



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y REPROTÓXICO**  
**DEL ACETATO DE TALIO *IN VIVO***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERIBERTO HERNÁNDEZ DE LA CRUZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO  
FES ZARAGOZA, UNAM  
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
FES ZARAGOZA, UNAM  
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
CENTRO EN CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

CD. DE MÉXICO. ENERO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y REPROTÓXICO**  
**DEL ACETATO DE TALIO *IN VIVO***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERIBERTO HERNÁNDEZ DE LA CRUZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**  
**FES ZARAGOZA, UNAM**  
**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**  
**FES ZARAGOZA, UNAM**  
**DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**  
**CENTRO EN CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM**

**MÉXICO, CD. DE MÉXICO. ENERO 2019**

OFICIO CPCB/1171/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 3 de septiembre del 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS del alumno, **HERNÁNDEZ DE LA CRUZ HERIBERTO** con número de cuenta 402081401 con la tesis titulada "Evaluación del efecto genotóxico y reprotóxico del acetato de talio *in vivo*," realizada bajo la dirección del Tutor Principal: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO:

Presidente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO  
Vocal: DR. JOSÉ MIGUEL BENTANCOURT RULE  
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Suplente: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
Suplente: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 04 de diciembre de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por darme la oportunidad de cursar estos estudios y por la formación en este campo de las ciencias, por las todas herramientas de aprendizajes, por ampliar mis perspectivas en los conocimientos y por todo lo que implica el grado.

Agradezco al **CONACyT** por la beca con registro **440969** otorgada durante la realización de los estudios de la Maestría en Ciencias Biológicas en este posgrado de esta casa de estudios.

Agradezco al **COMECyt del Estado de México** promoción 2014, por la beca con registro **14BTM0508** otorgada para gastos de impresión de tesis.

Para la realización de esta investigación se contó con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con clave de proyecto: **IA201312** "Evaluación del efecto genotóxico y reprotóxico del acetato de talio *in vivo*" en el que se empleó el ratón CD-1 como modelo de estudio; así como del proyecto **IN225216** "Comparación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de tres sales de talio *in vitro*".

Agradezco a los miembros del comité tutor:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, por los valiosos comentarios y sugerencias que la enriquecieron.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. Edmundo Bonilla González

Por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus comentarios y sugerencias que la enriquecieron.

A mi director de tesis el **Dr. Juan José Rodríguez Mercado**, por trabajar conmigo en la escritura y redacción del presente estudio. Por compartir sus conocimientos y por ser guía con su experiencia misma, que me alentó a concluir este proyecto en los momentos más complicados de esta etapa de mi vida, por su amistad, sus enseñanzas con paciencia y dedicación.

Agradecimientos al **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**, por abrírmelas puertas, por las enseñanzas y la confianza brindada gracias por todo.

Agradezco a la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo** y **Dra. Leticia Morales Ledesma** por las sugerencias en la mejora de este trabajo, por su experiencia y su tiempo invertido en el desarrollo de este trabajo que contribuye en mi formación. Gracias.

Agradecimientos a la **Universidad Nacional Autónoma de México** quien ha contribuido en mi formación y por darme la oportunidad entre tantos de ampliar mis conocimientos para trabajar al servicio de mi país y con la ciudadanía. Gracias.

## DEDICATORIA

Gracias a dios por todo lo dado

A mi esposa Norma Cadena Flores y mis hij@s Alexander y mis pequeñas  
Andrea Estrella e Isabela Lucero  
Hernández Cadena que hoy se encuentran con nosotros  
a mi padre Fructuoso Hernández y mi madre Teófila de la Cruz.

a mis hermanos y sobrin@s quienes quiero mucho  
por su compañía y apoyo.  
A todos les deseo bienestar y una larga vida.  
Gracias por todo.

A mis seres queridos  
que guiaron mi vida con sus enseñanzas  
y que ya han partido.  
Siempre vivirán en mi corazón y en mi memoria,  
pido a dios los guarde en su gloria.

Gracias mi dios,  
quedamos en tus manos.

# INDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Talio.....	2
2.1.1 Propiedades físicas y químicas.....	2
2.1.2 Usos y aplicaciones.....	3
2.1.3 Liberación al ambiente y exposición ocupacional.....	3
2.1.4 Toxicidad.....	5
2.1.5 Toxicocinética.....	6
2.2 Ácido desoxirribonucleico.....	7
2.2.1 Generalidades.....	7
2.2.2 Daño al ADN.....	8
2.2.3 Electroforesis unicelular en gel.....	11
2.2.4 Efectos mutagénicos y genotóxicos del talio y sus compuestos.....	13
2.3. El ratón como modelo de experimentación.....	15
2.3.1 Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).....	15
2.3.2 Tratamientos con animales.....	16
2.3.3 Eje hipotálamo hipófisis testículo.....	16
2.3.3.1 Regulación hormonal.....	16
2.3.4 Xenobióticos como disruptores.....	18
2.4. Espermatogénesis.....	20
2.4.1 Alteraciones al espermatozoide.....	23
2.4.2 Efectos reprotóxicos del talio y sus compuestos.....	25
III JUSTIFICACIÓN.....	27
IV HIPÓTESIS.....	28
V OBJETIVOS.....	29

VI	MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
6.1	Animales.....	30
6.2	Acetato de talio(I).....	30
6.2.1	Selección de subdosis de la DL <sub>50</sub> de acetato de talio(I).....	31
6.2.2	Tratamientos.....	31
6.3	Obtención de muestras celulares.....	31
6.3.1	Viabilidad celular.....	33
6.4	Electroforesis unicelular en gel con células de órganos.....	34
6.5	Evaluación de parámetros seminales, viabilidad y daño al ADN	36
6.5.1	Obtención de espermatozoides.....	36
6.5.2	Parámetros seminales.....	36
6.5.3	Anormalidades en espermatozoides.....	36
6.5.4	Electroforesis unicelular en gel con espermatozoides.....	37
6.6	Cuantificación hormonal por radioinmunoanálisis.....	38
6.7	Análisis estadístico.....	39
6.8	Diagrama del método de trabajo.....	40
VII	RESULTADOS.....	41
7.1	Tratamientos, dosis y pesos de animales.....	41
7.2	Evaluación de la viabilidad celular de órganos.....	41
7.3	Evaluación del daño al ADN en células de órganos.....	41
7.4	Evaluación de parámetros seminales.....	41
7.5	Evaluación de anomalidades de espermatozoides.....	42
7.6	Evaluación del daño al ADN en espermatozoides.....	42
7.7	Determinación de testosterona.....	42
VIII	DISCUSIÓN.....	55
IX	CONCLUSIONES.....	66
X	REFERENCIAS.....	67

## ABREVIATURAS

ACE	Aberraciones cromosómicas estructurales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Sitios apurínicos
Br-et	Bromuro de etidio
CAS	Registro químico de una sustancia (del inglés <i>Chemical abstracts Service</i> )
DE	Desviación estándar
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DTT	Dithiothreitol
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección al Ambiente ( <i>Environmental Protection Agency</i> )
EUG	Electroforesis unicelular en gel
FSH	Hormona folículo estimulante
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IMg	Índice de migración
ip	Intraperitoneal
LH	Hormona leutinizante
mA	Miliamperios
mM	Milimolar
MN	Micronúcleos
MT	Metalotionina
PBS	Búfer salino de fosfato
PRL	Prolactina
RHD	Rompimiento de hebra doble
RHS	Rompimiento de hebra simple
TI	Talio
UV	Luz ultravioleta

## RESUMEN

El talio (Tl) es un metal pesado catalogado como agente químico tóxico para el ambiente y los seres vivos por la agencia de protección al ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América. Por sus amplios usos y aplicaciones, residuos del metal son liberados a la atmósfera ocasionando contaminación antropogénica. La intoxicación en seres humanos ocurre por contacto ocupacional, accidental o intencional y las principales vías de acceso al organismo son la oral, dérmica y respiratoria. El daño que ocasiona en organismos es acorde a su concentración y el efecto provocado puede ser irreversible y conducir a la muerte (Vargas 2005).

El Tl no tiene función fisiológica reconocida; sin embargo, por ser ion positivo monoatómico y tener similitud de radio iónico al potasio ( $K^+$ ) es confundido con cationes esenciales. Desafortunadamente, el mecanismo de acción por el cual el Tl induce toxicidad *in vivo* no se conoce del todo y la información acerca de los alcances y repercusiones de los efectos tóxicos que induce sobre el material genético, células, tejidos y células germinales responsables de la descendencia es escasa. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el daño al ADN en diferentes tejidos somáticos y en gónada, así como alteraciones en los espermatozoides y en la concentración de testosterona de ratones machos de la cepa CD-1 tratados vía intraperitoneal (ip) con distintas dosis del acetato de talio(I) ( $CH_3COOTl$ ).

Las dosis elegidas fueron de 1.15, 2.31 y 4.62 mg/kg de acetato de talio(I) (correspondientes a 1/32, 1/16 y 1/8 de la  $DL_{50}$ ), las cuales permitieron la sobrevivencia de los animales para evaluar los efectos tóxicos a 10 y 60 días. Los resultados obtenidos en el peso corporal no muestran cambios considerables en ambos protocolos y en el peso de los órganos (hígado, riñón, cerebro y testículo) se observaron algunos aumentos en hígado y testículo en los tratamientos de 1.15 mg/kg a 10 días y en el de 4.62 mg/kg a 60 días, respectivamente. En ambos protocolos, la viabilidad celular de órganos fue mayor al 92%, la medición del daño al ADN se incrementó significativamente en los órganos evaluados en todos los tratamientos con acetato de talio(I). Los valores de los indicadores de daño al ADN

(longitud del cometa e IMg), muestran un comportamiento similar en todos los órganos en el protocolo a 10 días comparado con el de 60 días, donde el tratamiento de 1.15 mg/kg fue el que mayor daño causó; el órgano más afectado fue hígado, seguido de riñón, cerebro y testículo. En relación con las evaluaciones de parámetros seminales se observaron cambios estadísticos sobre la movilidad, el conteo y las anomalías de espermatozoides, mientras que la viabilidad y la determinación de testosterona no mostraron cambios importantes. Los resultados obtenidos aportan evidencia que el TI induce efecto genotóxico en células somáticas, células de la línea germinal y espermatozoides, además, por sus efectos adversos sobre los parámetros seminales, se puede considerar al acetato de talio(I) como un agente con propiedades genotóxicas, gonadotóxicas y reprotóxicas; sin efectos como disruptor endocrino.

## ABSTRACT

Thallium (Tl) is a heavy metal cataloged as a chemical agent toxic to the environment and living beings by the Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America. Due to its wide uses and applications, metal residues are released into the atmosphere causing anthropogenic contamination. Intoxication in humans occurs through occupational, accidental, or intentional contact and the main routes of access to the organism are the oral, dermal, and respiratory. The damage it causes in organisms is consistent with its concentration and the effect caused can be irreversible and lead to death.

Tl has no recognized physiological function; however, because it is a positive monatomic ion and has a similarity of ionic radius to potassium ( $K^+$ ), it is confused with essential cations. Unfortunately, the mechanism of action by which Tl induces *in vivo* toxicity is not fully understood, and information about the extent and repercussions of the toxic effects it induces on genetic material, cells, tissues, and germ cells responsible for the offspring is scarce. Therefore, the objective of this study was to evaluate DNA damage in different somatic tissues and in the gonad, as well as alterations in spermatozoa and in the testosterone concentration of male CD-1 mice of treated intraperitoneally with different doses of thallium(I) acetate ( $CH_3COOTl$ ).

The doses chosen were 1.15, 2.31, and 4.62 mg/kg of thallium(I) acetate (corresponding to 1/32, 1/16, and 1/8 of the  $LD_{50}$ ), which allowed the survival of the animals to evaluate the toxic effects at 10 and 60 days. The results obtained in the body weight do not show considerable changes in both protocols and in the weight of the organs (liver, kidney, brain, and testicle) some increases in liver and testicle were observed in the treatments of 1.15 mg/kg at day 10 and in the 4.62 mg/kg at day 60, respectively. In both protocols, the organ cell viability was higher than 92%, the measurement of DNA damage was significantly increased in the organs evaluated in all treatments with thallium(I) acetate. The values of DNA damage indicators show a similar behavior in all organs in the 10-day protocol compared to the 60-day protocol, where the treatment of 1.15 mg/kg was the one that caused the greatest damage; the most affected organ was the liver, followed by kidney, brain and testicle. In relation to

evaluations of seminal parameters, statistical changes were observed regarding mobility, counting, and sperm abnormalities, while viability and testosterone determination showed no significant changes. The obtained results provide evidence that the TI induces genotoxic effect in somatic cells, germline cells, and sperm. Additionally, thallium(I) acetate can be considered as an agent with genotoxic, gonadotoxic, and reprotoxic properties for its adverse effects on the seminal parameters with no effects as endocrine disruptor.

## I. INTRODUCCIÓN

Los metales son constituyentes de minerales en la corteza terrestre, desde la antigüedad el hombre se ha beneficiado con su manejo marcando momentos muy importantes en la historia como fue con la edad de cobre, bronce y hierro que llevaron a las civilizaciones a su desarrollo hasta la época actual. A inicios del siglo pasado los usos y aplicaciones de metales se han incrementado con el diseño de nuevos materiales, medicamentos y en el avance de nuevas tecnologías (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Villanueva-Rodríguez 2008).

Algunos metales cumplen funciones importantes para el metabolismo y tienen gran significado por las funciones biológicas que desempeñan, como ocurre con el hierro (Fe) en la hemoglobina, el potasio (K), magnesio (Mg) y sodio (Na) en neurotransmisores, entre otros más. Esto ha posicionado a ciertos metales en la categoría de esenciales (Ciudad 2014). Por otro lado, están los metales pesados (densidad  $\geq 5 \text{ g/cm}^3$ ) que conforman una categoría distinta, entre los que se encuentra el berilio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni), vanadio (V) y **talio (Tl)**. De este último, poco se conoce y se requiere ampliar estudios para esclarecer los mecanismos de acción y del potencial tóxico que representan, así como los efectos adversos que inducen en los seres vivos (Fergusson 1990, Rojas *et al* 1999, Järup 2003, Singh *et al* 2011, Dhokpande y Kaware 2013).

La toxicidad de algunos metales es capaz de alcanzar y alterar redes tróficas de distintos ecosistemas en agua, suelo y aire. Entre los efectos más comunes ocasionados por metales, se encuentra la reducción de la actividad antioxidante en órganos como riñón, hígado y cerebro, también pueden ocasionar deterioro oxidante a biomoléculas como el glutatión, e inducir peroxidación lipídica en membranas, así como ataque a grupos funcionales de aminoácidos y lesiones al material genético (Schützendübel y Polle 2001, Pinto *et al* 2003, Maldonado *et al* 2010, Zuluaga y Gaviria 2012).

El Tl es un metal pesado, no esencial, con efectos tóxicos a bajas concentraciones y considerado contaminante ambiental. Este metal compite por los sitios de cationes esenciales como  $\text{Na}^+$  y potasio  $\text{K}^+$  (Rangel-Guerra *et al* 1990, John y Viraraghavan 2005), además tiende a acumularse en los compartimentos intracelulares y causar toxicidad celular (EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010). Dentro de sus propiedades se encuentran sus dos estados de oxidación principales, el Tl(I) y el Tl(III), capaces de formar sales orgánicas e inorgánicas altamente solubles (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013). Toxicológicamente ambos estados de oxidación son considerados peligrosos; sin embargo, la información relacionada con los efectos toxicológicos de este metal sobre el material genético y la reproducción se encuentra limitada.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Talio

El Tl es un metal pesado (con densidad de  $11.85 \text{ g/cm}^3$ ) descubierto por Sir. William Crookes en 1874, el cual está catalogado como altamente peligroso a bajas dosis y como contaminante ambiental. Su abundancia en el planeta se estima en aproximadamente  $0.004 \text{ mg/kg}$  y a nivel de corteza se encuentra en concentraciones de  $0.3$  a  $3 \text{ mg/kg}$ . En la tabla periódica se le ubica en la familia (IIIA) con número atómico 81, su masa atómica reportada es de  $204.38 \text{ g/mol}$ , su configuración electrónica  $[\text{Xe}] 4f^{14}, 5d^{10}, 6s^2, 6p^1$ , posee dureza de  $1.2$  Mohs con electronegatividad de  $2.04$  y radio atómico de  $171$  picómetros (Douglas *et al* 1990, Budavari *et al* 1996, Pau 2000, Frattini 2005).

#### 2.1.1 Propiedades físicas y químicas

El Tl como metal presenta puntos de ebullición de  $1457 \text{ }^\circ\text{C}$  y de fusión de  $303.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Artificialmente se conocen 26 isotopos artificiales del cual el  $29.52\%$  se encuentra como isotopo  $^{203}\text{Tl}$  y el  $70.48\%$  como  $^{205}\text{Tl}$  (Fergusson 1990, Frattini 2005). Los cationes estables  $\text{Tl}^+$  y  $\text{Tl}^{3+}$  pueden formar compuestos orgánicos e inorgánicos con aniones como el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), oxido ( $\text{O}^{2-}$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), por mencionar algunos (Frattini 2005, EPA, 2009,

Karbowska 2016,). Cabe señalar que la mayoría de las sales tálicas son altamente solubles en agua con elevado peso molecular y consideradas tóxicas. En cuanto a las propiedades organolépticas estas sales en solución acuosa son incoloras, inodoras e insípidas, aspectos relevantes en su toxicidad (Fergusson 1990, Frattini 2005, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

En particular, el acetato de talio ( $\text{CH}_3\text{COOTl}$ , CAS 563-68-8) es un compuesto con peso molecular de 263.43 g/mol del cual, el 77.59 es metal puro, la forma que adquiere es cristalina, altamente soluble en agua y alcohol (Budavari *et al* 1996, ACHPPM 2007). En el pasado el metal se empleó como bactericida, en cosméticos depilatorios, en el tratamiento de hongos como la tiña y actualmente en la catálisis de reacciones químicas (Lewis y Lloyd 1933, Soria *et al* 2005).

### **2.1.2 Usos y aplicaciones**

Desde el descubrimiento del Tl, por sus propiedades toxicológicas, se utilizó en el tratamiento de enfermedades dermatológicas y en padecimientos de la sífilis, la tuberculosis y en el combate de la malaria (Rusyniak *et al* 2002). En la medicina el isótopo  $^{201}\text{Tl}$  se emplea en la obtención de imágenes al miocardio y de tumores (McKillop 1980, Yildirim *et al* 2005). Farmacéuticamente es usado en productos de belleza como agente depilatorio.

### **2.1.3 Liberación al ambiente y exposición ocupacional**

Desde el punto de vista industrial, el manejo de Tl y sus compuestos implica la liberación de residuos a la atmósfera a causa de las actividades de producción, por ejemplo; en la quema de carbón en plantas de energía, en la elaboración de conductores eléctricos para la industria, en la fabricación de diversos productos por las plantas cementeras, en la refinación de productos de minería y en menor grado en la obtención de color verde en la pirotecnia, en la quema del tabaco, en la coloración de joyería de fantasía, en la elaboración de cristales ópticos y en la fabricación de termómetros de baja temperatura, así como de algunos venenos y pesticidas de amplio espectro (Kenneth *et al* 1989, Frattini 2005, Tsai *et al* 2006,

ACHPPM 2007, Peter y Viraraghavan 2008, Cvjetko *et al* 2010, Rodríguez-Mercado *et al* 2013).

A pesar de que desde la década de los 70 varios países lo prohibieron en los pesticidas, los reportes de intoxicaciones en seres humanos por este metal indican que posiblemente se siguen formulando venenos para plagas como ratas, ratones, insectos, entre otros (Cvjetko 2010, Rodríguez-Mercado *et al* 2013).

El uso del TI va de la mano con el crecimiento poblacional y se estima que solo en Estados Unidos de América al año se liberan aproximadamente 1000 toneladas de TI al ambiente, esto como parte de residuos de actividades industriales (Léonard y Gerber 1997, OEHHACEPA 1999, Karbowska 2016).

En México no existe una regulación apropiada acerca de los usos y aplicaciones del TI, solo se le ha considerado como compuesto químico tóxico en la Gaceta Sanitaria emitida por la Secretaria de Salud (Cofepris 1987). En 2004, se publicó la norma para determinar las concentraciones de TI en probables suelos contaminados. Posteriormente, en 2009 en el acuerdo DF: 24/12/2009 la Secretaria de Salud Publicó las disposiciones respecto a pictogramas y mensajes en materia de salud, que establece la exhibición y advertencia con imágenes acerca de los efectos del consumo de tabaco y las trazas de metales pesados incluido el TI (DOF 2009). Los datos existentes que describen los efectos tóxicos del TI se han obtenido de reportes de personas intoxicadas ocupacionalmente, por accidentes, intentos de homicidio e intentos de suicidio. Lo anterior nos lleva a investigar los efectos por exposición en dosis bajas que contribuyan a explicar los mecanismos de acción de este metal (Sánchez-Chardi 2007).

Los datos que expliquen la contaminación por TI en México son limitados. Cabe señalar que un estudio realizado en Sonora y San Luis Potosí, se determinaron concentraciones de metales en sedimentos por actividad minera y metalúrgica, el análisis de muestras confirmó la presencia de TI en concentraciones de 1.20 mg/kg que están por debajo del valor establecido para suelos de uso agrícola e industrial con 5.2 mg/kg y 67 mg/kg, respectivamente (Cruz-Hernández *et al* 2018). No

obstante, cabe señalar que los residuos de metales son acumulables y representan riesgo ambiental (Sánchez-Chardi 2007).

#### **2.1.4 Toxicidad**

Las intoxicaciones en seres humanos a causa del TI ocurren principalmente por contacto ocupacional, accidental y por la ingestión de venenos. Cuando una intoxicación en persona ha ocurrido y se ignora que los síntomas son provocados por el TI, el diagnóstico clínico observado puede ser erróneo y confundido por una gripe común (IPCS 1996, Achenbach *et al* 1980, Dougherty *et al* 1988, Rangel-Guerra *et al* 1990, EPA 2009, Sharquie *et al* 2011, Afshari *et al* 2012); no obstante, se conoce toxicológicamente como gripe tállica; que, además se acompaña de náuseas, dolor abdominal e inapetencia, pérdida de pelo, efectos neurotóxicos como el temblor en manos, entumecimiento de pies, debilidad muscular, depresión, alteraciones de la conducta, taquicardia y arritmias con dificultad para respirar, que en muchos de los casos conducen a la muerte (Hirata *et al* 1998, Pau 2000, Saha *et al* 2005, Khalifa *et al* 2011). Se sabe que las manifestaciones clínicas dependen de la ruta y tiempo de exposición, así como de la concentración interna en el organismo (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Repetto y Del Peso 2001, Yumoto *et al* 2017).

En ser humano se sabe que dosis entre 8 a 12 mg/kg de TI pueden ser fatales (NIOSH 2005, Rodríguez-Mercado *et al* 2017). En particular el acetato de talio(I), es muy tóxico en bajas cantidades y catalogado como veneno para el ser humano, una dosis aproximada de 3.4 mg/kg en adultos son perjudiciales para la salud y menores a 40 mg/kg provocan la muerte. En animales de experimentación, se ha comprobado su toxicidad y la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) vía oral para perro, ratón o rata es de 18.5, 35.2 y 41.3 mg/kg respectivamente mientras, que vía intraperitoneal (ip) para rata y ratón es de 30 y 37 mg/kg, respectivamente (Carson *et al* 1987, Budavari *et al* 1996, NJDHDS 2000).

Uno de los mecanismos por los cuales el TI y sus compuestos producen toxicidad está relacionada con la interferencia de procesos vitales dependientes del potasio,

con la sustitución de potasio en la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , también por la disminución de la actividad enzimática, por ataque a los grupos sulfhídrico (-SH).

Otro mecanismo es bajar la actividad antioxidante y aumentar la oxidante en células provocando lipoperoxidación, también se conoce que el TI ataca el sitio activo del piruvato cinasa, aldehído deshidrogenasa y riboflavina, interrumpiendo o alterando de esta manera procesos metabólicos esenciales. El TI al ingresar a la célula es secuestrado por distintos orgánulos membranosos como mitocondrias, donde produce cambios en la polaridad de la membrana interna, hinchamiento mitocondrial e interrupción de la cadena respiratoria (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Cvjetko *et al* 2010, Rodríguez-Mercado *et al* 2013).

### **2.1.5 Toxicocinética**

La población en general está expuesta a través de los alimentos; por ejemplo, vegetales provenientes de sitios con riego de lagos y ríos cercanos a zonas industriales o mineras (Rodríguez-Mercado *et al* 2013). Por la semejanza con iones como el  $\text{K}^+$ , el  $\text{TI}^+$  atraviesa los canales iónicos de membranas y es absorbido rápidamente por la piel, mucosa nasal y digestiva (DeIvalls 1999, Karbowska 2016). Se acumula en los tejidos como cerebro, riñón, hígado, pulmón, músculo esquelético, hueso y cuero cabelludo. Además, se sabe que atraviesa barreras biológicas como la hematoencefálica, la hematotesticular y la placentaria (DeIvalls 1999, Galván-Arzate *et al* 2000, Karbowska 2016).

Debido a la elevada solubilidad que presentan la mayoría de sus sales, incluyendo el acetato de talio(I), este metal se distribuye homogéneamente e induce efectos dermatológicos, neurotóxicos y cardiotoxicos. En lo que respecta a su eliminación, ésta se da a través de fluidos biológicos como orina, sudor, saliva, lágrimas, en las heces a través de la bilis y en leche de madres lactantes (Galvan-Arzate y Santamaría 1998, EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010, Katsuhisa 2014).

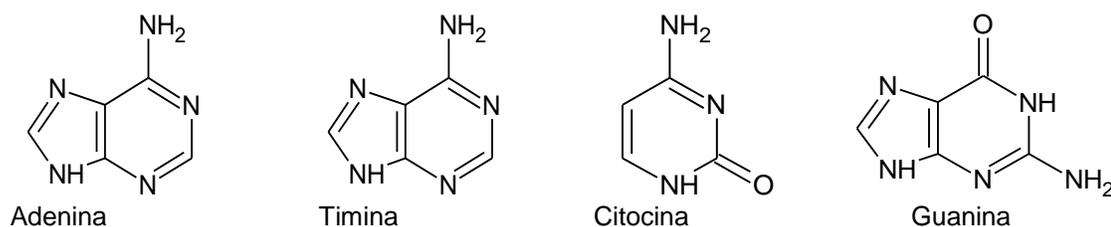
## 2.2 Ácido desoxirribonucleico

### 2.3 2.2.1 Generalidades

Durante la reproducción en mamíferos el óvulo es fecundado por el espermatozoide y se restituye la condición diploide con el 50% de la información genética de cada progenitor que trasmite a la descendencia (Jiménez-García *et al* 2003). La molécula de la herencia o ácido desoxirribonucleico (ADN) es universal y contiene información codificada de secuencias (genes) como parte del genotipo que expresa rasgos o caracteres físicos o visibles de un organismo “fenotipo”. Otras funciones del ADN, genóticamente hablando, es su eficiente capacidad para la regulación del metabolismo celular de tejidos, órganos y sistemas (Wilkins *et al* 1953, Ageno *et al* 1969, Flores y Vilanova 2015).

Por lo anterior, es imprescindible conocer la integridad del ADN incluyendo su estructura, su conformación tridimensional, el apareamiento correcto de los nucleótidos, así como los tipos de lesiones existentes sobre la molécula por agentes físicos o químicos. El nucleótido es la unidad estructural del ADN conformado por; una base nitrogenada púrica (adenina o guanina) o pirimídica (timina o citocina) enlazada a un azúcar pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato, juntos constituyen la unidad de ensamble de la molécula de la herencia (Figura 1 y 2). El orden de apareamiento entre bases que corresponde es adenina-timina, citocina-guanina para formar hebras complementarias antiparalelas unidas por interacciones “puentes de hidrógeno” que son fuerzas electrostáticas débiles susceptibles de romperse y ocasionar desnaturalización (Whatson y Crick 1953, Wilkins *et al* 1953, Pierce 2010).

Las hebras antiparalelas de la macromolécula le confieren estabilidad sobre la topología de su estructura para llevar a cabo las funciones de replicación y transcripción (RNAm en la producción de proteínas por el ribosoma), así también para regular su mantenimiento y empaquetamiento durante la compactación a cromosomas. De manera general, la información del material genético regula toda actividad bioquímica y celular.



**Figura 1.** Bases nitrogenadas de nucleótidos de la molécula de (ADN).

Algunos agentes físicos y químicos pueden modificar la estructura primaria del ADN ocasionando pérdida de conformación espacial o desnaturalización, entre ellos factores como cambios de pH alcalino y temperatura, lesiones o rompimientos en las hebras (Thomas 1993, Sancar *et al* 2004). Las agresiones químicas pueden ocurrir sobre la molécula de la herencia ocasionados por agentes como los metabolitos celulares o agentes exógenos que conducen a cambios en el genoma de cualquier organismo.

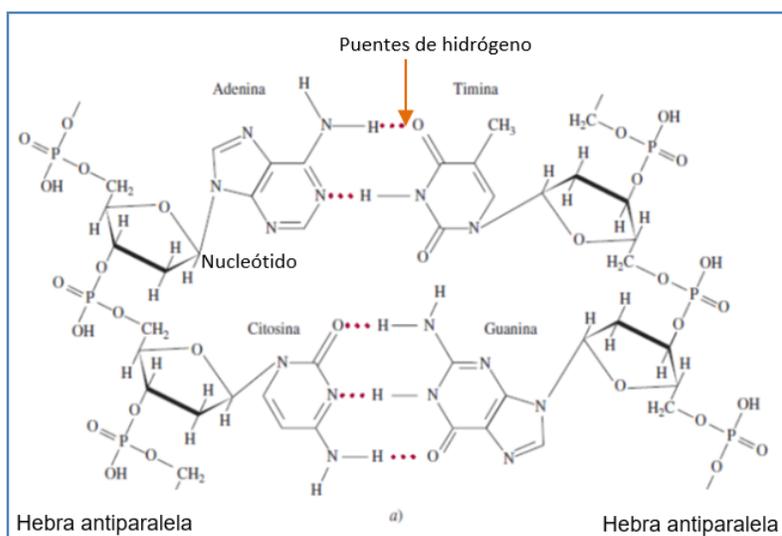
### 2.2.2 Daño al ADN

La importancia de conocer los tipos de daño al ADN se debe a que se pueden modificar vías de señalización o bien amplificar o interrumpir señales bioquímicas de genes así, perturbar procesos como la replicación del ADN, la división celular, el metabolismo o procesos de reparación del material genético, tanto en células somáticas encargadas del buen funcionamiento de órganos, como en células germinales responsables de transmitir la herencia en las especies (Sancar *et al* 2004).

En la célula, el daño primario al ADN es un evento que puede originar mutaciones, cambios en la proliferación celular y muerte, entre otras respuestas celulares. Para enfrentar y corregir los perjuicios ocasionados sobre el ADN, se activan sistemas proteicos complejos que intervienen en procesos para reparar cualquier lesión tal como bases oxidadas, pérdida de bases, entrecruzamiento de bases, enlaces cruzados proteínas-ADN, rompimientos de cadena sencilla o doble, por mencionar

algunos. Cuando las agresiones son extremas, la célula queda sin posibilidad de reestablecer sus condiciones de homeostasis y se puede inducir a la muerte celular programada o apoptosis (Wang *et al* 2003, Sancar *et al* 2004, Moustafa *et al* 2004).

Existen agentes físicos capaces de provocar daños al material genético tal como la radiación ionizante, que induce roturas mono o bicatenarias del ADN y una amplia gama de daños sobre las bases nitrogenadas. La proporción relativa de cada una de estas lesiones al ADN depende del tipo de radiación. Por ejemplo, la luz ultravioleta conduce lesiones en las que predominan los dímeros de timina (anillos de ciclobutano entre dos timinas adyacentes) y formación de los fotoproductos (6, 4-piridinas). Estas anomalías pueden cuantificarse por métodos químicos e inmunológicos (Sancar *et al* 2004).

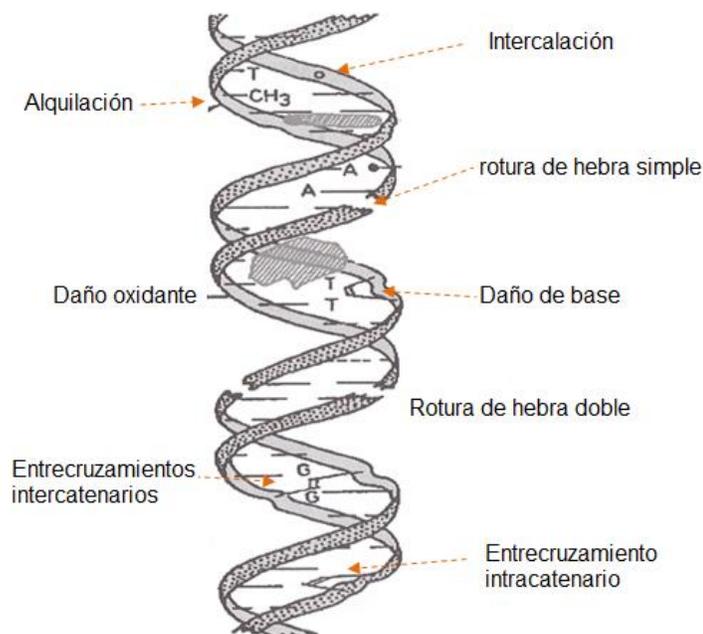


**Figura 2.** Formación de pares de bases adenina con timina y citocina con guanina a través de puentes de hidrógeno (adaptado de Chang *et al* 2010).

Por otro lado, algunas sustancias químicas electrofílicas se unen al ADN por intercalación entre bases y forman aductos. Otras sustancias generan alquilación de bases y dan lugar durante su reconocimiento y reparación a la pérdida de bases en el ADN dejando puntos apurínicos o apirimidínicos (sitios AP) o bien inserción de

bases incorrectas. La formación de aductos voluminosos sobre hebras, son reconocidos y retirados por la célula, de la misma manera la rotura de bases provocada por agentes físicos como luz UV (Sancar *et al* 2004, Tafurt y Marín 2014, Shrinivas *et al* 2017). El daño que se genera a partir de uniones covalentes y no covalentes sobre la estructura del ADN, producen anomalías y desajuste en apareamiento de bases, que conducen a la formación de bucles y burbujas entre las cadenas de ADN desestabilizando el genoma (Figura 3).

Los rompimientos de hebra sencilla (RHS) y rompimientos de hebra doble (RHD) son dos tipos de lesiones sobre ADN originados por efectos de agentes tóxicos que en algunos casos conducen a mutaciones o muerte celular. Los rompimientos se producen de manera directa e indirectamente; por acción de agentes químicos como radicales libres y agentes radiomiméticos como la bleomicina que tienen la capacidad de matar células que han perdido la capacidad de replicarse (Wyman y Roland 2006, Raynard *et al* 2008, Tafurt y Marin 2014, Shrinivas *et al* 2017,).



**Figura 3.** Molécula del ADN con algunas lesiones que inducen alteraciones conformacionales y sobre sus secuencias génicas, editado de Klaassen *et al* 1996, 2003, 2005).

Entre las técnicas disponibles para evaluar daño provocado al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos, se encuentran las pruebas citogenéticas como las aberraciones cromosómicas (AC), los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (MN). Existen otras pruebas de biología molecular como el ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling), DBD-FISH (DNA Breakage Detection Fluorescence *In Situ* Hybridization), la electroforesis unicelular en gel (EUG) o “ensayo cometa” (Cortés-Gutiérrez 2007, Álvarez *et al* 2015). Este último ensayo es ampliamente usado para evaluar el daño provocado al ADN y sobre la respuesta celular, en poblaciones de organismos expuestos en laboratorio, así como en estudios moleculares y epidemiológicos de bio-monitoreo ambiental en poblaciones humanas (Klaassen *et al* 1996, Friedberg 2003, Anderson *et al* 2013, Jadoon y Malik 2017).

### **2.2.3 Electroforesis unicelular en gel**

Algunas agencias reguladoras como la International Comet Assay Workshops (ICAW, por sus siglas en inglés) y la International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT, por sus siglas en inglés) recomiendan este ensayo para evaluar la actividad y la potencialidad tóxica de sustancias químicas que se encuentran en fase de pruebas (Hartmann 2003) y que aún permanecen en investigación sus efectos genotóxicos y carcinógenos en células somáticas, así como en células germinales que portan y transmiten la información en la herencia en organismos incluido el ser humano (Hartmann y Speit 1997, Anderson y Plewa 1998, Brendler *et al* 2005, Burlinson *et al* 2007, GHS 2011). El amplio uso del ensayo cometa se debe a que ofrece varias ventajas como:

- Es una prueba altamente sensible en la detección de daño al material genético (lesiones primarias de daño al ADN).
- La evaluación del daño es fácilmente observable al microscopio.
- Ofrece información desde una célula y para su ensayo se requieren cantidades bajas de muestra (<10,000 células) (Östling y Johansson 1984, Singh *et al* 1988, Olive *et al* 1990).

- Permite trabajar con cualquier tipo de células, su evaluación es fácil, rápida y altamente reproducible.
- Los datos obtenidos se ajustan a diferentes alternativas de análisis estadístico,
- Además, este ensayo se apoya en pruebas de viabilidad celular, que permiten eliminar falsos positivos (Hartmann *et al* 2003, Rodríguez-Mercado *et al* 2003).

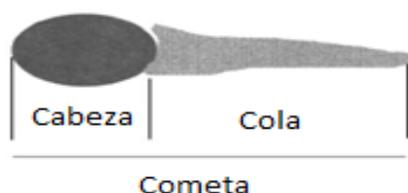
Recabando un poco de historia, en 1984 por primera vez Östling y Johanson publicaron un trabajo realizado con electroforesis donde describen la evaluación del daño al ADN al microscopio en muestras teñidas con naranja de acridina, dicho daño había migrado por acción de campo eléctrico dejando un patrón de migración de los rompimientos de hebra doble de cada célula expuestas previamente a radiación ionizante.

Originalmente el ensayo presentó algunos inconvenientes y ciertas limitaciones al detectar solo un tipo de lesiones al ADN, posteriormente se modificó incrementando el pH para aumentar el desenrollamiento y mejorar la detección del daño por tipos de corrimiento electroforético acorde a versiones de pH: *i*) a pH 7-8 conocida como electroforesis neutra, capaz de detectar RHD, *ii*) alcalina a pH 12.1–12.4, capaz de detectar RHS y RHD, sitios de reparación por escisión incompleto y entrecruzamientos o enlaces cruzados (cross-links) y por último la *iv*) alcalina a pH>12.6, para evaluar sitios sensibles al álcali (Müller 2007, McKelvey-Martin *et al* 1993).

En 1999 Tice y cols, propusieron una versión nueva que permite la detección de todos los tipos de daño en ADN. Esta modificación de incremento de pH>13 potencializa la migración de rompimientos de cadena sencilla así como, sitios sensibles al álcali, sitios de reparación incompleta y entrecruzamientos en la molécula de ADN de poblaciones celulares, de distintas líneas celulares (Singh *et al* 1988, 1989, Tice *et al* 1999, 2000, Harman *et al* 2003, Burlinson *et al* 2007), así como con células obtenidas de animales de experimentación expuestos a

xenobióticos de los cuales se desconoce su potencial genotóxico (Hellman *et al* 1995).

En este ensayo, para evaluar el daño al ADN de las células, se requiere de dos tratamientos, primero para remover todo el sistema membranoso, así como las interacciones ADN-proteínas y otro para la desnaturalización del ADN cuando se encuentra en solución salina electroforética, donde las lesiones al ADN migran por diferencias de carga bajo la influencia de un campo eléctrico (Lee y Steinert 2003). El resultado de este campo eléctrico es la formación de cometas fácilmente observables por fluorescencia a través de la tinción del ADN por fluorocromos (como el agente intercalante bromuro de etidio, el cual debido a la alta afinidad que presenta reacciona y emite fluorescencia). Los cometas observados muestran un patrón de migración distinto uno de otro y su evaluación requiere de la medida del tamaño de la cabeza y la cauda o bien mediante programas computacionales (Figura 4) (Ashby *et al* 1995). En la literatura la evaluación del daño al ADN mediante EUG, es altamente recomendable llevarla a cabo seguida de la evaluación de la viabilidad celular, esto para eliminar falsos positivos en el momento del análisis de los datos (Cotelle y Féraud 1999).



**Figura 4.** Patrón de migración del daño al ADN a partir del núcleo de una célula agredida químicamente (imagen adaptada de Lee y Steinert 2003).

### 2.2.3.1 Efectos mutagénicos y genotóxicos del TI y sus compuestos

Los daños que son ocasionados en células y sobre el material genético conducen a la inestabilidad del genoma, así como a mutaciones relacionadas con diversos padecimientos y enfermedades degenerativas como Alzheimer, Parkinson o cáncer (Myung 2008, Ogino *et al* 2016). Los agentes que dañan o lesionan el ADN,

directa o indirectamente, se consideran genotóxicos (Phillips y Arlt 2009, Nagarathna 2013).

Para el caso TI y sus compuestos, la información acerca de los efectos mutagénicos y genotóxicos son escasos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013). Se tienen algunos estudios con bacterias (Kanematsu *et al* 1980, Léonard y Gerber 1997) y plantas (Babić *et al* 2009); pero los datos son poco concluyentes. Resultados similares se encontraron en líneas celulares de mamífero donde el TI no induce mutaciones, pero en un modelo *in vivo* causa letales dominantes (Zasukhina *et al* 1983).

También son contradictorias evaluaciones citogenéticas con pruebas como aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), micronúcleos (MN) e intercambios de cromátidas hermanas (ICH), así como con la prueba de mutaciones del gen *hprt*, utilizando células de médula ósea de criceto chino, cultivos de células humanas y líneas celulares de ratón (IPCS 1996, Migliore *et al* 1999). No obstante, en seres humanos la exposición accidental o intencional a venenos de TI da indicios de riesgo genotóxico.

En resultados obtenidos de un análisis citogenético con células sanguíneas de un paciente varón de 48 años que ingirió 200 mg de veneno sulfato de talio(I) ( $Tl_2SO_4$ ), se encontró un incremento de células binucleadas con una frecuencia elevada de MN sin embargo, las frecuencias de AC e intercambio de cromátidas hermanas no mostraron cambios, mientras que, en otro estudio se encontraron AC de tipo cromatídico en linfocitos de sangre periférica de 13 personas expuestas accidentalmente a venenos a base de TI; no obstante, no se hallaron cambios en la frecuencia de MN en células binucleadas (OEHHACEPA 1999).

Por lo anterior y debido a que hay disimilitudes en los reportes antes citados, en estudios previos se propuso como objetivo evaluar la capacidad de varias sales de TI ( $TlCH_3COO$ ,  $TlCl_3$  y  $Tl_2SO_4$ ) para inducir cambios en la proliferación celular y alteraciones en el material genético a nivel cromosómico y sobre las cadenas de ADN, utilizando como modelo biológico cultivos celulares de sangre periférica de

humana. Entre los datos obtenidos que observo que las sales de TI (en concentraciones de 0.5 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) incrementan las ACE, bloquean la proliferación e inducen acentuados efectos citotóxicos, además el acetato de talio(I) provoca rupturas sobre la cadena de ADN, rupturas inducidas principalmente por lesiones conocidas como sitios abásicos (Rodríguez-Mercado *et al* 2015, 2017).

### **2.3 El Ratón como modelo de experimentación**

En la segunda parte del siglo pasado, los estudios de los efectos toxicológicos en el sistema reproductivo del macho ganaron mayor importancia debido a la acción adversa de compuestos químicos y xenobióticos que inducen alteraciones en la descendencia de los animales. Entre los organismos de prueba más usados como modelo de prueba en toxicología se encuentran el conejo, el cobayo, el criceto, la rata y el ratón. Este último es recomendado en la literatura como un modelo biológico confiable para la investigación y por la pronta respuesta que ofrece su metabolismo durante estudios toxicológicos (Antoine-Moussiaux *et al* 2008).

El ratón casero *Mus Musculus* es un organismo ampliamente usado y recomendado en el campo de la investigación como animal de laboratorio. Entre las ventajas que presenta se encuentran su ciclo de vida corto, elevado número de crías, temprana madurez sexual, fácil manejo y alojamiento, manutención a bajos costos, estabilidad genómica, la similitud metabólica con el ser humano, bajo coeficiente de variabilidad en respuesta comparado con el metabolismo humano, elevada producción espermática, alta organización del epitelio germinal, factibilidad celular al evaluar la morfología espermática y sobre el contenido del eyaculado, por mencionar algunas (Amann 1986, Sans-Fuentes 2014). Por estas razones el organismo se ajusta y se extiende su empleo a diferentes líneas de investigación para estudios *in vitro* e *in vivo*.

#### **2.3.1 Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)**

En estudios experimentales el empleo de animales de laboratorio es esencial con objeto de realizar pruebas que permitan revelar efectos toxicológicos de sustancias como fármacos en fases de prueba. La literatura recomienda emplear

dosis menores a la  $DL_{50}$  caracterizada por provocar la muerte del 50% de organismos sometidos a tratamientos por alguna ruta de administración en una población de animales sometidos a pruebas, lo cual, implica monitoreo de los efectos observables en organismos de estudio (RTECS 1997, Honma y Suda 1998, Saganuwan 2017). Para el caso del acetato de talio(I) la  $DL_{50}$  en ratón es de 37 mg/kg (Bingham 2001).

### **2.3.2 Tratamientos con animales**

En estudios de toxicidad *in vivo* se recomiendan probar tres dosis distintas, de ellas una alta que induzca toxicidad evidente, una intermedia y una dosis baja que no sea capaz de producir efectos tóxicos notables (Klaassen *et al* 2005). Otros criterios que considerar son; el nivel mínimo efecto adverso observable (LOAEL del inglés: lowest observed effect level), el nivel de efecto adverso no observable (NOAEL del inglés: no observed adverse effect level) que al evaluarse no existen significancias considerables ya sean biológicamente o estadísticamente. Los tratamientos por su duración en organismo pueden ser agudos (una sola administración del compuesto), los subcrónicos que incluyen dosificaciones en un periodo aproximado de 3 meses y los crónicos que son mayores de 6 meses (OECD 1983 CBMNR 1987, OECD 2001, Fuentes y Candela 2003).

### **2.3.3 Eje hipotálamo hipófisis testículo**

#### **2.3.3.1 Regulación hormonal**

Las hormonas son sustancias o señales químicas que regulan vías metabólicas. Su síntesis se lleva a cabo en glándulas endocrinas como hipotálamo que vierte sus secreciones a la circulación sistémica para luego ser transportadas a tejidos específicos u órganos blancos como el testículo. El tipo de interacción que ocurre es entre hormonas y receptor en superficie de membrana celular está codificada por la especificidad enzima-sustrato, con la formación del complejo a nivel bioquímico se inducen respuestas fisiológicas susceptibles de ser modificadas positivamente o de forma negativa ante la presencia de estímulos de sustancias denominadas agonistas que estimulan la producción hormonal y antagonistas que la

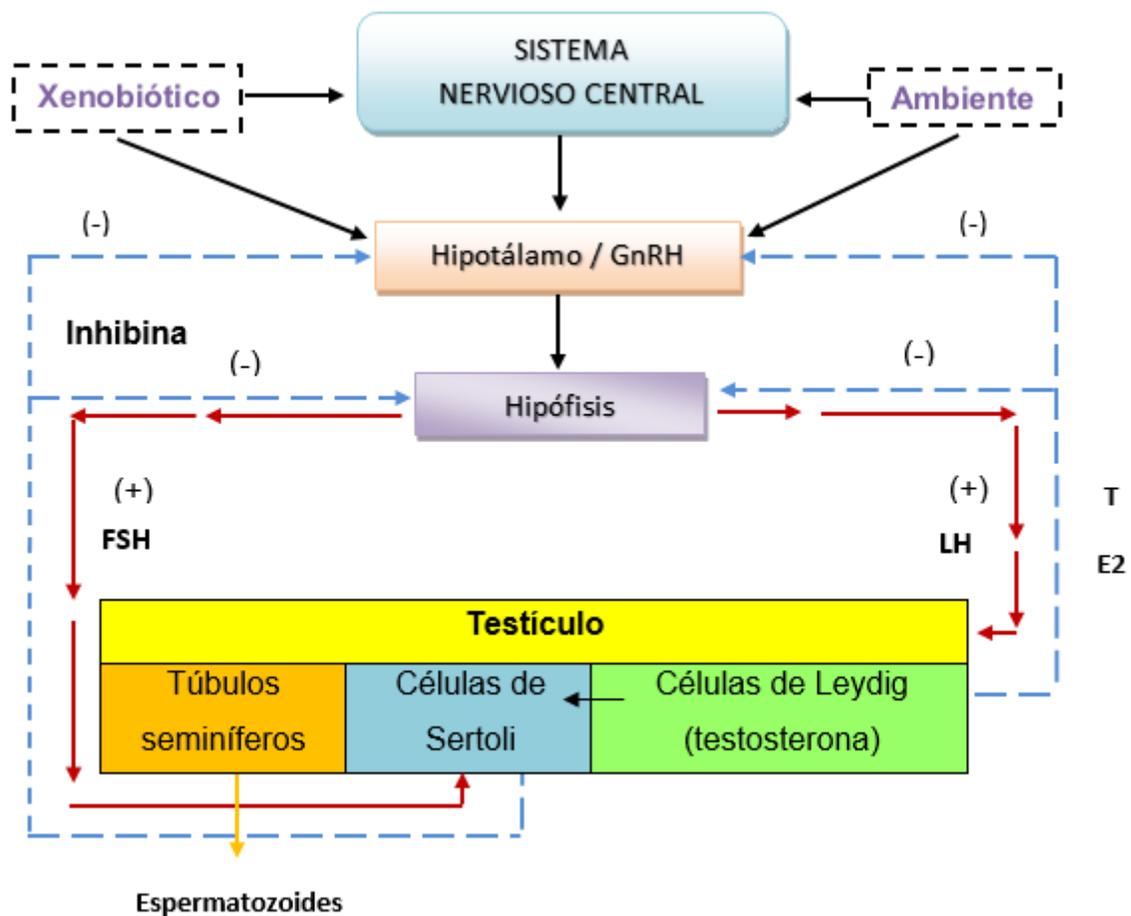
bloquean modificando así la homeostasis y la funcionalidad de órganos, incluyendo la espermatogénesis (Nelson y Cox 2008).

La espermatogénesis está regida por la actividad neuroendocrina a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. El circuito hormonal se activa al nacer para dar paso al mantenimiento y regulación hormonal, tanto para el crecimiento como para el desarrollo sexual, el comportamiento sexual y la maduración gonadal y de espermatozoides, procesos que requiere de buena comunicación hormonal (Ramaswamy y Weinbauer 2015).

En la Figura 5, se muestra el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, donde la secreción de la hormona luteinizante (LH) es producida por la hipófisis en el hipotálamo. La presencia de la hormona reguladora de gonadotropinas (GnRH) se une a receptores en células de la adenohipófisis para inducir en la hipófisis la secreción de LH y de la hormona folículo estimulante (FSH). Así, juntas son transportadas sistémicamente a las células intersticiales del testículo (Barañaño 2009).

En el testículo la LH controla la secreción de testosterona y FSH la producción de espermatozoides en el túbulo seminífero. La testosterona junto con la Inhibina, ejercen la retroalimentación negativa directamente sobre el hipotálamo y sobre la hipófisis para el reajuste de LH y FSH, regulando de esta manera el proceso de espermatogénesis y la secreción de testosterona (Scaglia *et al* 2009, Yeung *et al* 2011).

En mamíferos de vida fértil, la espermatogénesis es el proceso especializado y altamente sensible que implica la proliferación de células germinales a partir de espermatogonias esenciales ( $2n$ ) que evolucionan a espermatozoides maduros y capacitados ( $n$ ). Existen algunos parámetros que permiten monitorear la funcionalidad del testículo y a través de su evaluación se obtiene información del estatus funcional. Entre estos se encuentran los parámetros seminales tal como el movimiento de espermatozoides, la densidad espermática, las alteraciones o anomalías morfológicas de los espermatozoides, así como la viabilidad celular y los niveles de testosterona en sangre, entre otros (Batty 1978, Malmgren 1997).



**Figura 5.** Esquema de la relación de xenobióticos y el ambiente sobre el eje hipotálamo-hipofisis-testículo. Así también la acción de hormonas tal como LH, GnRH, FSH, testosterona (T), estradiol (E<sub>2</sub>). Las líneas negativas punteadas de color azul indican regulación negativa y las líneas color marrón con dirección indican regulación positiva (adaptado de Norman y Litwack 1997).

### 2.3.4 Xenobióticos como disruptores

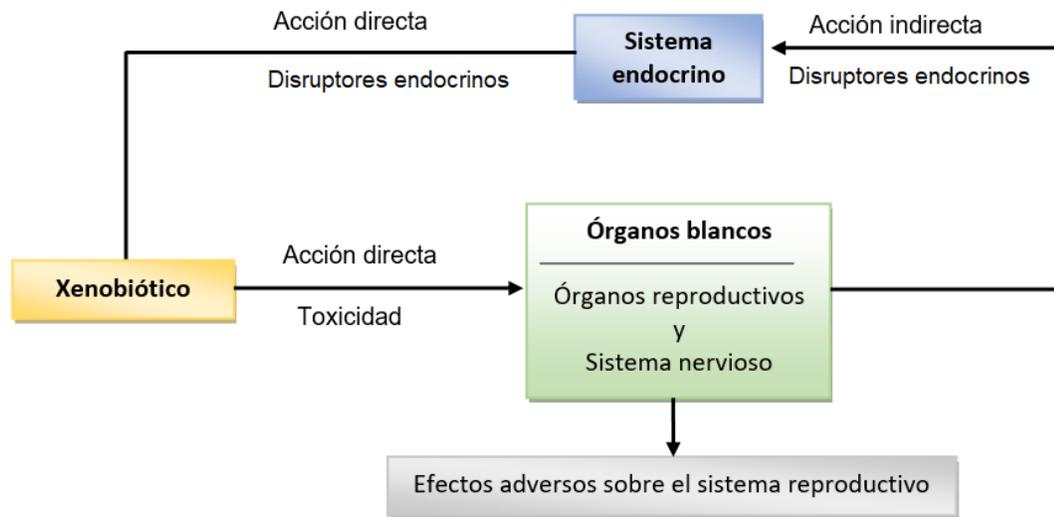
Un xenobiótico es considerado un agente extraño al organismo con capacidad de alterar el metabolismo o alguna ruta bioquímica. Los xenobióticos que alteran la modulación hormonal, por mecanismos como sobre expresar o interrumpir los mensajes químicos son considerados como disruptores endocrinos (Amann 1986, Brinkworth 1995, Scaglia 2009, Wirth y Mijal 2010, Pizent *et al* 2012).

Los disruptores endocrinos pueden tener diferentes orígenes, pueden ser i) compuestos farmacéuticos como el etinil estradiol, dietilestilbestrol, ii) productos naturales como los fitoestrógenos y el genistein y daidzein, iii) algunos fungicidas como la micotoxina fúngica, la zearalelona, o bien iv) pertenecer al grupo de los metales como cadmio, mercurio, uranio, arsénico o plomo (Choi *et al* 2004, Scaglia *et al* 2009, Marzec-Wróblewska *et al* 2012, Knez 2013).

Al estudiar los efectos de xenobióticos en animales de prueba, además de las dosis se recomienda tomar en cuenta la duración del tratamiento (agudo o crónico), la vía de administración, así también conocer las propiedades físicas y químicas de la sustancia, el grado de solubilidad y en lo posible la velocidad de distribución y acumulación en órganos blanco (CBMNRC 1987, Fenner-Crisp *et al* 2000, Pizent *et al* 2012).

En la gónada el desbalance de metales esenciales y la presencia de metales tóxicos puede provocar efectos perjudiciales e irreversibles sobre células de (Valko *et al* 2005, Scaglia *et al* 2009, Pizent *et al* 2012). Se conocen algunos xenobióticos los cuales además de causar perjuicios en diversos tejidos pueden afectar la gónada masculina y ocasionar alteraciones hormonales, daño al material genético y alteraciones sobre espermatogénesis y la espermiogénesis (Figura 6) (Smith 1976, Wirth y Mijal 2010).

Por lo anterior, el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (NRC, del inglés: *National Research Council*) estableció tres categorías de biomarcadores; a) de exposición, b) de efectos y c) de susceptibilidad, para estudiar alteraciones en distintos estadios celulares para comprender mecanismos básicos de respuesta sobre el testículo como daño reproductivo (BMEHR 1987, Kyung-Taek 2017).



**Figura 6.** Diagrama de acción directa e indirecta de disruptores endocrinos causantes de efectos adversos en mamíferos (adaptado de Kavloc y Ankley 1996).

## 2.4 Espermatogénesis

Después de los años 50, se iniciaron estudios de investigación experimental en mamíferos tratando de comprender el papel del espermatozoide en la reproducción humana, desde entonces los estudios con animales de laboratorio han permitido la comprensión de parámetros seminales como la cantidad, su movilidad, la viabilidad, la morfología, la cinética, mecanismos de regulación hormonal, la fecundidad, entre otros (Junko y Kazuo 1986, Yoshida 2012, Ariagno y Mormandi 2016, Kouassi *et al* 2017).

La cinética de la espermatogénesis es un proceso constante caracterizado por la reducción de material genético, es altamente sensible y delicado que implica cambios en su desarrollo morfológico para su maduración y capacitación. La duración de la espermatogénesis es distinta entre especies, por ejemplo, en rata va de 12 a 13.3 días, en conejo 43 días, en perro 54 días, en criceto o ratón 35 días, mientras que para el ser humano dura 64 días; no obstante, factores naturales como la edad influyen en la calidad y producción de gametos (Haschek *et al* 2010). La espermatogénesis está regulada por la secreción de testosterona producida por células de Leydig en testículo (Rey 2003, Silva-García 2006). Por ésto, los estudios

realizados con esta estirpe celular han ganado importancia ya que transmiten el 50% del material genético del progenitor a la descendencia.

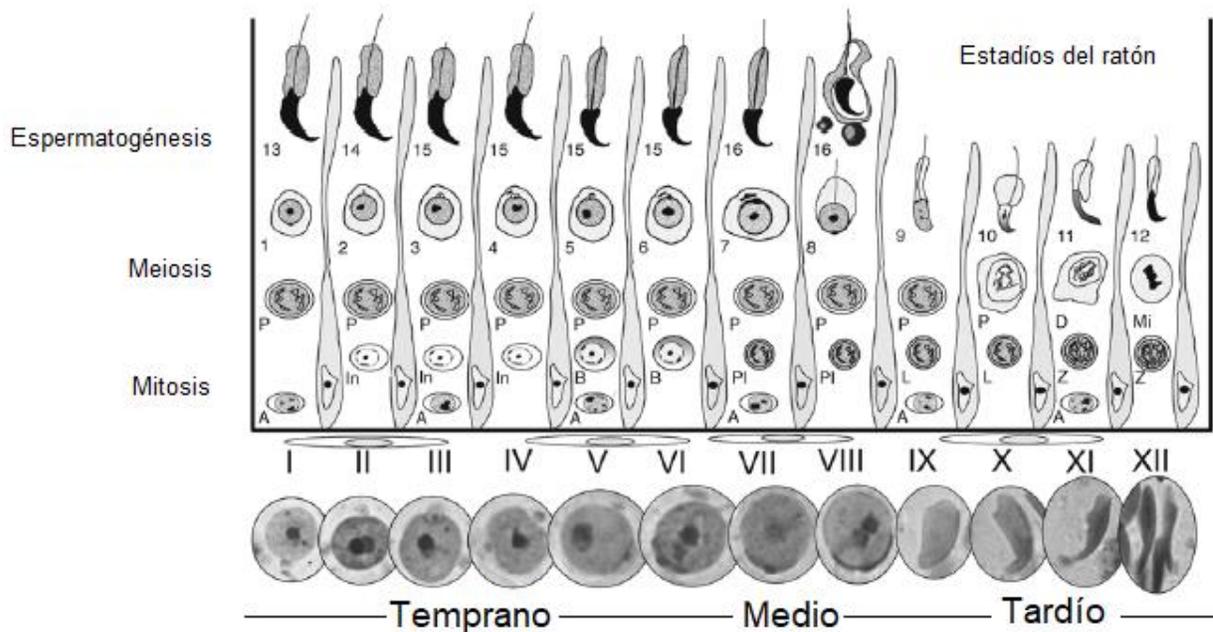
En el ratón, la espermatogénesis consta de tres etapas; la mitosis, meiosis y espermiogénesis. Para su estudio, Hess y Renato (2008), propusieron XII estadios acorde a cambios observados en la región de Golgi de espermátidas, acorde a la formación del sistema acrosómico. Estos estadios se dividen en tempranos (I-V), medios (VI-VIII) y tardíos (VIII-XII) (Figura 7).

En el tejido testicular, la membrana basal se caracteriza por un soporte de células diploides ( $2n$ ) llamadas espermatogonias o células madre no diferenciadas, que se encuentran reguladas por testosterona secretada por células intersticiales. La mitosis se lleva a cabo en espermatogonias ( $2n$ ) para mantener una población basal, el nicho del epitelio seminífero contiene 4 tipos distintos de espermatogonias indiferenciadas; tipo A [A sola; ( $A_s$ ), A pareada; ( $A_{pr}$ ), A alineada; ( $A_{al}$ )], espermatogonias diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  y  $A_4$ ), espermatogonias intermedias ( $I_n$ ) y espermatogonias tipo (B); todas reguladas por las células de Sertoli (Figura 7).

Una vez ocurrida la división de células B por mitosis se da paso a la meiosis I y II en el estadio XII, para formar dos espermatocitos que pasan por preleptoteno, leptoteno y zigoteno, esta transición dura aproximadamente 14 días en ratones. Es decir, las espermatogonias B se dividen por mitosis para originar espermatocitos primarios  $2n$ , donde la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I produce 2 células  $1n$  o espermatocitos secundarios los cuales entran en meiosis II, separándose las cromátidas hermanas “no idénticas”, para formar 4 células  $1n$  conocidas como espermátidas esféricas (Figura 7).

La espermiogénesis se inicia con espermátidas esféricas ( $1n$ ) para continuar con su elongación y la alta condensación y madurez del espermatozoide en el lumen del túbulo seminífero. La espermiogénesis implica una evolución en 4 pasos esenciales; primero la formación del acrosoma a través de vesículas y enzimas hidrolíticas, segundo la maduración de la envoltura nuclear y la vesícula cromosómica se acerca al núcleo espermático, tercero la migración del sistema acrosomal a través de la

superficie ventral de la elongación del núcleo y cuarta la maduración en la cual el núcleo continúa con su condensación y el cromosoma con la maduración. Dicho proceso es similar en ratas, búfalos, carneros y cerdos (Hess y Renato 2008).



**Figura 7.** Esquema del nicho del epitelio del tubo seminífero de ratón, estadios I-XII de la espermatogénesis del ratón (modificado de Hess y Renato 2008).

Con la madurez los espermatozoides adquieren movilidad, dinamismo para alcanzar y fertilizar el óvulo, para de esta manera restituir la diploidía y transmitir los genes del progenitor a su descendencia (Brinster y Zimmermann 1994).

Para proteger el material genético (ADN) de los espermatozoides de alteraciones o lesiones, este se encuentra altamente organizado a distintos niveles de compactación por proteínas de empaquetamiento como son las histonas y protaminas (Brinster y Zimmermann 1994, Alberts *et al* 2004, Klug *et al* 2006). El espermatozoide anatómicamente presenta dos regiones morfológica y funcionalmente distintas; la cabeza y el flagelo. La cabeza contiene el acrosoma

rodeado de enzimas hidrolíticas, orgánulos citoplasmáticos y el núcleo que en su interior contiene, altamente ordenado y compactado por protaminas, el 50% del genoma de un organismo. Mientras que, el flagelo alberga a las mitocondrias que produce la energía, por hidrólisis del ATP, necesaria para la ondulación y el desplazamiento de la cubierta de la zona pelúcida prolongada hasta la corona radial del óvulo para la fecundación (Haschek *et al* 2010, Ikawa *et al* 2010). Otras funciones del sistema reproductor de animales macho se pueden apreciar en el Cuadro I.

**Cuadro I.** Algunas funciones del sistema reproductor en mamífero.

Tejido	Función reproductiva
Testículo	Producción de espermatozoides a partir de células espermatogonias madre
Epidídimo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de testosterona por las células de Leydig</li> <li>• Maduración de espermatozoides para la fertilización</li> <li>• Almacenamiento de espermatozoides antes de la eyaculación</li> <li>• Reabsorción de líquido de los túbulos seminíferos</li> <li>• Aporte de moléculas esteroides, transporte de ácidos grasos por la carnitina, inositol o vitamina B8</li> </ul>
Vesículas seminales, próstata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de fluido seminal con nutrientes y enzimas para la sobrevivencia del espermatozoide y proteínas involucradas en la reacción acrosómica</li> </ul>
Glándula coagulante y glándula prepuccial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de feromonas</li> </ul>
Hipófisis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secreción de gonadotropinas: LH, FSH y prolactina (PRL).</li> </ul>
Hipotálamo /SNC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secreción de dopamina</li> <li>• Regulación del comportamiento sexual y del funcionamiento</li> </ul>

Tomado de Haschek *et al* (2010).

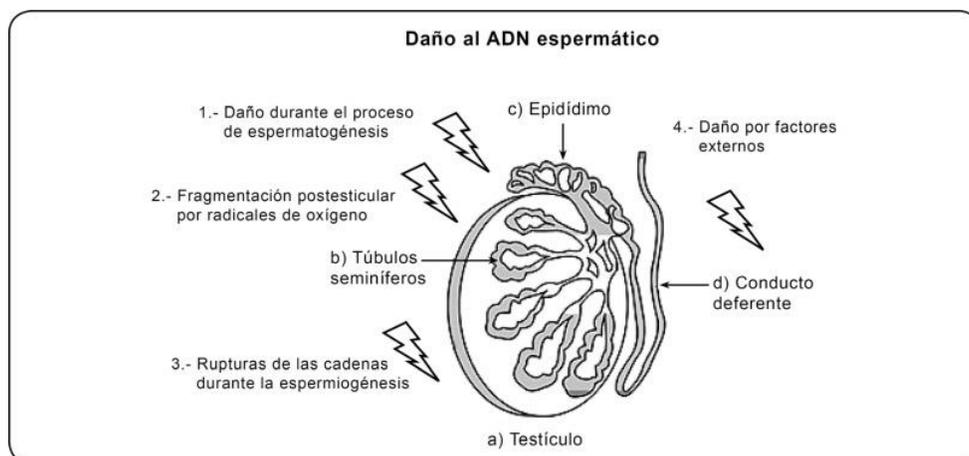
#### 2.4.1 Alteraciones al espermatozoide

La linfa sanguínea es el medio de transporte de nutrientes y de oxígeno, puede contener xenobióticos que se han filtrado a la circulación sistémica y tienen capacidad de atravesar barreras biológicas como la testicular. Aquellas sustancias que modifican la homeostasis del testículo se conocen como gonadotóxicos que al

activarse pueden provocar agresiones químicas sobre distintas biomoléculas como lípidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos y otras como glutatión ocurre con algunos metales (Figura 8) (Steinberger y Klinefelter 1993, Kavloc *et al* 1996, Prado *et al* 2002).

Además, se conoce que los xenobióticos compiten por receptores celulares con capacidad de inhibir la actividad reguladora de la esteroidogénesis y ocasionar trastornos endocrinos sobre la testosterona, reguladora de la espermatogénesis (Hodgson 2004). Entre los efectos más comunes de agentes gonadotóxicos se encuentran los siguientes:

- Daño al material genético.
- Reducción de la calidad del semen que incluye el volumen del semen, la concentración de espermatozoides, la cantidad, la motilidad, la viabilidad (vitalidad) y la morfología espermática.
- Alteraciones de la función secretora de la próstata y vesículas seminales y en plasma seminal por ejemplo zinc y azúcar.
- Disrupción en la función endocrina de hormonas sexuales como testosterona, entre otras.



**Figura 8.** Muestra la gónada del macho como órgano blanco de ataque por xenobióticos (tomado de Quintero-Vásquez *et al* 2015).

#### **2.4.2 Efectos reprotóxicos del TI y sus compuestos**

En la literatura son pocos los estudios en ser humano encaminados a conocer los efectos sobre la reproducción provocados por el TI; sin embargo, estos indican que el sistema reproductor es susceptible a ser dañado. Por ejemplo, datos clínicos y epidemiológicos hacen mención de que la acumulación de TI en gónadas provoca, reducción de libido e impotencia en personas expuestas crónicamente (Ziskoven *et al* 1983, Mulkey y Oehme 1993). O bien, se han encontrado personas que desarrollan alopecia como síntomas de toxicidad (Dolgner *et al* 1983, Repetto y Del peso 2001).

Buscando explicación a las repercusiones del TI, a nivel reproductivo, algunos estudios con animales de experimentación han contribuido a conocer el modo de acción, pero aún son limitados. Datos con rata o ratón sugieren que las consecuencias observadas sobre el desarrollo y la reproducción en ser humano son ocasionadas por sus efectos sobre testículos y células espermáticas (Zasukhina *et al* 1983, Gregotti 1985, Formigli *et al* 1986, Wei 1987).

En ratas Wistar macho la administración de sulfato de talio(I) en agua de beber, no causa cambios en los niveles de testosterona plasmática, pero se observó acumulación de TI en testículo y a los 60 días anomalías testiculares y reducción de la motilidad espermática (Formigli *et al* 1986). Gregotti (1985 y 1992) encontraron cambios ultraestructurales en el testículo con alteraciones en las células de Sertoli y al examinar el efecto *in vitro* notaron que el TI causa desprendimiento de las células de Sertoli de forma dependiente del tiempo y de la concentración.

En otro estudio al experimentar con ratones machos Kunming la administración vía oral de carbonato de talio(I) en agua durante 6 meses, fue capaz de reducir la movilidad e incrementar la mortalidad espermática de forma dependiente de la dosis, así también indujo acumulación del número de espermatozoides e incrementó el porcentaje de espermatozoides anormales; sin embargo, al cruzar machos tratados con hembras sin tratar el índice de reproducción y el número de implantes no se modificó (Wei 1987). A pesar de que se tiene datos de sus efectos sobre la reproducción y el desarrollo, éstos no son completos, además de que son aislados y

no se han realizado estudios en el que se relaciones su efecto en el sistema reproductor y sus alcances sobre el material hereditario en el mismo organismo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El TI es un metal pesado considerado altamente tóxico que al contacto con organismos se absorbe sin dificultad, se distribuye vía linfática y tiende a acumularse en el cuerpo. Esto se debe a que cruza al interior de la célula por los mismos canales que utiliza el potasio ( $K^+$ ). Por otro lado, el TI tiene alta afinidad por los grupos sulfhídrico de las proteínas, además es capaz de alterar la producción de ATP y otros procesos del metabolismo. Sin embargo, son pocas las investigaciones que demuestran sus efectos a nivel sistémico en organismos expuestos, por lo que en el presente estudio se analizó su mecanismo de acción sobre el material genético, así como sus efectos sobre los parámetros seminales y la testosterona. Para ello, se utilizó como modelo experimental el ratón, donde se evaluó *in vivo* el efecto del TI sobre la función de las células somáticas y germinales.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El TI es capaz inducir toxicidad celular y genética *in vitro*. Si estos efectos son inducibles *in vivo*, al administrar dosis de acetato de talio(I) a ratones de la cepa CD-1, se espera encontrar cambios como la reducción de la viabilidad celular y daños sobre el ADN de diferentes órganos, además de, alteraciones en los parámetros seminales como incrementos de anomalías, reducción del conteo, movilidad y viabilidad de espermatozoides y en los niveles de testosterona.

## V. OBJETIVOS

### General

Evaluar el daño al ADN de células obtenidas de distintos tejidos somáticos y de gónada, así como alteraciones en los espermatozoides y en la concentración de testosterona de ratones machos de la cepa CD-1 tratados vía intraperitoneal (ip) con distintas dosis del acetato de talio(I).

### Particulares

- A partir de la  $DL_{50}$  de acetato de talio seleccionar tres dosis que permitan la sobrevivencia durante los tratamientos de 10 ó 60 días.
- Evaluar la viabilidad de muestras celulares de hígado, riñón, testículo y cerebro mediante la tinción dual de CFDA-BrEt.
- Estimar el daño al ADN de las células de los diferentes tejidos mediante la electroforesis unicelular en gel alcalina.
- Realizar el conteo de espermatozoides y evaluar la viabilidad, la morfología y la movilidad de los mismos mediante el análisis seminal.
- Estimar el daño al ADN de los espermatozoides.
- Determinar las concentraciones de testosterona en plasma sanguíneo.
- Establecer la relación dosis y tiempo-dependiente

## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Animales

Se emplearon ratones de la cepa CD-1, de al menos diez semanas de edad con pesos entre 28-42 gramos. Los animales fueron elegidos al azar y las camadas integradas se alojaron en cajas de polisulfonato marca Allentown, durante los tratamientos se mantuvieron en condiciones de bioterio (Bioterio FES-Zaragoza, Campus II), con fotoperiodos controlados de 12 h de luz/12 h de oscuridad, temperatura de 23 °C y humedad promedio de 36%. La alimentación de ratones se basó en pellets (Harlan 2018S Tekland Global 18% Protein Rodent Diet, USA) y agua *ad libitum*. El manejo de animales se dio como lo establece en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (SAGARPA1999, De Aluja 2002).

### 6.2 Acetato de talio(I)

El compuesto acetato de talio (I) fue obtenido de la compañía de productos químicos Riedel-de Haën, (CH<sub>3</sub>COOTl, CAS no. 563-68-8; Miunich, Alemania) con pureza ≥ 97%. El compuesto fue disuelto en agua inyectable y filtrado con membrana de poro de 0.22 µm antes de su uso. En todos los casos, la ruta de administración fue por vía ip.

Antes de seleccionar las dosis a trabajar se valoró la DL<sub>50</sub> por exposición aguda (a 14 días) reportada en la literatura. Se conformaron dos grupos de 5 animales, se contó con un grupo testigo al cual se le administró agua inyectable y otro grupo al que se le administró la DL<sub>50</sub> de acetato de talio(I) que es de 37 mg/kg de peso (de acuerdo con la guía 415 y 416 de la OECD (1983, 2001). Los animales se pesaron cada tercer día previamente a la administración y se monitorearon dos veces por día para registrar los decesos por toxicidad del acetato de talio(I). Se realizaron dos experimentos independientes con su repetición.

### **6.2.1 Selección de subdosis de DL<sub>50</sub> de acetato de talio(I)**

Para los tratamientos por 10 ó 60 días, después de la valoración experimental de la DL<sub>50</sub>, se probaron y eligieron 3 dosis que permitieron la sobrevivencia de los ratones, lo anterior fue para poder evaluar los efectos tóxicos ocasionados por el compuesto. Las subdosis seleccionadas fueron 1/32, 1/16 y 1/8 de la DL<sub>50</sub> de acetato de talio(I), correspondientes a 1.156, 2.312 y 4.625 mg/kg de peso del ratón, respectivamente.

### **6.2.2 Tratamientos**

Para los tratamientos tanto de 10 como de 60 días, se formaron 4 grupos de 5 animales cada uno, los grupos se distribuyeron de acuerdo con el **Cuadro II**.

### **6.3 Obtención de muestras celulares**

Al término del tiempo de tratamientos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los órganos de interés fueron extraídos y pesados. Posteriormente, se tomaron las biopsias de hígado, riñón, corazón, pulmón, testículo y cerebro, se lavaron con solución fisiológica (PBS, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> de Sigma-Aldrich Chem. GmbH, USA) y las muestras celulares de cada órgano se obtuvieron disgregando mecánicamente el tejido en 1.5 mL de PBS y se trabajaron de inmediato. Por otro lado, con una jeringa de insulina con heparina se obtuvieron células sanguíneas por punción cardíaca. De esta manera una parte de cada muestra se utilizó para evaluar la viabilidad celular y con otra se realizaron las preparaciones de las laminillas para estimar el daño al ADN empleando la electroforesis unicelular en gel.

**Cuadro II.** Tratamientos a 10 ó 60 días con acetato de talio(I) y su influencia sobre la espermatogénesis y la espermiogénesis del ratón *Mus musculus*.

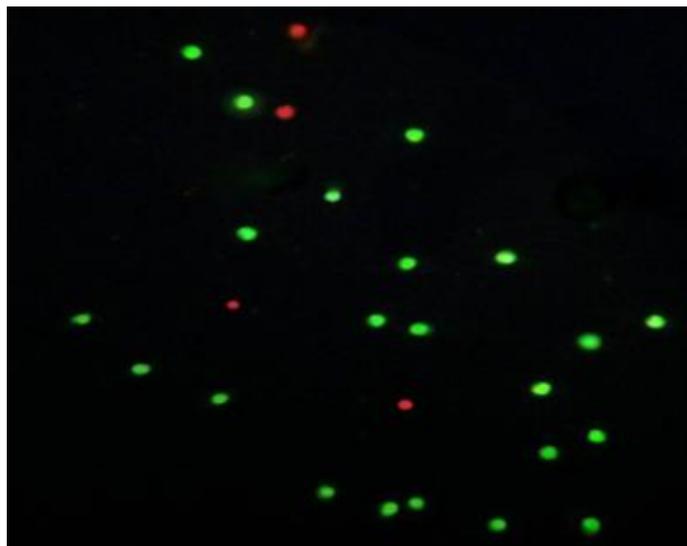
		Tratamiento en días *																													
		60	50	40	30	20	10	0																							
		Espermatogénesis entre 39-41 días							Espermiogénesis																						
		<b>Fases celulares:</b>																													
		Mitosis	Meiosis	Especialización y capacitación celular (espermiogénesis)						Maduración																					
		<b>Características principales:</b>																													
Tratamientos con acetato de talio(I)	Tejido basal: células de Sertoli, células de Leydig y espermatogonias indiferenciadas		Fases en el espermatozoide: meiosis I (preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno) y meiosis II						Espermatozoide morfo- y fisiológicamente funcional y capacitado																						
	Síntesis de ADN			Transición de proteínas (histonas a protaminas)																											
	Eficiencia en la reparación del ADN con daño										Deficiencia en la reparación al ADN con daños																				
	Días de administración																	Dosis total administrada													
		59	57	54	51	49	47	45	43	41	39	37	35	33	31	29	27	25	23	21	19	17	15	13	11	9	7	5	3	1	
<b>A 10 días</b>																															
	Testigo																								Eutanasia	.	.	.	.	00.00 mg/kg (0.000)	
	1/32 DL <sub>50</sub>																								Eutanasia	.	.	.	.	04.62 mg/kg (0.124)	
	1/16 DL <sub>50</sub>																								Eutanasia	.	.	.	.	09.25 mg/kg (0.299)	
	1/8 DL <sub>50</sub>																								Eutanasia	.	.	.	.	18.50 mg/kg (0.500)	
<b>A 60 días</b>																															
	Testigo	Eutanasia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	00.00 mg/kg (0.000)	
	1/32 DL <sub>50</sub>	Eutanasia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	33.53 mg/kg (0.906)	
	1/16 DL <sub>50</sub>	Eutanasia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	67.06 mg/kg (1.812)	
	1/8 DL <sub>50</sub>	Eutanasia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	134.12 mg/kg (3.889)	

\* Relación del tiempo de los tratamientos a 10 ó 60 días (4 y 29 administraciones, respectivamente) vía ip con acetato de talio(I). Cada tratamiento contó con un grupo testigo al cual se le administró el vehículo (elaborado a partir de Oakberg 1956, Hess y Renato 2008, Marchetti y Wyrobek 2008, Wanda *et al* 2010).

### 6.3.1 Viabilidad celular

Se preparó una solución de fluorocromos utilizando diacetato de 5,6 carboxifluoresceína (CFDA, 0.125 µg/mL, Sigma-Aldrich) y bromuro de etidio (BrEt, 0.025 µg/mL, Sigma-Aldrich) (Tice *et al* 1999). El primer colorante es permeable a las membranas y tiñe de verde las células debido a que el metabolismo lleva a cabo una reacción de oxidación, en tanto que el segundo únicamente penetra a la célula si esta tiene huecos en la membrana y por lo tanto tiñe de color rojo los ácidos nucleicos (LePecq y Paolletti 1967, Morgan *et al* 1979, Hartmann y Speit 1997, Henderson *et al* 1998).

Para evaluar la viabilidad celular se tomaron 10 µL de las muestras celulares y se mezclaron con 10 µL de solución de colorantes fluorocromados y se incubaron a 37 °C durante 15 min, después se realizaron 4 lavados con 1 mL PBS e inmediatamente se evaluó la viabilidad. El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 con un filtro de excitación de luz de 450-490 nm. Se cuantificaron 100 células por muestra, distinguiendo células viables las cuales se tiñen de verde de las no viables las cuales tiñen su núcleo de rojo (Figura 9) (Tice *et al* 1999, 2000).



**Figura 9.** Representación de la viabilidad celular. En verde células viables y en rojo las células no viables; tinción CFDA-BrEt (tomado de Rodríguez-Espitia 2017).

#### **6.4 Electroforesis unicelular en gel con células de tejidos**

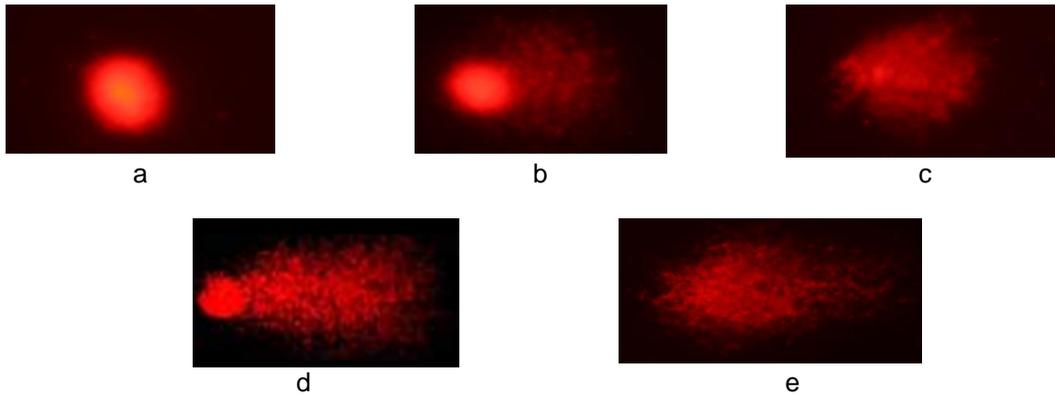
De las muestras celulares iniciales, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada tejido y mezclaron con 75  $\mu\text{L}$  de gel de agarosa de bajo punto de fusión (al 0.5%, Sigma-Aldrich) en tubos eppendorf de 1.7 mL. La mezcla células-agarosa se colocó sobre una laminilla esmerilada previamente preparada con una capa homogénea de agarosa de punto de fusión normal (al 1%, Sigma-Aldrich); encima se colocó un cubreobjetos para extender uniformemente las células en forma de monocapa y se dejó 10 min a 4 °C. El cubreobjetos fue retirado, se aplicó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión y se repitió el paso del cubreobjetos. Se elaboraron dos laminillas por cada muestra de cada órgano por ratón.

Después de realizar las preparaciones, las laminillas se mantuvieron por 24 h en solución de lisis fría (4 °C) protegidas de la luz. La solución de lisis fue preparada al momento con NaCl 2.5 M, EDTA- $\text{Na}_2$  100 mM, Tris 10 mM, Tritón X-100 al 1% y DMSO al 10% ajustando el pH a 10. Pasado el tiempo de lisis, las laminillas fueron colocadas dentro de una cámara de electroforesis horizontal (20-25 Gibco BRL Life Technologies), la cual contenía solución de electroforesis (NaOH 10 N y EDTA 200 mM a pH >13). Posteriormente, las preparaciones se dejaron 20 min en la cámara para el desenrollamiento y se conectó la fuente de poder (MBP 1000ET, International Biotechnologies) para llevar a cabo el corrimiento electroforético por 20 min a 25 volts y 300 mA. Los pasos anteriores se realizaron con luz amarilla.

Una vez terminado el tiempo de corrimiento, las preparaciones fueron transferidas a solución neutra de Tris (0.4 M a pH 7.5) donde permanecieron 5 min, se deshidrataron por 5 min en etanol frío al 75% (Macron Fine Chem.) y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente. Para la evaluación del daño al ADN, las preparaciones fueron teñidas 10 min con 75  $\mu\text{L}$  de BrEt (0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y el análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia con filtro G-2A de excitación de luz en rango de 450-490 nm. Las evaluaciones se hicieron tomando en cuenta la longitud de la migración (Figura 10) y el siguiente criterio:

- a) Núcleos intactos o sin daño (Figura 10a).

- b) Núcleos con daño o cometas; que involucra la cabeza y la estela (Figura 10b-d).
- c) Núcleos con daño severo los cuales se observan con apariencia de nubes, en los cuales todo el ADN migró prácticamente del núcleo principal (Figura 10e).



**Figura 10.** Categorías de daño al ADN, de acuerdo con la longitud de la migración. En (a) núcleo sin daño, (b) núcleo con daño bajo, (c) núcleo con daño medio, (d) núcleo con daño alto y (e) núcleo con daño severo.

El ADN nuclear se midió con una escala ocular adaptada al microscopio, se tomó en cuenta la longitud de la región proximal a la distal. El ADN nuclear con daño severo únicamente se registró. Por cada muestra se analizaron 100 núcleos a 40X y los resultados se expresaron en micrómetros. Además, con los datos de daño al ADN se calculó el “índice de migración” (IMg) de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

Donde (A) representa el porcentaje de núcleos sin daño con valor de  $r = 1$  más los núcleos con daño bajo  $r \leq 1$ , (B) daño medio  $1 < r \leq 2$ , (C) daño alto  $r > 2$  y (D) núcleos con ADN fuera de la región de la cabeza o daño severo ( $r =$  medición de la cola/medición de la cabeza) (Rodríguez-Mercado *et al* 2011). Debido a que se observó migración prácticamente en todos los experimentos, se decidió agrupar la categoría A y B en una sola (A+B).

## **6.5 Evaluación de parámetros seminales, viabilidad y daño al ADN**

### **6.5.1 Obtención de espermatozoides**

En el momento en que se disectaron los testículos se removieron y exprimieron los conductos deferentes para la obtención de los espermatozoides, el contenido de ambos conductos de cada ratón se depositó en 1 mL de solución Tyrode's (Sigma-Aldrich) a 36.5 °C.

### **6.5.2 Parámetros seminales**

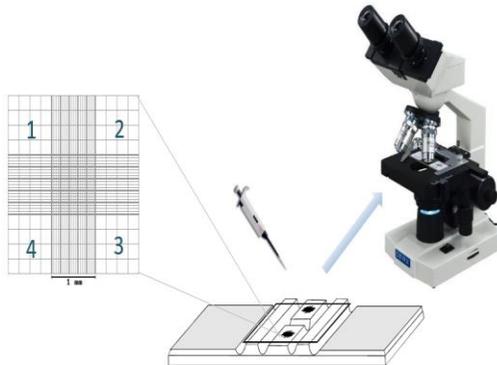
En la cámara de Neubauer (PROPER Lumicyte), profundidad 1/100 mm (Figura 11) (Cardona-Maya *et al* 2008, Marienfeld 2010), se colocaron 10 µL de la muestra de espermatozoides mezcladas con 10 µL del reactivo azul tripano (SIGMA Chemical Co. Cell Culture™) y se realizaron las evaluaciones de los parámetros seminales a 100X en el microscopio de campo claro (OLYMPUS BX40).

La viabilidad celular se determinó empleando los criterios de inclusión y exclusión del colorante, donde las células no teñidas (claras) y las células teñidas (azules) fueron catalogadas como viables y no viables, respectivamente (Wyrobeck y Bruce 1975, 1978). Al mismo tiempo se obtuvo el número de espermatozoides móviles e inmóviles, así como la densidad espermática (Aragón *et al* 2001 y 2005). Para viabilidad y movilidad se cuantificaron 100 células por parámetro por cada ratón; en tanto que para el conteo espermático se utilizó el criterio de los cuatro cuadrantes (Figura 11).

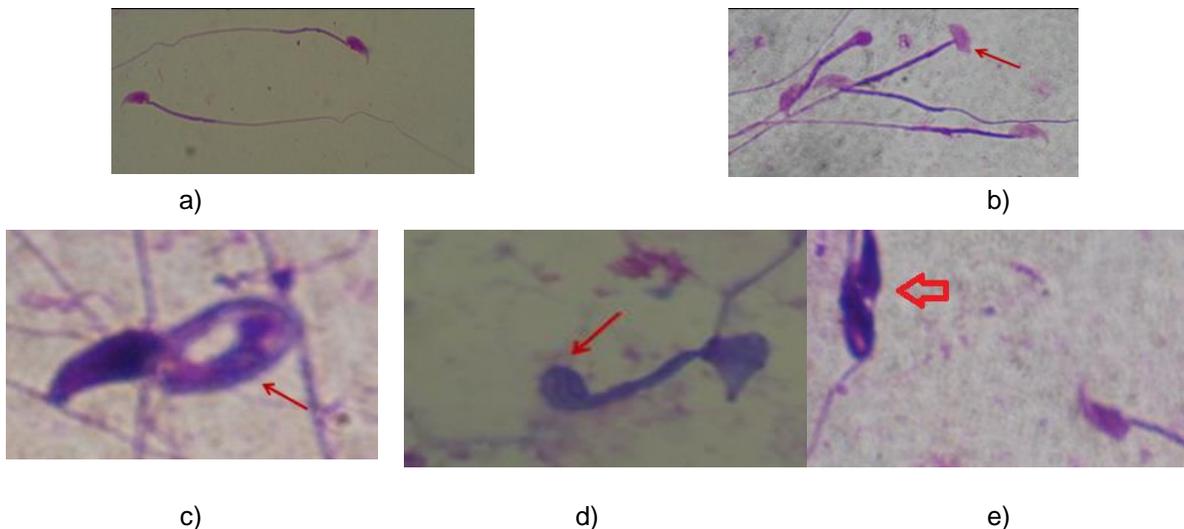
### **6.5.3 Anormalidades de espermatozoides**

Para conocer las alteraciones en la morfología de espermatozoides (Figura 12), se realizaron las preparaciones de los espermatozoides por barrido. Se colocaron 5 gotas de la muestra de espermatozoides en portaobjetos y con ayuda de un cubreobjetos se extendió, se dejaron secar al aire y después de 24 h se tiñeron en solución de Giemsa al 5% (se hicieron 4 preparaciones por muestra de cada ratón). El análisis de las laminillas se realizó al microscopio campo claro a 100X, se examinaron 1000 espermatozoides por cada animal tomando en cuenta los criterios

propuestos en la literatura (Wyrobek y Bruce 1975, 1978, Sakamoto y Hashimoto 1986, Aragón *et al* 2001 y 2005, Cooke y Saunders 2002).



**Figura 11.** Cámara Neubauer con cuadrantes esmerilados para el recuento celular (Marienfeld superior 2018).



**Figura 12.** Espermatozoides de ratón teñidos con Giemsa. En (a) espermatozoides normales y en (b-e) algunas anomalías; por ejemplo, b) gancho anormal, c) flagelo enrollado, e) flagelo semienrollado y f) espermatozoide enrollado.

#### 6.5.4 Electroforesis unicelular en gel con espermatozoides

Se tomaron 10  $\mu$ L de las muestras de espermatozoides, se resuspendieron en 75  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión y se prepararon las laminillas siguiendo el procedimiento EUG antes descrito. Al terminar la elaboración de las laminillas fueron sumergidas y mantenidas en solución de lisis durante 24 h a temperatura ambiente.

La solución de lisis se preparó al momento de su uso a partir de una solución básica de NaCl 2.5 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 100 mM y Tris 10 mM con ditionotreitól (DTT) 4 mM y Tritón X-100 al 5%, a pH 10. Transcurridas las 24 h, para remover residuos celulares en las laminillas se realizaron 2 lavados de 20 min cada uno con PBS. Inmediatamente después, las preparaciones se colocaron en solución de lisis sin detergentes (NaCl 2.5 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 100 mM y Tris 10 mM a pH 10) y con 10.5 µg/mL de proteinasa K (SIGMA-ALDRICH) durante 2 h a 37°C; al terminar este tiempo se colocaron en el amortiguador de electroforesis (NaOH 10 N, EDTA 200 mM a pH>13), se dejó 10 min de desenrollamiento y 5 min de corrimiento a 25 volts y 300 mA. Al término de la electroforesis las laminillas se neutralizaron y se deshidrataron en alcohol etílico.

Para la evaluación del daño al ADN de los espermatozoides, las preparaciones se tiñeron y el análisis se llevó a cabo al microscopio de fluorescencia cuantificando 100 células, siguiendo los criterios descritos anteriormente (Chang *et al* 2013) (ver apartado 6.4).

## **6.6 Cuantificación hormonal por radioinmunoanálisis**

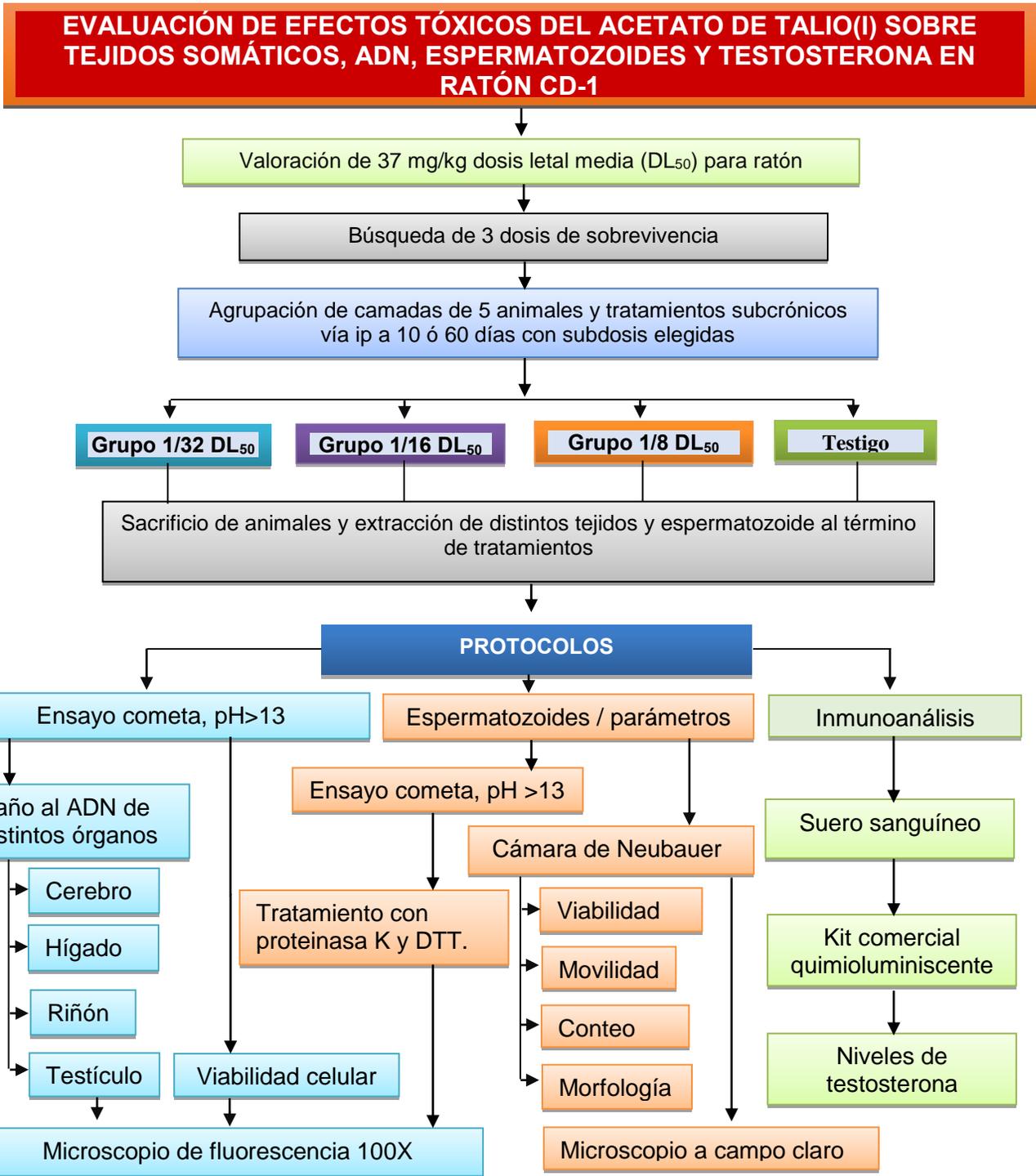
La sangre de cada animal fue colectada en tubos eppendorf de 1.7 mL (Sorenson BioScience inc.), después de 15 min se obtuvo el suero por centrifugación (3000 rpm durante 15 min) y se almacenó a -20°C. Las determinaciones de los niveles de testosterona se realizaron por inmunoensayo enzimático con un estuche comercial quimioluminiscente competitivo en fase sólida para testosterona total (IMMULITE®/IMMULITE® 1000 Total Testosterone, PILKTW-7).

El estuche comercial contenía tubos de polipropileno impregnados con el anticuerpo específico policlonal de conejo anti-testosterona-<sup>125</sup>I y los calibradores (de 0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 ng/mL). En cada tubo se adicionó 50 µL del suero problema, más 1 mL de la hormona radioactiva (<sup>125</sup>I). Para facilitar la reacción, los tubos se agitaron en un vortex durante 1 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h. La muestra fue decantada, se retiró el sobrenadante y los tubos se colocaron en un contador de centelleo gamma modelo Cobra 5005 Packard™ para la determinación de la concentración de la hormona en la muestra problema. Los datos

obtenidos del análisis se expresan en pg/mL de suero (Figura 13). La cuantificación de la hormona esteroide se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides y Proteicas del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

### **6.7 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos del grupo tratado se compararon con el grupo testigo y se presentan con la media  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis de la viabilidad celular de tejidos de órganos se empleó la prueba  $J^2$ . Para el análisis del ADN se utilizó la prueba de *ANOVA-Dunnnett* y  $J^2$  para determinar las diferencias en el nivel de daño de los cometas. Para la evaluación de la morfología de espermatozoides se utilizó *U* de *Mann-Whitney*. El análisis de la concentración de testosterona se realizó con *t* de *Student*.



**Figura 13.** Diagrama de los procedimientos experimentales y de la evaluación de efectos tóxicos inducidos por el acetato de talio(I) sobre el ADN, parámetros de espermatozoides y testosterona total.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Tratamientos, dosis y pesos de animales

A partir de búsqueda experimental de subdosis de la  $DL_{50}$  de acetato de talio(I) que permitieran la sobrevivencia de los animales, se eligieron tres dosis para evaluar los efectos tóxicos *in vivo*. Se administraron vía ip las 1.15, 2.31 y 4.62 mg/kg del acetato de talio(I) en el protocolo a 10 días y a 60 días; correspondientes a 1/32, 1/16 y 1/8 de la  $DL_{50}$ . Los resultados obtenidos en el peso corporal no muestran cambios significativos en ambos protocolos al comparar los grupos de acetato de talio(I) con grupo testigo (Cuadro III). En relación con el peso de los órganos (Cuadro IV) se observaron algunos aumentos; por ejemplo, en hígado y testículo en los tratamientos de 1.15 mg/kg a 10 días y en el de 4.62 mg/kg a 60 días, respectivamente.

### 7.2 Evaluación de la viabilidad celular de órganos

En ambos protocolos, se evaluó la viabilidad celular con la prueba de CFDA/BrEt de órganos inmediatamente después de la eutanasia y fue mayor al 92% (Cuadro V, Figuras 14 y 15).

### 7.3 Evaluación del daño al ADN en células de órganos

La medición del daño al ADN se incrementó significativamente en los órganos evaluados en todos los tratamientos con acetato de talio(I) (Cuadros VI y VII). Los valores de la longitud del cometa e I/Mg, muestran un comportamiento similar en todos los órganos en el protocolo a 10 días comparado con el de 60 días. Cabe señalar que el tratamiento de 1.15 mg/kg fue el que mayor daño causó y a pesar de que los resultados no muestran un comportamiento dosis respuesta, el daño al ADN se acentúa en el protocolo a 60 días (Figuras 14 y 15). El órgano más afectado fue el hígado, seguido de riñón, cerebro y testículo.

### 7.4 Evaluación de parámetros seminales

Las evaluaciones de parámetros seminales viabilidad, movilidad y conteo de los espermatozoides, muestran cambios estadísticos en los dos últimos. La viabilidad

analizada por la técnica de exclusión de azul tripano, en todos los tratamientos fue mayor al 95% (Cuadro VIII, Figura 15).

En relación con la movilidad de los espermatozoides, ésta se redujo en la dosis alta en los tratamientos a 10 días, en tanto que este efecto se observó en las dosis intermedia y alta en los tratamientos a 60 días, en ambos casos con una tendencia dosis respuesta. Por otro lado, el conteo espermático disminuyó significativamente en los animales tratados con TI durante 10 días en la dosis más alta y en 60 días para la dosis intermedia y alta (Cuadro VIII); reducción que sigue un comportamiento dosis respuesta (Cuadro VIII, Figura 16).

### **7.5 Evaluación de anomalías en espermatozoides**

En tratamientos de ambos protocolos, la evaluación de la morfología en espermatozoides mostró incremento del número de espermatozoides con anomalías. Siendo las que se observaron con mayor frecuencia: enrollados totalmente sobre sí, microencéfalo y cabeza anormal a 10 días las significancias se encontraron a partir de la dosis de 2.31 mg/kg de acetato de talio(I), mientras que a 60 días los datos mostraron significancias en todas las dosis, sin aparente relación dosis-respuesta (Cuadro VIII, Figura 16).

### **7.6 Evaluación del daño al ADN en espermatozoides**

Los datos de la evaluación del daño al ADN en los tratamientos mostraron cambios significativos respecto a su testigo, en ambos protocolos se observó incremento en la longitud del cometa (Cuadro VIII, Figura 15). Como se mostró en las evaluaciones de daño en los órganos, en espermatozoides también el tratamiento de 1.15 mg/kg fue el que mayor daño causó, el que se acentúa en los tratamientos a 60 días, sin aparente relación dosis-respuesta.

### **7.7 Determinación de testosterona**

Los datos de la concentración de testosterona se presentan en el Cuadro IX. En ambos protocolos se evidencia heterogeneidad en la dosis. No obstante, al someter los datos al análisis estadístico no mostraron significancias.

**Cuadro III.** Peso corporal de los ratones macho adulto tratados con dosis de acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días.

Tratamientos	Grupo testigo	Grupo de acetato de talio(I) en mg/kg		
		1.15	2.31	4.62
<b>10 días</b>				
Peso corporal inicial	40.50 ± 2.51	40.98 ± 5.59	42.07 ± 2.93	38.96 ± 5.64
Peso corporal final	41.76 ± 2.42	40.97 ± 5.72	42.44 ± 3.14	39.70 ± 5.78
Peso promedio	44.97 ± 3.07	41.73 ± 2.67	41.04 ± 0.89	40.78 ± 1.52
<b>60 días</b>				
Peso corporal inicial	39.35 ± 6.42	43.17 ± 2.60	43.24 ± 8.98	37.03 ± 3.00
Peso corporal final	40.66 ± 6.82	42.34 ± 2.91	49.27 ± 7.49	36.76 ± 3.87
Peso promedio	40.31 ± 5.88	42.91 ± 2.26	43.79 ± 8.71	36.41 ± 3.04

Los animales fueron pesados y tratados cada tercer día. Los datos son el peso en gramos y se presentan como media ± desviación estándar. La n fue de 5 ratones, excepto en el tratamiento de 4.62 mg/kg a 60 días donde n= 4 ratones.

**Cuadro IV.** Pesos de órganos de los ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días.

Tratamientos	Grupo testigo	Tratamientos con acetato de talio(I) en mg/kg		
		1.15	2.31	4.62
<b>10 días</b>				
Hígado	2.15 ± 0.71	2.61 ± 0.56*	2.16 ± 0.03	2.00 ± 0.42
Riñón	0.60 ± 0.04	0.70 ± 0.06	0.65 ± 0.04	0.61 ± 0.10
Testículo	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.27 ± 0.04
Cerebro	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.08	0.38 ± 0.08
<b>60 días</b>				
Hígado	1.86 ± 0.46	2.18 ± 0.28	2.18 ± 0.64	1.74 ± 0.16
Riñón	0.62 ± 0.11	0.67 ± 0.12	0.75 ± 0.13	0.60 ± 0.05
Testículo	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.28 ± 0.02*
Cerebro	0.41 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.41 ± 0.04

Los datos expresan el peso de los órganos en gramos y se presentan como media ± desviación estándar. La n fue de 5 ratones, excepto en el tratamiento de 4.62 mg/kg a 60 días donde n= 4 ratones. \*  $P < 0.05$ , al compararse con su testigo.

**Cuadro V.** Viabilidad celular de órganos de ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días.

Órgano	Grupo testigo	Tratamientos con acetato de talio(I) en mg/kg		
		1.15	2.31	4.62
<b>Tratamiento 10 días</b>				
Hígado	96.40 ± 1.14	97.20 ± 1.64	94.40 ± 1.34	93.20 ± 1.48
Riñón	97.40 ± 0.89	96.80 ± 2.28	95.20 ± 1.30	92.00 ± 2.54
Cerebro	99.40 ± 0.54	99.20 ± 0.44	99.00 ± 1.00	96.20 ± 1.78
Testículo	98.00 ± 1.41	99.80 ± 0.44	98.20 ± 1.09	97.00 ± 1.58
<b>Tratamiento 60 días</b>				
Hígado	96.80 ± 0.44	96.40 ± 0.54	97.00 ± 0.81	98.40 ± 1.14
Riñón	96.60 ± 0.54	95.60 ± 0.50	96.50 ± 1.29	98.20 ± 0.44
Cerebro	98.00 ± 1.00	98.00 ± 1.00	98.00 ± 1.82	99.00 ± 0.70
Testículo	97.60 ± 0.89	96.60 ± 0.89	97.00 ± 1.41	98.80 ± 0.83

Los datos se presentan como media ± desviación estándar de 100 células por órgano y por ratón. La n fue de 5 ratones, excepto en el tratamiento de 4.62 mg/kg a 60 días donde n= 4 ratones.

**Cuadro VI.** Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 días.

Tratamientos	Longitud del cometa en $\mu\text{m}$	Categorías de daño al ADN en %				IMg
		Bajo	Medio	Alto	Severo	
<b>Grupo testigo</b>						
Hígado	44.67 $\pm$ 01.74	92.60 $\pm$ 09.52	07.40 $\pm$ 02.07	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.07 $\pm$ 0.13
Riñón	45.04 $\pm$ 01.45	93.20 $\pm$ 06.68	06.80 $\pm$ 01.92	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.06 $\pm$ 0.10
Cerebro	44.96 $\pm$ 01.52	99.40 $\pm$ 01.81	00.60 $\pm$ 00.54	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.00 $\pm$ 0.02
Testículo cc	43.33 $\pm$ 05.19	87.60 $\pm$ 01.87	13.20 $\pm$ 01.30	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.14 $\pm$ 0.04
Testículo cg	58.74 $\pm$ 09.40	62.20 $\pm$ 00.44	37.80 $\pm$ 01.30	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.37 $\pm$ 0.03
<b>1.15 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	113.20 $\pm$ 08.58**	00.00 $\pm$ 00.00	00.20 $\pm$ 00.44	95.00 $\pm$ 02.73	04.80 $\pm$ 00.83	3.04 $\pm$ 0.12**
Riñón	102.81 $\pm$ 10.08**	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	93.80 $\pm$ 01.48	06.20 $\pm$ 01.30	3.06 $\pm$ 0.09**
Cerebro	84.62 $\pm$ 09.98**	00.00 $\pm$ 00.00	07.60 $\pm$ 00.89	88.60 $\pm$ 01.81	03.80 $\pm$ 00.44	2.96 $\pm$ 0.08**
Testículo cc	60.38 $\pm$ 11.26**	00.00 $\pm$ 00.00	01.00 $\pm$ 00.70	86.60 $\pm$ 01.34	12.40 $\pm$ 01.14	3.11 $\pm$ 0.09**
Testículo cg	77.02 $\pm$ 13.40**	00.00 $\pm$ 00.00	16.00 $\pm$ 01.58	72.40 $\pm$ 02.19	11.60 $\pm$ 01.14	2.95 $\pm$ 0.14**
<b>2.31 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	86.24 $\pm$ 09.63**	00.00 $\pm$ 00.00	11.80 $\pm$ 00.83	85.80 $\pm$ 02.16	02.40 $\pm$ 00.54	2.90 $\pm$ 0.10**
Riñón	89.24 $\pm$ 09.27**	00.00 $\pm$ 00.00	05.20 $\pm$ 02.68	89.60 $\pm$ 00.89	05.20 $\pm$ 00.44	3.00 $\pm$ 0.09**
Cerebro	71.14 $\pm$ 07.75**	00.00 $\pm$ 00.00	49.40 $\pm$ 01.14	46.60 $\pm$ 00.89	04.00 $\pm$ 00.70	2.54 $\pm$ 0.07**
Testículo cc	55.87 $\pm$ 13.25*	00.80 $\pm$ 00.83	04.40 $\pm$ 01.30	84.69 $\pm$ 00.89	10.20 $\pm$ 01.09	3.04 $\pm$ 0.10**

Testículo cg	73.10 ± 18.69**	25.00 ± 01.00	12.80 ± 01.09	51.00 ± 01.00	11.20 ± 00.54	2.48 ± 0.08**
<b>4.62 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	88.96 ± 07.80**	00.00 ± 00.00	03.00 ± 00.70	94.00 ± 01.22	03.00 ± 01.22	3.00 ± 0.09**
Riñón	88.04 ± 08.97**	00.20 ± 00.44	08.00 ± 00.70	88.00 ± 01.22	03.80 ± 00.83	2.95 ± 0.08**
Cerebro	80.36 ± 10.17**	00.00 ± 00.00	12.40 ± 02.07	85.60 ± 01.14	02.00 ± 00.70	2.89 ± 0.10**
Testículo cc	53.94 ± 13.74*	13.20 ± 00.83	16.40 ± 00.54	64.40 ± 01.14	06.00 ± 01.87	2.63 ± 0.12**
Testículo cg	70.97 ± 18.41**	03.20 ± 00.44	19.00 ± 01.58	69.00 ± 01.87	08.80 ± 00.83	2.80 ± 0.12**
<b>Peróxido de hidrógeno</b>						
200 µM	123.90 ± 14.21**	00.00 ± 00.00	00.00 ± 0.00	93.80 ± 01.48	06.20 ± 00.83	3.06 ± 0.06**

Los datos se presentan como media ± desviación estándar de 100 células evaluadas por órgano y por ratón. Células chicas, cc; células grandes cg; índice de migración, IMg. \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ , al compararse con el grupo testigo.

**Cuadro VII.** Daño al ADN en células de distintos órganos de ratones tratados con acetato de talio (I) durante 60 días.

Tratamientos	Longitud del cometa en $\mu\text{m}$	Categorías de daño al ADN en %				IMg
		Bajo	Medio	Alto	Severo	
<b>Grupo testigo</b>						
Hígado	45.33 $\pm$ 01.88	90.80 $\pm$ 04.86	09.20 $\pm$ 01.48	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.09 $\pm$ 0.07
Riñón	44.74 $\pm$ 02.43	93.20 $\pm$ 04.38	06.80 $\pm$ 01.09	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.06 $\pm$ 0.06
Cerebro	44.87 $\pm$ 01.95	95.80 $\pm$ 02.16	04.20 $\pm$ 01.30	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.04 $\pm$ 0.04
Testículo cc	43.24 $\pm$ 04.39	52.40 $\pm$ 01.14	47.60 $\pm$ 00.54	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.47 $\pm$ 0.02
Testículo cg	62.16 $\pm$ 05.61	66.80 $\pm$ 01.30	33.20 $\pm$ 00.44	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	1.33 $\pm$ 0.02
<b>1.15 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	117.46 $\pm$ 09.91**	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	92.60 $\pm$ 01.51	07.40 $\pm$ 01.51	3.07 $\pm$ 0.10**
Riñón	109.78 $\pm$ 11.41**	00.00 $\pm$ 00.00	00.20 $\pm$ 00.44	89.40 $\pm$ 00.54	10.40 $\pm$ 00.89	3.10 $\pm$ 0.06**
Cerebro	93.45 $\pm$ 13.78**	00.00 $\pm$ 00.00	04.20 $\pm$ 00.44	90.20 $\pm$ 00.44	05.60 $\pm$ 00.89	3.01 $\pm$ 0.05**
Testículo cc	81.21 $\pm$ 06.52**	00.00 $\pm$ 00.00	00.20 $\pm$ 00.44	93.00 $\pm$ 01.22	06.60 $\pm$ 00.54	3.06 $\pm$ 0.06**
Testículo cg	92.00 $\pm$ 07.46**	00.00 $\pm$ 00.00	60.40 $\pm$ 00.89	31.80 $\pm$ 00.83	07.80 $\pm$ 00.44	2.47 $\pm$ 0.06**
<b>2.31 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	90.95 $\pm$ 10.98**	00.00 $\pm$ 00.00	04.50 $\pm$ 00.57	92.00 $\pm$ 02.16	03.50 $\pm$ 01.00	2.99 $\pm$ 0.11**
Riñón	94.26 $\pm$ 09.58**	00.00 $\pm$ 00.00	02.00 $\pm$ 00.81	91.50 $\pm$ 01.29	06.50 $\pm$ 00.57	3.04 $\pm$ 0.07**
Cerebro	77.41 $\pm$ 08.96**	00.00 $\pm$ 00.00	17.50 $\pm$ 01.91	78.25 $\pm$ 01.70	04.25 $\pm$ 00.95	2.86 $\pm$ 0.12**

Testículo cc	65.26 ± 09.94**	00.50 ± 00.57	51.50 ± 00.57	41.25 ± 00.95	06.75 ± 00.95	2.54 ± 0.08**
Testículo cg	81.98 ± 07.91**	01.00 ± 00.00	86.00 ± 00.81	07.75 ± 00.50	05.25 ± 00.50	2.17 ± 0.05**
<b>4.62 mg/kg de acetato de talio(I)</b>						
Hígado	95.52 ± 12.92**	00.00 ± 00.00	05.80 ± 00.83	88.60 ± 01.67	05.60 ± 00.89	2.99 ± 0.10**
Riñón	91.74 ± 11.95**	00.00 ± 00.00	03.40 ± 01.51	91.20 ± 01.30	05.40 ± 00.89	3.02 ± 0.10**
Cerebro	86.28 ± 08.76**	00.00 ± 00.00	08.60 ± 00.89	88.60 ± 01.14	02.80 ± 01.09	2.94 ± 0.09**
Testículo cc	54.28 ± 05.55*	00.80 ± 00.44	90.40 ± 01.14	04.80 ± 00.44	04.00 ± 00.00	2.12 ± 0.04**
Testículo cg	70.01 ± 06.47*	16.20 ± 01.09	79.60 ± 00.89	00.40 ± 00.54	04.00 ± 01.58	1.91 ± 0.10*
<b>Peróxido de hidrógeno</b>						
200 µM	123.80 ± 11.96**	00.00 ± 00.00	00.00 ± 00.00	91.40 ± 01.14	08.60 ± 00.89	3.08 ± 0.06**

Los datos se presentan como media ± desviación estándar de 100 células evaluadas por órgano y por ratón. Células chicas, cc; células grandes cg; índice de migración, IMg. \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ , al compararse con el grupo testigo.

**Cuadro VIII.** Evaluación de parámetros seminales y de daño al ADN de ratones tratados con acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días.

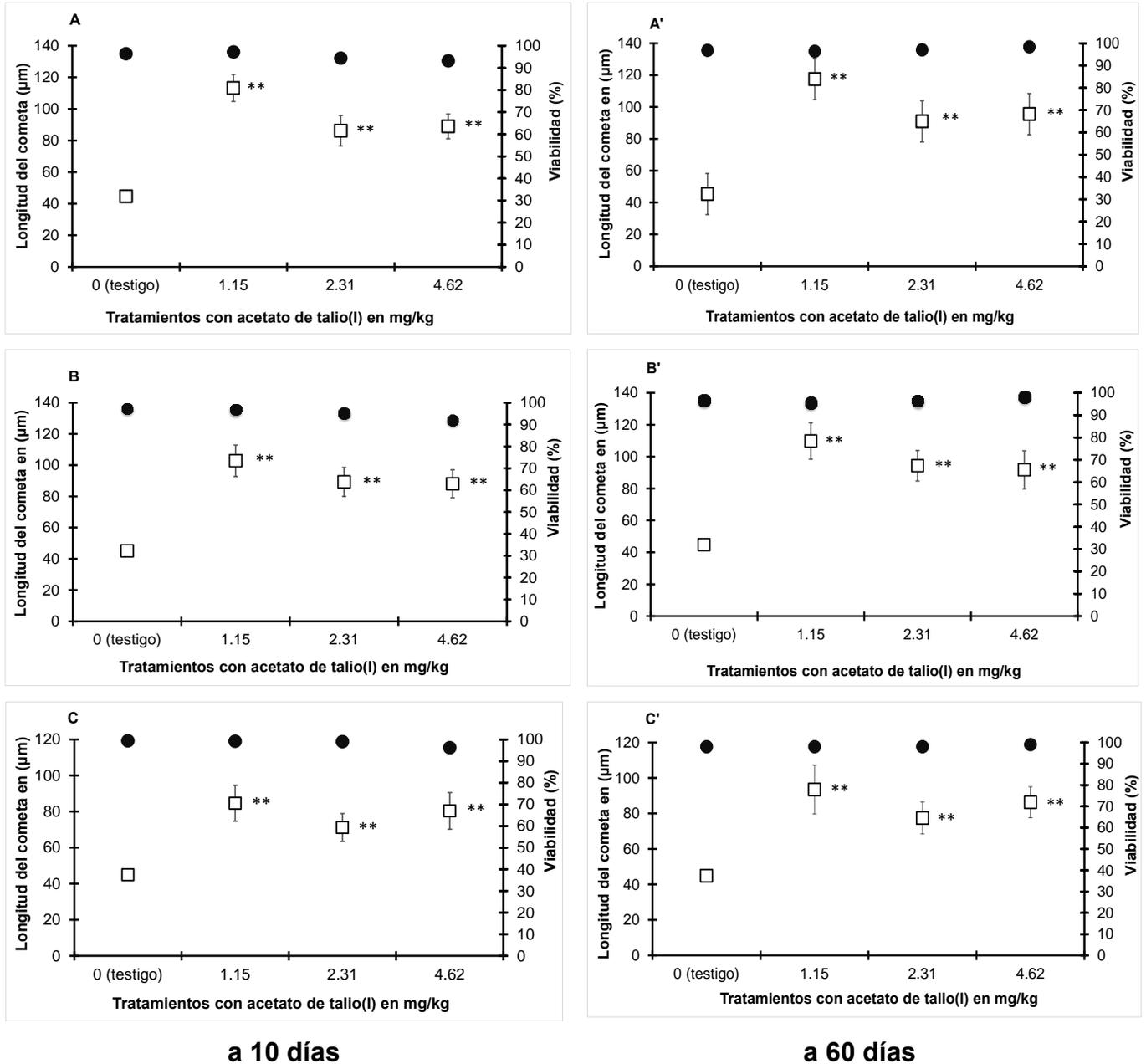
	Grupo testigo		Tratamientos con acetato de talio(I) en mg/kg					
	10 días	60 días	1.15		2.31		4.62	
			10 días	60 días	10 días	60 días	10 días	60 días
<b>Parámetros seminales</b>								
Viabilidad (%)	99.60 ± 00.42	99.50 ± 00.35	99.30 ± 00.57	97.90 ± 00.65	97.50 ± 01.41	96.20 ± 00.91	96.70 ± 00.76	95.20 ± 01.78
Movilidad (%)	97.00 ± 00.35	96.90 ± 01.14	95.50 ± 01.46	96.40 ± 01.93	94.00 ± 02.18	91.00 ± 02.24*	92.80 ± 02.36*	84.00 ± 07.00*
Conteo (x 10 <sup>4</sup> )	448.00 ± 42.92	461.40 ± 22.72	405.00 ± 37.75	359.00 ± 45.96**	403.40 ± 79.59	330.60 ± 70.53**	338.80 ± 75.61*	258.60 ± 99.23**
<b>Anormalidades de espermatozoides</b>								
Promedio (%)	8.10 ± 1.85	7.70 ± 2.95	10.60 ± 2.32	12.60 ± 3.24**	13.40 ± 2.63**	19.30 ± 4.40**	13.80 ± 2.57**	20.01 ± 4.51**
<b>Daño al ADN de espermatozoides</b>								
Longitud del cometa en µm	44.15 ± 03.25	40.94 ± 07.16	74.60 ± 05.08**	85.99 ± 05.25**	51.67 ± 04.13*	52.92 ± 04.43*	52.62 ± 04.69*	57.20 ± 07.62*

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Para viabilidad, movilidad y daño al ADN se evaluaron 100 espermatozoides por ratón. Para anomalidades se analizaron 1000 espermatozoide por ratón. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  al compararse con el grupo testigo.

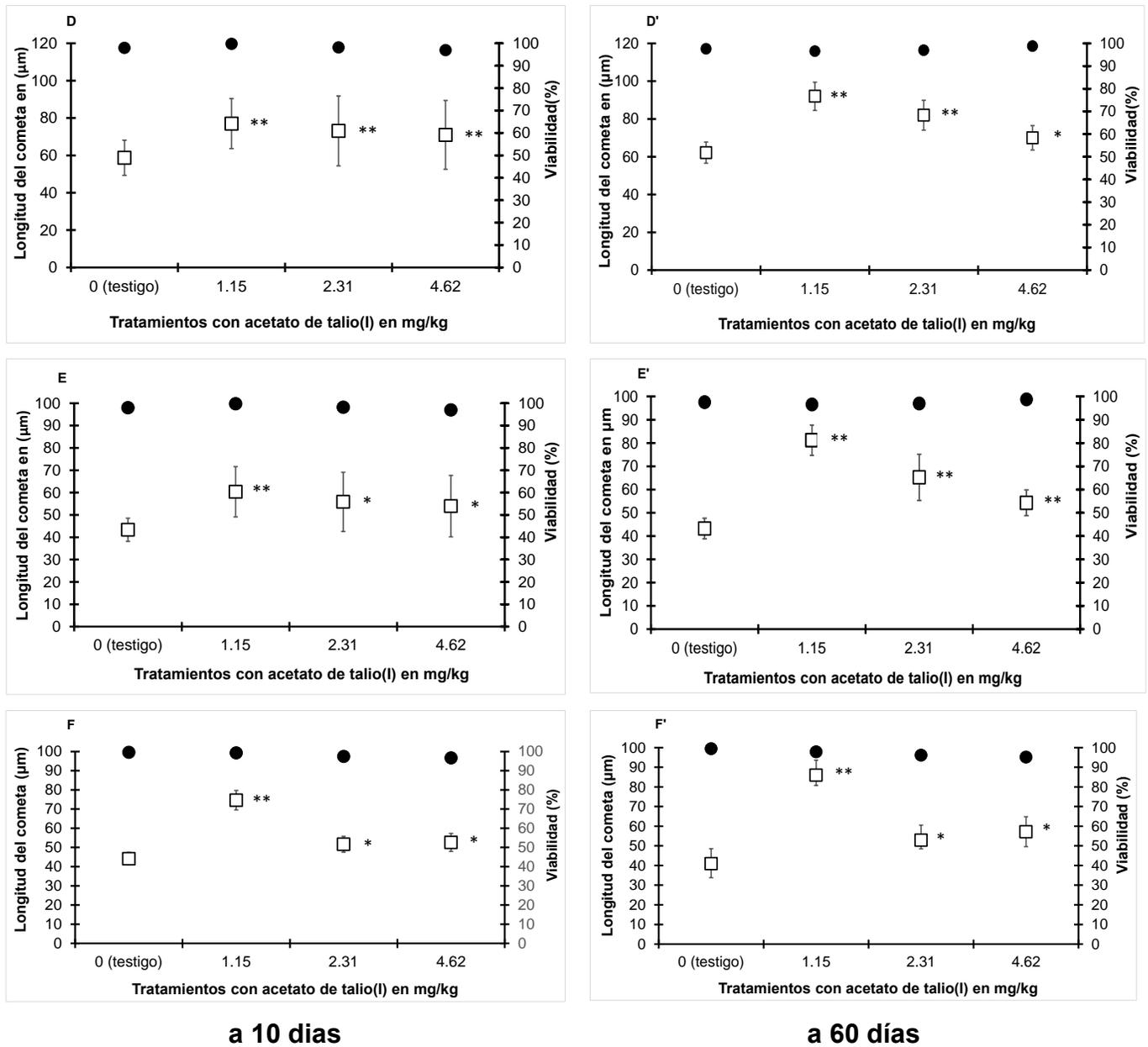
**Cuadro IX.** Concentración de testosterona en suero (ng/mL) de animales tratados con acetato de talio(I).

Protocolo	Grupo testigo	Tratamientos con acetato de talio(I) en mg/kg		
		1.15	2.31	4.62
A 10 días	2.00 ± 1.62	2.09 ± 1.60	0.32 ± 0.10	2.29 ± 1.58
A 60 días	2.09 ± 1.59	1.17 ± 0.84	2.03 ± 1.61	1.09 ± 0.74

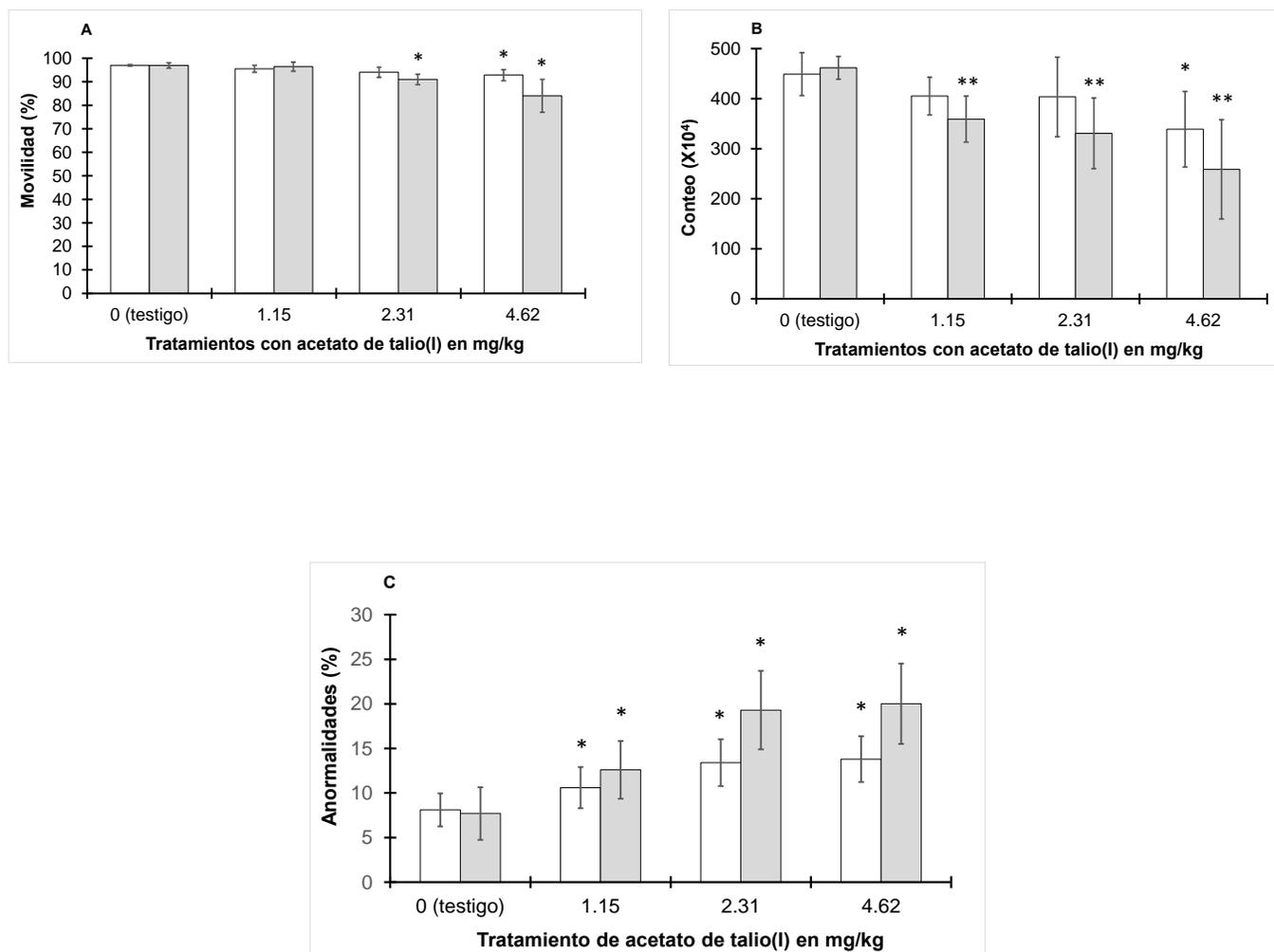
Los datos se presentan como media ± error estándar.



**Figura 14.** Viabilidad ● y daño al ADN (longitud del cometa) □ de las células de los diferentes órganos de los animales tratados y no tratados con acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días. Células de hígado (A y A'), riñón (B y B'), cerebro (C y C') a 10 ó 60 días, respectivamente. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (\* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$ , comparado con su testigo).



**Figura 15.** Viabilidad ● y daño al ADN (longitud del cometa) □ de las células de testículo y, espermatozoides de los animales tratados y no tratados con acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días. Células de grandes de testículo (D o D'), células chicas de testículo (E o E') y de espermatozoides (F o F'), respectivamente. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (\* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$ , comparado con su testigo).



**Figura 16.** Movilidad (A), conteo (B) y anomalías espermáticas (C) de grupos tratados y no tratados con acetato de talio(I) a 10 □ ó 60 □ días, respectivamente. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (\*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.001$ , comparado con su testigo).

## VIII. DISCUSIÓN

La información acerca de los efectos citotóxicos, genotóxicos y reproductivos del TI es escasa y aún se desconocen los mecanismos de acción a nivel bioquímico, celular, tisular y orgánico; por lo cual, en el presente estudio se evaluó el daño al ADN de diferentes células de órganos y en gónada, así como alteraciones en los espermatozoides y en la concentración de testosterona de ratones machos después de la exposición a acetato de talio(I).

En el caso de seres humanos los síntomas característicos que aparecen después de 10 días de la intoxicación por TI, son resequedad de la piel, pérdida del pelo en todo el cuerpo, dificultad al mover los ojos, dificultad para hablar y para comer, al mismo tiempo se manifiestan temblores en manos, entumecimiento de pies, debilidad muscular en extremidades, cambios de conducta, alteraciones del sistema nervioso central y periférico; como delirio, convulsiones y estado de coma (Hoffman 2000, Hann *et al* 2005, Wang *et al* 2007).

El peso corporal de animales y de los órganos, es considerado indicador de efectos tóxicos cuando se obtienen cambios significativos en estudios multidosis (Michael *et al* 2007, Sellers *et al* 2007). Los tratamientos con acetato de talio(I) en este estudio no produjeron la muerte de ratones en tiempos de exposición cortos o largos; 10 y 60 días, respectivamente. Durante los tratamientos los animales presentaron cambios en coloración de la piel, caída de pelo, reducción de la conducta activa, lentitud al moverse y aparente dificultad al respirar, síntomas que evidencian toxicidad sistémica; mismos que se han reportado con otros modelos experimentales y en personas envenenadas con este metal (Rangel-Guerra *et al* 1990, Wang *et al* 2007, Gascó *et al* 2017, Salehi *et al* 2017).

En este estudio, uno de los órganos que mostró ganancia de peso fue el hígado, con 21% en la dosis más baja a 10 días y el otro fue el testículo con 16% en la dosis alta a 60 días. El peso ganado en hígado, probablemente se debe al incremento de triglicéridos, fosfatasa y suero en las células de este órgano (Mourelle *et al* 1988). Se conoce que el hígado es capaz de trabajar en condiciones desfavorables con la

síntesis de glucógeno, grasas, en la producción de ATP (Nelson y Cox 2008), lo cual, evidencia su capacidad para sobreponerse o enfrentar los efectos tóxicos producidos por este metal. De ser así, esto explicaría la ganancia de peso del órgano en las dosis bajas y tiempos de exposición cortos, donde además las condiciones de crecimiento, mantenimiento y regeneración del órgano no se ven comprometidas después de una intoxicación (Grant 1991, Sun *et al* 2017).

Algunos estudios en los que hubo ganancia de peso en hígado y ayudan a explicar el aumento de peso en hígado a 10 días son los estudios de Formigli *et al* (1986). Ellos, después de tratar subcrónicamente (durante 60 días) a ratas con sulfato de talio(I), encontraron en hígado incremento de triglicéridos, aparición de gránulos o vesículas con retención de líquido en las mitocondrias, así como alteraciones en las cisternas de Golgi y en retículo endoplásmico rugoso.

En testículo, la ganancia de peso en dosis alta a 60 días se puede deber a la activación de procesos de desintoxicación por metalotioneinas (MT). Se ha observado en testículo de ratas expuestas a metales pesados como el cadmio ( $Cd^{2+}$ , el cual presenta afinidad por grupos sulfhídrido de MT), inducción de daño celular, así como alteraciones en el tejido intersticial y en la barrera hematotesticular, también se encontró aumento de MT en espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli (Ramos-Treviño *et al* 2017, Kusakabe 2008). Cabe señalar que el TI, también tiene afinidad por los grupos -SH de la cisteína y se ha encontrado su presencia en gónadas de ratas (Formigli 1986).

La viabilidad CFDA-BrEt, es una prueba de exclusión muy sencilla, altamente reproducible que permite evaluar la actividad metabólica de la célula, una vez que la CFDA atraviesa la membrana reacciona con las esterasas y el citoplasma fluoresce en verde; mientras que, el BrEt se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia de color rojo cuando la célula presenta discontinuidades en la membrana (Hartmann y Speit 1997, Henderson *et al* 1998). La viabilidad celular es útil para eliminar falsos positivos al evaluar daño al ADN por EUG (Tice *et al* 2000). En este estudio la

viabilidad fue  $\geq 92\%$  en las células de los órganos de los animales tratados y no tratados con acetato de talio(I).

Algunos autores han reportado resultados similares en la viabilidad celular de órganos. Valverde *et al* (2002), al estudiar el efecto *in vivo* del acetato de plomo(II) inhalado por ratones CD-1, no encontraron cambios en la viabilidad con azul tripano en riñón, cerebro pulmón, testículo, epitelio nasal, médula ósea o en leucocitos; únicamente observó reducción de la viabilidad en células de hígado; sin cambios en el peso de los animales.

Las células y el material genético son susceptibles a daño por distintos tipos de agentes incluidos los metales (Wiesmüller *et al* 2002). La capacidad de inducir daño a la estructura del ADN depende de las propiedades intrínsecas del agente y de su toxicodinámica (Suresh 2015). Esta capacidad de ocasionar daño primario al material genético es de importancia genotóxica por su potencial mutagénico. La EUG es una herramienta altamente sensible para detectar xenobióticos con actividad genotóxica (Collins *et al* 2002, 2014 y 2008) y el presente estudio permitió medir el daño al ADN de células de tejidos de animales tratados con dosis bajas intermedias y altas de acetato de talio(I).

Los datos obtenidos de las evaluaciones del daño al material genético en las células de los órganos, mostraron que el acetato de talio(I) incrementa la longitud de los cometas, lo que refleja que se están induciendo diferentes tipo de lesiones en el ADN, ya que la EUG en condiciones alcalinas detecta rompimientos de cadena sencilla y/o doble, sitios sensibles al álcali y sitios de reparación tardía (Rojas *et al* 1999, Tice *et al* 1999), principalmente; por lo tanto, se puede decir que este compuesto produce efecto genotóxico *in vivo*.

El daño producido se observó en todos los órganos, en los dos tiempos de exposición, lo que demuestra que el TI una vez absorbido es distribuido a sus órganos blanco, donde, de acuerdo con la magnitud del daño al ADN, el hígado fue el órgano más afectado seguido de riñón, cerebro y testículo. Este comportamiento se presentó de manera similar en ambos protocolos, donde además la dosis baja

(1.15 mg/kg), en comparación con las dosis intermedia y alta (2.41 y 2.62 mg/kg, respectivamente), es la que induce mayor daño al ADN. Dicho comportamiento, se ajusta al modelo hormético descrito en estudios de biología molecular, farmacología y toxicología (Paalzow 1992, Andrews *et al* 2003).

La hormesis generalmente presenta una relación dosis-respuesta, con tendencia bifásica, caracterizada por un efecto de estimulación a bajas dosis y de inhibición o menor respuesta en dosis altas. La dosis-respuesta hormética, ha sido típicamente representada en gráficos como una U invertida o una curva tipo J, dependiendo del efecto evaluado (Calabrasc y Mattson 2017, Agathokleous *et al* 2018).

La hormesis, es un fenómeno que en toxicología después de la exposición inicial a determinado agente tóxico puede observarse un incremento dosis dependiente (Pérez *et al* 2009). Sin embargo, los modelos biológicos responden de manera compensatoria, reparando los daños y restableciendo la homeostasis. Durante este periodo de recuperación es frecuente observar ligeras respuestas que superan los valores de los testigos (Zhang *et al* 2009). Sin embargo, los resultados con acetato de talio(I), en dosis medias y altas no alcanzan los valores de los testigos, siempre ejercen efecto genotóxico. Además, los resultados sugieren que los órganos de ratones expuestos al TI, son blanco de acción genotóxica (directa o indirecta) y almacenamiento del metal, tal como se ha reportado en la literatura (Lund 1956, Lie *et al* 1960, Ríos y Monroy-Noyola 1992, Mulkey y Oehme 1993).

Uno de los efectos horméticos que respalda la reducción de la magnitud del daño al ADN en dosis  $\geq 2.31$  mg/kg de acetato de talio(I), se puede explicar por el aumento en la activación de mecanismos de desintoxicación, reparación celular y de reparación del ADN, así como incremento de niveles MT, de glutatión y de otras enzimas encargadas de reducir el estrés oxidante (Zhang *et al* 2009).

La vía de exposición ip facilita la rápida absorción a través de intestinos, por el peritoneo y principalmente por el hígado, para su posterior distribución a órganos y tejidos mediante la circulación sistémica (Machholz *et al* 2012). Al respecto, se conoce que el TI es rápidamente absorbido por cualquier vía de exposición, sea

inhalada, cutánea, oral o parenteral y distribuido prácticamente a todo el cuerpo ya que se conoce que puede cruzar las barreras hematotesticular, encefálica y placentaria (Lund 1956, Lie *et al* 1960, EPA 2009). Como se mencionó previamente el hígado es el órgano con más daño al ADN, esto debido a que después de la administración ip está en contacto constante con el compuesto de talio.

Nakamura *et al* (1983) encontraron que la distribución de los iones de  $Tl^+$  en los órganos de ratas adultas está relacionado con la actividad de la ATPasa dependiente de  $Na^+/K^+$  en tejidos. Los iones de  $Tl^+$  son confundidos con los iones  $K^+$ , esto debido a la similitud de carga y del radio iónico (Britten y Blank 1968, Yoshida *et al* 1997, Maluszynski 2009). El Tl se mimetiza al pasar por membrana y se acumula en células, ocasionando pérdida del potencial de membrana e interactuando con enzimas como piruvato cinasa, aldehído deshidrogenasa, riboflavina y modificando la función mitocondrial (Kenneth 1990, Mulkey y Uehme 1993, Mourelle *et al* 1998).

Uno de los mecanismos por el cual el Tl podría estar ejerciendo daño al ADN en los distintos órganos, se debe posiblemente a que disminuye o modifica los niveles de enzimas antioxidantes tal como glutatión, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa por su afinidad con los grupos sulfhídrico como sucede en células en cultivo (López y Rodríguez 1997, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013), provocando pérdida del control de mecanismo antioxidante y aumentando los niveles de especies reactivas de oxígeno (González-Torres *et al* 2000, Jan *et al* 2015), las cuales se conoce que a través de óxido-reducciones pueden modificar bases nitrogenadas, desoxirribosas, el esqueleto de fosfatos, entre otros, que finalmente conducen a la fragmentación del ADN (Rex *et al* 2017) y que se pueden evaluar con la EUG.

Una de las consecuencias del daño primario al ADN, es que son indicadores de genotoxicidad y consideradas potencialmente mutagénicas; además se conoce que este daño primario está involucrado en las alteraciones de la compactación y el enrollamiento de la cromatina, así como también puede afectar la regulación de la transcripción, que finalmente pueden conducir a otro tipo de respuestas celulares (Cortés-Gutiérrez *et al* 2007, Rex *et al* 2017).

Las especies reactivas de oxígeno no solo atacan los componentes de los ácidos nucleicos, sino también, cadenas insaturadas de lípidos creando lipoperoxidación y radicales alquilo que reaccionan con membranas afectando la fluidez y su integridad (Ames *et al* 1993). Las proteínas en condiciones oxidantes enfrentan otro tipo de daño por pérdida o modificación de su función, lo cual compromete distintos procesos celulares que en casos graves pueden conducir a la muerte de la célula (Pickering y Davies 2012).

Al momento que la estructura del ADN sufre lesiones o daños, los mecanismos de reparación los detecta. Estos mecanismos mantienen la integridad de la molécula de ADN y en caso de alguna lesión ya sea rompimiento de cadena sencilla o doble, pérdida de base, bases oxidadas, nucleótidos modificados o alteraciones en las uniones fosfodiéster, entre otros, son detectados y reparados por distintas rutas tal como escisión de bases, escisión de nucleótidos, bases mal apareadas, recombinación homóloga o unión terminales no homólogas, por mencionar algunas (Friendberg 2003, D'Errico *et al* 2008).

Se ha encontrado que el potencial de toxicidad del TI es semejante al de metales como plomo (Pb), cadmio (Cd) o mercurio (Hg) (Zitko 1975, Cheam 2001). Los estudios encaminados a conocer la genotoxicidad del TI en modelos de prueba *in vivo* son escasos y contradictorios (Léonard y Gerber, Cvjetko *et al* 2010). Por ejemplo, en células de médula ósea de criceto el cloruro de talio(III), en tratamiento de 24 h no modificó la frecuencia de ICH (PHG 1999), así mismo en linfocitos de sangre periférica de una persona intoxicada con 200 mg de un veneno que contenía sulfato de talio(I), tampoco se encontraron cambios en la frecuencia de ICH o ACE, únicamente incrementó el porcentaje de células binucleadas, lo que indica que el TI interfiere con la división celular (Hantson *et al* 1997). Estas pruebas no revelaron efecto genotóxico por exposición a TI; sin embargo, los resultados del presente estudio muestran evidencia del efecto genotóxico por el daño al ADN evaluado mediante el ensayo cometa, resultados que se suman a los encontrados recientemente con la prueba de MN en ratones expuestos a sulfato de talio(I) (García-Rodríguez *et al* 2014).

Estos resultados del daño al ADN en células de los órganos con el modelo del ratón, en conjunto con otros estudios donde se empleó el modelo de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a acetato de talio(I), sulfato de talio(I) o cloruro de talio(III) (Rodríguez-Mercado *et al* 2015, 2017), así como en el cultivo de células C57BL/6 de ratón con carbonato de talio(I) (Zasukhina *et al* 1983) donde se ha observado daño al ADN, alteraciones cromosómicas e inducción de MN (García-Rodríguez *et al* 2014), confirman que el TI y sus compuestos inducen genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Debido a que los parámetros seminales son importantes para conocer la capacidad fecundante del espermatozoide y a que la información al respecto es escasa y la poca que hay señala al TI como probable agente causante de efectos adversos sobre la reproducción (Galván-Arzate y Santa María 1998). El presente estudio aporta evidencia sobre los efectos reprotóxicos del acetato de talio(I). Como se observó, el metal altero la movilidad, el conteo y el número de espermatozoides con anomalías sin que esto fuera un reflejo de la concentración del TI.

La viabilidad celular en espermatozoides también brinda información acerca del daño en la membrana. Los resultados obtenidos con azul tripano, no mostraron cambios considerables en la viabilidad de los espermatozoides, la cual fue  $\geq 95\%$  en los grupos expuestos y no expuestos. Este resultado concuerda con lo observado en la viabilidad de células de los órganos de los mismos animales y con estudios previos en los que se utilizó el mismo modelo a tiempos de exposición de 60 días con otros metales como el vanadio (Altamirano *et al* 1999, Aragón *et al* 2001). En los tratamientos con acetato de talio(I), en caso de que se afectara la estructura de la membrana, los espermatozoides no viables serían reabsorbidos en el epidídimo y solamente llegarían a los conductos deferentes los viables, razón por la cual la viabilidad supera el 95%.

La reducción de la movilidad se observó en ambos tiempos, principalmente en dosis altas. Dicha disminución puede estar relacionada con la pérdida del potencial interno de la mitocondria y con fallas en la fosforilación oxidante del metabolismo energético

(Ly *et al* 2003); efectos que se conoce que ocasiona el TI. Anatómicamente en el espermatozoide las mitocondrias se encuentran dispuestas en la región intermedia (Ly *et al* 2003, Olivera *et al* 2006), el ATP producido debe ser suficiente ya que se invierte en el movimiento que realiza la dineína del axonema para el movimiento flagelar, una baja producción de ATP explicaría del porqué la reducción de movilidad en espermatozoides (tratados cuando se encontraban en la etapa de maduración en epidídimo), lo que explica los resultados a 10 días.

Sin embargo, los datos a 60 días muestran que el TI puede afectar distintas etapas del proceso espermático, desde la etapa de diferenciación hasta la de maduración, esto último evidenciado por la baja movilidad en dosis intermedias a 60 días; efecto que no se observó en esta dosis a 10 días. Esto podría explicarse por mutaciones en genes entre ellos ADNH5, ADNI1 y ADN11 que codifican brazos para la dineína y otros que intervienen en la expresión de proteínas motoras en el axonema. Dichas mutaciones han sido detectadas en muestras de semen de seres humanos y son además causa de infertilidad (Horowitz *et al* 2005, Escalier 2006, Góngora-Rodríguez *et al* 2016).

Por otro lado, la reducción de la cantidad de espermatozoides, a 60 días, respalda la idea de que el acetato de talio(I) al contacto con el testículo puede intervenir con el proceso de espermatogénesis. Tomando en cuenta que en tratamientos prolongados los espermatozoides pasan por mitosis y meiosis, la célula se encuentra en condiciones vulnerables a la acción de los xenobióticos y sus metabolitos. Algunos agentes que producen cambios metabólicos alteran vías de señalización, dañan los componentes celulares o inducen genotoxicidad, pueden inhibir la proliferación o conducir a la muerte de la célula (Croom 2012). Se sabe que el TI activa vías de señalización intrínsecas e induce muerte celular por apoptosis (Pino *et al* 2017), también se conoce que inhibe la proliferación celular (Rodríguez-Mercado *et al* 2015) e induce genotoxicidad y citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* (García-Rodríguez *et al* 2014, Rodríguez-Mercado *et al* 2015). Estos eventos en su conjunto podrían desencadenar procesos de apoptosis en los diferentes estadios de la espermatogénesis y explicar

la reducción en el conteo y la relación dosis efecto en tiempos de exposición prolongados.

Además, la genotoxicidad y la citotoxicidad reportada para el TI ayudan a explicar la reducción del conteo espermático a 10 días, en la dosis alta, lo anterior debido a que los espermatozoides apoptóticos (junto con los no-viables) son reabsorbidos en el epidídimo antes de llegar a los conductos deferentes. Uno de los órganos en donde se almacena TI es en la gonada (Formigli *et al* 1986). El incremento del porcentaje de espermatozoides con anormalidades fue dependiente de la dosis ambos tiempos de exposición. Las anormalidades observadas frecuentemente, fueron cabeza amorfa y microencéfalo, en tanto que en flagelo espermatozoides enrollados sobre si; ambas descritas por Wyrobek y Bruce (1978).

En los tratamientos de 60 días, se abarcó la espermatogénesis completa incluyendo espermátogonias (2n), espermátidas y espermatozoides. El incremento observado de las anormalidades, podría estar relacionado tanto con alteraciones en membrana plasmática como con las alteraciones génicas (ocasionadas por daño al ADN) que pueden conducir a modificaciones transcripcionales.

Otra posible causa, estaría relacionada con la estructura del citoesqueleto, el cual está involucrado en el proceso de morfogénesis de la cabeza, en la elongación y consolidación del sistema acrosómico del espermatozoide. Lo anterior podría ocurrir debido a la interferencia del TI con la actividad mitocondrial, la baja en los niveles de ATP y sus repercusiones sobre las proteínas como miosina y actina involucradas en morfogénesis del espermatozoide.

Las anormalidades encontradas en la dosis más alta a 10 días, solo abarcó la exposición del estadio de maduración del espermatozoide en el epidídimo, que se caracteriza por la remoción de exceso de citoplasma, lípidos y vesículas, además de la reorientación de la membrana basal. De ser así, el daño sería acumulativo y explicaría el por qué se observó el mayor daño a 60 días respecto a 10 días. Los efectos reprotóxicos en la inducción de anormalidades espermáticas del TI son

comparables a los reportados en la literatura con metales como el Cd administrado a subcrónicamente a ratas (Shen *et al* 1999, Adamkovicova *et al* 2016).

Los resultados de la evaluación del daño al ADN de espermatozoides mostraron que el acetato de talio induce efecto genotóxico en espermatozoides en tiempos cortos o largos en todas las dosis. Los datos demuestran mayor daño al ADN en dosis bajas y en dosis  $\geq 2.31$  mg/kg el daño se reduce; aunque sigue siendo significativo este comportamiento se observó en ambos protocolos.

El daño al ADN de espermatozoides durante la exposición a 10 días abarcó solo la fase de madurez en el epidídimo mientras que a 60 días incluyó todo el proceso de espermatogénesis desde espermatogonias, células de Sertoli, hasta espermatozoides lo cual expone al ADN durante la mitosis (duplicación) meiosis (recombinación y reducción) una vez diferenciado el espermatozoides comienza la elongación y formación del sistema acrosómico lo cual, se caracteriza por la condensación de la cromatina de las espermátidas (Hess y Renato 2008) al sustituirse las histonas asociadas al ADN por protaminas que actúan sobre los puentes disulfuros (Ward y Coffey 1991, Bianchi *et al* 1996). Este sería otro momento donde probablemente ocurre el ataque al ADN. No obstante, la exposición a TI sucede en todo el nicho celular incluso durante la espermiogénesis y espermatogénesis. Además, como se mencionó anteriormente, el daño sería acumulativo y explicaría porqué fue mayor a 60 días.

Aunque se detectó daño al ADN en espermatozoides y células de gonada, además de incrementos de anomalías en espermatozoides y disminuciones en la cantidad de los mismos, los niveles de testosterona total no mostraron cambios en las diferentes dosis y tiempos de exposición. Esto debido a que el desarrollo de espermatozoides como la depuración de xenobióticos en testículo son procesos dependientes de testosterona que requieren de niveles óptimos para su regulación, esto explicaría la razón por la que no hay cambios en testosterona (Stocco 1998, Zirkin 1998). Estos resultados concuerdan con otros obtenidos por Formigli *et al* (1986), al evaluar los niveles de testosterona en ratas Wistar expuestas a sulfato de talio a 60 días.

Finalmente, la exposición ip de acetato de talio(I) durante 10 ó 60 días a ratones macho CD-1, induce daño al ADN en células de los órganos considerados como blancos y de acumulación; hígado, riñón, cerebro y testículo incluyendo espermatogonias tempranas, así como en espermatozoides maduros. En la evaluación de los parámetros seminales se encontró que este compuesto disminuye el movimiento, la cantidad y aumenta las anormalidades en los espermatozoides. Los resultados anteriores aportan evidencia que el TI induce efecto genotóxico en todas las células incluidos los espermatozoides, además de que sus efectos adversos sobre los parámetros seminales, se puede considerar al acetato de talio(I) como un agente con propiedades genotóxicos, gonadotóxicas y reprotóxicos; sin efectos como disruptor endocrino.

## IX. CONCLUSIONES

La administración de acetato de talio por vía ip a ratones macho adulto durante 10 ó 60 días, en dosis de 1.15, .31 y 4.62 mg/kg, correspondiente a 1/32, 1/16 y 1/8 de la DL<sub>50</sub>, respectivamente:

- No modificó el peso corporal, únicamente se observaron algunos aumentos en hígado y testículo en los tratamientos de 1.15 a 10 días y en el de 4.62 a 60 días, respectivamente.
- No redujo la viabilidad de las células obtenidas de hígado, riñón, testículo y cerebro. La viabilidad fue  $\geq 92\%$ , en ambos protocolos.
- La estimación del daño al ADN (longitud del cometa e IMg), en ambos protocolos, muestran que el tratamiento de 1.15 mg/kg fue el que causó mayor efecto, siendo el hígado el órgano que presentó más daño seguido de riñón, cerebro y testículo.
- En relación con las evaluaciones de parámetros seminales, no se observaron cambios en la viabilidad de espermatozoides y en los niveles de testosterona en plasma. Sin embargo:
  - Se observó reducción en la movilidad (a 10 y 60 días en dosis de 4.62 mg/kg y  $\geq 2.31$  mg/kg, respectivamente) y en el conteo (a 10 días en la dosis de 4.62 mg/kg y a 60 días con reducción dosis-efecto) de los espermatozoides.
  - Se observó incremento de anormalidades en espermatozoides con relación dosis-efecto en ambos protocolos.
  - La estimación del daño al ADN en los espermatozoides, en ambos protocolos, muestran que el tratamiento de 1.15 mg/kg fue el que causó mayor efecto.

## X. REFERENCIAS

- Achenbach C, Hauswirth O, Heindrich C, Ziskoven R, Kohler F, Bahr U, Heindrichs A, Schulten H-R.** 1980. Quantitative measurement of time-dependent thallium distribution in organs of mice by field desorption mass spectrometry. *Journal Toxicology Environment Health.* 6(3): 519-28.
- ACHPPM US, (Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine).** 2007. Wildlife toxicity assessment for thallium. Proyecto 37-EJ1138-01. Recuperado de [Última consulta 03/09/2018].
- Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R., Krajcovicova V, Grosskopf B. Massanyi P.** 2016. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 14(42): 1-7.
- Afshari R, Mégarbane B, Zavar A.** 2012. Thallium poisoning: one additional and unexpected risk of heroin abuse. *Clinical Toxicology.* 50(8): 791-792.
- Agathokleous E, Kitao M, Calabrese EJ.** 2018. Environmental hormesis and its fundamental biological basis: rewriting the history of toxicology. *Environmental Research.* 165: 274-8.
- Agno M, Dore E, Frontali C.** 1969. The alkaline denaturation of DNA. *Biophysical Journal.* 9(11): 1281-1311.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** 2004. Biología molecular de la célula. Barcelona. 4ta edición, Ediciones Omega. 1146-7.
- Altamirano-Lozano M, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M, Rojas E.** 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis.* 16(1): 7-17.
- Altamirano-Lozano MA, Valverde M, Alvarez-Barrera L, Molina Bertha, Rojas Emilio.** 1999. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* 19: 243-255.
- Álvarez GC, Arellano FE y Pérez CA.** 2015. Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación in la producción animal. *Senasa, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación.* No. 7. 21-37.

- Amann RP.** 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology.* 2: 37-58.
- Amann RP.** 1986. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environmental Health Perspectives.* 70: 149-158.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.** 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90(17): 7915–7922.
- Anderson D, Dhawan A, Laubenthal J.** 2013. The comet assay in human biomonitoring. *Methods in Molecular Biology.* 1044: 347-62.
- Anderson D, Plewa MJ.** 1998. The international Comet Assay Workshop. *Mutagenesis.* 13(1): 67-73.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones. F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *PEMS Microbiology. Review.* 27: 215–237.
- Antoine-Moussiaux N, Magez S, Desmecht D.** 2008. Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends in Parasitology.* 24(9): 411-8.
- Aragón MA, Altamirano-Lozano M.** 2001. Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology.* 15(2): 145-151.
- Aragón MA, Ayala ME, Fortoul TI, Bizarro P, Altamirano-Lozano M.** 2005. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproductive Toxicology.* 20(1): 127-34.
- Arguello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T.** 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology.* 3: 73.
- Ariagno J, Mormandi E.** 2016. Guía práctica para la evaluación del semen. *ByPC.* 80(3): 29-36.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Browne MA.** 1995. The single cell electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail and moment. *Mutagenesis.* 10(2): 85-90.

- Babić M, Radić S, Cvjetko P, Roje V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M.** 2009. Antioxidative response of Lemna minor plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquatic Botany*. 91(3): 166-172.
- Baraño RI.** 2009. Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *Bio Review*. 2: 20-30.
- Batty J.** 1978. Acute Changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*mus musculus*). *Animal Behaviour*. 26(2): 349-57.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D.** 1996. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 2(3): 139-44.
- Bingham E, Cohrssen B, Powell CH.** 2001. Patty's Toxicology. Editorial Elsevier vol 2. Quinta edición, Nueva York. 484-586.
- BMEHR, (Biological Markers in Environmental Health Research).** 1987. By: The Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environmental Health perspectives*. 74: 3-9.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G.** 2005. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 20(4): 245-254.
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E.** 1995. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105(1): 25-33.
- Brinster RL, Zimmermann JW.** 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(24): 11298-11302.
- Britten JS, Blank M.** 1968. Thallium activation of the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-activated ATPase of rabbit Kidney. *Biochimica et Biophysica Acta*. 159(1): 160-6.
- Budavari S, Maryadele J, Smith A, Heckelman P.** 1996. The Merck index: Encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Decima primera edición. *Editorial Asistente. EUA*, p. 1458.

- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kundram TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A.** 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutation Research*. 627(1): 31-7.
- Calabrese EJ, Mattson PM,** 2017. How do hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ Again and Mechanism of Disease*. 3: 13.
- Cardona-Maya W, Berdugo JW, Cadavid A.** 2008. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urológicas Españolas*. 32(4): 443-5.
- Carson BL, Elli IIIHV, McCann JL.** 1987. Thallium: mammalian toxicity summary. *Toxicology and biological monitoring of metals in human. Including Feasibility and Need. Lewis EUA*. 243-254.
- CBMNRC, (The Committee on Biological Markers of the National Research Council).** 1987. Biological Markers in Environmental Health Research. *Environmental Health Perspectives*, 74: 3-9.
- Chang H, Kim JB, Kim YS, Suarez SS, Wu M.** 2013. Different migration pattern of sea urchin and mouse sperm revealed by a microfluidic chemotaxis device. *PLoS ONE*. 8(4): 1-8.
- Chang R.** 2010. Química. Décima edición. México. Editorial McGraw Hill. Pág. 1076-1078. p.
- Cheam V.** 2001. Thallium contamination of water in Canada. *Water Quality Research Journal*. 36(4): 851-77.
- Choi SM, Yoo SD, Lee BM.** 2004. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity and mutagenicity. *Journal Toxicology Environmental Health*. 7(1): 1-24.
- Ciudad RA.** 2014. Requerimientos de micronutrientes y oligoelementos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 60(2): 161-170.
- Cofepris. México.** 1987. Secretaria de Salud. Gaceta sanitaria. IV. Information sanitaria básica. Rescatado de

<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/Establecimientos/listasusttoxicas1a parte.pdf> [última consulta 03/09/2018].

- Collins AR, Dusinská M.** 2002. Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols*. Human Press. *Methods in Molecular Biology* 186: 146-159.
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R.** 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 23(3): 143-51.
- Collins AR.** 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26(23): 249-261.
- Cooke HJ, Saunders PTK.** 2002. Human genetics and disease: mouse models of male infertility. *Nature Reviews Genetics*. 3: 790-801.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J.** 2007. Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 31(2): 120-131.
- Cotelle S, Ferard JF.** 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 34(4): 246-255.
- Croom E.** 2012. Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. (112): 31-88.
- Cruz-Hernández Y, Ruiz-García M, Villalobos M, Romero FM, Meza-Figueroa D, Garrido F, Hernández-Alvarez E, Pi-Puig T.** 2018. Fractionation and mobility of thallium in areas impacted by mining-metallurgical activities: Identification of a water-soluble Tl(I) fraction. *Environmental Pollution*. (237):154-165.
- Cvjetko P, Cvjetko I, Pavlica M.** 2010. Thallium toxicity in humans. *Arhivza Higijenu Rada Toksikologiju*. 61(1): 111-9.
- D'Errico M, Parlanti E, Diogliotti E.** 2008. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutation Research*. 659(1-2): 4-14.
- De Aluja, Aline S.** 2002. Animales de laboratorio y Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Bioética. *Gaceta Médica de México*. 138(3): 295-9.
- DelValls TA, Sáenz V, Arias AM, Blasco J.** 1999. Thallium in the marine environment: first ecotoxicological assessments in the Guadalquivir estuary

- and its potential adverse effect on the doñana european natural reserve after the Aznalcollar mining spill (SW Spain). *Ciencias Marinas*. 25(2) 161-175.
- Dhokpande SR, Kaware. JP.** 2013. Biological methods for heavy metal removal: a review. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology (IJESIT)*. 304-9.
- DOF, Diario Oficial de la Federación.** 2009. Secretaría de Gobernación. Rescatado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5126251&fecha=24/12/2009](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5126251&fecha=24/12/2009). [Última consulta 03/09/2018].
- Dolgnier R, Brockhaus A, Ewers U, Wiegand H, Majewski F, Soddemann H.** 1983. Repeated surveillance of exposure to thallium in a population living in the vicinity of a cement plant emitting dust containing thallium. *International archives of occupational and environmental health*. 52(1): 79-94.
- Dougherty JP, Costello JA, Michael RG.** 1988. Determination of thallium in bovine liver and mouse brains by laser excited atomic fluorescence spectrometry in a graphite tube furnace. *Analytical chemistry*. 15:60(4): 336-40.
- Douglas KT, Bunni MA, Baidur SR.** 1990. Thallium in biochemistry. *International Journal Biochemistry*. 22(5): 429-438.
- EPA, US Environmental Protection Agency.** 2009. Washinton, DC. Toxicological review of thallium and compounds, p. 1-163.
- Escalier D.** 2006. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Human Reproduction. Human Reproduction Update*. 12(4): 449-461.
- Fenner-Crisp, PA, Maciorowski AF, Tim GE.** 2000. The endocrine disruptor screening program developed by the US Environmental Protection Agency. *Ecotoxicology*. (9): 85-91.
- Fergusson JE.** 1990. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press. *Health and Fitness*. 614.
- Flores C, Vilanova L.** 2015. Metabolismo espermático. *Gaceta de Ciencias veterinarias*. Vol. 20. 23-32.
- Formigli L, Scelsi R, Poggi P, Gregotti C, Di Nucci A, Sabbioni E, Gottardi L, Manzo L.** 1986. Thallium-induced testicular toxicity in the rat. *Environment Research*. 40(2): 531-9.

- Frattini P.** 2005. Thallium Properties and Behaviour. *Geologian Tutkimuskeskus*. 1-46.
- Friedberg EC.** 2003. DNA damage and repair. *Nature*. 23; 421(6921): 436-40.
- Fuentes YM, Candela E.** 2003. Peso de los órganos en relación al peso corporal en ratones C57Bl/6 y NMRI/UCLA. *Revista científica, FCV-LUZ*. Vol XIII. 389-402.
- Galván-Arzate S, Martínez A, Medina E, Santamaría A, Rios C.** 2000. Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions. *Toxicology Letters*. 116(1-2): 37-43.
- Galván-Arzate S, Santamaría A.** 1998. Thallium toxicity. *Toxicology Letters*. 99(1): 1-13.
- García-Rodríguez MC, García-Cárdenas GP, Montaña-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA** 2014. Cytotoxic and genotoxic effects of exposure to heavy metals (Chromium [II] and thallium [I]) of mice CD-1 strain: micronúcleos, apoptosis and cell viability. *Acta universitaria Multidisciplinary Scientific Journal*. 24: 91-6.
- Gascó CN, Martínez DY, Collado S.N, Junyet E.I, Pascual J.S.** 2017. Caso clínico: Intoxicación aguda por Talio: hemodiálisis diaria de bajo flujo vs alto flujo. *Hospital del Mar. Barcelona España*. 10-4.
- GHS, Globally Harmonized System of Clasification and Labelling of Chemicals.** 2011. Fourt Revised Edition, *United Nations. New York and Geneva*. 1-561.
- Góngora-Rodríguez A, Cortés-Algara A, Cortés-Vásquez A, Parra-Forero LY.** 2016. Infertilidad masculina causada por discinecia ciliar primaria Síndrome de Kartagener. *Revista del Hospital Juárez de México*. 83 (1-2): 41-51.
- González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz.** 2000. Rocío Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*. 25(1): 3-9.
- Grant DM.** 1991. Detoxification pathways in the liver. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 14(4): 421-30.
- Gregotti C, DI NA, Costa LG, Manzo L, Scelsi R, Bertè F, Faustman EM.** 1992. Effects of thallium on primary cultures of testicular cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 36: 59-69.

- Gregotti C.** 1985. The Effect of Chronic Thallium Administration on Testicular Enzyme Activities in the Rat. In: Chambers PL, Cholnoky E, Chambers CM. *Receptors and Other Targets for Toxic Substances. Archives of Toxicology (Supplement), vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg*, p. 332-3.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R.R.** 2003. 4<sup>th</sup> International Comet Assays Workshop. *Mutagenesis*. 18(1): 45-51.
- Hartmann A, Speit G.** 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*. 7(90):183-8.
- Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W.** 2003. Comparative study with the alkaline Comet Assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research*. 536(1-2): 27-38.
- Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA.** 2010. Fundamentals of toxicologic pathology. EUA, Segunda edición. *Academic Press*, p. 558-569.
- Hellman B, Vaghef H, Boström B.** 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 336(2): 123-31.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bouner C, Windebank S.** 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. 13(1): 89-94.
- Hess RA, Renato FL.** 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 636: 1-15.
- Hirata, M, Taoda K, Ono-Ogasawara M, Takaya M, Hisanaga N.** 1998. A probable case of chronic occupational. Thallium poisoning in a glass factory. *Industrial Health*. 36(3): 300-3.
- Hodgson, D. E.** 2004. Project Work: The Legacy of Bureaucratic Control in the Post-Bureaucratic Organization. *Organization*. 11(1): 81-100.
- Hoffman RS.** 2000. Thallium poisoning during pregnancy: a case report and comprehensive literature review. *Journal Toxicology: Clinical Toxicology*. 38(7): 767-75.

- Honma T, Suda M.** 1998. Correlation of lethal doses of industrial chemicals between oral or intraperitoneal administration and inhalation exposure. *Industrial Health*. 36(3): 273-81.
- Horowitz E, Zhang Z, Jones BH, Moss SB, Ho C, Wood JR, Wang X, Sammel MD, Strauss JF.** 2005. Patterns of expression of sperm flagellar genes: early expression of genes encoding axonemal proteins during the spermatogenic cycle and shared features of promoters of genes encoding central apparatus proteins. *Molecular Human Reproduction*. 11: 307–317.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM y Okabe M.** 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical investigation*. 120(4): 984-94.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety.** 1996. Thallium environmental health criteria. Vol.182. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Rescatado de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc182.htm> [Última consulta 30/11/2018].
- Jadoon S, Malik A.** 2017. DNA damage by metals in animals and human beings: an overview. *Biochemistry & Pharmacology*. 6(3): 1-8.
- Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QMR.** 2015. Heavy metals and human health: mechanistic insight in to toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(12): 29592–29630.
- Järup L.** 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 68: 167-182.
- Jiménez-García LF, Mechant-Larios H.** 2003. Biología celular y molecular, México. Pearson Prentice Hall. 679- 680. p.
- John AL, Viraraghavan T.** 2005. Thallium: A review of public health and environmental concerns. *Environment International*. 31. 493-501.
- Junko S, Kazuo H.** 1986. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice - effects on fertility and sperm morphology. *Archives of Toxicology*. 59(4): 201-5.

- Kanematsu N, Hara M, Kada T.** 1980. REC assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Research.* 77: 109-116.
- Kanematsu N, Hara M, Kada T.** 1980. REC assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Research.* 77: 109–116
- Karbowska B.** 2016. Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods. *Environmental Monitoring and Assessment.* 188(11): 640. 1-19.
- Katsuhisa H, Ryo T, Toraya F.** 2014. Distribution Characteristics of Heavy Metals in the Organs and Tissues of Striped Dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 46(12): 3011-3021.
- Kavloc RJ, Ankley GT.** 1996. A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Analysis.* 16: 731-739.
- Kavlock RJ, Daston GP, De Rosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA.** 1996. Research needs for the risk assessment of health and environment effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives.* 104(4): 715-740.
- Kenneth T, Douglas MA, Bunni T, Swati R.** 1989. Thallium biochemistry. *Introduction Journal. Biochemistry.* 22(5): 429-438.
- Kenneth TD, Marlene AB, Swati RB.** 1990. Thallium in biochemistry. *International Journal of Biochemistry.* 22(5): 429-38.
- Khalifa E. Sharquie, Ghassan A. Ibrahim, Adil A. Noaimi, Hussain K. Hamudy.** 2011. Outbreak of thallium poisoning among Iraqi patients. *Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery.* 15(1): 29-32.
- Klaassen CD, Watkins JB.** 2003. Casarett and Doull's Essentials of Toxicology. Segunda edición EUA. McGraw-Hill Medical, p.82-86.
- Klaassen CD, Watkins JB.** 2005. Fundamentos de Toxicología. McGraw-Hill, p. 78.
- Klassen CD, Amdur M, Doull J.** 1996. Casarrette and Doull's Toxicology: The basic Science of poisons. 5ta edición Nueva York: MCGraw-Hill, p. 504-5.

- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA.** 2006. Conceptos de genética. Madrid-España. 8ª Edición. Pearson Prentice Hall, p. 34-5.
- Knez J.** 2013. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive BioMedicine Online* 26(5): 440-8.
- Kouassi KM, Mousan AA, Gervais MM, N'Guessan ZE, Allico DJ, Mireille D. Jean ND.** 2017. Effects of chronical lead exposure on zinc concentration and spermatic parameters in Wistar rats. *Annals of Medical and Biomedical Sciences.* 3(2): 51-8.
- Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Koyama H, Arakawa K, Nagamine T.** 2008. The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals.* 21(1): 71-81.
- Kyung-Taek R.** 2017. Reproductive toxic chemicals at work and efforts to protect workers health: a literature review. *Safety and Health at Work.* 8(2): 143-150.
- Lee RF, Steinert S.** 2003. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in acuatic (marine and freshwater) Animals. *Mutation Research.* 544(1): 43-64.
- Léonard A, Gerber GB.**1997. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research.* 387: 47-53.
- LePecq JB y Paoletti C.** 1967. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical-chemical characterization. *Journal of Molecular Biology.* 27(1): 87-106.
- Lewis DR, Lloyd WA.** 1933. Treatment of ringworm of the scalp with thallium acetate. *British Medical Journal* 2(3784): 99-100.
- Lie R, Thomas RG, Scott JK.** 1960. The distribution and excretion of thallium-204 in the rat, with suggested MPC's and a bio-assay procedure. *Health Physics.* 2(4): 334-40.
- López NJ, Rodríguez-Puyol D.** 1997. Mecanismos de envejecimiento celular. *Nefrología.* 15-22.
- Lund Ali.** 1956. Distribution of thallium in the organism and its Elimination. *Acta pharmacologica et Toxicologica Banner.* (12): 251-9.

- Ly JD, Grubb DR, Lawen A.** 2003. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; and update. *Kluwer Academic Publishers*. 8: 115-128.
- Machholz E, Mulder G, Ruiz C, Corning BF, Pritchett-Corning KR.** 2012. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *Journal of Visualized Experiments*. 26(67): 1-8.
- Maldonado SO, Jiménez VEN, Bernabé GMR, Ceballos RGM, Méndez BE.** 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revisión Médica UV*. 1-8.
- Malmgren L.** 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*. 48: 523-530.
- Maluszynski MJ.** 2009. Thallium in environment. Institute of Environment Protection, Poland. *Environmental Protection and Natural Resources*. 40: 31-38
- Marchetti F, Wyrobek AJ.** 2008. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA repair*. 7(4): 572-581.
- Marienfeld.** 2018. Laboratory Glassware. Cámaras de recuento. Alemania. Recuperado de <https://www.marienfeld-superior.com/camaras-de-recuento.html> [Última consulta 26/11/2016].
- Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Lakota P.** 2012. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)*. 58(1): 7-15.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A.** 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*. 288(1): 47-63.
- McKillop JH.** 1980. Thallium 201 Scintigraphy. *Western Journal of Medicine*. 133(1): 26-43.
- Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Romme N, Johnson JK, Schafer K, Pitsch S.** 2007. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic Pathology*. 35(5): 742-50.

- Migliore L, Cocchi L, Nesti C, Sabbioni E.** 1999. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 34(4): 279-284.
- Morgan AR, Lee JS, Pulleyblank DE, Murray NL, Evans DH.** 1979. Ethidium fluorescence assays. Part 1. Physicochemical studies. *Nucleic Acids Research*. 7(3): 547-565.
- Mourelle M, Favari L, Amezcua JL.** 1988. Protection against thallium hepatotoxicity by silymarin. *Journal of Applied Toxicology*. 8(5): 351-4.
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Agarwal A.** 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19(1): 129-38.
- MRI (Midwest Research Institute).** 1988. Toxicity of thallium sulfate (CAS No 7446-18-6) in Sprague-Dawley rats. Vol 2. Recuperado de [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). [Última consulta 03/09/2018].
- Mulkey JP, Oehme Favari L, Amezcua JL.** 1998. Protection against thallium hepatotoxicity by simyarin. *Journal of Aprolied Toxicology*. 8(5): 351-354.
- Mulkey JP, Oehme FW.** 1993. A review of thallium toxicity. *Veterinary and Human Toxicology*. 35(5): 445-53.
- Müller WU.** 2007. Comet Assay. In: Obe G., Vijayalaxmi (eds) Chromosomal Alterations. Springer, Berlin, Heidelberg. *Springer*.161-176.
- Mullins LJ and Moore RD.** 1960. The movement of thallium ions in muscle. *The Journal of General Physiology*. 43: 759-73.
- Myung NH, Zhu X, Kruman II, Castellani RJ, Petersen RB, Siedlak SL, Perry G, Smith MA y Lee HG.** 2008. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. *Age Dordrecht, Netherlands*. 30(4): 209-15.
- Nagarathna PK, Wesley MJ, Reddy PS, Reena K.** 2013. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. (22): 236-243.

- Nakamura K, Nishiguchi I, Takagi Y, Kubo A, Hashimoto S, Takami H.** 1983. Accumulation mechanism of  $^{201}\text{Tl}$ —k-contents and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activities of tissues. *Radiosiotopes*. 32(12): 626-8.
- Nelson DL, Cox MM.** 2008. Principles of Biochemistry. Tercera Edición. Editorial ediciones Omega. Nueva York, p. 439, 869-873.
- NG TB, Liu WK.** 1990. Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. *In vitro cellular & Developmental Biology*. 26: 24-8.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health.** 2005. Thallium (soluble compounds, as Tl). Centers for Disease Control and Prevention. Washington, DC: Department of Health and Human Services. Recuperado de <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0608.html>. [Última consulta 03/09/2018].
- NJDHDS, New Jersey Department of Health and Senior Services.** 2000. Thallium acetate. RTK. CAS 563-68-8. USA. Recuperado de <https://www.nj.gov/hath/> [Última consulta 2/12/2018].
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.** 2007. Norma Oficial Mexicana. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsenic, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos. Distrito Federal, México. Recuperado de [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat\\_ssa1-2004.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf) [última consulta 2/12/2018].
- Norman AW, Litwack G.** 1997. Hormones. EUA, New York. Academic Press. Segunda edición. 350-351.
- Oakberg EF.** 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*. 99: (3): 507-516.
- Oatley JM, Brinster RL.** 2012. The Germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews*. 92(2): 577-595.

- OECD, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.** 2001. Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4. Paris, p. 1-13.
- OECD, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.** 1983. Test No 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4. Paris, p. 1-8.
- OEHHACEPA; Office of environmental Health Hazard Assessment California. Environment Protection Agency.**1999. Public health goal for thallium in drinking water. Rescatado de <https://oehha.ca.gov/water/phg/pdf/thalirs.pdf>. [Última consulta 2/12/2018].
- Ogino M, Ichimura M, Nakano N, Minami A, Kitagishi Y, Matsuda S.** 2016. Roles of PTEN with DNA Repair in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(6): 2-13.
- Olive PL, Banáth JP, Durand. RE.** 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA-damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay, *Radiation Research*. 122: 86-94.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C.** 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19(4): 426-436.
- Östling O, Johansson KJ.** 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123: 291-3.
- Paalzow GH.** 1992. I-Dopa induces opposing effects on pain in intact rats: (-) Sulpiride, SCH 23390, or  $\alpha$ -methyl-dl-p-tyrosine methylester hydrochloride reveals profound hyperalgesia in large antinociceptive doses. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 263: 470– 479.
- Pau P.** 2000. Management of thallium poisoning. *Hong Kong Medical Journal*. 6(3): 316-318.
- Pérez DG, Restrepo MR, Martinez SG.** 2009. Hormesis: Antecedentes e Implicaciones en los sistemas biológicos. *Latín American Journal of Pharmacy*. 28(6): 954-60.

- Peter J AL, Viraraghavan T.** 2008. Removal of thallium from aqueous solutions by modified *Aspergillus niger* biomass. *Bioresource Technology*. 99: 618-25.
- PHG, Public Health Goal.** 1999. Thallium in drinking water. Office of Environmental Health Assessment. *California Environmental Protection Agency*. EUA.
- Philips BT, Gassei K, Orwig KE.** 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 365: 1663–1678.
- Phillips DH, Arlt VM.** 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 87-110.
- Pickering AM, Davies KJ.** 2012. Degradation of damaged proteins - the main function of the 20S proteasome. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 109: 227–248.
- Pierce BA.** 2010. Genética un enfoque conceptual. España. Editorial Médica Panamericana, p. 276-9.
- Pinto E, Sigaud-kutner TC, Leitão MA, Okamoto OA, Colepicolo DM.** 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 1008 - 1018.
- Pizent A, Tariba B, Živković T.** 2012. Reproductive toxicity of metals in men. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 1: 35-46.
- Prado FG, Carabias MR, Rodríguez GE, Herrero HE.** 2002. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Revista Española de Salud Pública*. (76): 133-47.
- Quintero-Vásquez GA, Bermúdez-Cruz RM, Castillo-Cadena J.** 2015. Infertilidad Masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18(2):144–151.
- Ramaswamy S, Weinbauer GF.** 2015. Endocrine Control of spermatogenesis: role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*. 26: 4(2): 1-15.
- Ramos-Treviño J, Bassol-Mayagoitia S, Ruiz-Flores P, Espino-Silva PK, Saucedo-Cárdenas O, Villa-Cedillo SA, Nava-Hernández MP.** 2017. *In vitro* evaluation of damage by heavy metals in tight and gap junctions of Sertoli Cells. *DNA and Cell Biology*. 36(10): 829-36.

- Rangel-Guerra R, Martínez-Héctor R, Villareal-Héctor J.** 1990. Intoxicación por talio, experiencia con 50 pacientes. Hospital Universitario de Nuevo León. Servicio de Neurología. *Gaceta Médica de México*. 12(6): 487-495.
- Rao MV and Gangadharan B.** 2008. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. 22: 935-942.
- Raynard S, Niu H, Patrick S.** 2008. DNA double-strand break processing: the beginning of the end. *Genes and Development*. 22. 2903-7.
- Repetto G, Del Peso A.** 2001. "Gallium, Indium, and Thallium." In *Patty's Toxicology*, edited by E. Bingham and B. Cohrssen, p. 257-353.
- Rex AS, Aagaard J, Fedder J.** 2017. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*. 5(4): 622-630.
- Rey R.** 2003. Regulation of spermatogenesis. The developing testis. *Physiology and Pathophysiology*. 5: 38-55.
- Ríos C, Monroy-Noyola A.** 1992. D-penicillamine and Prussian blue as antidotes against thallium intoxication in rats. *Toxicology*. 74: 69-76.
- Rodríguez-Espitia JD.** 2017. Evaluación de la toxicidad celular de tres sales de talio en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de pregrado, licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, p. 27. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2017/marzo/0757356/Index.html>
- Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA.** 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista de Contaminación Ambiental*. 22(4): 173-189.
- Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA.** 2013. Genetic toxicology of thallium a review. *Drug and Chemical Toxicology*. 36(3): 369-383.
- Rodríguez-Mercado JJ, Hernández-de la Cruz H, Felipe-Reyes M, Jaramillo-Cruz E, Altamirano-Lozano MA.** 2015. Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium(I) acetate in human blood cells. *Environment Toxicology*. 30(5): 572-80.

- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano Lozano MA.** 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. 25(8): 1996-2002.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mosqueda-Tapia G, Altamirano-Lozano MA.** 2017. Genotoxicity assessment of human peripheral Lymphocytes induced by thallium(I) and thallium (III). *Toxicological and Environmental Chemistry*. 99(5-6): 987-998.
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldán Reyes E, Altamirano-Lozano MA.** 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood Cells. *Toxicology Letters*. 144: 359-369.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P.** 1999. Are metals dietary carcinogens? *Mutation Research*. 443(1-2): 157-181.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M.** 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatology B: Biomedical Science and Applications*. 722(1-2): 225-54.
- RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.** 1997. NIOSH. Comprehensive Guide to the RTECS.NIOSH. Rescatado de <https://www.cdc.gov/niosh/docs/97-119/default.html>. [Última consulta 02/12/2018].
- Rusyniak DE, Furbee RB, Kirk MA.** 2002. Thallium and arsenic poisoning in a small midwestern town. *Annals of Emergency Medicine*. 39(3): 307-311.
- Saganuwan SA.** 2017. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: an overview. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 20(4): 291-328.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.** 1999. Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México.
- Saha A.** 2005. Thallium toxicity: a growing concern. *India Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 9(2): 53-6.

- Sakamoto J y Hashimoto K.** 1986. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice – effects on fertility and sperm morphology. *Archives of Toxicology*. 59(4): 201-205.
- Salehi S, Saljooghi AS, Badiie S, Moqadam MM.** 2017. Chelation of thallium (iii) in rats using combined deferasirox and deferiprone therapy. *Toxicology Research*. 33(4): 299-304.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S.** 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review Biochemistry*. 73: 39-85.
- Sánchez-Chardi A.** 2007. Tissue, age, and sex distribution of thallium in shrews from Doñana, a protected area in SW Spain. *Science of the Total Environment*. 383(1-3): 237-40.
- Sans-Fuentes. M.A.** 2014. Ratón casero-Mus musculus. Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles. Museo Nacional de ciencias naturales. Madrid. Rescatado de <http://www.vertebradosibericos.org/> [Última consulta 21/11/2018].
- Scaglia H, Chichizola C, Cecilia FM, Ludueña B, Mastandrea C, Scaglia J.** 2009. Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efectos sobre el eje reproductivo. *Hospital Italiano de la Plata y Alkemy-Center Lab. Santa Fe*. 24: 74-86.
- Schützendübel A, Polle A,** 2001. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and Protection by mycorrhization. *Journal Experimental Botany*. 53: 1351-1365.
- Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K.** 2007. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic Pathology*. 35(5): 751-5.
- Sharquie KE, Ibrahim GA, Noaimi AA, Hamudy HK.** 2011. Outbreak of thallium poisoning among Iraqi patients. *Hydrometallurgy*. 15: 29-32.

- Shen HM, Chia SE, Ong CN.** 1999. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *Journal Andrology*. 20(6): 718-23.
- Shrinivas SA, Shanta SH, Prajakta BB.** 2017. DNA: Damage and repair mechanisms in humans. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*. 3(2): 1-8
- Silva-García C.** 2006. Laboratorio de bioquímica. España. Editorial MAD, SL, p. 118: 130-1.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL.** 1989. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Experimental Cell Research*. 184(2): 461- 470.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** 1988. A simple technique for quantification of lows levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175(1): 184-191.
- Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R.** 2011. Heavy metals and living systems: an overview. *Indian Journal of Pharmacology*. 43(3): 246-253.
- Smith CC, Stetina R.** 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 23(3): 143-51.
- Smith RG.** 1976. Hormone-receptor interactions--basic mechanisms. *International Journal of Fertility & Sterility*. 21(3): 159-62.
- Soria ML, Repetto G, Repeto M.** 2005. Revisión General de la toxicología de los metales. En: Repetto M, ed, Toxicología avanzada. España, Díaz de Santos, p. 206-358.
- Steinberger A, Klinefelter G.** 1993. Sensitivity of Sertoli and Leydig cells to xenobiotics in *in vitro* models. *Reproductive Toxicology*. (7): 23-37.
- Stocco DM.** Testosterone biosynthesis. In: Knobil E, Neill JD, editors, Encyclopedia of reproduction, vol 4. San Diego: Academic Press; 1998, p. 784-9.
- Sun H, Wang N, Nie X, Zhao L, Li Q, Cang Z, Chen C, Lu M, Cheng J, Zhai H, Xia F, Ye L, Lu Y.** 2017. Lead exposure induces weight gain in adult rats, accompanied by DNA hypermethylation. *PLoS One*. 20(12): 1-13.

- Suresh AK.** 2015. Co-relating metallic nanoparticle characteristics and bacterial toxicity. *Springer Briefs in Biometals*, p. 1-13.
- Taufert Y, Marin MA.** 2014. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*. 13(2): 95-110.
- Thomas R.** 1993. The denaturation of DNA. *Gene*.135: 77-9.
- Tice R y Vasquez M.** 1999. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (scg) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Experimental. Cell Research*. 175: 184-191.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J.C y Sasaki YF.** 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35(3): 206-221.
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP.** 1990. The Single Cell Gel (SCG) Assay: An Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells. Biological Reactive Intermediates IV. Molecular and Cellular Effects and Their Impacts on Human Health, *Plenum Press, New York*. 157-164.
- Tice RR, Straus GH, Peters WP.** 1992. High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 271(2): 101-113.
- Tsai YT, Huang CC, Kuo HC, Wang HM, Shen WS, Shih TS, Chu NS.** 2006. Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *Neurotoxicology*. 27(2): 291-295.
- Valko M, Morris H, Cronin MT.** 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12(10): 1161-208.
- Valverde M, Fortoul IT, Díaz-Barriga F, Mejía J, Rojas del Castillo E.** 2002. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*. 17(1): 56-61.
- Vargas MF.** 2005. La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista Española de Salud Pública*. 79(2): 117-127.

- Villanueva-Rodríguez T.** 2008. Los metales en Castilla y León. Junta de Castilla y León. España, p. 1-24.
- Wanda MH, Colin GR, Matthew AW.** 2010. Male Reproductive system. Fundamentals of toxicology pathology, segunda edición, p. 553-597.
- Wang Q, Huang X, Liu L.** 2007. Analysis of nine cases of acute thallium poisoning. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Science.* 27 (2): 213-6.
- Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A.** 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil and Sterility.* 80(3): 531-5.
- Ward WS, Coffey DS.** 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction.* 44(4): 569-74.
- Webster SH, Liljegen EJ.** 1955. Organ: Body-weight ratios for certain organs of laboratory animals. III. White Swiss mouse. *Archive of Journal of Anatomy.* 97: 129-53.
- Wei B, Jiang F, Li S, Mu S.** 2009. Contamination levels assessment of potential Toxic metals in road dust deposited in different types of urban environment. *Environmental Earth Science.* 61(6): 1187-1196.
- Wei Q.** 1987. Studies on spermotoxicity of thallium carbonate in drinking water and its effect on reproductive function of mice. *Chung-hua Yu Fang Hsueh Tsa Chih (Chinese Journal of Preventive Medicine).* 21: 141-143.
- Watson JD, Crick F. HC.** 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 171(4356): 737-8.
- Wiesmüller L, Ford JM, Schiestl RH.** 2002. DNA damage, repair, and diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2(2): 45-45.
- Wilkins MH, Stokes AR, Wilson HR.** 1953. Molecular structure of nucleic acids: molecular structure of deoxyribose nucleic acids. *Nature.* 171: 738-40.

- Wirth JJ, Mijal RS.** 2010. Adverse of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 56(2): 147-167.
- Wyman C, Roland K.** 2006. DNA Double-Strand Break repair: All's Well that Ends Well. *Annual Review Genetics*. 40: 363-383.
- Wyrobek AJ, Bruce WR.** 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America*. 72(11): 4425-9.
- Wyrobek, A.J. and Bruce, W.R.** 1978. The Induction of Sperm shape abnormalities in mice and humans. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. *A Hollander and FH de Serres Plenum Press*. 257-285.
- Yeung BH, Wan HT, Law AY, Wong CK.** 2011. Endocrine disrupting chemicals: multiple effects on testicular signaling and spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 1(3): 231-9.
- Yildirim M, Ikbal M, Tos T, Seven B, Pirim I y Varoglu E.** 2005. Genotoxicity of thallium 201 in patients with angina pectoris undergoing myocardial perfusion study Tohoku. *Journal Expediente Médico*. 206: 299-304.
- Yoshida M, Igeta S, Kawashima R, Akama Y, Yoshida K.** 1997. Changes in adenosine triphosphate (ATP) concentration and its activity in murine Tissue after thallium administration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 59(2): 268-73.
- Yoshida S.** 2012. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction*. 144(3): 293-302.
- Yumoto T, Tsukahara K, Naito H, Iida A, Nakao A.** 2017. A successfully treated case of criminal thallium poisoning. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11(4).
- Zasukhina GD, Vasilyeva IM, Sdirkova NI, Krasovsky GN, Vasyukovich LY, Kenesariiev UI, Butenko PG.** 1983. Mutagenic effect of thallium and mercury salts on rodent cells with different repair activities. *Mutation Research*. 124(2): 163-73.

- Zhang Y, Shen G, Yu Y, Zhu H.** 2009. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*. 157(11): 3064-8.
- Zirkin BR.** 1998. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FISH. *Seminars in and Developmental Biology*. 9: 417-21.
- Ziskoven R, Achenbach C, Schulten HR, Roll R.** 1983. Thallium determination in fetal tissues and maternal brain and kidney. *Toxicology Letters*. 19(3): 225-231.
- Zitko V.** 1975. Toxicity and pollution potential of thallium. *Science of the Total Environment*. (4): 185-92.
- Zuluaga VA, Gaviria AD.** 2012. Una mirada al estrés oxidativo en la célula. *Revista Médica de Risaralda*. 18(2). Rescatado de [https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistamedica/article/view/7923%20\[%C3%9Altima%20consulta%2021/11/2018\]](https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistamedica/article/view/7923%20[%C3%9Altima%20consulta%2021/11/2018]). [Última consulta 21/11/2018].