



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Biología

**“Evaluación de la viabilidad y el daño al ADN en
células de varios tejidos de ratones macho de la cepa
CD-1 tratados con diferentes dosis de fosforo de
indio (InP)”**

Tesis

Que para obtener el título de

Biólogo

Presenta:

Pérez Dimas Iván

Director: Dra. Lucila Álvarez Barrera

Asesor: Dr. Juan José Rodríguez Mercado



México, D.F.

Septiembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Lucila Álvarez Barrera y la asesoría del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en el Laboratorio de Teratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES Zaragoza UNAM, a cargo del Dr. Mario Altamirano Lozano.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo de PAPIIT-DGAPA-UNAM clave IA 201312

*"A veces sentimos que lo que hacemos
es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara esa gota."*

-Madre teresa de Calcuta-

*"Medir lo que es medible y tratar
de hacer medible lo que todavía no lo es".*

-Galileo Galilei-

Dedicatoria y agradecimientos.

A mi Madre por su amor y su apoyo incondicional, sabes que te amo muchísimo, a ti principalmente está dedicada esta tesis; a mi hermano Antonio, gracias por estar conmigo, por ser amigo y confidente, sabes que puedes contar conmigo; a papá Mario †Q.E.P.D. espero que desde allá arriba estés muy orgulloso de mi.

A mi tía Laura y a mi abuelita Domi, gracias por inculcarme esos buenos valores, pero sobre todo gracias por su cariño, sus consejos y su apoyo.

A mis padrinos Martha e Isidro que aunque tal vez no lo demuestre muy seguido pero los quiero enormemente como mis segundos padres.

A mi tío Wenceslao inspiración de superación en mi vida, a mi tío Silvestre gracias por su apoyo y por compartir conmigo sus anécdotas, conocimientos y filosofía de vida; a mis tíos Emilio, Soledad †, Beatriz, Martha, Paulina, Arturo, Sergio, Blanca, Layo, gracias por su apoyo tíos, los quiero.

A mis primos José, Cristina, Alejandro, Gabriela, Karina, David, Giovanna, Javier, Sebastián e Ismael y en especial a mi primo Arturo a quien admiro y quiero como a un hermano mayor, gracias por tantos buenos momentos, las anécdotas, experiencias y enseñanzas de vida.

A mis amigos que se convirtieron en mis hermanos, quienes han sido mi apoyo en momentos difíciles, psicólogos, y confidentes, un especial agradecimiento a ustedes Eva, Luis y Elías.

A mis amigos y profesores de IPeHZ y CESMAC

A la Dra. Lucila Álvarez gracias por tenerme tanta paciencia, al Dr. Juan José Mercado muchas gracias de todo corazón por sus valiosas aportaciones a este trabajo, al Dr. Mario Altamirano, gracias por su apoyo, al M. en C. Aníbal por compartir conmigo un poco de su sabiduría y sus anécdotas, a la Dra. Elia gracias por enriquecer este trabajo con sus consejos, a la Biol. María Cristina por motivarme, a la Dra. Patricia Velazco por apoyarme y orientarme en los momentos más difíciles de mi carrera.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, gracias por su apoyo, su amistad y buenos momentos en el laboratorio y en especial a Karla y Fabricio, porque sencillamente sin su ayuda esta tesis no existiría, gracias por su apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis amigos, colegas y compañeros de carrera, en especial a Mayra, Lulú, Pilar, Mariel, Inés, Gerardo e Iris quienes me acompañaron en este camino, gracias por apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas.

Al Capitán Ítalo Manca y la señora Amalia, al Ing. Manuel Pérez, al Cap. Guillermo Gordoza, y al señor Pedro Ledezma muchas gracias a todos por su apoyo.

A Fer, gracias por inyectar energía, ilusión y esperanza a esta etapa de mi vida, por alimentar mis sueños, metas y esperanzas, gracias de todo corazón.

Índice

Resumen	1
I. Introducción	2
1.1 Metales	2
1.2 Indio.....	3
1.2.2 Propiedades fisicoquímicas	3
1.2.3 Distribución en la tierra.....	3
1.2.4 Producción e industrialización	4
1.2.5 Usos	4
1.2.6 Toxicidad	5
1.2.7 Exposición	6
1.2.8 Metabolismo	7
1.3 Fosforo de In (InP).....	8
1.3.1 Características generales.....	8
1.3.2 Propiedades fisicoquímicas	8
1.3.3 Toxicidad	8
1.3.4 Genética Toxicológica	9
1.4 Electroforesis unicelular en gel (alcalina)	9
II. Justificación	12
III. Hipótesis	13
IV Objetivos	14
V. Material y métodos	15
5.1 Reactivos	15
5.2 Animales	15
5.3 Hemicastración.....	15
5.4 Tratamientos.....	16
5.5 Obtención de las células	16
5.6 Viabilidad	17
5.8 Grados de daño	18
5.9 Estadística	18
5.10 Diagrama de Flujo.....	19

VI. Resultados	20
6.1 Peso corporal de los animales y peso relativo de los órganos.....	20
6.2 Viabilidad Celular.....	20
6.3 Electroforesis unicelular alcalina.....	23
6.4 Grados de daño.....	27
VII Discusión	32
7.1 Peso corporal y peso relativo de los órganos.....	32
7.2 Viabilidad celular.....	33
7.3 Electroforesis unicelular alcalina.....	34
VIII Conclusiones	41
IX Referencias	42

Resumen

El Indio es un metal pesado utilizado en soldaduras en las industrias eléctricas y electrónicas, en el recubrimiento de cristales, en la elaboración de vidrios ópticos, en la fabricación de diferentes componentes de aparatos electrónicos como televisores, computadoras, teléfonos y reproductores de música; también se emplea en la medicina como radioisótopo para detectar tumores y forma parte de algunas aleaciones aplicadas en la odontología.

Debido a su amplio uso la demanda de fosfuro de indio (InP) se ha incrementado en los últimos años lo cual aumenta el riesgo de que este compuesto se convierta en un contaminante antropogénico. Por ejemplo en la atmosfera del valle de la ciudad de México se encontró In en las partículas de diferentes tamaños: PM10, PM2.5 y PM1 (que son aquellas que tienen diámetros menores a 10 μ) que por sus dimensiones tienden a penetrar profundamente en las vías respiratorias.

Por ello es necesario conocer más sobre este compuesto y sus interacciones con los seres vivos. En este trabajo se evaluó la viabilidad y el daño al ADN en células de distintos tejidos de ratones macho de la cepa CD-1, los cuales primero fueron hemicastrados y después tratados con 500, 1000 y 2000 mg/kg de fosfuro de In (InP) administrado por vía sonda gástrica por 24 horas.

Los resultados mostraron que no existió cambio en el peso de los organismos, pero si una disminución en el peso relativo de corazón, hígado y pulmón. También se encontró disminución significativa de la viabilidad de células pulmonares. Además en todos los tejidos evaluados se observó aumento en el número de células con daño así como en la longitud total de los cometas obtenidos mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel.

Con todo lo anterior se puede concluir que el InP es un agente genotóxico debido a que produjo daño al ADN en los órganos evaluados con las dosis aplicadas en este trabajo.

I. Introducción

1.1 Metales

Metales como el oro, la plata y el cobre, fueron utilizados desde la prehistoria. Al principio, sólo se usaron los que se encontraban disponibles, pero paulatinamente se fue desarrollando la tecnología necesaria para obtenerlos a partir de sus menas. Sin lugar a duda el descubrimiento y empleo de estos elementos ha sido un paso decisivo para el desarrollo de la cultura y la tecnología del ser humano, ya que se han utilizado para elaborar distintos utensilios y herramientas, descubriendo así que existen de todo tipo: preciosos, ferrosos, no ferrosos y pesados, entre otros (Williams, 1990; Beyersmann & Hartwig, 2008).

Los metales pesados son aquellos elementos de la tabla periódica cuya densidad es superior a 5 g/ml ó que tienen un número atómico por encima de 20, excluyendo generalmente a los alcalino y alcalinotérreos (Tiller, 1989; Breckle, 1991; Järup, 2003). Dentro de este grupo se incluyen algunos como el hierro, cobre, selenio y zinc que son esenciales para los organismos vivos en pequeñas cantidades, sin embargo otros son tóxicos como el mercurio, cadmio, plomo y arsénico (Lee *et al.*, 2012).

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre, pero debido a la actividad humana pueden convertirse en contaminantes ambientales, esto puede ocurrir durante la extracción y el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos también ha ocasionado la polución del suelo, agua superficial, subterránea y de ambientes acuáticos (Manahan, 2007; INE, 2013).

Las fuentes de contaminación antropogénicas contribuyen de forma importantemente a la emisión de metales pesados al ecosistema pudiendo ser tóxicos para los seres vivos incluyendo al ser humano, este fenómeno cada vez van en aumento, no solamente por el crecimiento de la población, sino también por el descubrimiento y la aplicación de nuevas tecnologías que favorecen la explotación de metales que antes no eran utilizados, por ejemplo en la industria de la microelectrónica los componentes de silicio están siendo sustituidos paulatinamente por semiconductores fabricados con metales como el galio, talio o indio (Flora, 2000; Tanaka 2004).

1.2 Indio

1.2.1 Antecedentes históricos

El indio (In) fue descubierto por Ferdinand Reich y H.T. Richter en 1863 cuando buscaban talio en minas de zinc, en donde descubrieron un extraño recubrimiento que en el espectrógrafo daba un color azul, debido a esta coloración “índigo” se le confirió el nombre de “indio”, sin embargo no fue hasta 1867 que fue aislado por Ritcher, y su producción comenzó hasta 1926. En 1934 la Corporación de Indio de América identificó la primera aplicación práctica, usándolo como recubrimiento en motores de alto rendimiento de aviones durante la Segunda Guerra Mundial (Jorgenson & George, 2005). Después se ha destinado a nuevas aplicaciones en aleaciones, en soldadura, en la industria electrónica, optoelectrónica, la medicina entre otras (Hines *et al.*, 2013).

1.2.2 Propiedades fisicoquímicas

El In se localiza en el periodo 5, grupo 13 (el grupo del boro), al igual que el galio y el talio es un elemento perteneciente a la familia IIIA de la tabla periódica, es un metal maleable blanco-platinado. Su masa atómica es de 114.82, su número atómico es 49, tiene una densidad de 7.31 g/ml, su punto de fusión es 156.6 °C y su punto de ebullición es 2080 °C. Su configuración electrónica es [Kr] 4d¹⁰5s²5p¹ y sus principales estados de oxidación son: 1+, 2+ y 3+, siendo este último el más estable (Friberg *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2014).

Los compuestos de In son extremadamente insolubles, no se disuelve con sustancias alcalinas, agua hirviendo o con la mayoría de los ácidos orgánicos aunque se disuelve en ácidos minerales (Jorgenson & George 2005; White & Hemond, 2012). De los 24 isotopos conocidos del In, solo 2 se encuentran en la naturaleza, el In⁻¹¹³ el cual es estable y el In⁻¹¹⁵ que es radioactivo (Castronovo & Wagner, 1971; Schwarz-Schampera, 2014).

1.2.3 Distribución en la tierra

El In es un elemento relativamente raro, el promedio de abundancia en la superficie de la tierra es aproximadamente 0.24 ppm siendo en abundancia el elemento número 61 (Jorgenson & George, 2005; Sinclair *et al.*, 2006).

En la corteza terrestre se encuentra a una concentración promedio de 52 µg/kg de sedimento es decir se encuentra a una concentración similar a la de la plata y el

mercurio, dos veces menos que la concentración del magnesio y tres veces menos que la de plomo (White & Hemond, 2012).

Por otro lado en sedimento marino se ha encontrado In en una concentración de 74-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ así como una concentración de 20-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en sedimentos lacustres y en una concentración aproximada de 0.0001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en aguas naturales (White y Hemond, 2012).

1.2.4 Producción e industrialización

La producción e industrialización del In a nivel mundial se está incrementado en los últimos años y es muy posible que se incremente aún más. La mayor producción de In la encabeza China, seguida por Japón, Corea, Canadá y Bélgica. Las minas de zinc y de plomo-zinc son la principal fuente de obtención de In metálico, de las cuales se pudo obtener aproximadamente 670 toneladas métricas en 2012 a nivel mundial, (Alfantazi & Moskalyk, 2003; Jorgenson & George, 2005; White & Hemond, 2012; USGS, 2013).

El In metálico es producido en diversas formas y presentaciones que incluyen: hojas, cintas, lingotes, placas, polvo, pellets y alambres. El principal uso de las hojas es el de conductor ya que tienen una buena actividad tanto térmica como eléctrica; el alambre y el listón son usados en soldaduras y preparación de sellos que soportaran temperaturas criogénicas, los polvos de In metálico, óxido de In, hidróxido de In y aleaciones de In-estaño también son vendidos para la fabricación de distintos productos (Jorgenson & George, 2005; Schwarz-Schampera, 2014).

1.2.5 Usos

De los compuestos de In, los intermetálicos son de gran importancia, en donde se combina con metales preciosos, el grupo del hierro y algunos álcalis; también se puede combinar con metaloides y no metales; formando algunos de los semiconductores más importantes con el antimonio (InSb), el arsénio (InAs) y el fósforo (InP) (Jorgenson & George, 2005).

El In puede formar aleaciones con gran número de metales, algunas con bismuto, cadmio, plomo o estaño son usadas generalmente en aplicaciones involucradas con bajas temperaturas. Sin embargo la más empleada es la conformada por In-estaño (ITO), la cual es utilizada en diversos aparatos electrónicos, debido a que tiene resistencia a la corrosión y a la fatiga térmica, algunos ejemplos son: celdas fotovoltaicas, pantallas planas, de cristal líquido, y de LED'S. La iluminación de fuentes de agua, calculadoras, tabletas electrónicas, bicicletas entre muchas otras, son otros

ejemplos de la utilización de los electrodos fabricados con ITO (Jorgenson & George, 2005; Hines, 2013).

Al mismo tiempo el uso del In como metal sustituto del plomo se ha incrementado para la fabricación de productos libres de plomo (Asakura, 2009), por ejemplo en soldaduras en las industrias eléctricas y electrónicas, en el recubrimiento de cristales, en la elaboración de vidrios ópticos, etcétera (Martin *et al.* 1998).

También es utilizado como material en medicina con propósitos terapéuticos y de diagnóstico ya que se utilizan radioisótopos como el ^{111}In para escaneo de leucocitos y otros órganos, además de su utilización en algunas radioterapias (Gilbert *et al.*, 1978; Fowler, 1986; Jorgenson & George, 2005).

1.2.6 Toxicidad

Los efectos tóxicos del In tienen poco de ser evaluados aunque para el año 2010 ya se habían reportado diez casos de daño pulmonar relacionados con compuestos de In, siete en trabajadores japoneses que desarrollaron neumonía intersticial, dos casos en trabajadores estadounidenses que desarrollaron proteinosis alveolar y pulmonar; y finalmente un caso de proteinosis alveolar en un trabajador chino (Omae *et al.*, 2010). Además existe un caso documentado de muerte, en un trabajador japonés, que laboraba con compuestos de óxido de In-estaño quien falleció después de 4 años de enfermedad a causa de neumotórax bilateral, la autopsia demostró neumonía intersticial además de finas partículas que estaban dispersas por ambos pulmones (Homma *et al.*, 2003).

Por otro lado la toxicidad por inhalación de In como elemento ha sido confirmada en varios experimentos utilizando ratones, ratas y hámsteres, estos experimentos claramente muestran que causa inflamación pulmonar, fibrosis y carcinogénesis; además se ha reportado que la eliminación del In en los pulmones es lenta y sus efectos son prolongados (Asakura *et al.* 2008).

Los compuestos insolubles de In son menos tóxicos al ser administrados por vía oral. La dosis letal de óxido de In equivale a más de 10g/kg. Sin embargo no hay datos disponibles en relación a las dosis letales de compuestos insolubles de In cuando estos son administrados intratraquealmente (Tanaka *et al.*, 2010).

1.2.7 Exposición

La principal causa de exposición a este metal, hasta el momento, es aquella que se da en el ambiente laboral, durante la elaboración de diferentes compuestos de In, en la limpieza y el mantenimiento de reactores, la fabricación de semiconductores y disposición de desechos de la industria electrónica.

Por otro lado la exposición humana a este elemento puede ocurrir de manera natural por el consumo de distintos alimentos como carne de res y de cerdo en donde existen concentraciones de 0.01 mg/kg, y en otros alimentos como algas la concentración es de 0.4-7 mg/kg, y en peces y mariscos la concentración es de 10-15 mg/kg (Fowler, 1986; White & Hemond, 2012).

La exposición humana a través del agua es un poco probable, sin embargo los tubos de hierro galvanizado pueden tener trazas de este metal, se calcula que el promedio de ingesta diaria de In es alrededor de 8-10 μg (Carson *et al.*, 1986)

El In no solamente se encuentra presente en suelo y agua, pues hay reportes que indican la presencia de partículas de In de diferentes tamaños PM10, PM2.5 y PM1 (que son aquellas que tiene diámetros menores a 10 μ) en la atmosfera del valle de la ciudad de México y que por sus dimensiones tienden a penetrar profundamente en las vías respiratorias e interaccionar con ellas (Sepulveda, 2002). Lo anterior probablemente se deba a emisiones de hidrocarburos; ya que el In se encuentra en combustibles fósiles teniendo una concentración promedio de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en carbón y de 1-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en petróleo (White & Hemond, 2012).

Existen otras causas de exposición, algunas como resultado de la utilización de isotopos para escaneo de órganos y en radioterapias para el tratamiento de linfomas e insulinomas (Clarkson *et al.*, 1988; Flora, 2000; Jiménez-Bonilla *et al.*, 2007; Wicki *et al.*, 2007).

Además el In puede entrar al organismo humano de forma oral debido a que se encuentra en cerca del 2-4% del material utilizado para la elaboración de dentaduras, coronas, puentes e incrustaciones dentales (Churnjitapirom *et al.*, 2004; Asakura *et al.*, 2008).

1.2.8 Metabolismo

Las principales rutas de entrada del In al organismo son por inhalación o por ingestión, para las personas que están expuestas de forma ocupacional la principal ruta de entrada es la inhalada, aunque el uso del In en la nanotecnología podría incrementar la posibilidad de absorción dérmica en los ambientes de trabajo donde se utiliza este elemento (Fowler & Sexton, 2002).

En cuanto a su distribución cabe mencionar que el In en su forma iónica es transportado a la sangre unido a la transferrina (Hoisain *et al.*, 1969; Castronovo & Wagner, 1973; Zang *et al.*, 2004) y claramente ha sido encontrado 3 días después de la administración en sangre de ratones administrado vía intravenosa (Castronovo & Wagner, 1971).

La distribución en los tejidos está determinada por la forma química en que se presenta el metal. El In iónico es ampliamente acumulado por riñón mientras que el óxido de In coloidal es acumulado por hígado, bazo y sistema reticuloendotelial. (Castronovo & Wagner, 1971).

De igual manera, la ruta principal de excreción del In está determinada por su forma química, por ejemplo el In iónico es principalmente excretado por la orina, mientras que el óxido de In coloidal es eliminado en las heces (Castronovo & Wagner, 1971; 1973).

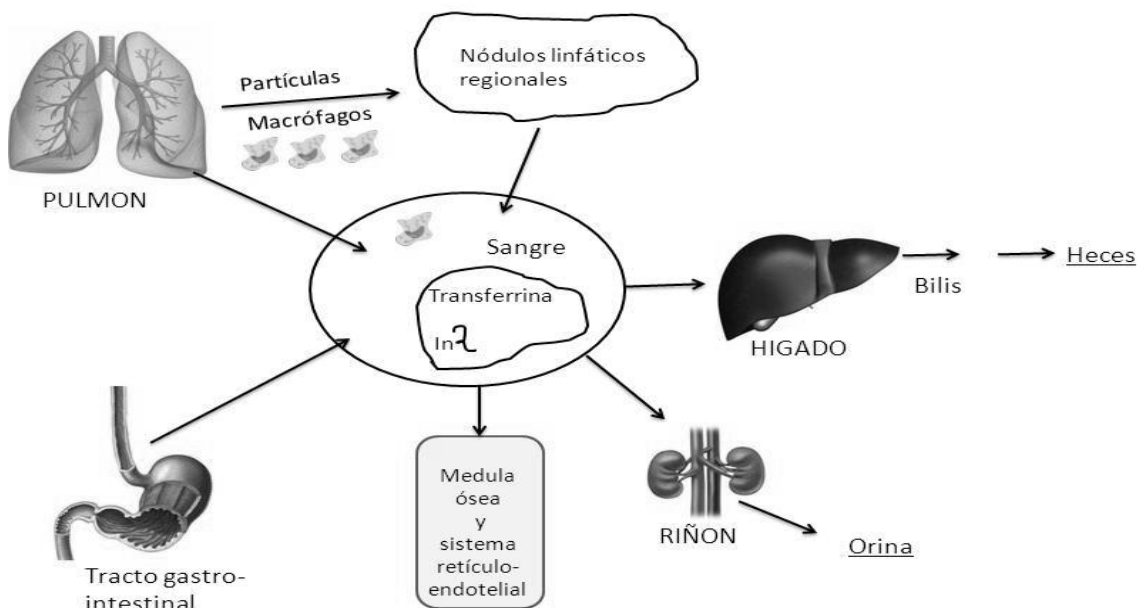


Figura 1. Diagrama general de la distribución del Indio *in vivo* y su unión con la transferrina en la circulación. Diagrama modificado de Fowler, (2007).

1.3 Fosfuro de In (InP)

1.3.1 Características generales

A finales de la década de 1980 se despertó el interés en el empleo del fosfuro de In en la producción de semiconductores y películas delgadas de óxidos de In y estaño para el desarrollo de pantallas de cristal líquido (LCD). Esto es debido a que el uso del In permitió la obtención del color azul en diodos emisores de luz (LED), que había sido un problema durante años (Jorgenson & George 2005). Desde entonces el InP se ha convertido en uno de los semiconductores más importantes del grupo III-V utilizado en dispositivos optoelectrónicos tales como diodos emisores de luz, fotodiodos, diodos laser, baterías solares, por mencionar algunos (Kabe, 1996; Hines, 2013).

1.3.2 Propiedades fisicoquímicas

El InP posee una apariencia de cristales cúbicos color negro, una masa molecular de 145.79, un punto de fusión de 1062 °C, una densidad de 4.81 g/cm³, no es soluble en agua, pero reacciona con soluciones acidas produciendo hidrogeno, fosforo y fosfina (Kabe, 1996).

1.3.3 Toxicidad

El InP debido a su creciente demanda es blanco de nuevos estudios para observar las reacciones adversas que este compuesto puede provocar al organismo, por lo cual ha sido probado en ratas mostrando un efecto tóxico y carcinogénico al exponer al organismo a partículas en aerosol que son inhaladas. Por ello la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) lo ha clasificado como posible carcinógeno en humano en el grupo "2A", por otro lado la comisión MAK (comisión alemana para la investigación de peligros a la salud por compuestos químicos en el área de trabajo) lo ha ubicado en el grupo "2" en el cual se agrupan las sustancias que pueden ser carcinógenas en humanos basados en resultados de varios experimentos realizados en animales (Oda, 1997; IARC, 2006; Beyersmann & Hartwig, 2008).

En estudios previos se ha observado que el InP produce un efecto en el peso de pulmones y bazo de ratones de la cepa ICR, además de que se observaron gránulos negros de InP depositados en los nódulos linfáticos, bazo, pulmón e hígado al ser administrados vía oral (Kabe, 1996).

1.3.4 Genética Toxicológica

La genética toxicológica es el estudio sistemático de como los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente afectan al sistema genético de los organismos causando daño al ADN, aberraciones estructurales en los cromosomas o en general mutaciones en el genoma (Andrae & Speit, 2008).

El Programa Nacional de Toxicología (NTP) ha realizado experimentos con ratones de la cepa B6C3F expuestos a partículas inhaladas de InP, revelando un incremento no significativo en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos en machos y ningún incremento en hembras (NTP, 2001).

Además existen reportes de genotoxicidad de In en líneas celulares CHL/IU incrementando en menos del 5% de aberraciones cromosómicas en cada uno de los distintos tratamientos (Asakura *et al.* 2009).

Cabe mencionar que en el laboratorio de teratogénesis de la FES Zaragoza UNAM se realizó un estudio con ratones machos de la cepa CD-1 los cuales fueron tratados con 5, 10 ó 20 mg de InP en una dosis aguda de 24 horas. Encontrando que el compuesto no provoco efectos tóxicos ni citotóxicos y al utilizar la técnica de electroforesis unicelular alcalina, el número de órganos que mostraron células con daño al ADN se incrementó conforme lo hacia la dosis 2 órganos en la dosis de 5 mg, 3 en la de 10 mg y 4 en la de 20 mg (Beltrán, 2011).

1.4 Electroforesis unicelular en gel (alcalina)

Östling y Johanson fueron los primeros en desarrollar la técnica de la electroforesis en gel para detectar el daño al ADN. En su técnica, las células eran embebidas en agarosa y colocadas en un portaobjetos, posteriormente eran tratadas con una solución de lisis que contenía sales y detergentes, una vez liberado el ADN realizaron un proceso de electroforesis en condiciones de pH neutro, las células con una frecuencia más alta de rompimientos de doble cadena migraron hacia el ánodo, esta migración fue cuantificada mediante una tinción con bromuro de etidio y medida por la intensidad de la fluorescencia (Tice *et al.*, 2000; García *et al.*, 2011).

Posteriormente Singh y colaboradores en 1988 introdujeron una técnica de electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas (pH>13), llamada también “ensayo cometa”, para detectar daño al ADN en células individuales. A este pH hay un incremento en la migración del ADN que está relacionado con rompimientos de cadena sencilla algunos asociados con una incompleta reparación por escisión y sitios álcali sensibles, debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos inducen este tipo

específico de daño, esta versión ofrece una gran sensibilidad para detectar dichos compuestos (Tice *et al.*, 2000; García *et al.*, 2011).

Las ventajas de esta técnica incluyen: sensibilidad para detectar niveles bajos de daño al ADN, requiere cantidades pequeñas de muestra, es una técnica flexible y es de relativo fácil manejo, los datos se pueden obtener a nivel de células individuales y puede utilizarse cualquier célula eucariota tanto *in vivo* como *in vitro* incluyendo humanas y organismos acuáticos expuestos a diversos agentes (Tice *et al.*, 2000; Çelik *et al.*, 2013).

En el ensayo cometa también es importante la utilización de una prueba de citotoxicidad para la interpretación de los datos, es por eso que se utiliza una doble tinción basada en la combinación de 5-6 diacetato de carboxifluoresceína y bromuro de etidio, para identificar células que son metabólicamente competentes y/o tienen su membrana celular comprometida (Tice *et al.*, 2000).

La electroforesis unicelular alcalina es ampliamente utilizada en sistemas *in vivo* ya que es muy útil para las pruebas órganos blanco/órgano, donde es posible analizar el daño de hebras de ADN. Una de las ventajas de la EUG son que las lesiones del ADN pueden ser medidas en ausencia de actividad mitótica, y que la genotoxicidad de cada órgano de mamífero puede ser detectada. Sin mencionar que entre las ventajas más importantes de trabajar con un modelo *in vivo* resalta el hecho de poder observar el metabolismo, la excreción, y el comportamiento del organismo frente a los compuestos administrados (Seikihashi *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2012).

Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Se requieren tanto para proyectos de investigación, como en pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos (Andrees, 1992).

Entre las diferentes especies animales los ratones son los más ampliamente usados en una variedad de diseños para estudio de toxicidad genética, ya que es un mamífero pequeño, de fácil manejo, prolifero, dócil, fácilmente domesticable, se desarrolla bien en cautiverio, con requerimiento mínimo de espacio y alojamiento, de dieta omnívora y genéticamente caracterizado y sobre todo representa un modelo ideal para el estudio de la genética humana, ya que por ser un mamífero se tiene una similitud funcional con el hombre (OPS/OMS 1980; Rodríguez, 2007; Nowrouzi *et al.*, 2013; Andrees, 1992; Hwang *et al.*, 2014).

Al utilizar al ratón como modelo de prueba se pueden realizar ensayos *in vivo*, en los cuales se puede evaluar el daño genotóxico y mutagénico ya que, en general, el ratón tiene una alta frecuencia metabólica en comparación con otras especies, lo que resulta en un incremento o disminución de la toxicidad dependiendo del mecanismo de intoxicación. Además debido a su tamaño, las dosis que se requieren son usualmente proporcionales a su peso corporal (OPS/OMS 1980; Rodríguez, 2007; Nowrouzi *et al.*, 2013; Andrees, 1992; Hwang *et al.*, 2014).

II. Justificación

La creciente demanda de indio para la producción de semiconductores utilizados en aparatos electrónicos de última generación ha provocado que los trabajadores de la industria microelectrónica estén en contacto con diversos compuestos de este elemento, hasta el año 2010 se había reportado 10 casos de daño pulmonar a nivel mundial por este tipo de exposición laboral.

La toxicidad por inhalación de partículas de In ha sido confirmada en varios experimentos utilizando ratones, ratas y hámsteres, donde se demuestra que el In afecta el pulmón provocando inflamación, fibrosis y carcinogénesis, razón por la cual la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2006) lo ha clasificado como posible carcinógeno en humano en el grupo 2A. Sin embargo los efectos de la ingestión de partículas de In, la cual es la segunda fuente importante de entrada al organismo por parte de este elemento no han sido reportados.

Debido a lo anterior y a que el In es utilizado en material odontológico, en la producción de aparatos de última generación como son televisores, computadoras, teléfonos y reproductores de música, los cuales tienen en sus componentes semiconductores fabricados a base de fosfuro de indio; esto sumando sus usos en medicina como radioisótopo para detectar tumores y además de la presencia de partículas de In en la atmosfera de la ciudad de México hace necesario ampliar el conocimiento de los efectos tóxicos de este metal y sus compuestos.

Por lo tanto con la finalidad de evidenciar los efectos del indio *in vivo*, se decidió administrar InP a ratones macho de la cepa CD-1 para evaluar la viabilidad y el daño al ADN en células de diferentes tejidos afectados por el compuesto al administrarse por vía oral mediante una sonda gástrica.

III. Hipótesis

Los compuestos de In provocaron daño severo en pulmones de trabajadores expuestos y en algunos experimentos con animales de laboratorio se observaron efectos tóxicos, inflamación pulmonar e indicios de carcinogénesis. En un trabajo realizado anteriormente en el laboratorio de Teratogénesis se encontró que la administración vía sonda gástrica de las dosis 5, 10 y 20 mg de fosforo de In a ratones macho de la cepa CD-1, no provocó efectos tóxicos ni citotóxicos y al utilizar la técnica de electroforesis unicelular, el número de órganos que mostraron células con daño al ADN se incrementó conforme lo hacia la dosis (2 órganos en la dosis de 5 mg, 3 en la de 10 mg y 4 en la de 20 mg).

Por lo tanto se espera que al administrar fosforo de In en dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg, se incremente la toxicidad celular, disminuya la viabilidad y se incremente el número de células con daño al ADN en los órganos evaluados.

IV Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar la viabilidad y el daño al ADN en células de distintos tejidos de ratones macho de la cepa CD-1 tratados con diferentes dosis de fosforo de In (InP), administrado vía sonda gástrica en un tratamiento de 24 horas.

4.2 Objetivos particulares:

- Evaluar la viabilidad con la técnica descrita por Strauss en 1991 en las células de pulmón, testículo, corazón, estomago, hígado, sangre y riñón de los ratones tratados con diferentes dosis de InP.
- Evaluar el daño al ADN mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina en células de pulmón, testículo, corazón, estomago, hígado, sangre y riñón de los ratones tratados con diferentes dosis de InP.

V. Material y métodos

5.1 Reactivos

Se aplicó fosforo de In (InP, Cas: 22398-80-7 del Laboratorio Sigma-Aldrich Co. St Louis MO, EUA, pureza: 99.998%) el cual se maceró finamente con ayuda de una varilla de vidrio en un tubo de ensayo y se utilizó aceite de maíz vegetal como vehículo para poder realizar una suspensión que arrastrar a el compuesto a la hora de la administración ya que el InP no es soluble en agua. Administrándose tres diferentes dosis: 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal de este compuesto.

Todos los reactivos utilizados en la técnica de electroforesis unicelular alcalina fueron comprados de Sigma-Aldrich Co. St Louis MO, EUA, con excepción del peróxido de hidrógeno proveniente de Riedel de Hiên; y el cloruro de sodio y etanol, de Baker de México.

5.2 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 obtenidos del bioterio de la FES Zaragoza UNAM, de dos a tres meses de edad con un promedio de peso de 38 gramos, mantenidos en condiciones controladas de: luz/oscuridad (12:12), humedad al 45% y temperatura en la sala de 22 °C; con libre acceso a agua y alimento (Harlan Laboratories 2018S). Durante el transcurso del trabajo los animales fueron pesados antes y después del tratamiento en una balanza digital (Ohaus modelo SC2020) y revisados en su apariencia externa es decir buena textura del pelo, ausencia de protuberancias, etc.

5.3 Hemicastración

Previo a la hemicastración el ratón se pesó y se le tomó una muestra de sangre de la cola, la cual fue colocada en un tubo eppendorf heparinizado, de este tubo se tomó 40 µl para realizar una prueba de viabilidad y 10 µl para realizar las láminas de electroforesis.

Los ratones de todos los grupos fueron sometidos a una operación quirúrgica entre las 11 y las 13 hrs, la cual consistió en extraer uno de los testículos del animal (hemicastración) con la finalidad de utilizarlo como testigo negativo y compararlo con el restante después del tratamiento.

En todos los ratones hemicastrados siempre se removió el testículo derecho, se pesó en una balanza digital, se macero en un tubo con 3 ml de PBS a 37 °C con el fin de

obtener una suspensión celular para realizar pruebas de viabilidad y electroforesis; después de la operación quirúrgica el ratón se mantuvo en reposo durante 24 horas.

5.4 Tratamientos

En el cuadro 1 se observan los distintos tratamientos a los cuales fueron sometidos los grupos de ratones

Cuadro1.- Administración de los distintos grupos de ratones

Tratamiento en mg/kg	Vehículo	Tratamiento
0 (Testigo -)	0.6 ml de aceite de maíz	Tratamiento agudo de 24 hrs. Una sola aplicación vía sonda gástrica
500 InP		
1000 InP		
2000 InP		
32 CdCl ₂ (Testigo +)	0.6 ml de agua	

El número de ratones administrados fue de 5 animales por grupo. La administración de los diferentes grupos se realizó a las 13hrs.

Se eligió al cloruro de cadmio (CdCl₂) como testigo positivo ya que su actividad mutagénica ha sido demostrada en células V79 de hámster chino y en células L5178Y de linfoma de ratón. Además han sido reportados rompimientos de una sola hebra de ADN en células de hámster chino tratadas con este compuesto (Ochi & Ohsawa, 1983). También se han observado rompimientos en el ADN en diferentes tejidos de ratas tratadas con CdCl₂ (Saplakoglu & Iscan, 1997). Y existen reportes de que el CdCl₂ induce un daño genotóxico en varios órganos de ratón de la cepa CD-1 cuando se administra por vía inhalada (Valverde *et al.*, 2000). Y en pruebas donde el CdCl₂ se ha administrado de forma oral a roedores ha demostrado causar rompimientos de cadena sencilla evaluados por el método de electroforesis unicelular alcalina (Devi *et al.*, 2001).

5.5 Obtención de las células

Se registró el peso corporal del ratón para posteriormente sacrificarlo por dislocación cervical y obtener los siguientes órganos: pulmón, testículo, corazón, estomago, hígado y riñón; estos fueron pesados con excepción del estómago en una balanza analítica para posteriormente obtener el peso relativo de cada órgano con la formula

$$\text{Peso relativo} = (\text{peso del órgano} / \text{peso del ratón}) \times 100.$$

Después de registrar su peso, los órganos se maceraron individualmente en frascos con 3 ml. de PBS (Buffer salino de fosfatos). Se dejaron reposar durante 5 minutos

aproximadamente, se tomó 1 ml. del sobrenadante de cada frasco y se colocaron en dos tubos eppendorf diferentes. Posteriormente se centrifugaron a 7000 rpm durante 6 minutos, para obtener un botón celular, y se procedió a realizar las técnicas de viabilidad y electroforesis.

5.6 Viabilidad

A uno de los tubos eppendorf antes obtenidos de cada órgano se les agregó 20 µl de una mezcla 1:1 de bromuro de etidio [0.125 µg/ml] con 5-6 diacetato de carboxifluoresceína [0.025 µg/ml]. Se dejó incubar el colorante durante 10 min protegido de la luz, pasados los 10 min se agregó 1 ml de PBS a cada tubo, y se colocaron en un agitador de toque vórtex, posteriormente se centrifugaron a 7000 rpm durante 6 minutos y se realizaron 2 lavados más con PBS. Una vez completados los 3 lavados se tomaron 20µl del botón celular y se coloraron en un portaobjetos, se les colocó encima un cubreobjetos y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se revisaron 100 células determinando si eran viables (color verde), no viables (color rojo) o células comprometidas (anaranjadas) a un aumento de 400 X.

5.7 Electroforesis unicelular en gel (alcalina)

Se tomaron 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión y se mezclaron con 10 µl de preparación celular (botón obtenido de la centrifugación previa) y se depositó la mezcla sobre un portaobjetos previamente cubierto con una capa de agarosa de punto normal de fusión al 1%. Se cubrió la preparación con un cubreobjetos y se colocó sobre una placa de hielo, hasta que la agarosa se solidificó. Se retiró el cubreobjetos y se aplicó una tercera capa de agarosa (75 µl); una vez seca la tercera capa, se retiró el portaobjetos y se colocó en una caja con solución de lisis fría (6.5 ml de DMSO, 0.65 ml triton x-100, 58.85 ml de solución stock de lisis). Se dejó a una temperatura de 4 °C y protegido de la luz durante una hora como mínimo.

Después del tiempo de reposo se removieron las láminas con cuidado de la solución de lisis y se enjuagaron con agua destilada durante 5 minutos en una caja coplin.

Se colocaron en la cámara de electroforesis las láminas lado con lado lo más cerca posible de forma horizontal entre las líneas rojas de la caja con el esmeril hacia arriba y de lado izquierdo; y su repetición enfrente de esta entre las líneas rojas. Siempre se colocó un testigo positivo realizado con 40 µl de sangre y 50 µl de una solución stock de peróxido de hidrogeno 100 M, con la finalidad de asegurar el correcto funcionamiento de la cámara de electroforesis. Se rellenó la caja de electroforesis con solución buffer (60 ml NaOH 10 N, 10 ml EDTA 200 mM aforados a 2000 ml) recién

preparada hasta cubrir las láminas. Dejándose en la solución durante 20 minutos para el desenrollamiento de la molécula de ADN.

Se encendió la fuente de poder y se regulo a 25 Voltios y 300 miliamperios. Se dejó pasar corriente durante 20 min. Posteriormente se apagó la fuente de poder y se retiraron cuidadosamente las láminas del buffer y se colocaron en las cajas coplin con solución de neutralización (Tris 0.4 M a pH 7.5) durante 5 min y se realizaron otros 2 lavados más con esta solución. Se realizaron 2 fijaciones de 5 min en alcohol del 70% y alcohol 100% respectivamente. Finalmente se dejaron secar y se almacenaron hasta el momento de su lectura al microscopio.

Al momento de revisar las láminas en el microscopio de fluorescencia se agregó 50 μ l de Bromuro de Etidio y se observaron a 400x y con filtro de excitación de 515-560 nm (Rodamina). Se revisaron 100 células por órgano (50 células por lámina) y se registró cuantas de ellas presentaban daño o no. Las células que no presentaron cometa (no migraron) únicamente se les tomo la medida de sus diámetros en tanto que a las células que presentaron formas de cometa se les midió la longitud de la cola y el diámetro de su cabeza, así como su longitud total.

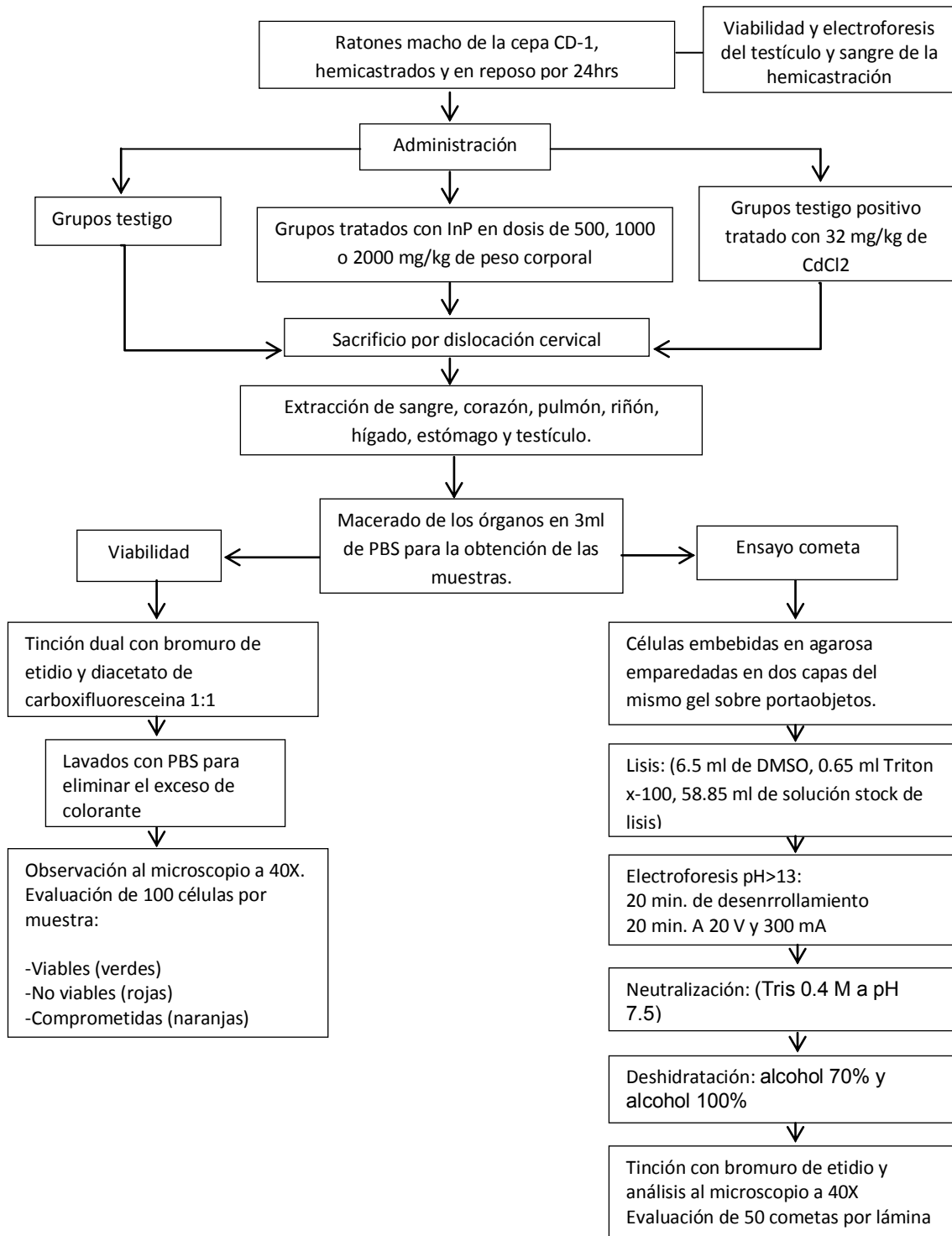
5.8 Grados de daño

Se realizó una categorización de los grados de daño la cual es una forma de representar el nivel de daño producido después de la prueba de electroforesis, esta clasificación se realizó con la relación de la longitud de la cola entre la longitud de la cabeza, ubicando en el grado 0 (sin daño) a aquellas que no presentaban cola, en el grado 1 (daño bajo) aquellas cuyas colas midieran hasta 1 cabeza, en el grado 2 (daño medio) aquellas colas que midieran hasta 2 cabezas y en el grado 3 (daño alto) más de 3 cabezas.

5.9 Estadística

Para conocer las diferencias significativas al peso de los ratones y el de los órganos se les aplico la prueba de "t de Student". La viabilidad y los grados de clasificación de daño de los cometas fue analizada con la prueba de Z de diferencia de proporciones, mientras que para la longitud total del cometa se utilizó un análisis de varianza seguida de la prueba de Dunett. El número de animales fue de 5 por grupo. Los resultados están representados por la media \pm la desviación estándar. Se leyeron en total 100 células por órgano por animal en cada uno de los grupos.

5.10 Diagrama de Flujo



VI. Resultados

6.1 Peso corporal de los animales y peso relativo de los órganos

En el cuadro 2 se muestra el promedio del peso de los animales en los grupos antes y después del tratamiento, así como la media de los pesos relativos de los testículos, donde se puede observar que no existe variación en ninguno de los dos parámetros después del tratamiento de 24 horas con InP con respecto al grupo testigo.

En el cuadro 3, se muestran los pesos relativos de corazón, pulmón, riñón e hígado de los grupos tratados, donde se observa que no existen cambios en la mayoría de los órganos, sin embargo disminuyó el peso del hígado en la dosis de 1000 y de pulmón y corazón en la dosis de 2000 mg/kg.

6.2 Viabilidad Celular

En el cuadro 4, se muestra el promedio del porcentaje de células viables para cada uno de los grupos tanto antes como después del tratamiento con InP. Se puede observar que en todos los grupos el promedio fue mayor a 80% de células vivas. Para sangre y testículo la estadística se realizó comparando el grupo de antes vs el grupo de después del tratamiento.

La viabilidad de los demás órganos de los grupos tratados se comparó con los datos del grupo testigo. Se puede observar que en pulmón la viabilidad disminuyó significativamente en la dosis de 2000 mg/kg, aunque sigue conservándose por arriba del 80% de viabilidad celular.

Cuadro 2. Peso corporal de los animales y peso relativo del testículo antes y después del tratamiento con fosforo de In

Grupo	Peso en gramos			
	Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
	Ratón	Testículo derecho	Ratón	Testículo izquierdo
Testigo	38.38 ± 5.10	0.29 ± 0.06	37.36 ± 4.24	0.27 ± 0.04
Tratados con InP				
500 mg/kg	38.78 ± 4.37	0.30 ± 0.05	38.46 ± 4.10	0.25 ± 0.02
1000 mg/kg	35.00 ± 3.81	0.32 ± 0.02	33.90 ± 3.61	0.28 ± 0.03
2000 mg/kg	41.50 ± 2.42	0.27 ± 0.04	39.88 ± 2.85	0.27 ± 0.02
Tratado con CdCl₂				
32 mg/kg	37.0 ± 7.29	0.38 ± 0.02	36.23 ± 7.11	0.33 ± 0.04

5 ratones en cada grupo.
 Datos: Medias ± desviación estándar.

Cuadro 3. Peso relativo de los órganos después del tratamiento con fosforo de In

Grupos	Peso de los distintos órganos en gramos			
	Corazón	Pulmón	Riñón	Hígado
Testigo	0.53 ± 0.11	0.88 ± 0.05	0.73 ± 0.1	5.32 ± 0.47
Tratados con InP				
500 mg/kg	0.43 ± 0.07	0.78 ± 0.18	0.66 ± 0.07	5.05 ± 0.57
1000 mg/kg	0.42 ± 0.04	0.93 ± 0.14	0.71 ± 0.1	4.55 ± 0.47*
2000 mg/kg	0.41 ± 0.03*	0.76 ± 0.06*	0.76 ± 0.04	4.92 ± 0.41
Tratado con CdCl₂				
32 mg/kg	0.47 ± 0.05	0.75 ± 0.16	0.67 ± 0.11	5.09 ± 1.23

* $P < 0.05$, comparado con el grupo testigo, prueba de t de student.

6.2 Viabilidad celular de los distintos grupos

Cuadro 4. Viabilidad celular antes y después del tratamiento agudo con InP.

Grupo	Pre-tratamiento		Post-tratamiento						
	Sangre	Testículo	Sangre	Testículo	Corazón	Pulmón	Riñón	Hígado	Estomago
Testigo	97.82 ± 0.83	95.60 ± 2.29	97.82 ± 1.27	98.01 ± 1.39	94.53 ± 3.61	98.21 ± 1.30	94.05 ± 2.87	92.06 ± 3.87	93.03 ± 5.53
Tratados con InP									
500 mg/kg	96.61 ± 2.85	97.04 ± 1.36	96.41 ± 2.84	94.41 ± 1.79	96.20 ± 1.09	95.37 ± 1.50	90.57 ± 4.86	89.39 ± 4.57	91.05 ± 4.57
1000 mg/kg	97.82 ± 1.78	96.23 ± 2.58	96.23 ± 2.23	95.04 ± 2.66	96.80 ± 1.64	93.63 ± 2.83	92.46 ± 3.34	92.03 ± 4.31	90.50 ± 5.27
2000 mg/kg	98.21 ± 0.82	95.45 ± 4.51	95.86 ± 1.46	93.23 ± 1.28	95.62 ± 1.81	88.49 ± 6.96*	93.29 ± 1.89	89.60 ± 4.61	88.74 ± 5.52
Tratado con CdCl₂									
32 mg/kg	99.00 ± 1.00	98.80 ± 1.30	86.51 ± 9.27* ^o	84.77 ± 11.62* ^o	87.50 ± 9.37	83.27 ± 9.83*	87.80 ± 4.55	85.86 ± 10.29	78.57 ± 12.51*

* $P < 0.05$, en comparación con el grupo testigo, prueba de Z de diferencia de proporciones.

^o $P < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento, prueba de Z de diferencia de proporciones.*

Datos: Medias ± desviación estándar.

6.3 Electroforesis unicelular alcalina

En los cuadros 5, 6 y 7 se pueden observar los datos obtenidos después de someter a las células a la prueba de electroforesis, en estos se muestran la longitud total del cometa, la cabeza más la cola, además del porcentaje de células con daño para cada uno de los grupos.

En el cuadro 5 se muestran los datos de las células sanguíneas de los ratones tratados, como se puede observar existe un aumento significativo en la longitud total del cometa y en el porcentaje de células con daño, al comparar los grupos antes y después del tratamiento. También se puede apreciar diferencias estadísticas al comparar únicamente los grupos post-tratamiento con su testigo. Cabe mencionar que la dosis de 1000 mg/kg fue la que presentó cometas con mayor longitud total y un mayor porcentaje de células con daño con respecto a los demás grupos.

En el cuadro 6 se muestran los datos obtenidos de las células testiculares, pequeñas y grandes, se puede observar que los datos del testículo derecho el cual fue removido al momento de la hemicastración no difieren significativamente entre grupos del pre-tratamiento. Sin embargo después del tratamiento con InP las células testiculares presentan un aumento, tanto en la longitud del cometa como en el porcentaje de células con daño. También se pueden ver diferencias estadísticas al comprar únicamente los grupos post-tratamiento con su testigo.

En el cuadro 7 se muestran los datos de los demás órganos analizados, se puede observar el incremento en ambos parámetros después del tratamiento agudo con InP. Además los distintos órganos responden diferente a las dosis administradas siendo corazón, riñón y estomago los que presentan mayor longitud de cometa así como un aumento en el porcentaje de células con daño en la dosis de 1000 mg/kg, mientras que en la dosis de 2000 mg/kg fueron hígado y pulmón.

Cuadro 5. Longitud total del cometa y porcentaje de células sanguíneas con daño antes y después del tratamiento con InP

Grupos	Longitud en μm (células con daño en %)	
	Pre-tratamiento	Post-tratamiento
Testigo	24.92 \pm 7.58 (10.4)	29.84 \pm 17.52(9.2)
Tratados con InP		
500 mg/kg	24.73 \pm 6.58(10)	45.14 \pm 35.55 (58.6)*°
1000 mg/kg	25.60 \pm 11.64(9.4)	61.26 \pm 43.49 (71.6)*°
2000 mg/kg	24.48 \pm 14.41(11.4)	37.20 \pm 35.60 (39.6)*°
Tratado con CdCl₂		
32 mg/kg	26.34 \pm 8.04(14)	59.48 \pm 42.83 (77)*°

* $P < 0.05$ en comparación con el grupo testigo post-tratamiento

° $P < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos en el pre- tratamiento con un análisis de varianza y una prueba de Dunnett.

Cuadro 6. Longitud del cometa y porcentaje de células testiculares con daño antes y después del tratamiento con InP

Grupo	Longitud en μm (% de células con daño)			
	Pre-tratamiento: testículo derecho		Post-tratamiento: testículo izquierdo	
	Células pequeñas	Células grandes	Células pequeñas	Células grandes
Testigo	28.77 \pm 7.27 (5.8)	39.20 \pm 6.62 (5.4)	30.71 \pm 10.38 (26.8)	44.04 \pm 11.55 (31.8)
Tratados con InP				
500 mg/kg	27.57 \pm 7.63 (3.6)	39.59 \pm 7.13 (2.8)	46.95 \pm 36.39 (53.8)* ^o	67.61 \pm 40.30 (64.6)* ^o
1000 mg/kg	26.79 \pm 3.46 (2.0)	38.70 \pm 3.94 (0.8)	46.28 \pm 22.06 (72.6)* ^o	73.00 \pm 43.29 (73.2)* ^o
2000 mg/kg	28.10 \pm 7.77 (9.0)	40.08 \pm 8.54 (7.2)	43.89 \pm 36.52 (34.8)* ^o	52.95 \pm 31.99 (31.2)* ^o
Tratado con CdCl₂				
32 mg/kg	30.35 \pm 15.18 (14.8)	45.14 \pm 14.93 (20.6)*	47.96 \pm 24.29 (74.2)* ^o	65.91 \pm 28.50 (77.4)* ^o

* $P < 0.05$ en comparación con el grupo testigo post-tratamiento

^o $P < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento con un análisis de varianza y una prueba de Dunnett.

Cuadro 7. Longitud del cometa y porcentaje de células con daño en los órganos de los ratones tratados con InP.

Grupo	Longitud en μm (% de células con daño)				
	Corazón	Pulmón	Riñón	Hígado	Estomago
Testigo	39.48 \pm 14.15(8.8)	33.30 \pm 15.64 (14.8)	33.08 \pm 8.72(9.8)	39.55 \pm 7.60(4.2)	30.07 \pm 28.30(14)
Tratados con InP					
500 mg/kg	48.16 \pm 28.96 (45.0)*	52.15 \pm 35.13 (50.6)*	61.75 \pm 44.03 (52.2)*	47.87 \pm 26.63 (18.8)*	49.82 \pm 56.50 (22.6)*
1000 mg/kg	56.39 \pm 42.21 (54.2)*	48.68 \pm 41.72 (30.2)*	59.50 \pm 40.82 (55.8)*	44.66 \pm 22.46 (12.4)	62.64 \pm 62.87 (36.2)*
2000 mg/kg	48.31 \pm 35.93 (25.2)*	65.58 \pm 47.92 (56.0)*	46.31 \pm 30.85 (37.6)*	51.62 \pm 33.41 (19.0)*	43.91 \pm 54.63 (16.4)*
Tratado con CdCl₂					
32 mg/kg	65.67 \pm 59.95 (40.8)*	81.81 \pm 55.05 (78.6)*	86.56 \pm 47.85 (70.8)*	71.23 \pm 46.85 (40.8)*	60.96 \pm 56.99 (38.0)*

* $P < 0.05$ en comparación con el grupo testigo con un análisis de varianza y una prueba de Dunnett.

6.4 Grados de daño

En figura 2 se muestra la distribución del grado de daño para células sanguíneas antes y después del tratamiento con InP, en donde se observa un incremento en los grados de daño al comparar los datos obtenidos de los grupos pre-tratados y post-tratados.

En las figuras 3 y 4 se muestra la distribución del grado de daño para el caso de células pequeñas y grandes de testículo. Donde se puede observar un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células que presentan distintos grados de daño después del tratamiento con InP así como una disminución de las células que no presentan daño.

En los demás órganos (figuras 5-9), las células con diferentes grados de daño fueron comparados con el grupo testigo.

Todos los órganos muestran un incremento en el porcentaje de células que presentan distintos grados de daño después del tratamiento, también existe una disminución en el porcentaje de células sin-daño.

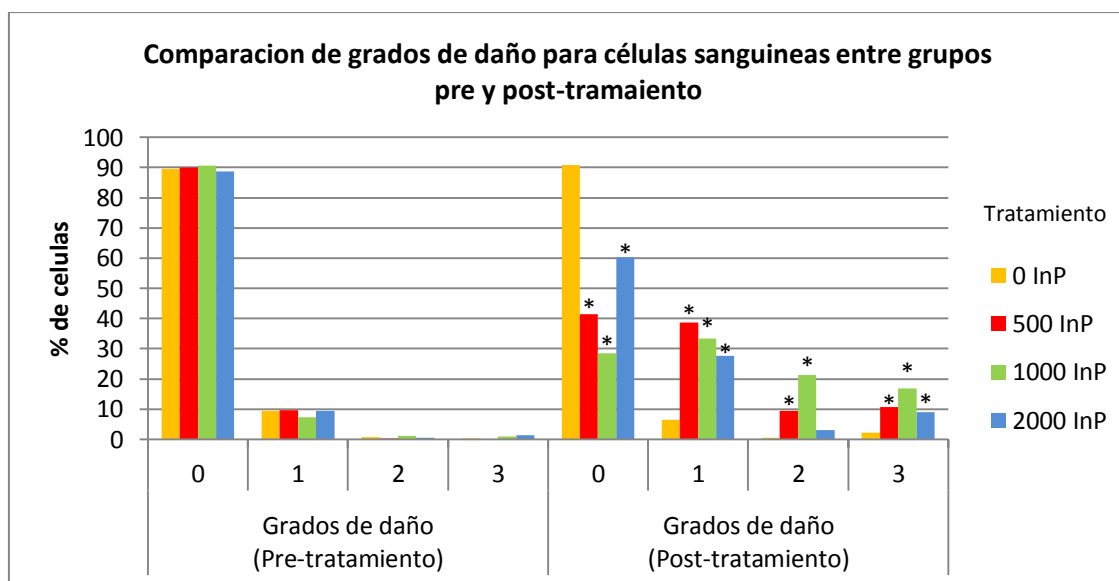


Figura 2. Distribución del grado de daño en células sanguíneas de ratones pre-tratados y post-tratados con 500, 1000 o 2000 mg/kg de InP. La comparación de los datos de los grupos tratados se realizó con los datos obtenidos de los ratones de los grupos pre-tratados. Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

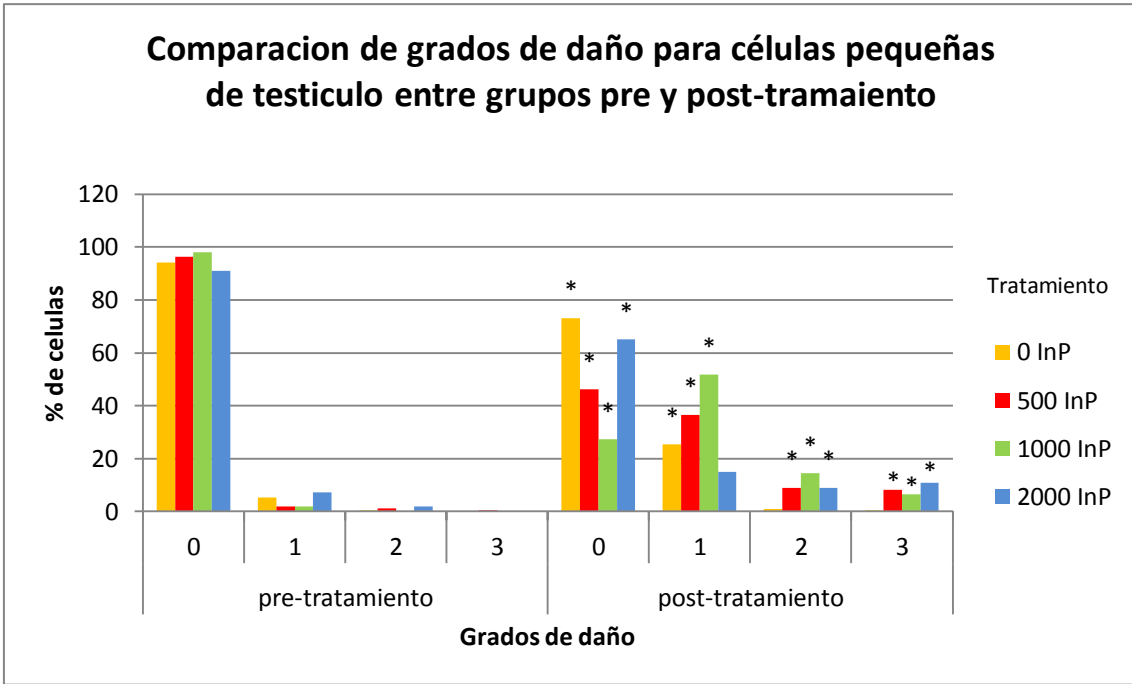


Figura 3. Distribución del grado de daño en células pequeñas de testículo de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación de los datos de los grupos tratados se realizó con los datos obtenidos de los ratones de los grupos pre-tratados. Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

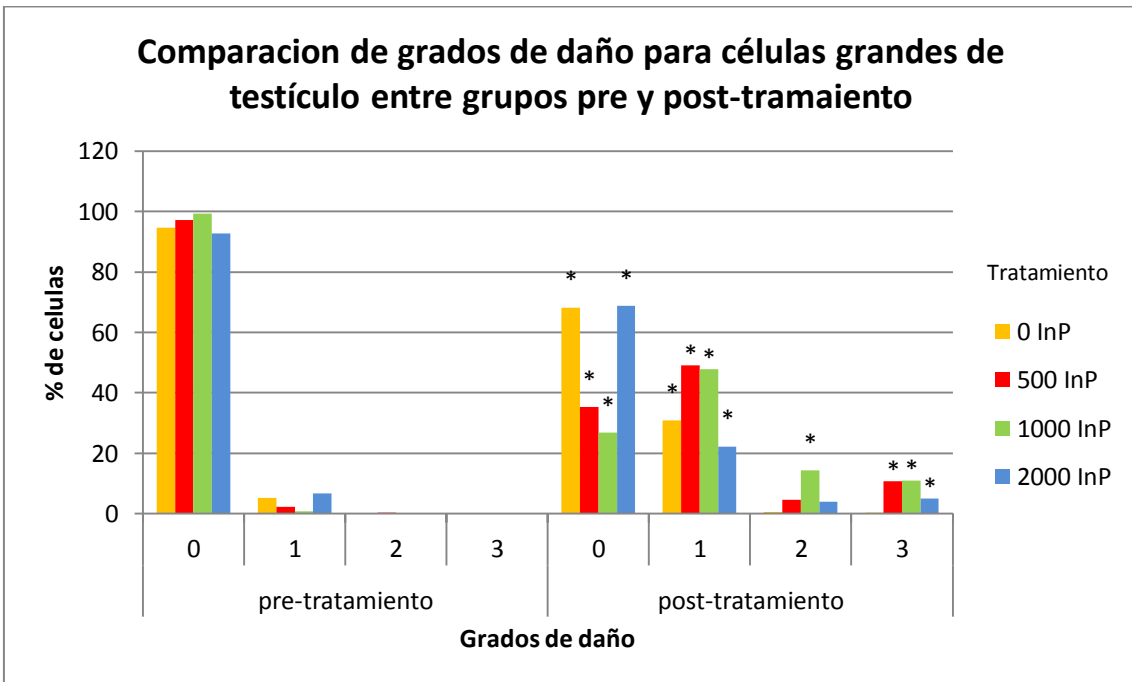


Figura 4. Distribución del grado de daño en células grandes de testículo de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación de los datos de los grupos tratados se realizó con los datos obtenidos de los ratones de los grupos pre-tratados. Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

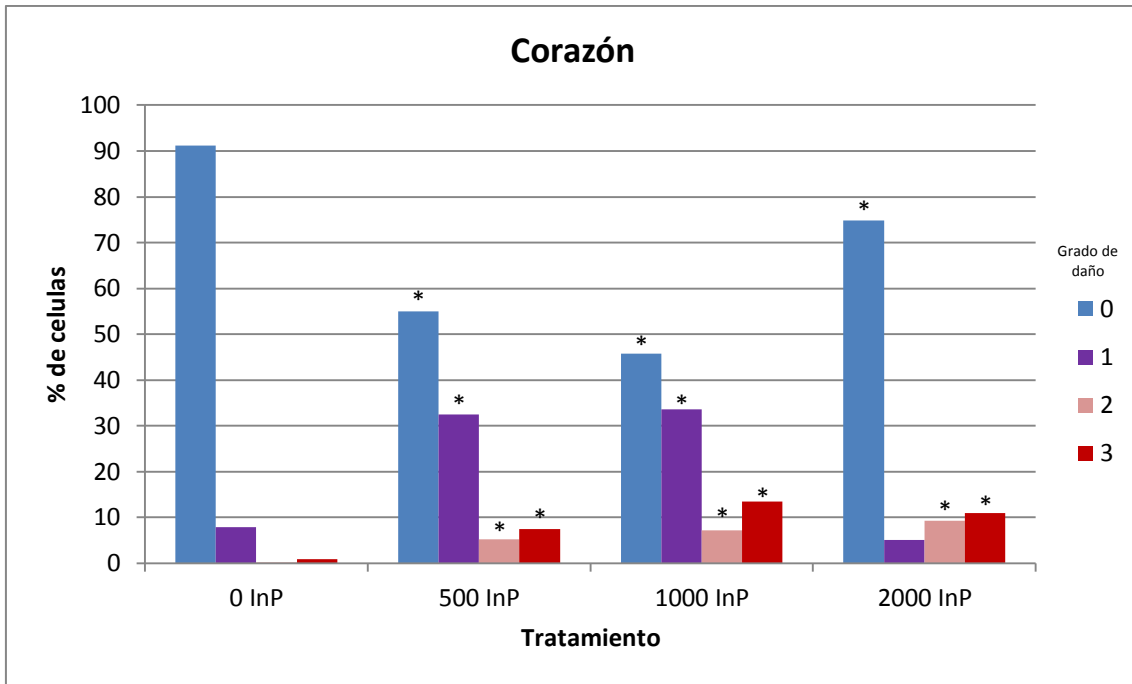


Figura 5. Distribución del grado de daño en células de corazón de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 InP). Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

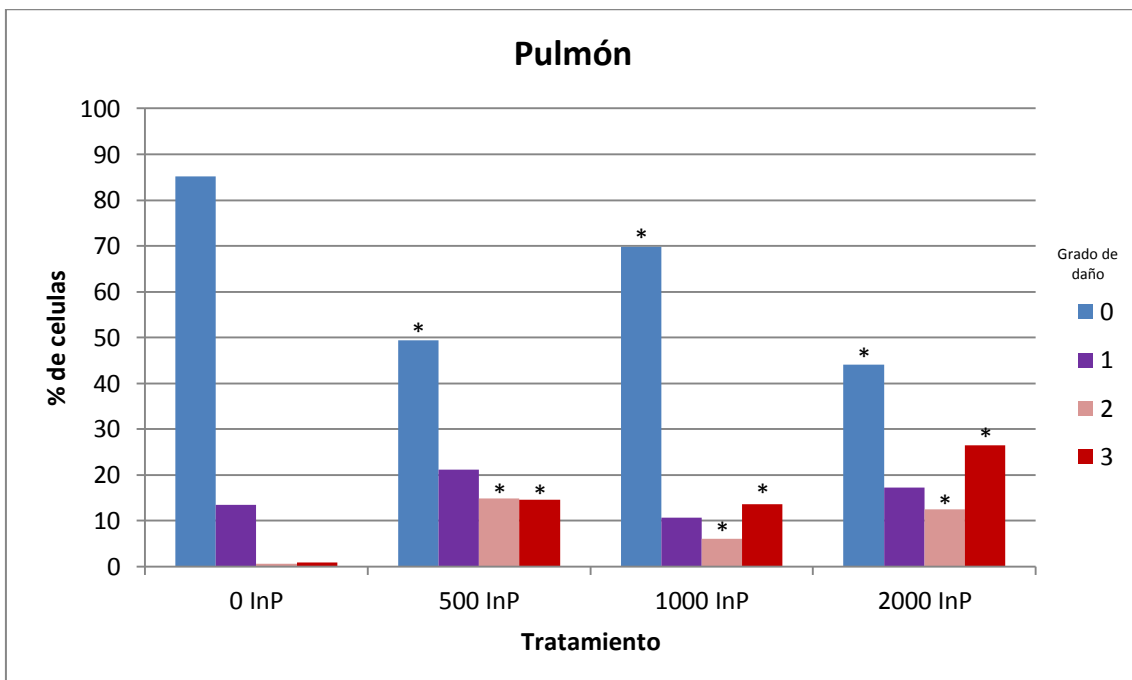


Figura 6. Distribución del grado de daño en células de pulmón de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 InP). Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

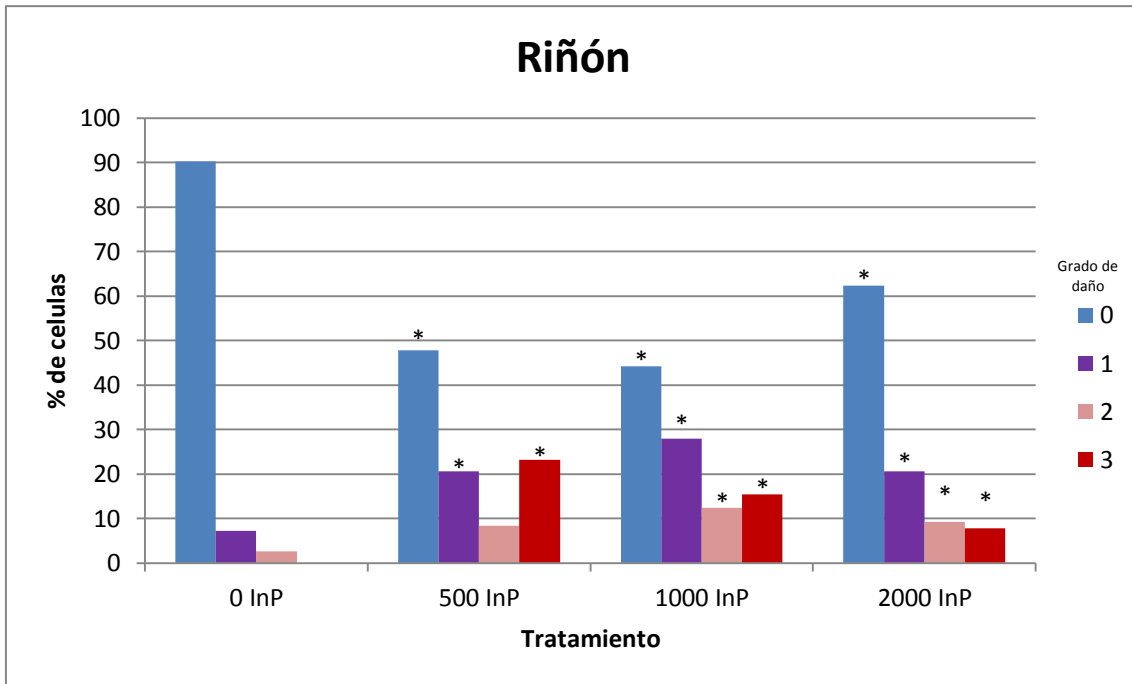


Figura 7. Distribución del grado de daño en células de riñón de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 InP). Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

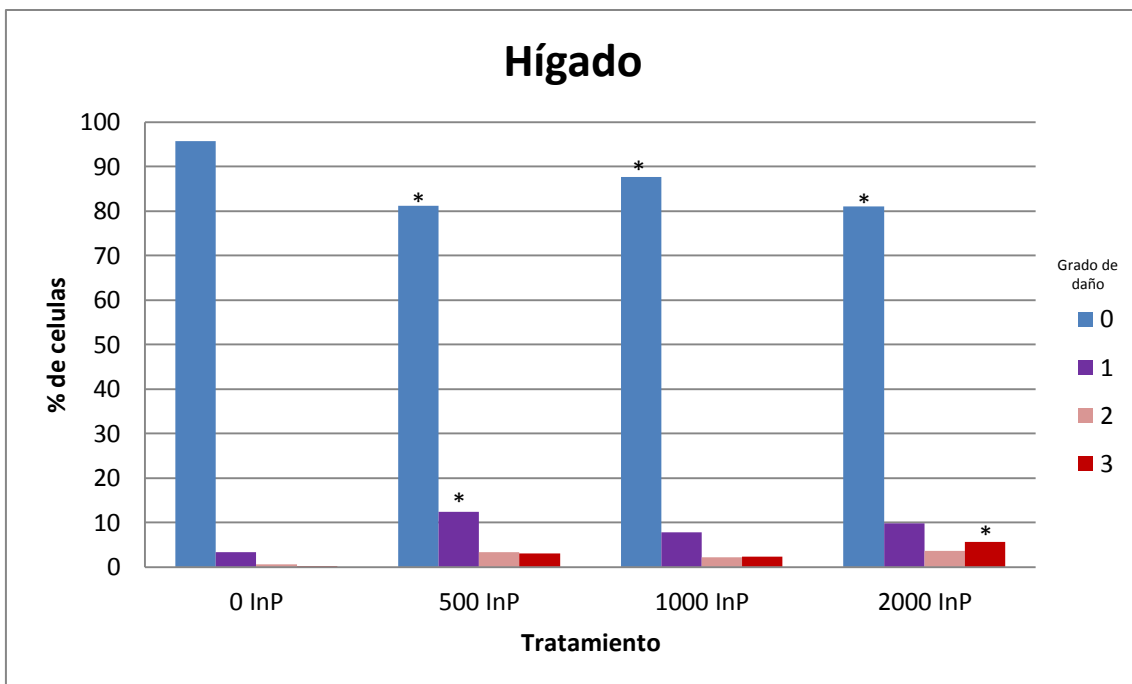


Figura 8. Distribución del grado de daño en células de hígado de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 InP). Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

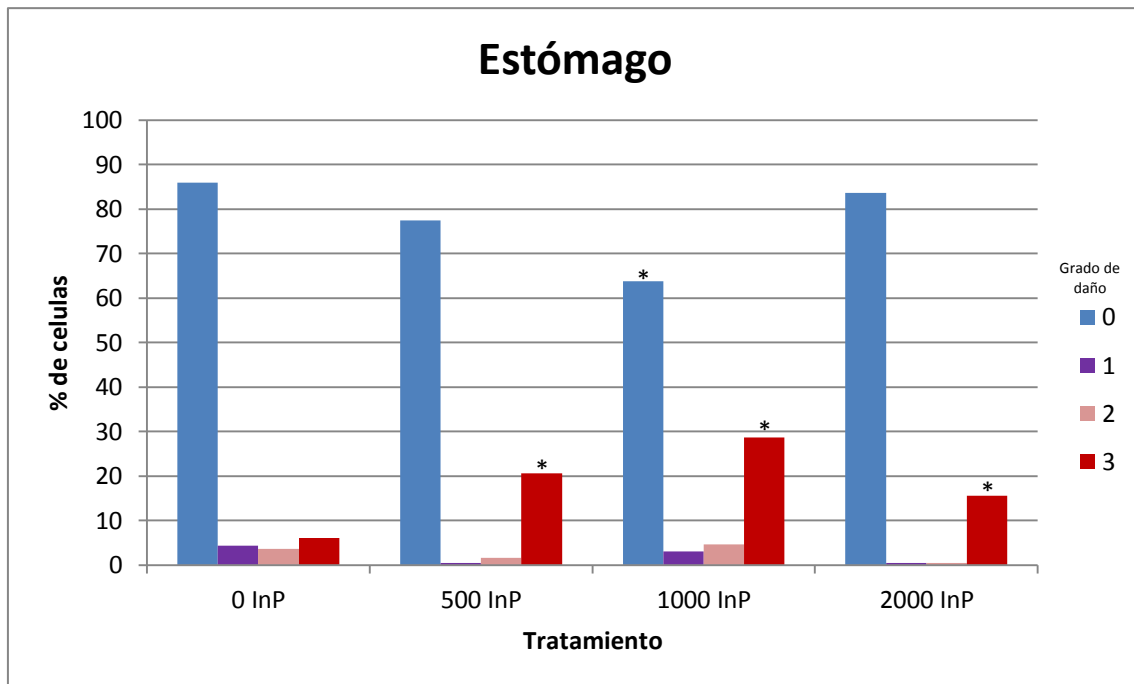


Figura 9. Distribución del grado de daño en células de estómago de ratones tratados con 500, 1000 o 2000mg/kg de InP. La comparación se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 InP). Donde la clasificación de daño es: 0 = sin daño, 1 = daño bajo, 2 = daño medio, 3 = daño alto. * $p < 0.05$ evaluado con la prueba de Z de diferencia de proporciones.

VII Discusión

En los últimos veinte años, la demanda de In se ha incrementado, a causa de su uso en la fabricación de semiconductores y como sustituto de diversos materiales. Debido a esto el riesgo de que este elemento se convierta en un contaminante antropogénico es muy alto (Lim *et al.*, 2014), por ello es necesario conocer más sobre este elemento y sus interacciones con los seres vivos.

7.1 Peso corporal y peso relativo de los órganos

La variación en el peso de los animales después de un tratamiento ha sido aceptada como uno de los criterios para determinar toxicidad cuando se emplean modelos *in vivo*, puesto que se reconoce generalmente como señal de perjuicio en el organismo. La comparación entre animales tratados y no tratados, proporciona los datos para determinar si el compuesto produce variación en el peso del organismo, que antecede a posibles cambios en el peso de los órganos blanco (Feron *et al.* 1973; Anderser *et al.* 1999; Wolfsegger *et al.* 2009), donde el peso de los órganos generalmente se expresa como la razón del peso del órgano entre el peso del corporal a la hora de la necropsia (Feron *et al.* 1973).

En el presente estudio no se registraron cambios significativos en el peso de los organismos ni en el peso de los testículos. Lo anterior concuerda con los datos de la literatura (Yu, 1998) donde se considera que el testículo derecho es más pesado que el testículo izquierdo, sin una diferencia biológicamente relevante. Además, de que no hay diferencia significativa entre el peso de los testículos antes y después de la hemicastración, ni tampoco desarrollo de hipertrofia compensatoria después de la extirpación testicular (Fawke *et al.* 1972).

Sin embargo, en los animales a los que se les administro InP se observó disminución en el peso relativo de algunos órganos, tal como el hígado en la dosis de 1000 y pulmón o corazón en la dosis de 2000 mg/kg, lo que por un lado revela toxicidad y por otro indica posibles órgano blanco del In, tal como otros autores lo han reportado (Fowler, 1986; Flora, 2000).

En relación al efecto sobre peso, la vía de administración del compuesto es un factor importante esto se puede observar en experimentos como los de Kabe (1996) que al aplicar InP en dosis de 1000, 3000 y 5000 mg/kg por vía sonda gástrica o vía intraperitoneal a ratones ICR, encontraron diferentes resultados, en el primer caso no encontraron variación en los pesos de los organismos y de los órganos con respecto al

grupo control, sin embargo en el segundo experimento los ratones presentaron diferencias estadísticas en el peso de pulmón, bazo y riñón.

Otro factor importante que se ha observado que influye sobre el peso, es forma química del compuesto administrado, por ejemplo Tanaka en el 2004 encontró disminución en el peso de los animales al administrar 6 mg/kg de InP vía intratraqueal a hámster (una vez por semana durante 16 semanas), pero no observaron cambios cuando utilizaron ITO. Resultados similares se han encontrado en modelos murinos, al administrar In metálico, InCl_3 o $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ vía intragástrica o intraperitoneal (Asakura *et al.*, 2008; Takagi *et al.*, 2011; Maghraoui *et al.*, 2011).

Lo anterior confirma que la forma química del compuesto, la vía de administración, el tiempo de exposición y el número de dosis, son decisivos para producir un efecto en el peso del organismo. En este trabajo con las dosis y el tiempo aquí empleadas se pudo observar que el peso de los organismos no se veía afectado, no obstante el peso relativo de corazón, pulmón e hígado disminuyó significativamente.

7.2 Viabilidad celular

Así como es importante monitorear el peso de los órganos, también es relevante conocer la viabilidad de las células. Una de las formas más eficaces para determinar muerte celular es evaluar fallas en los procesos metabólicos y alteraciones en la membrana de la célula, ya que muchos agentes citotóxicos son capaces de bloquear procesos bioquímicos como la glucólisis o la respiración, así como inducir cambios en la permeabilidad celular ocasionando la aparición de huecos en la membrana celular que finalmente pueden conducir a la muerte de la célula (Strauss, 1991; Hartmann & Speit 1997).

En este estudio se utilizó una mezcla de colorantes fluorescentes, bromuro de etidio (Br-et) y diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), la cual tiñe de forma diferencial las células. El Br-et es impermeable a la membrana celular y únicamente puede atravesarla cuando hay perforaciones en la misma, al ingresar tiñe el núcleo de un color rojizo; por otro lado el CFDA si es permeable a la membrana y cuando se metaboliza se forma un compuesto esterificado que emite una fluorescencia de color verde, de esta forma se puede discriminar entre células vivas (verdes) o muertas (rojas)(Rowland-Jones & McMichael 2000; Greim & Snyder 2008).

De manera general, en los grupos tratados con InP la viabilidad se mantiene arriba del 80% lo cual nos indica que el compuesto no induce una toxicidad celular acentuada.

Solamente en el caso de pulmón en la dosis más alta se observó diferencia estadística, aunque está se mantiene en el rango del 80%.

El In y sus compuestos no se consideran agentes que induzcan marcada citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo Bustamante y colaboradores (1997) no encontraron efectos citotóxicos al evaluar la viabilidad mediante la técnica de exclusión de azul de tripano en cultivos de células T de rata tratadas con InCl_3 (en concentraciones de 10, 100 y 1000 μM), al registrar una viabilidad mayor al 86%, del mismo modo en un estudio de tesis realizado en el laboratorio por Beltrán (2011), utilizando el método de tinción dual (Br-et y CFDA) se encontró que al administrar de 5, 10 o 20 mg de InP vía intragástrica en ratones macho de la cepa CD-1, la viabilidad se mantiene arriba del 80%.

Por lo que en este trabajo las dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg de InP, no afectan la viabilidad significativamente en las células de los diferentes órganos evaluados. Estos datos de viabilidad celular son relevantes porque el ensayo cometa, al igual que otras pruebas de genotoxicidad, puede ser sujeto a errores de interpretación, ya que en algunos casos se ha encontrado toxicidad celular la cual conduce a daño al ADN, y lo que se quiere es conocer sí el agente químico es capaz de inducir genotoxicidad en dosis en la que no genere citotoxicidad. Por ello es importante realizar pruebas de viabilidad junto con el ensayo cometa para evitar falsos positivos (Hartmann & Speit, 1997; Henderson *et al.*, 1998).

7.3 Electroforesis unicelular alcalina

El principio básico del ensayo cometa, es mezclar células individuales en agarosa y posteriormente someterlas a un proceso de lisis removiendo todo el contenido celular excepto el ADN para finalmente someterlas a un proceso de separación por diferenciación de cargas eléctricas. El proceso de lisis incluye la remoción de todas las proteínas histonas, el ADN permanece súper enrollado y probablemente aun unido a la matriz nuclear. En los sitios en donde hay rupturas en el ADN el superenrollamiento se pierde y el ADN queda relajado (ADN dañado), el cual es arrastrado fuera de la matriz nuclear por acción de la electroforesis hasta el ánodo provocando una figura extendida con forma de cola de cometa, mientras que el ADN no dañado se queda confinado en la región que forma la cabeza del cometa (Collins, 2004; Ciğerci *et al.*, 2013).

La electroforesis unicelular alcalina es ampliamente utilizada en sistemas *in vivo* ya que es muy útil para las pruebas órganos-blanco/órgano, donde es posible analizar el

daño primario al ADN. Unas de las ventajas de esta técnica es que la genotoxicidad de cada órgano de mamífero puede ser detectada de forma individual (Sekihashi, 2002; Sharma, 2012). Cabe señalar que al utilizar ratones hemicastrados se obtiene una ventaja a la hora de analizar el comportamiento de un agente xenobiótico ya que pueden observarse los efectos que este causa comparando al mismo organismo antes y después de la administración (Fawke *et al.* 1972) como se hizo en el caso de testículo y sangre.

La **sangre** es un tejido cuya función es transportar oxígeno y nutrientes a todos los componentes del cuerpo, está formada por una solución acuosa de moléculas orgánicas, proteínas y sales llamada plasma además de plaquetas, células rojas, y blancas. Los leucocitos son considerados buenos bioindicadores de daño por exposición a metales (Bazkurt, 2003) y la longitud del cometa o número de células con daño obtenidas con el ensayo cometa es un buen parámetro de efecto genotóxico (Altamirano-Lozano *et al.* 1999).

La administración de InP en los ratones de la cepa CD-1 incrementa tanto la longitud total del cometa como el porcentaje de células sanguíneas con daño de manera significativa al comparar el grupo pre-tratado contra el post-tratado, así como al comparar el grupo tratado contra su grupo testigo post-tratado. Lo anterior concuerda con lo reportado por Beltrán en 2011, quien administro InP por vía intragástrica a ratones macho CD-1, encontrando un aumento en el porcentaje de células con daño así como un aumento en la longitud de las colas de los cometas en las dosis más altas de su tratamiento (10 y 20 mg de InP).

Si comparamos el porcentaje de células sanguíneas con daño en el trabajo de Beltrán contra el nuestro se puede observar un aumento de 15 veces registrándose valores de 4.6% vs 39.6% cuando se comparan los resultados de las dosis más altas de ambos estudios 20mg VS 2000 mg/kg (96.14 mg).

El In establece enlaces con la transferrina del suero sanguíneo probablemente utilizando la maquinaria bioquímica del hierro incluyendo los receptores de membrana lo que conlleva a su almacenamiento en el interior de la célula (Castronovo & Wagner, 1973; Harris & Messori, 2002; Gomme & McCann, 2005). Lo que podría explicar por un lado el daño genético encontrado en células sanguíneas y por otro la distribución del metal en los demás tejidos.

Una vez en torrente sanguíneo, el In puede llegar a cualquier parte del organismo incluyendo órganos que poseen barreras biológicas como la barrera hemotesticular. Al

respecto, algunos autores encontraron que la administración intratraqueal de InP e InAs afecta la función y la estructura del tejido testicular (Omura *et al.* 2000; Tanaka 2004), así como su acumulación en células de Sertoli y de Leydig cuando es administrado In metálico vía intraperitoneal (Maghraoui *et al.*, 2011).

El **testículo** posee dos funciones básicas, pues se encarga de la producción de ciertas hormonas así como de la producción de espermatozoides. Entre el 85 y 90% del interior del volumen testicular está constituido por túbulos seminíferos y su epitelio germinal, lugar de producción de los espermatozoides, células que son haploides y cuya función es la formación de un cigoto totipotente al fusionar su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que posteriormente dará lugar al desarrollo de un nuevo individuo (Hall, 2011).

La hemicastración de los ratones macho de la cepa CD-1 antes del tratamiento, representa una ventaja a la hora de analizar el comportamiento de un agente xenobiótico debido a que es posible observar el efecto de dicho agente en un sistema *in vivo*, tanto su genotoxicidad como su citotoxicidad, comparando al mismo organismo antes y después de la administración (Fawke *et al.*, 1972).

En el presente estudio, los datos obtenidos al evaluar el daño al ADN de las células testiculares concuerdan con algunos obtenidos en el laboratorio (Beltrán, 2011), donde dosis de 20 mg de InP inducen más daño sobre las células testiculares grandes en comparación con las células testiculares pequeñas.

Cabe recalcar que los datos del testículo derecho (el cual fue removido al momento de la hemicastración) no difieren significativamente entre grupos antes del tratamiento. Sin embargo después de la administración, las células testiculares muestran aumento tanto en la longitud del cometa como en el porcentaje de células con daño, del mismo modo se observan diferencias significativas al comparar únicamente los grupos post-tratamiento con su testigo, con lo cual se puede decir que el compuesto está produciendo daño al ADN en las células testiculares; lo anterior muestra que el testículo es un órgano susceptible de ser dañado por la exposición a In.

El **estómago** es una cavidad donde se almacena temporalmente los alimentos, en él se lleva a cabo reacciones catabólicas que permitirán la absorción de nutrientes, iones y diversas moléculas. Por su función también puede intervenir en el metabolismo de xenobióticos. Es uno de los primeros órganos que están expuestos por la ingestión de alimentos contaminados o bien cuando en modelos experimentales (como el ratón) se administran sustancias vía intragástrica. Se conoce que el In en forma de InP es

pobremamente absorbido por el tracto gastrointestinal cuando se administran por esta ruta dosis bajas (10 mg/kg) en ratas (Zheng *et al.* 1994). En este estudio una de las razones de administrar dosis de 500 mg/kg de InP fue por un lado su baja absorción y por el otro que dosis de 10 mg no mostraron efectos citotóxicos y genotóxico (Beltrán, 2011).

Al administrar 500, 1000 y 2000 mg/kg de InP se observaron cambios significativos sobre la longitud total del cometa y el número de núcleos con daño en las células de estómago. Estos datos muestran el estómago también es susceptible a los efectos perjudiciales de In a pesar de que el InP es pobremamente absorbido.

La mayoría de los metales al igual que otras sustancias, después de ser absorbidos por el tracto gastrointestinal, pasan a torrente sanguíneo y el **corazón** es el músculo encargado de bombear esa sangre a todo el cuerpo a través de los vasos sanguíneos. La acción del corazón es proveer al cuerpo de oxígeno y nutrientes aunque también ayuda en la remoción de desechos metabólicos (Taber & Venes, 2009; Hall, 2011). Lo que lo hace que el corazón este en contacto con todas las sustancias administradas como el caso del InP. Al respecto el corazón presentó un aumento de daño al ADN. Datos en el laboratorio muestran que el InP no induce efectos genotóxicos considerables en dosis de >20 mg, sin embargo la inhalación prolongada del compuesto produce inflamación de las arterias coronarias de ratones B6C3F1 (Moyer *et al.*, 2002).

La cardiotoxicidad del In se conoce muy poco, se ha propuesto que algunos compuestos metálicos tienen un efecto secundario en este órgano, el mecanismo de toxicidad estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* esencialmente consiste en la formación de radicales libres que conduce a un estrés oxidante (Lamberti *et al.*, 2014) y consecuentemente daño al ADN.

Una vez bombeada la sangre por el corazón hasta llega a **pulmón**. La principal función de los pulmones es el intercambio gaseoso, suministrando oxígeno a los tejidos y removiendo el CO₂; el intercambio gaseoso tiene lugar en los alveolos. Debido a que el pulmón tiene una amplia superficie y realiza intercambio de sustancias considerable, el pulmón es la mayor interface entre el organismo y el medio ambiente y cualquier toxico que pudiera estar presente (Hodgson 2004).

La variación en el peso, la viabilidad, la longitud del cometa y el número de células dañadas para el caso de pulmón reafirman que este órgano es un órgano blanco del InP, lo anterior está respaldado por estudios como los de Blazka *et al.*, (1994),

Gottschling y colaboradores (2001) y Tanaka y col. (2002), quienes han encontrado efectos marcados en pulmón cuando se administra In de forma inhalada. Además, otros compuestos como $[\text{In}(\text{SO}_4)_3]$ también inducen daño pulmonar cuando se administran por rutas distintas como la subcutánea (Fowler, 1986).

Independientemente de la ruta de exposición el In provoca daños en pulmón. Lo anterior puede deberse a que el pulmón es un órgano de excreción y el In es llevado por el torrente sanguíneo a los alveolos donde ejerce su toxicidad. Este órgano es especialmente susceptible por naturaleza debido a que es altamente irrigado haciéndolo blanco del In y de otros xenobióticos (Gottschling *et al.*, 2001; Hodgson 2004)

Al respecto, el pulmón puede también ser blanco debido a que es uno de los compartimentos que acumulan In, se ha descrito que los macrófagos secuestran partículas con este metal en el lumen intersticial del pulmón Gottschling *et al.* (2001) encontraron en ratas, que la inhalación de 0.3 mg/m^3 de InP por 6 horas al día durante 21 semanas provoca la acumulación del compuesto en alveolos y en el epitelio pulmonar, seguida de procesos inflamatorios con aumento de EROs y disminución de moléculas antioxidantes, lo cual desencadena hiperplasia alveolar, adenoma y finalmente carcinoma metaplásico en el pulmón.

Recientemente Gwinn *et al.* (2013) sugieren que la captación de partículas de In insolubles se da por medio de los macrófagos y posteriormente es seguida por una acidificación fagolisosomal, lo cual resulta en la solubilización de dichas partículas en iones de In, los cuales son citotóxicos. Los estudios de Gottschling *et al.* (2001) y Gwinn *et al.* (2013) concuerdan con lo descrito por Maghraoui *et al.* (2013) quienes observaron que el In, al igual que Al (ambos elementos del grupo IIIA), producen estrés oxidante causado por la sobreproducción de EROs, en particular radicales libres, inducidos por acción indirecta de dichos metales.

El **hígado** desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, en el metabolismo de los aminoácidos, en la síntesis y degradación de proteínas plasmáticas, en el almacenamiento de vitaminas y metales esenciales; también tiene la capacidad de metabolizar y desintoxicar una variedad amplia de xenobióticos (Baynes & Domiczak, 2006).

El hígado además tiene función excretora, por lo que los productos de desecho metabólico son secretados a un sistema de conductos ramificados conocidos como árbol biliar, que a su vez drena en el intestino delgado; los constituyentes de la bilis se

excretan posteriormente en las heces (Baynes & Domiczak, 2006). Cabe señalar que algunos ácidos orgánicos y fármacos activos se secretan en la bilis contra un gradiente de concentración elevado (Harrison 1986), y se conoce que el In se solubiliza en ácidos orgánicos (Jorgenson y George 2005), por lo cual puede estar biodisponible como ion metálico y ejercer daño en el ADN de las células de los diferentes tejidos como las de hígado de los ratones tratados con el InP.

El In ejerce diversos efectos en hígado, se ha demostrado que en ratas al administrar óxido de In coloidal dihidratado vía intravenosa, en concentración de 20-25 mg/kg, produce necrosis en células de hígado y bazo (Castronovo y Wagner, 1971). Maghraoui *et al.* (2011) al administrar intraperitonealmente In metálico observaron que se concentraba selectivamente en los lisosomas de hepatocitos y se conoce que los lisosomas son fuente de estrés por radicales libres, si esto sucede en el modelo empleado de ratón de este trabajo entonces se podría explicar el daño encontrado en el ADN en las células del hígado.

En las células hepáticas se llevan a cabo múltiples reacciones metabólicas, no se conoce si el In es transformado en el interior de los mamíferos por la misma acción del metabolismo provocando reacciones de óxido-reducción, sin embargo muchos xenobióticos son transformados a sustancias solubles que puedan ser excretadas por el sistema renal (Rodríguez 1994).

La eliminación de los agentes tóxicos del organismo es un factor importante en relación con los efectos biológicos que sean capaces de producir. La eliminación rápida de los agentes externos reduce los riesgos y en muchos casos la toxicidad. La ruta más importante de eliminación es a través del sistema renal. Los sistemas renal y urinario están constituidos por un grupo complejo de órganos que en conjunto se encargan de filtrar los productos residuales de la sangre y de fabricar, almacenar y eliminar la orina. Durante el proceso los **riñones** pueden exponerse a concentraciones elevadas de sustancias tóxicas endógenas y exógenas, de este modo algunas células renales están expuestas a concentraciones mil veces superiores a las sanguíneas (Rodríguez R., 1994).

El In suele acumularse en este órgano pues Kan y Miyamae en 1997 reportaron que el In se acumula en riñones y otros órganos cuando es administrado en forma de InCl_3 ; de igual forma Maghraoui *et al.* en 2011 encontraron que cuando se administra In por vía i.p. el In se concentra en algunas células incluyendo las células contorneadas de los túbulos proximales de los riñones. A su vez al ser acumulado en estas zonas suele provocar efectos adversos como los descritos por Azakura *et al.* (2008) quienes tras

hacer una revisión patológica e histopatológica encontraron cambios en ratas tratadas con 1000 mg/kg de In metálico, en los que se observaron basofilia renal tubular, quistes renales, algunas gotas hialinas en el túbulo proximal epitelial e infiltración de células inflamatorias en los riñones.

En nuestro estudio el riñón también muestra ser un órgano sensible a los efectos del In debido a que en todas las dosis empleadas se incrementa el daño al ADN y el número de células dañadas. Lo anteriormente descrito concuerda con el hecho de que los riñones son un sitio común de toxicidad química ya que las nefronas sirven para concentrar los agentes tóxicos incrementando los niveles de exposición, esta exposición puede resultar en una toxicidad de los túbulos de los riñones. Esto también puede ocurrir por una concentración dentro de las nefronas cuando un químico es capaz de utilizar una proteína de transporte (Hodgson, 2004). Como es el caso del In que se une a transferrina, y es transportado desde el lumen de los túbulos hasta las células renales, las cuales pueden reabsorber el complejo metal-transferrina.

Finalmente es importante mencionar que en todos los tejidos tanto la longitud del cometa como el número de células con daño se incrementa después del tratamiento, donde la intensidad del efecto producido para cada tejido es diferente, es decir, para el caso del porcentaje de células con daño la dosis de 1000 mg/kg fue la que registro los valores más altos en sangre (71.6%), testículo (72.6 y 73.2%), riñón (55.8%), corazón (54.2%), estómago (36.2%). en tanto que el incremento en el número de células con daño para pulmón (56%) e hígado (19%) registro su valor más en la dosis de 2000 mg/kg

Maghraoui *et al.* (2011) tras una administración de In metálico por vía intragástrica observaron que el In se precipita en los lisosomas en forma de sales de fosfato insolubles, esto debido a la acción de una enzima intralisosomal conocida como fosfatasa ácida. Lo anterior podría explicar el hecho de que en órganos encargados de la detoxificación en el cuerpo sean los principales afectados por InP administrado en el presente trabajo. Además, los resultados obtenidos en el número de células con daño en los diferentes órganos evaluados pueden explicarse como consecuencia de la unión del In con la transferrina, pues todas las células de los tejidos y órganos de los mamíferos tienen receptores de membrana para esta proteína, aunque los receptores varían considerablemente de un tipo celular a otro, se puede encontrar principalmente en hepatocitos, precursores de eritrocitos y placenta, aunque también se encuentran en cantidades significativas en órganos como pulmón, riñón e intestino delgado (Harris & Messori, 2002)

VIII Conclusiones

No se observaron cambios significativos en el peso de los ratones tratados con 500, 1000 y 2000 mg/kg de InP administrado de forma aguda por vía intragástrica,

No se observaron cambios significativos en el peso de testículo y riñón de ratones tratados con 500, 1000 y 2000 mg/kg administrado de forma aguda por vía intragástrica. Sin embargo se presenta una disminución del peso del hígado en la dosis de 1000 así como corazón y pulmón en la dosis de 2000 mg/kg.

No se observaron cambios significativos en la viabilidad de los ratones tratados con 500, 1000 y 2000 mg/kg de InP administrado de forma aguda por vía intragástrica, Excepto en el caso del pulmón.

La administración de InP produjo un aumento tanto en la longitud total de los cometas como en el porcentaje de células con daño en cada uno de los órganos, en las concentraciones administradas a los ratones.

Los órganos que presentan valores más altos en el porcentaje de células con daño en la dosis de 1000 mg/kg son: sangre (71.6%), testículo (72.6 y 73.2%), corazón (54.2%), riñón (55.8%), estómago (36.2%).

Los órganos que presentan valores más altos en el porcentaje de células con daño en la dosis de 2000 mg/kg son: pulmón (56%) e hígado (19%).

Los grados de daño muestran una disminución de las células sin daño y un aumento en los distintos grados de daño de forma dosis-respuesta al administrar 500, 1000 o 2000 mg/kg de InP

Con todo lo anterior se puede concluir que el InP es un agente genotóxico debido a que produjo daño al ADN en los órganos evaluados con las dosis aplicadas en este trabajo.

IX Referencias

- Alfantazi A., Moskalyk R. (2003). *Processing of indium: A review*. Minerals Eng 16:687-694
- Altamirano-Lozano M., Valverde M., Alvarez-Barrera L., Molina B., Rojas E. (1999). *Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues*. Teratog Carcinog Mutag 19:243-255
- Anderser H., Larsen S., Spliid Henrik., Christensen N. (1999). *Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies*. Toxicology 136: 67-77
- Andrae U., Speit G. (2008). "In vitro test for genotoxicity" en *Toxicology and risk assessment*. Greim H. Snyder R. eds. John Wiley & Sons. EUA. Pp: 385-406
- Andrees M. (1992). En *Animal models in toxicology*. editado por Shayne Cox Gad. Marcel Dekker Inc. Nueva York E.U.A. Pp. 165-272
- Asakura K., Satoh H., Chiba M., Okamoto M., Serisawa K., Nakano M. (2009). *Genotoxicity studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony*. J Occup. Health. 51:498-512
- Asakura K., Satoh H., Chiba M., Okamoto M., Serizawa K., Nanako M., Omae K. (2008). *Oral toxicity of indium in rats: single and 28-day repeated administration studies*. J. Occup. Health. 50(6):471-9.
- Baskurt K. y Meiselman J. (2003). *The hyperviscosity syndromes* in Seminars in thrombosis and hemostasis. Thieme medical publishers and biophysics. 29(5):435-450.
- Baynes J. y Domiczak M. (2006) "Bioquímica Médica" Elsevier. 2da edición Barcelona España
- Beltrán R. (2011). *Estudio del efecto de la aplicación del fosforo de In (InP) en células de diferentes órganos de ratones macho de la cepa CD-1, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina, para evaluar el daño al ADN*. Tesis de licenciatura Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
- Beyersmann D. y Hartwig A. (2008). *Carcinogenic metal compounds: recent insight molecular and mechanisms*. Arch Toxicol 82: 493-512
- Blazka ME., TepperJS., Dolxon D., Winsett DW., O'Connor RW., Luster MI. (1994). *Pulmonary response of fischer 344 rats to acute nose-only inhalation of indium trichloride*. Environmental research. 67:68-83
- Breckle, S. (1991). *Growth under stress: heavy metals*. En: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkaffi, V., (eds.), *Plant roots: the hidden half*. pp. 351-373. Marcel Dekker Inc. New York.
- Bustamante J., Dock., Lennart, Vahter M., Fowler B. Orrenius S. (1997). *The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes*. Toxicology. 118: 129-136
- Carson L., Ellis V. y McCann L. (1986). *Toxicology and biological monitoring of metal in humans including feasibility and need*. Lewis Publishers. E.U.A. Pp: 115:120
- Castronovo FP y Wagner HN. (1973). *Comparative toxicity and pharmacodynamics of ionic indium chloride and hydrated indium oxide*. J. Nucl. Med. 14:677-682
- Castronovo, F.P., & Wagner H.N. (1971). *Factors affecting the toxicity of the element indium*. Br. J. Exp. Pathol. 52: 543-559
- Çelic A., Eke D., Ekinci S., Yildirim S. (2013). *The protective role of curcumin on perfluorooctanesulfonate-induced genotoxicity: Single cell gel electrophoresis and micronucleus test*. Food Chem Toxicol. 53:249-255
- Churnjitapirom P., Goto S., Ogura H. (2004). *Effects of heat treatments and Sn Ga and In aditives on mechanical proprieties of 35Ag-30Pd-20Au-15Cu alloy*. Dent Mater J 23(4): 474-489
- Ciğerci İH., Liman R., Özgül E., Konuk M. (2013). *Genotoxicity of indium tin oxide by*

- allium and comet tests*. Cytotechnology. 67(1):157-163
- Clarkson W., Friberg, L., Nordenberg F., y Sager R. (1988). *Biological monitoring of toxic metals*. Plenum Press. EUA. Pp:46-49, 473-479
- Collins A. (2004). *The comet assay for DNA damage repair: principles, applications and limitations*. Mol. Biotechnol. 26(3): 249-261
- Devi D., Banu S., Mahboob M., Jamil K., Grover P. (2001). *In vivo genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay*. Teratog. Carcinog. Mutagen. 21:325-333.
- Fawke L., Morris A., Brown PS. (1972). *Effects of hemicastration and the subsequent administration of drugs in the mouse*. J. Reprod. Fert. 28:177-183
- Feron V., Goot A., Spanjers M., Til H. (1973). *Evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation*. Fd Cosmet. Toxicol 11:85-94
- Flora S. (2000). *Possible health hazards associated with the use of toxic metals in semiconductor industries*. J. Occup. Health. 42:105-110
- Fowler B. (1986). *Indium en handbook on the toxicology of metals*. Friberg L., Nordberg F., Vouck B. eds. Publicaciones científicas Elsevier. Pp 35-43
- Fowler B. (2007). *Indium en Handbook on the toxicology of metals*. Nordberg F., Fowler B., Nordberg M., Friberg L. eds. Academic Press Inc. Pp 558-576
- Fowler B., Sexton M. (2002). *"heavy metals in the environment"* (B. Sarkar Ed.) pp. 631-646. Marcel Dekker Publishers, New York
- Friberg L., Nordberg F., Vouk B., (1990). *Handbook on the toxicology of metals volumen II*. 2da edición. Elsevier. Amsterdam.
- Garcia O., Romero I., Gonzalez J., Moreno D., Cuetara E., Rivero Y., Gutierrez A., Perez C., Alvarez A., Camesolta D., Guevara I. (2011). *Visual estimation of the percentage of DNA in the tail in the comet assay: evaluation of different approaches in an intercomparison exercise*. Mutat Res. 720: 14-21
- Gilbert E., Glatstein E., Goris M., Earle J. (1978). *Value of ¹¹¹indium chloride bone marrow scanning in the differential diagnosis of blood count depression in lymphoma*. Cancer. 41: 143-152
- Gomme PT. y McCann KB. (2005). *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. Drugs discovery today. 10:267-273
- Gottschling C., Maronpot R., Hailey R., Peddada S., Moomaw R., Klaunig J., Nyska A. (2001). *The role of oxidative stress in indium phosphide-induced lung carcinogenesis in rats*. Toxicological sciences 64:28-40
- Greim H., Snyder R. (2008). *Toxicology and risk assessment: a comprehensive introduction*. Wiley. Gran Bretaña. Pp 677
- Gwinn W., Qu W., Shines C., Bousquet R., Taylor G., Waalkes M., Morgan D. (2013). *Macrophage solubilization and cytotoxicity of indium-containing particles in vitro*. Toxicol. Sci. 135(2): 414-424
- Hall J. (2011) Guyton and Hall textbook of medical physiology. Saunders/Elsevier. 12th ed. P. 157 Philadelphia. USA.
- Harris W.R. y Messori L. (2002). *A comparative study of aluminium (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin*. Coordination Chemistry Reviewa. 228: 237-262.
- Harrison T. 1986. *Principios de medicina interna volumen 2*. 6ta edición. McGraw-Hill
- Hartmann A. y Speit G. (1997). *The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the cell gel test (comet assay)*. ToxicolLett. 90:183-188
- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Winderbank S. (1998). *The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins*. Mutagenesis 13:89-94
- Hines C., Roberts J., Andrews R., Jackson M., Deddens J. (2013). *Use of and occupational exposure to indium in the United States*. J Occup Environ Hyg. 10-12:723-733
- Hodgson E. (2004). *A textbook of modern toxicology*. Jhon Wiley & sons Inc. USA. Pp 557

- Homma T., Ueno T., Sekizawa K., Tanaka A., Hirata M. (2003). *Interstitial pneumonia developed in a worker dealing with particles containing indium-tin oxide*. J Occup. Health. 45: 137-139
- Hosain F., McIntyre PA., Poulouse K., Stern S., Wagner N. (1969). Clin. Chim. Acta. 24:69-75
- Hwang H., Kim J., Park j., Yun H., Cheon W., Kim B., Lee C., Suh H., Lim K. (2014). Red ginseng treatment for two weeks promotes fat metabolism exercise in mice. Nutrients. 6(5):1874-85
- IARC. (2006). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 86 cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide*. Lyon France.
- INE. (2013). 20/05/13-16:30hrs <http://www.ine.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales>
- Järup L. (2003). *Hazards of heavy metal contamination*. Br Med Bull. 68:167-82. UK.
- Jiménez-Bonilla J., Quirce R., Banzo I., Martínez-Rodríguez I., Sainz-Esteban A., Barragán J., López-Cordovilla J., Carril J. (2007). *In-111 ibritumomab scintigraphy (planar and SPECT) and FDG PET/CT before Y-90 ibutumomab treatment in patient with mantle cell lymphoma*. Clin. Nucl. Med. 32:952-953.
- Jorgenson J., George M. (2005). "Mineral Commodity profile". USGS. Virginia E.U.A.
- Kabe I. (1996). *In vitro solubility and In vivo Toxicity of Indium Phosphide*, J. of Occup. Health. 38:6-12
- Kan M. y Miyamae T. (1977). Bone marrow scintigraphy with 111In-chloride: a clinical study for systemic hematopoietic disorders. Radioisotopes. 26:852-857
- Lamberti M., Giovane G., Garzillo M., Avino F., Feola A., Porto S., Tombolini V., Di Dominico M. (2014). Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antiproliferative drugs in patients and occupational exposed workers. Biomed Res Int. 2014:1-8
- Lee J., Son Y., Pratheeshkumar P., Shi X. (2012). *Oxidative stress and metal carcinogenesis*. Free radic. Boil. Med 53: 742-757
- Lee KH., Chen HL., Leung CM., Chen HP., Hsu PC. (2014). *Indium acetate toxicity in male reproductive system in rats*. Environ toxicol. Wiley periodicals. doi: 10.1002/tox.22022.
- Lim C., Han JH., Cho HW., Kang M. (2014). *Studies on the toxicity and distribution of indium compounds according to particle size in Sprague-Dawley rats*. Toxicol. Res. 30(1):55-63
- Maghraoui S., Ayadi A., Ammar AB., Jaafoura MH., Hili AE., Galle P., Tekaya L. (2011). Microscopy and microanalysis study of the indium (In) behavior in the intestinal mucosa, the liver, the kidney and the testicle. Journal of Electron Microscopy 60(2):183-190.
- Maghraoui S., Clichici S., Ayadi A., Login C., Moldovan R., Daicoviciu D., Decea N., Muresan A., Tekaya L. (2013). Oxidative stress in blood and testicle of rat following intraperitoneal administration of aluminium and indium.
- Manahan E., (2007). "Introducción a la química ambiental". Reverte. México D.F., Pp 148-149
- Martin R., Martinez J., Malats A. (1998). *Recubrimientos espectralmente selectivos sobre vidrios arquitectónicos: recubrimientos de baja emisividad*. Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio, 37 [1] 7-12
- Moyer CF., Kodavanti UP., HasemanJK., Costa DL, Nyska A. (2002). *Systemic vascular disease in male B6C3F1 mice exposed to particulate matter by inhalation: studies conducted by the national toxicology program*. ToxicolPathol. 30(4): 427-434
- Nowrouzi A., Cheung W., Li T., Zhang X., Arens A., Paruzynski A., Waddington S., Osejindu E., Reja S., Kalle C., Wang Y., All-Allaf F., Gregory L., Themis M., Holder M., Dighe N., Ruthe A., Buckley S., Bigger B., Montini E., Thrasher A., Andrews R., Roberts A., Roberts T., Newbold R., Coutelle C., Schmidt M., Themis M. (2013). *The fetal mouse is a sensitive genotoxicity model that*

- exposes lentiviral-associated mutagenesis resulting in liver oncogenesis. *Mol Ther.* 21(2):324-37
- NTP (National Toxicology Program). (2001). *Technical report on the carcinogenesis studies of indium phosphide in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. National Toxicology Program Technical Report. Pp:1-346
- Ochi T, Ohsawa M. (1983). *Induction of 6-thioguanine resistant mutants and single strand scissions of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells*. *Mutat. Res.* 111:69-78
- Oda K. (1997). *Toxicity of a low level of indium phosphide (InP) in rats after intratracheal instillation*. *Ind. Health.* 35, 61-68
- Omae K., Nakano M., Tanaka A. (2010). *Indium lung case reports and epidemiology*. *International Arch. Occupational and Environmental Health.* 84:471-477
- Omura M., Yamazaki K., Tanaka A., Hirata M., Makita Y., Inoue N., (2000). *Changes in the testicular damage caused by indium arsenide and indium phosphide in hamsters during two years after intratracheal instillations*. *J. Occup. Health.* 42: 196-204.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) y OMS (Organización Mundial de la Salud). (1980). *Criterios de salud ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte 1*. Publicación científica No. 402.
- Rodríguez E. (2007). *Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas*. *Acta Bioethica* 13(1), 25-40.
- Rodriguez R. 1994. *Las toxinas ambientales y sus efectos geneticos*. Fondo de cultura económica. Pp 95
- Rowland-Jones SL., McMichael AJ. (2000). *Lymphocytes: a practical approach* Oxford University Press. EUA. Pp 352
- Saplakoglu U., Iscan M. (1997). *DNA single strand breakage in rat lung, liver and kidney after single and combined treatment of nickel and cadmium*. *Mutat. Res.* 394:133-140
- Schwarz-Schampera U. (2014). *Critical metals handbook*. British Geological Survey (4) 204-229
- Seikihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y. (2002). *Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay*. *Mutat. Res.* 517: 53-74
- Sepulveda J. (2002). *Estudio comparativo de las concentraciones de partículas antropogénicas entre las regiones centro, norte y sur y oriente y poniente de la zona metropolitana del valle de México, mediante microscopia electrónica de barrido y microanálisis elemental por espectrometría de rayos X*, México D.F. Instituto Nacional de Ecología (INE). Pp 23
- Sharma A., Soussaline F., Sallette J., Dybdahl M. (2012). *Influence of the number of cells scored on the sensitivity in the comet assay*. *Mutat. Res.* 749:70-75.
- Sinclair W.D., Kooiman G., Martin D., Kjarsgaard I. (2006). *Geology, Geochemistry and mineralogy of indium resources at Mount Pleasant, New Brunswick, Canada*. *Ore Geology Reviews.* 28: 123-145
- Strauss GH. (1991). *Non-random cell killing in cryopreservation: implication for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects*. *Mutat Res.* 252(1):1-15
- Taber CW. Y Venes D. (2009). *Taber's cyclopedic medical dictionary*. F a Davis Co. pp. 1018-23
- Takagi R., Suzuki Y., Seki Y., Ikehata M., Kajihara C., Shimizu H., Yanagisawa H. (2011). *Indium chloride-induced micronuclei in vivo and in vitro experimental systems*. *J Occup Health.* 53:102-109
- Tanaka A. (2004). *Toxicity of indium arsenide, gallium arsenide, and aluminium gallium arsenide*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 405-411
- Tanaka A., Hirata M., Kiyohara Y., Nakano M., Omae K. (2010). *Review of pulmonary*

- toxicity of indium compounds to animals and humans*. Thin Solid Films. 518:2934-2936
- Tanaka A., Hirata M., Omura M., Inoue N., Ueno T., Homma T., Sekizawa K. (2002). *Pulmonary toxicity of indium-tin oxide and indium phosphide after intratracheal instillations into the lung of hamsters*. J Occup Health. 44:99-102
- Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu C., Sasaki F. (2000). *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ. Mol. Mutagen. 35:206-221.
- Tice R., Andrews P., Vasquez M. (1996). *Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SGC) assay to the detection of damage in mammalian cells*. Experimental cellular research 175:1-8.
- Tiller G. (1989). *Heavy metals in soils and their environmental significance*. Advances in soil Science, 9: 113-141.
- USGS: U.S. Geological Survey, 2013, Mineral commodity summaries 2013: U.S. Geological Survey, 198 p
- Valverde M., Fortoul L., Diaz F., Mejia J., Rojas del Castillo E. (2000). *Induction of genotoxicity of cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1mice*. Mutagenesis 15:109-114
- White J., Hemond H. (2012). *The Anthropobiogeochemical Cycle of Indium: A Review of the Natural and Anthropogenic Cycling of Indium in the Environment*. Environmental science and technology 42:2 155-186, Massachusetts E.U.A.
- Wicki A., Wild D., Storch D., Seemayer C., Gotthardt M., Behe M., Kneifel S., Mihatsch M., Reubi J., Macke H., Christofori G. (2007). *[Lys40(Ahx-DTPA-111In)NH2]-Exendin-4 is a highly efficient radiotherapeutic for glucagon-like peptide-1 receptor-targeted therapy for insulinoma*. Clin. Cancer Res. 13: 3696-3705
- Williams T. (1990). *Historia de la tecnología Siglo XXI de España editores S.A. España. pp:376*
- Wolfsegger M., Jaki T., Dietrich B., Kunzler J., Baker K. (2009). *A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies*. Toxicol Appl Pharmacol. 240:117-122
- Yu ZH. (1998). *Asymmetrical testicular weights in mammals, birds, reptiles and amphibian*. international journal of andrology. 21:53-55
- Zhang M., Gumerov R., Kaltashov A. (2004). *Indirect detection of protein-metal binding: interaction of serum transferrin with In³⁺ and Bi³⁺*
- Zheng W., Winter SM., Kattinig MJ., Carter DE., Sipes IG. (1994). *Tissue distribution and elimination of indium in male fischer 344 rats following oral and intratracheal administration of indium phosphide*.