelmi P, Bono F, Guardia L, Ferrini B, Manzo L. 1980. Salivary levels of thallium in acute human poisoning. *Archives of Toxicology* 43(4):321-325.

Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano M. 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22(4):173-186.

Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. 2013. Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology* 36(3):369-83.

Rodríguez-Mercado JJ, Álvarez-Barrera L y Altamirano-Lozano MA. 2010. Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 33(1):97-102.

Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters* 144(3):359-369.

Rodríguez-Mercado JJ, Hernández-de la Cruz H, Felipe-Reyes M, Jaramillo-Cruz E, Altamirano-Lozano MA. 2013. Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium(I) acetate in human blood cells. *Environmental Toxicology* 1-8 DOI.

Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. *Toxicology in Vitro* 25(8):1996-2002.

Romero RE, Halabe CJ, Wache RN, Quiñonez GA, Laredo SF, Lifshitz GA. 1988. Crisis hipertensiva como manifestación de la intoxicación oculta por talio. *Revista Médica IMSS* 26(6):137-140.

Rojas E, López MC, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722(1-2):225-254.

Rojas E, Herrera LA, Ostrosky-Wegman P. 1999. Are metals dietary carcinogens? *Mutation Research* 443(1-2):157-181.

Rusyniak DE, Furbee RB, Kirk MA. 2002. Thallium and arsenic poisoning in a small Midwestern town. *Annals of Emergency Medicine* 39(3):307-311.

Sasaki FY, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research* 519(1-2):103-119.

Simon L, Carrell DT. 2013. Sperm DNA damage measured by comet assay. En: *Spermatogenesis: Methods and protocols*. Carrell DT, Aston KL (Ed). *Methods in Molecular Biology*. Páginas: 137-146.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1):184-191.

Singh NP. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research* 455(1-2):111-127.

Smart R, Hodgson E. 2008 *Molecular and Biochemical Toxicology*. John Wiley & Sons Inc. Hoboken New Jersey Cuarta Edición 902 págs.

Speit G, Rothfuss A. 2012. Chapter 6: The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology*. Lotte Bjergbæk (ed.) Nueva York 920:79-90.

Strauss GHS. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research* 252(1):1-15.

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. 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(3):431-444.

Taylor JS. 1994. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. *Accounts of chemical research* 27(3):76-82.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlison B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(3):206-221.

Tice RR, Andrews P, Vasquez M. 1999. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cell, in Integrated Laboratory Systems PO Box 13501. Research Triangle Park, NC, 27709. Páginas: 1-8.

Tyagi R, Rana P, Khan AR, Bhatnagar D, Devi MM, Chaturvedi S, Tripathi RP, Khushu S. 2011. Study of acute biochemical effects of thallium toxicity in mouse urine by NMR spectroscopy. *Journal of Applied Toxicology* 31(7):663-670.

US EPA, Environmental Protection Agency. 2009. Toxicological review of thallium and compounds. In support of summary information on the integrated risk information system (IRIS). Washington, D.C.

Valko M, Morris H, Cronin MTD. 2005. Metals toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161-08.

Villaverde M, Hanzel CE, Verstraeten SV. 2004. *In vitro* interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defense system. *Free Radical Research* 38(9):977-984.

Verstraeten SV. 2006. Relationship between thallium(I)-mediated plasma membrane fluidification and cell oxidants production in Jurkat T cells. *Toxicology* 222(1-2):95–102.

Wei B, Jiang F, Li S, Mu S. 2009. Contamination levels assessment of potential toxic metals in road dust deposited in different types of urban environment. *Environmental Earth Science* 61(6):1187-1196.

WHO, World Health Organization. 1996. Thallium. International Programme on Chemical Safety (IPCS), *Environmental Health Criteria* 192, Ginebra.

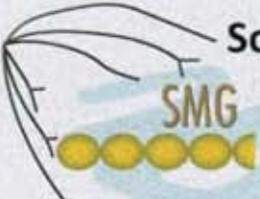
Yildirim M, Ikbal M, Tos T, Seven B, Pirim I, Varoglu E. 2005. Genotoxicity of thallium-201 in patients with angina pectoris undergoing myocardial perfusion study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 206(4):299-304.

Yokel RA, Lasley SM, Dorman DC. 2006. The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxic dynamics and therefore human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 9(1):63-85.

Yoshida M, Igeta S, Kawashima R, Akama Y, Yoshida K. 1997. Changes in adenosine triphosphate (ATP) concentration and its activity in murine tissue after thallium administration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(2):268-73.

Zasukhina GD, Vasilyeva IM, Sdirkova NI, Krasovsky GN, Vasyukovich Lya, Kenesariiev UI, Butenko PG. 1983. Mutagenic effect of thallium and mercury salts on rodent cells with different repair activities. *Mutation Research* 124(2):163-173.

XI. ANEXO



Sociedad Mexicana de Genética A. C.
Universidad Veracruzana
Facultad de Biología Xalapa



Universidad Veracruzana
Facultad de Biología

Otorgan la presente

Constancia a

Guzmán-Cruz Y, Rodríguez-Mercado J J, Hernández-de la Cruz H, Altamirano-Lozano M A

Por la presentación de su trabajo

DAÑO AL ADN EN CÉLULAS DE TEJIDOS DE RATONES CD-1 EXPUESTOS A TALIO

Durante el



NA GEN 2014 ATGG CONGRESO NACIONAL DE GENETICA
30 de Septiembre al 3 de octubre
Xalapa Veracruz



Dra. María del Socorro Fernández
Presidenta de la Sociedad Mexicana de Genética



70
ANIVERSARIO
Universidad Veracruzana
1944-2014



Dra. Clementina Barrera Bernal
Directora de la Facultad de Biología Xalapa
Universidad Veracruzana