



---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTADO DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Evaluación del daño celular y sobre el ADN en leucocitos humanos expuestos *in vitro* a talio(I) y talio(III), empleando pruebas de viabilidad y la metodología de electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas y en la versión acelular”.**

TESIS

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**Alfredo Hernández Caballero**

DIRECTOR

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

ASESOR

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava



Ciudad de México, Noviembre 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.

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología Genética bajo la Dirección del Dr. Juan José Rodríguez Mercado y la asesoría del Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), en el Edificio de la UMIE de la facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Campus II, UNAM.**

**Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo de la DGAPA-PAPIIT proyecto IN225216.**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **HERNÁNDEZ CABALLERO ALFREDO**, con número de cuenta **308256839**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26 de noviembre de 2019** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

**VOCAL** Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

**SECRETARIO** Dr. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA

**SUPLENTE** M. en E.S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

**SUPLENTE** Dra. ELIA ROLDÁN REYES

*[Handwritten signatures of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación del daño celular y sobre el ADN en leucocitos humanos expuestos *in vitro* a talio (I) y talio (III), empleando pruebas de viabilidad y la metodología de electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas y en la versión acelular.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Ciudad de México, a 30 de octubre de 2019

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**  
DIRECTOR  
DIRECCIÓN

*[Handwritten signature of Dr. Vicente Jesús Hernández Abad]*

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ  
JEFE DE CARRERA

“Si puedes creer, al que cree todo le es posible”.  
Marcos 9:23

## **Agradecimientos**

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, por la oportunidad de trabajar en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UIGTA) de la FES Zaragoza y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por haberme aceptado como alumno y tesista, por sus enseñanzas, su paciencia, comprensión y confianza.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por la paciencia y la enseñanza paso a paso y por ser un ejemplo de perseverancia.

A mis sinodales, Dra. Elia Roldán por las observaciones y consejos realizadas hacia este trabajo.

A la M. en E. S. María Cristina Alvarado Domínguez por el tiempo dedicado a revisar este trabajo.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por sus atenciones, estima, y aportaciones para conmigo, por el apoyo y el ánimo que siempre emite a los alumnos para que salgamos adelante.

Al Laboratorio 5-PA de la UMIEZ, desde los que me enseñaron a usar una micropipeta hasta los que me ayudaron a que mi paciencia se expandiera, con los que pasé momentos de risa, nervios, discusiones, perseverancia, y más paciencia... a todos y cada uno de ellos gracias.

Gracias Dios por permitirme llegar a este check point, porque sé que aún tiene muchos planes para mí, por su amor sin condición, su paciencia y sobre todo su lealtad ya que a pesar de mis errores sus promesas son las que avivaron mi fe cuando más lo necesitaba, ¡y porque comprendo que Él está cada proceso! ¡¡GRACIAS DIOS!!

A mis padres: Florencio Hernández G. y Halina Caballero R. gracias por todo el amor, cariño y apoyo que siempre me han brindado, por el esfuerzo para invertir en mí y por la confianza que me depositaron, por impulsarme a siempre ser mejor y a no darme por vencido, hoy quiero honrarlos con esta tesis.

A mis hermanos Saúl e Isaac, gracias por su apoyo, por ser siempre ese público atento en cada ensayo de exposición o estudio para comprender mejor las cosas, me seguiré esforzando para ser un buen ejemplo para ustedes.

A Toño por ser mi amigo fiel, porque me ayudó como enzima en muchas áreas de mi vida, por taaaanta paciencia para conmigo cuando pensaba que no había más remedio y por mostrarme que siempre puedes dar más, ¡¡muchas gracias!!

## ÍNDICE

### RESUMEN 1

INTRODUCCIÓN..... 1

MARCO TEÓRICO ..... 2

2.1 Metales ..... 2

2.2 Metales pesados ..... 3

2.3 Talio..... 3

2.3.1 Propiedades fisicoquímicas y datos toxicológicos ..... 3

2.3.2 Distribución..... 4

2.3.3 Fuentes de exposición ..... 5

2.3.4 Usos ..... 5

2.3.5 Exposición y sintomatología..... 6

2.3.6 Mecanismos de toxicidad del TI ..... 7

2.4 Modelo de estudio ..... 9

2.5 Citotoxicidad..... 9

2.5.1 Técnicas de citotoxicidad ..... 10

2.5.2 CFDA/BE ..... 10

2.5.3 NA/BE ..... 11

2.6 Genotoxicidad ..... 12

2.6.1 Pruebas de genotoxicidad ..... 12

2.6.2 La electroforesis unicelular en gel (EUG)..... 13

2.6.3 Versión acelular de EUG ..... 14

2.7 Cito y genotoxicidad del TI ..... 15

JUSTIFICACIÓN ..... 16

HIPÓTESIS 16

OBJETIVOS 17

6.1 General ..... 17

6.2 Particulares ..... 17

MATERIAL Y MÉTODO ..... 18

7.1 Obtención de la muestra..... 18

7.2 Tratamientos ..... 18

7.3 Evaluación de viabilidad con CFDA/BE ..... 18

7.4 Evaluación de apoptosis y necrosis con NA/BE.....	19
7.5 Análisis de daño al ADN por EUG .....	20
7.6 Análisis de daño al ADN con la versión acelular de la EUG .....	21
7.7 Análisis estadístico.....	22
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
8.1 Viabilidad .....	23
8.1.1 Muerte celular por apoptosis y necrosis.....	23
8.2.1 Daño al ADN.....	25
8.2.2 Daño al ADN con la prueba acelular de la EUG .....	28
<b>DISCUSIÓN 29</b>	
Daño al ADN y estimación del daño directo al ADN .....	30
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS 43</b>	

## RESUMEN

En la actualidad la presencia de metales pesados en el ambiente se ha incrementado debido a la intensa actividad antropogénica. Uno que ha llamado la atención es el talio (Tl) el cual ha demostrado tener la capacidad de inducir efectos tóxicos en el humano por exposición natural, ocupacional, accidental o terapéutica y del cual no se conoce su necesidad en algún proceso metabólico. El Tl es ampliamente usado en la elaboración de diversos productos y se encuentra principalmente en estados de oxidación I y III, lo que permite formar gran variedad de compuestos, donde la mayoría son elevadamente peligrosos. Al contacto con los organismos es rápidamente absorbido y distribuido por el torrente sanguíneo a prácticamente todos los tejidos del cuerpo. Estudios en los que utilizan concentraciones equivalentes a las encontradas en el ambiente y en los sitios de trabajo muestran que el Tl induce toxicidad celular y daño cromosómico, por lo cual es importante estudiar las concentraciones y tiempos cortos de exposición en los que este metal puede causar efectos dañinos a nivel celular y sobre todo a nivel genético. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad celular y sobre la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), en leucocitos humanos tratados *in vitro* con sulfato de Tl(I) y cloruro de Tl(III), empleando leucocitos de sangre periférica humana y diferentes metodologías. Se dieron tratamientos con sulfato de Tl(I) o cloruro de Tl(III) en concentraciones de 0.5, 1, 5, 50 y 100 µg/mL durante 2, 4 y 6 h, y se observó que la viabilidad no se modificó con la prueba de diacetato de carboxifluoresceína y bromuro de etidio (CFDA/BE), sin embargo, ambos compuestos incrementan la apoptosis en 6 h de exposición con la prueba de naranja de acridina y BE (NA/BE). Además, las evaluaciones con la prueba de electroforesis unicelular en gel (EUG) muestran que el Tl(I) y Tl(III) incrementa la longitud total del cometa, efecto que sigue un comportamiento dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Por otro lado, la versión acelular de la EUG (exposición directa del ADN) reveló incrementos significativos en las concentraciones probadas (0.5 y 50 µg/mL) para ambos compuestos. Los resultados demuestran que el Tl en sus dos estados de oxidación induce toxicidad celular, daño al ADN, así como daño directo al ADN; sin embargo, se sugiere realizar otras pruebas para corroborar estos últimos datos.

Apoyo de la DGAPA-PAPIIT proyecto IN225216.

## **INTRODUCCIÓN**

El uso de metales ha contribuido al desarrollo cultural y tecnológico del ser humano; sin embargo, su descarga al ambiente de manera natural y principalmente antropogénica ha aumentado su presencia en aire, agua y suelo, conduciendo a la contaminación del ambiente y de los alimentos (Rojas *et al.*, 1999).

Para su estudio, los metales se dividen en dos categorías, los que son esenciales para los seres vivos por realizar funciones biológicas y los no esenciales que pueden llegar a poseer propiedades curativas en bajas concentraciones, pero no tienen ninguna función biológica reconocida. Ambos en concentraciones no habituales o altas pueden ocasionar toxicidad y representar riesgo para la salud (Flora, 2014), debido a que la presencia de estos conduce a cambios a nivel molecular, celular, tisular y de órgano.

Un metal no esencial que ha ganado atención especial debido a su toxicidad es el talio (Tl), el cual es considerado contaminante y peligroso a bajas concentraciones. El Tl forma distintas sales solubles en agua, lo que facilita su biodisponibilidad, su absorción y acumulación, además la posibilidad de interactuar con el material genético alterando la integridad del genoma y por consecuencia, modificar el funcionamiento celular (Galván-Arzate y Santamaría 1998, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013).

## **MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Metales**

Los metales son un segmento inseparable para la vida y para los sistemas biológicos, estos pueden ser esenciales o no. Además de su gran aplicabilidad, influyen ampliamente sobre todas las formas de vida causando efectos severos comúnmente designados como "toxicidad inducida por metales", desde el punto de vista ambiental han ganado importancia en cuanto a las manifestaciones de toxicidad en humanos. Los metales llamados "pesados" son considerados de los más peligrosos ya que pueden causar la muerte por envenenamiento en la vida silvestre y en las personas (Flora, 2014).

La contaminación por metales es un problema que ha ido en aumento debido principalmente a actividades antrópicas. Entre las principales fuentes de contaminación se encuentran la minería, la metalúrgica, la agricultura, los vehículos automotores y el aporte natural en ciertos acuíferos (Covarrubias y Peña, 2017).

## 2.2 Metales pesados

Los metales pesados son un conjunto de elementos en los que se incluyen los de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. El criterio más general para su clasificación se basa en que su densidad específica es mayor a  $5 \text{ g/cm}^3$ . No obstante, algunos autores consideran esta definición inapropiada, pues la densidad específica no es una referencia en cuanto a la reactividad o toxicidad de un metal. Actualmente, el término “metal pesado” es utilizado para referirse de una manera amplia a aquellos metales o metaloides con potencial de causar problemas de toxicidad incluso en concentraciones muy bajas; algunos ejemplos, incluyen al mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), plomo (Pb) y **talio (Tl)**, entre otros (Lucho *et al.*, 2005; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013; Covarrubias y Peña, 2017).

Dichos metales se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica. Son peligrosos ya que tienden a bioacumularse e incorporarse en concentraciones no habituales en la cadena trófica (US EPA, 2009). Uno de los metales que ha ganado atención en los últimos años porque se puede incorporar a los organismos vía alimento y agua es el Tl.

## 2.3 Talio

### 2.3.1 Propiedades fisicoquímicas y datos toxicológicos

El Tl tiene un peso atómico de  $204.38 \text{ g/mol}$ , fue descubierto por Sir William Crookes en 1861 (Crookes, 1874). El nombre de Tl deriva de la palabra griega *thallos*, es brillante, dúctil, maleable y de color metálico gris azulado, se ubica en la familia IIIA de la tabla periódica, su número atómico es 81 y su configuración electrónica es  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^1$ , tiene densidad de  $11.85 \text{ g/cm}^3$ . Su punto de fusión es de  $303.5^\circ \text{ C}$ , punto de ebullición de  $1457^\circ \text{ C}$ , electronegatividad de 2.04, radio iónico de 150 pm, radio atómico de 171 pm para el Tl(I) y 89 pm para Tl(III).

Se presenta en dos estados de oxidación (I y III), donde el estado de oxidación I es considerado más estable y con propiedades semejantes a metales alcalinos como el potasio ( $\text{K}^+$ ), mientras que, en estado III es menos básico y se comporta similar al aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ). Debido a estas propiedades, el Tl puede formar diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos, estos últimos se consideran más peligrosos por su alta toxicidad.

Las formas comerciales más comunes son el acetato, carbonato y sulfato de Tl en estado de oxidación I. Otras formas de Tl(III), que derivan del catión  $Tl^{3+}$  incluyen el sesquióxido y tricloruro. La mayoría de sus compuestos son estables y solubles en agua, con excepción del sesquióxido de Tl (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Se sabe que compuestos inorgánicos de Tl(I), en solución acuosa a pH neutro, son más estables que los análogos de Tl(III). Por el contrario, los compuestos orgánicos son estables sólo en la forma III (Mulkey y Oehme, 1993). No obstante, los compuestos de Tl(I) como el sulfato ( $Tl_2SO_4$ ), acetato ( $CH_3COOTl$ ) y carbonato ( $Tl_2CO_3$ ) suelen ser más tóxicos, en comparación con el sulfuro ( $Tl_2S$ ) y el yoduro (TII), debido posiblemente a que estos últimos son menos solubles (Moeschlin, 1980).

El sulfato de Tl(I) es una sal en forma de prismas cristalinos, es incoloro e inodoro, con peso molecular de 504.83 g/mol, punto de fusión de 632 °C y densidad de 6.77 g/cm<sup>3</sup>. El cloruro de Tl(III) es un polvo color amarillo cristalino, tiene un peso molecular de 310.73 g/mol, punto de fusión de 25 °C, muy soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol o éter (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

La dosis letal media ( $dl_{50}$ ) del sulfato de Tl(I) para rata vía oral es de 25 mg/Kg y para ratón 29 mg/Kg y 26 mg/Kg vía subcutánea. Para el caso del cloruro de Tl(III) la  $dl_{50}$  se desconoce; no obstante, para el cloruro de Tl(I) se sabe que para ratón es de 24 mg/Kg vía oral y 28 mg/Kg vía intraperitoneal (ip) (Budavari *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1999).

En estudios *in vitro* se ha determinado que las sales de Tl en concentraciones de 0.05 a 100 µg/mL inducen citotoxicidad con efecto dependiente de la concentración. En líneas celulares y cultivos primarios de linfocitos humanos la concentración inhibitoria cincuenta va de 10 a 16 µg/mL (Yamamoto *et al.*, 2014; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017).

### **2.3.2 Distribución**

Este elemento se encuentra ampliamente distribuido sobre la corteza terrestre en bajas cantidades y no se considera esencial para los mamíferos. La concentración de Tl en la tierra se estima en 0.004 mg/Kg, y su abundancia en la corteza terrestre oscila entre 0.3 a 0.6 mg/Kg (Wedepohl, 1995; IPCS, 1996).

Principalmente, lo encontramos en rocas volcánicas, meteoritos, en minerales de potasio magmático como feldespatos y micas, en mayor medida en nódulos de granito, esquisto y manganeso. También se le puede encontrar en pequeñas concentraciones en algunos

minerales (de hierro, plomo y zinc) que se emplean comúnmente para la producción de ácido sulfúrico (Galván-Arzate y Santamaría, 1998).

### **2.3.3 Fuentes de exposición**

Su liberación al ambiente mediante procesos antropogénicos principalmente en industrias cementeras, eléctricas y refinerías ha llevado al aumento de los niveles de TI en varios ecosistemas afectando las cadenas tróficas. En general, la TI se obtiene durante los procesos de refinación y fundición de minerales con hierro, cadmio, plomo y zinc (Kazantzis, 1986, 2000).

Se conoce que menos de 15 t de TI son producidas anualmente en el mundo y se estima que alrededor de 2000-5000 t/año se liberan por procesos industriales (Kazantzis, 2000).

En el aire las concentraciones de TI generalmente son menores a 1 ng/m<sup>3</sup>. En agua continental aproximadamente es de 1 µg/L y aproximadamente de 10-20 ng/L en agua de mar. En el suelo las concentraciones varían de 0.1 a 1 mg/Kg. La concentración de TI en sedimentos en ríos es menor a 0.07 mg/Kg. En países y regiones como Canadá (CCME, 1999), Estados Unidos (US EPA, 2011a), México, América Latina (OPS, 2001), Inglaterra, la Unión Europea (Jørgensen *et al.*, 2008; Maycock *et al.*, 2008) y Rusia (Pohanish, 2011), la concentración máxima permisible de TI en el agua potable se basa en las pautas publicadas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (US EPA, 2009) donde el nivel máximo permitido es de 2 µg/L.

### **2.3.4 Usos**

El TI fue ampliamente utilizado con fines medicinales, en niños se usó en tratamientos contra la tiña del cuero cabelludo, además contra enfermedades venéreas, tuberculosis, malaria y sífilis (Léonard y Gerber, 1997; Kazantzis, 2000); también se ha empleado en productos para depilación. Fue utilizado como rodenticida contra ratas y ardillas, aunque fue prohibido su uso para control de plagas desde 1972 en los Estados Unidos de América y otros países (IPCS, 1996). En la actualidad se utiliza para catalizar algunas reacciones en aleaciones, en la fabricación de lentes ópticos, joyas, termómetros de baja temperatura, semiconductores, tintes, pigmentos y contadores de centelleo (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017).

El TI, al igual que el selenio (Se), se usa en la producción de gafas especiales, y en aleaciones con Pb, zinc (Zn), plata (Ag) y antimonio (Sb) para mejorar la resistencia a la

corrosión. Otros usos del Tl son en la fabricación de fuegos artificiales, pigmentos para cosméticos y para impregnar madera y cuero contra hongos (Kazantzis, 2000). Algunos isotopos radioactivos como el  $^{201}\text{Tl}$  se utilizan en pruebas médicas para obtener la imagen del miocardio y tumores (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Kim *et al.*, 2019).

El acetato de Tl(I), el carbonato de Tl(I) y cloruro de Tl(III) son clasificados altamente peligrosos, se han utilizado en fungicidas, en la fabricación de diamantes artificiales y como catalizador en cloración, respectivamente (Budavari *et al.*, 1996). Así mismo, el sulfato de Tl(I), se utiliza en la industria farmacéutica, en el tratamiento de fibras textiles y a pesar de que ya no se utiliza en rodenticidas, insecticidas o pesticidas, en la literatura se siguen reportando envenenamientos por este compuesto (Zhao *et al.*, 2008; Yumoto *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que esta sustancia u otros compuestos de Tl todavía se están produciendo y usando de forma clandestina. En humanos la exposición a dosis de 3.4 mg/Kg de peso corporal produce efectos adversos para la salud y 6 mg/Kg pueden ser letales (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

### **2.3.5 Exposición y sintomatología**

La exposición a Tl puede ser natural u ocupacional; por ejemplo, en plantas cementeras, eléctricas e industrias de vidrio, también la exposición se da de forma accidental o por envenenamiento. Se han reportado casos de intoxicación con Tl por envenenamiento crónico y agudo. Debido a sus características fisicoquímicas, y sus similitudes a otros cationes metálicos esenciales como el  $\text{K}^+$ , el Tl(I) se absorbe rápidamente y cruza fácilmente las membranas biológicas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Las principales vías de intoxicación por Tl se dan por ingestión, inhalación o contacto con la piel (**Figura 1**) (Rangel-Guerra *et al.*, 1980; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). Los casos de intoxicación humana que se han reportado generalmente son por vía oral, ya sean accidentales, suicidas u ocupacionales, con esto se ha podido establecer que la sangre, la orina y el pelo son buenos biomarcadores para detectar si hubo una exposición a compuestos con este metal (US EPA, 2009).

Algunos síntomas provocados por la exposición ocupacional a polvos o vapores que contienen Tl son: náuseas, dolor abdominal y pérdida de apetito seguido de pérdida de pelo y la aparición de las líneas de Mees (líneas blancas en las uñas), en la neurotoxicidad se presentan temblores en manos, entumecimiento en pies, depresión y alteraciones en el comportamiento, daño al nervio óptico que conduce a la discapacidad

visual, asimismo se han observado taquicardia, arritmias y dificultades respiratorias que a menudo culminan en la muerte (Lu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008).

La intoxicación por compuestos de TI interfiere con otros aspectos de la salud que incluye la fertilidad en mujeres y hombres expuestos en un ambiente ocupacional, por ejemplo, el TI se distribuye por todo el cuerpo mediante la circulación sistémica, además se sabe que puede cruzar la barrera encefálica, gonadal y placentaria (Ziskoven *et al.*, 1983). Lo anterior puede explicar los reportes de aumentos en las tasas de letalidad embrionaria y malformaciones congénitas en la descendencia de personas que habitan en áreas cercanas a las plantas de cemento (Xia *et al.*, 2016). Sin embargo, lo anterior no está del todo comprendido y aun no se conoce el mecanismo por el cual induce toxicidad.

La vida media de eliminación es variable, depende de la naturaleza de la exposición (aguda o crónica) y de la dosis. En personas envenenadas, el tiempo de excreción, principalmente en la orina, va de 2 a 95 días después de la ingestión. En los seres humanos se ha detectado en el cabello, uñas, sudor, saliva, lágrimas y la leche materna. Debido a esto, el TI tiende a acumularse en diferentes tejidos entre ellos el riñón, hígado, cerebro (hipófisis), testículos, músculo, estómago, corazón, huesos, pulmones, bazo, tiroides y la piel del cuero cabelludo (Galván-Arzate y Ríos, 1994; Galván-Arzate *et al.*, 2005).

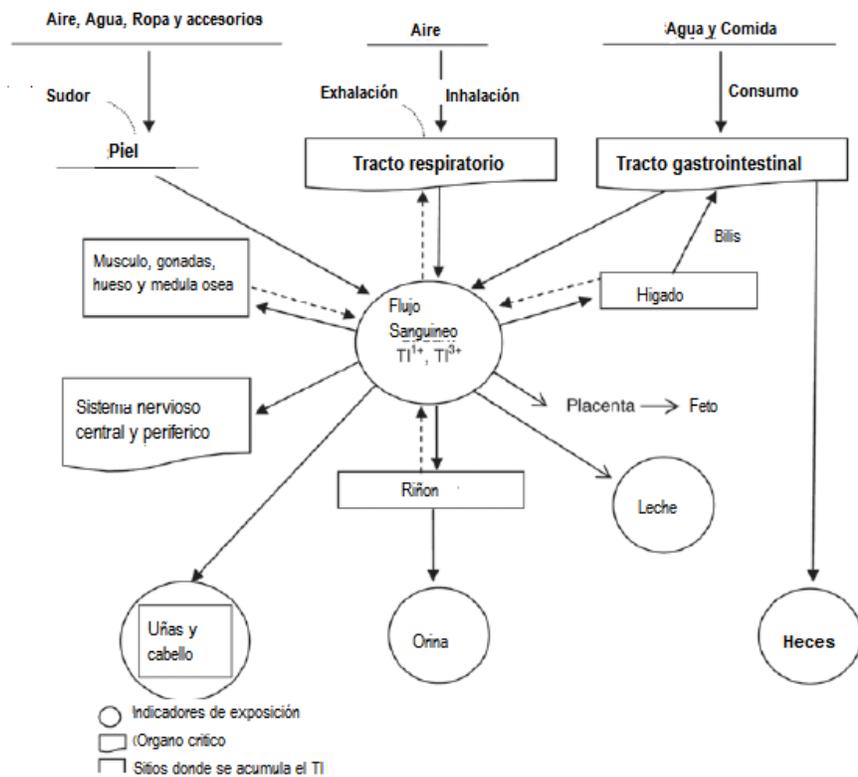
El TI es altamente tóxico, independientemente de la ruta de exposición es considerado uno de los metales más dañinos para los mamíferos, su toxicidad es comparable a diferentes elementos, Cd, Hg o Pb, aunque los datos epidemiológicos actuales sobre los efectos de TI en humanos son insuficientes (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Por otro lado, se ha encontrado que los compuestos de TI son capaces de interactuar con el material genético, a nivel cromosómico y de ADN. En particular, en pruebas bioquímicas se ha detectado que presentan una fuerte afinidad por las bases nitrogenadas, pero se desconoce si este evento puede ser el causante del daño directamente al ADN (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2015).

### **2.3.6 Mecanismos de toxicidad del TI**

Se han propuesto varios mecanismos y modos de acción para explicar la alta toxicidad de TI y sus compuestos. Los modelos experimentales en mamífero tanto *in vitro* como *in vivo*,

sugieren que la toxicidad es desencadenada por la lipoperoxidación y por la interferencia con el sistema de defensa antioxidante de la célula. Mismos efectos que induce en células vegetales. Su toxicidad también puede deberse a sus propiedades químicas, que son similares a las del ion  $K^+$  tal como radio iónico 133 pm y radio atómico de 235 pm. El TI puede modificar la actividad de las ATPasas de  $Na^+/K^+$ , piruvato quinasa, fructosa-1-6-bisfosfatasa y otras proteínas que dependen de iones metálicos. Dicho reemplazo permite que TI se mueva a través del sistema de membrana y se acumule en la célula (Léonard y Gerber, 1997; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).



**Figura 1.** Biocinética de TI. En humanos, mamíferos y otros animales. Modificado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013.

El TI puede despolarizar la membrana, interfiriendo con moléculas de la cadena respiratoria en las mitocondrias liberando calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) (Spencer *et al.*, 1973). Estas acciones conducen finalmente al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en

diferentes tipos de células (Repetto *et al.*, 1994). Una vez dentro de la célula, el TI puede interferir con la estabilidad del ribosoma y la síntesis de proteínas. Otros mecanismos de la toxicidad de TI incluyen la interferencia con los sitios activos de varias enzimas de la interacción con grupos amino-sulfhídrico (-SH) (Mulkey y Oehme, 1993; Léonard y Gerber, 1997).

## **2.4 Modelo de estudio**

Los cultivos celulares han jugado un papel fundamental en los avances recientes de la toxicología. Las células pueden aislarse y mantenerse en un estado viable durante el tiempo suficiente para realizar distintos tipos de experimentos.

Las células de sangre periférica se han utilizado como sustrato para evaluar los efectos de la exposición a agentes tóxicos; por ejemplo, el análisis de daño al ADN, aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, para conocer efectos clastógenos o aneuploidógenos, respectivamente, o bien, pruebas de viabilidad, muerte celular, citostaticidad y cinética de ciclo celular, para conocer efectos citotóxicos, por mencionar algunos (Albertini *et al.*, 2000, Prieto y Llópiz, 1999).

Las pruebas de genotoxicidad evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en lapsos de tiempo relativamente cortos. Estas pruebas a corto plazo resultan de gran utilidad ya que permiten detectar daño primario a la estructura del ADN, mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, transformaciones celulares u otras afectaciones (Arencibia y Rosario, 2003).

Las células humanas expuestas *in vitro* junto con los efectos descritos en animales de experimentación juegan un papel importante en la extrapolación de los efectos tóxicos hacia los humanos. Los cultivos de células humanas u otros mamíferos se utilizan en muchos de los métodos celulares y moleculares (Hodgson *et al.*, 2004). De los métodos más empleados se encuentran las pruebas de viabilidad y de daño al ADN.

## **2.5 Citotoxicidad**

La toxicidad celular indica procesos complejos que abarca desde la alteración y el mal funcionamiento de una población celular hasta la muerte de la célula (Pooga *et al.*, 2002),

de manera general este concepto se aplica cuando la célula es afectada por un agente sea químico, físico o biológico, y puede ser evaluada con ensayos de citotoxicidad.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* pueden dar una idea de lo que sucede sobre los tejidos, órganos, sistemas y hasta un organismo completo. Se aplican para conocer los efectos tóxicos de nuevos químicos, medicamentos, anticuerpos, contaminantes ambientales, metales y compuestos metálicos, en donde la evaluación de la proliferación, la viabilidad y la muerte celular son de los parámetros más empleados (Boyd *et al.*, 2008). Las pruebas *in vitro* se pueden llevar a cabo en diferentes modelos de prueba como bacterias, levaduras, vegetales, líneas celulares y células de tejidos u órganos; permitiendo analizar el comportamiento de las células en un ambiente más controlado.

### **2.5.1 Técnicas de citotoxicidad**

El uso de diferentes marcadores fluorescentes es de las técnicas comúnmente usadas para evaluar la viabilidad celular; estas se basan en el uso de una tinción con colorantes fluorescentes o con la combinación de más de uno, estos difieren en su permeabilidad a la membrana celular, lo que permite la evaluación de la integridad de la membrana y la actividad enzimática intracelular (Boyd *et al.*, 2008). Algunas de las pruebas más utilizadas debido a su facilidad, bajo costo y rapidez son las evaluaciones con la solución dual con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y bromuro de etidio (BE) o con naranja de acridina (NA) y BE. La visualización de diferentes tipos de células con estos colorantes provee una amplia variedad de información acerca de la actividad de la célula y su estructura. Un ejemplo de sustratos fluorescentes es el uso de la tinción dual de CFDA/BE.

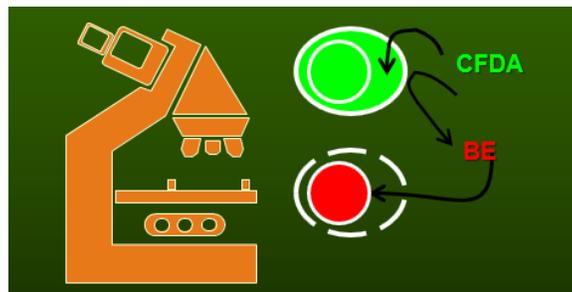
### **2.5.2 CFDA/BE**

El CFDA es un sustrato fluorescente esterificado que se ha utilizado para evaluar la viabilidad de varios tipos de células. El diacetato (DA) es hidrofóbico y permite que el compuesto se difunda a través de las membranas de la superficie celular hacia el citoplasma y se hidroliza mediante esterasas no específicas intracelulares. La carboxifluoresceína fluorescente (CF) al ser una molécula hidrófila y tener carga negativa permanece dentro de la célula, así, la célula con membrana intacta y actividad de esterasa intracelular muestra una alta retención de CF y de la tonalidad fluorescente (**Figura 2**). Por otro lado, el BE solo es absorbido cuando las células tienen daño en la

membrana, las cuales tiñen de rojo el ADN nuclear (Tice y Vázquez, 1999; Morono *et al.*, 2004).

### 2.5.3 NA/BE

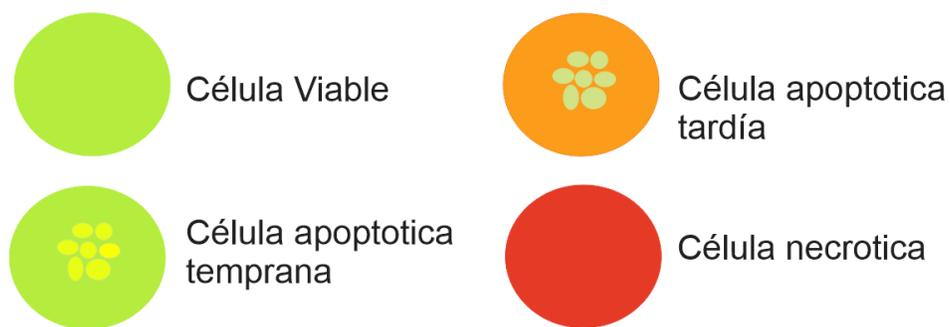
La muerte celular, por apoptosis o necrosis, es otro de los parámetros utilizados para evaluar la citotoxicidad de algunos agentes químicos. Existen pruebas simples que nos permiten diferenciar la viabilidad celular de las células que mueren por apoptosis o por necrosis (McGahon *et al.*, 1995). Las células apoptóticas son morfológicamente distintas y fácilmente distinguibles en una población celular. La cuantificación de la viabilidad celular y el índice de muerte utilizando fluorocromos como NA/BE nos permite diferenciar células viables de aquellas que mueren por apoptosis o necrosis basándose en la morfología y la integridad de la membrana (García-Rodríguez *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Esquema de célula viable (verde) y célula no viable (roja).

La determinación de la viabilidad celular y el índice apoptótico mediante NA/BE permite cuantificar la proporción de células viables y no viables, y de estas últimas las que se encuentran en apoptosis (temprana o tardía según la integridad de la membrana) o necrosis. El NA es permeable a la membrana se intercala en el ADN, dándole un aspecto verde (**Figura 3**), este colorante también se une al ARN dando un aspecto rojo-naranja sin embargo el color verde sobresale, así una célula viable fluoresce en verde brillante.

Las células apoptóticas tempranas cuyas membranas aún están intactas, pero con su ADN nuclear fragmentado y por tanto su cromatina condensada la cual se observa como parches de color verde brillante, mientras que las células en apoptosis tardía tendrán daño en membrana y el BE teñirá la cromatina condensada de núcleos de color naranja. Es decir, las células apoptóticas tardías tendrán áreas de color naranja brillante de cromatina condensada en el núcleo que las distinguirán fácilmente de las células necróticas, las cuales tienen de color naranja-rojizo uniforme (McGahon *et al.*, 1995).



**Figura 3.** Esquema de categorías morfológicas de las células con la prueba de NA/BE.

## 2.6 Genotoxicidad

La genotoxicidad es el resultado de una reacción de agentes químicos con el material genético que puede medirse bioquímicamente con ensayos que reflejan daño al ADN, los agentes considerados genotóxicos alteran la estructura del material genético, incluidos aquellos que interfieren en el proceso normal de la replicación (Nielsen, 2008).

### 2.6.1 Pruebas de genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad están diseñadas para detectar compuestos que provocan alteraciones genéticas de forma directa o indirecta en las células que están expuestas a sustancias tóxicas. Los estudios de genotoxicidad se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*.

Los ensayos más utilizados para determinar genotoxicidad son las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, intercambio de cromátidas hermanas,

micronúcleos, aductos de daños en el ADN, así como daños al ADN detectados con electroforesis unicelular en gel (EUG) entre otras (Albertini *et al.*, 2000; Nielsen, 2008).

### **2.6.2 La electroforesis unicelular en gel (EUG)**

La EUG, llamada comúnmente “ensayo cometa”, es un método microscópico fluorescente rápido y muy sensible, que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual, este ensayo tiene importantes aplicaciones en el campo de la genotoxicidad. Su fundamento se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH  $\geq$  a 13 y su comportamiento en una electroforesis. Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa” (**Figura 4**), donde existe una relación del ADN que migra con el daño ocasionado al ADN.

En este ensayo, las células suspendidas en agarosa se colocan en capas en portaobjetos, las células se lisan con detergentes y alto contenido de sal, y el ADN liberado se separa por medio de electroforesis en condiciones de pH alcalino. El ADN de las células con daño migra hacia el ánodo, el cual se visualiza al microscopio de fluorescencia después de teñir con un colorante adecuado.

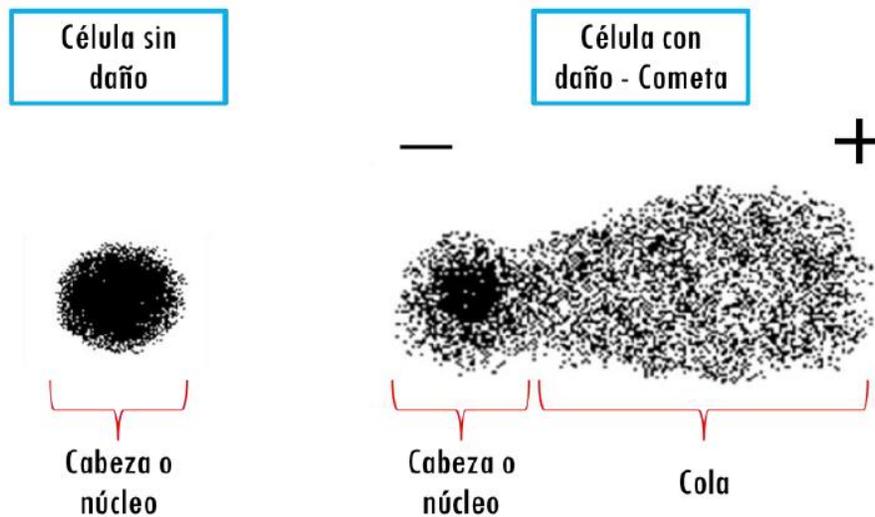
En condiciones electroforéticas de pH 9 (neutras) la migración del ADN se incrementa por roturas de doble cadena (RCD), en tanto que bajo condiciones electroforéticas de pH 12.1 o mayores, la migración del ADN se incrementa preferentemente por roturas de la cadena (tanto simple como doble) y a un pH  $\geq$  a 13 además se revelan en forma de rupturas los sitios sensibles al álcali (sitios básicos, conocidos como sitios AP) (Tice y Vázquez 2000; Villaverde *et al.*, 2004; Hanzel *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2007).

Dentro de las ventajas de utilizar la EUG se encuentra:

- La colecta de datos es a nivel de célula.
- Los datos se pueden procesar por análisis estadístico más robustos.
- Se requiere un pequeño número de células por muestra (<10,000).
- Es sensible para la detección de daño en el ADN.
- Prácticamente cualquier población celular eucariota es susceptible de este análisis (Tice y Vázquez 2000, Albertini *et al* 2000).

### 2.6.3 Versión acelular de EUG

La versión acelular, es una modificación de la metodología de EUG (EUG acelular). Resulta de gran interés en los estudios de toxicología genética, debido a que se puede conocer si el nivel de daño que causa el agente químico a probar lo hace de manera directa o indirecta. En esta variante, las células sin tratamiento se preparan como se describe en la EUG y se sumergen en solución de lisis, posteriormente se pasan a una lisis II suplementada con proteinasa K. De esta manera se obtiene el ADN nuclear embebido en el agar, una vez lisadas las células, se aplican los tratamientos con los agentes químicos a probar, es decir, se realiza el tratamiento directamente sobre el ADN desnudo de las células. De esta manera si se observa aumento en la migración del ADN (bajo las condiciones de electroforesis a pH <13), se estaría indicando que el compuesto es capaz de inducir daño directo al material genético donde, el daño resultante se produce de manera independiente de la citotoxicidad y de la protección que puedan ejercer las membranas celular y nuclear (Gichner, 2003; Landeros, 2012).



**Figura 4.** Esquema de ADN nuclear de una célula sin daño y otra con daño.

## 2.7 Cito y genotoxicidad del TI

La información del efecto mutagénico y genotóxico del TI y sus compuestos es escasa; en la literatura los resultados con bacterias y plantas no son concluyentes (Kanematsu *et al.*, 1980; Kada *et al.*, 1989; Babić *et al.*, 2009; Radić *et al.*, 2009).

En evaluaciones citogenéticas con pruebas como aberraciones cromosómicas estructurales, micronúcleos e intercambios de cromátidas hermanas, utilizando células de medula ósea de hámster Chino, así como líneas celulares del ratón y células de humano y los datos también son contradictorios y por lo tanto no concluyentes (IPCS, 1996; Migliore *et al.*, 1999; Fischer y Eikman, 2002), no obstante, en humano la exposición accidental o intencional a venenos de TI da indicios de riesgo genotóxico.

Hantson *et al.* (1997) en linfocitos de un paciente varón de 48 años que ingirió 200 mg de veneno de sulfato de TI(I), encontraron elevada frecuencia de micronúcleos. Por su parte Nikiforov *et al.*, (1999) encontraron alteraciones cromosómicas, principalmente aberraciones tipo cromatídico, en los linfocitos de sangre periférica de 13 personas expuestas accidentalmente a venenos con TI, pero no hallaron cambios en la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas.

Los efectos por exposición a dosis terapéuticas también han sido descritos, aunque estos son limitados. Por ejemplo, se tiene el reporte con el isótopo de <sup>201</sup>Tl aplicado en pacientes con problemas cardíacos o con angina de pecho en los cuales no se observó inducción de mutagenicidad, pero si encontraron inducción de daño cromosómico y cambios en la cinética de división celular al día tres posteriores al tratamiento (Bachand *et al.*, 1991; Kelsey *et al.*, 1991; Yildirim *et al.*, 2005).

En estudios realizados en el laboratorio, se encontró que el acetato de TI(I), sulfato de TI(I) y cloruro de TI(III), aplicado en cultivo de linfocitos humanos en concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL incrementan las aberraciones cromosómicas estructurales, bloquean la proliferación e inducen acentuados efectos citotóxicos, además encontraron que el acetato de TI(I) induce rupturas sobre la cadena de ADN, rupturas inducidas principalmente por lesiones conocidas como sitios básicos (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2015, 2017).

## **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad la exposición al TI ha incrementado debido a la intensa actividad antropogénica, que van desde la quema de combustibles fósiles hasta la exposición al humo del tabaco. Se sabe que, al contacto con el organismo, el TI puede cruzar barreras biológicas e interferir en procesos celulares gracias a su similitud con algunos metales esenciales. El TI y sus compuestos son elevadamente tóxicos para los seres vivos y los modelos *in vitro* son una excelente alternativa para indagar en los efectos dañinos que sea capaz de inducir a nivel celular y sobre todo a nivel genético. Por lo anterior, en este estudio se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿La magnitud del daño al ADN ocasionado por TI dependen su estado de oxidación y del tiempo de exposición?, ¿el TI induce daño directamente sobre la molécula de ADN?

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que el TI es permeable a las membranas biológicas, llega al núcleo e induce daño al ADN; sin embargo, no se tiene conocimiento de si el tiempo de exposición y el estado de oxidación influyen en la magnitud del daño, y si este efecto puede ser inducido de manera directa. Por lo tanto, si exponemos leucocitos humanos de sangre periférica a TI(I) o TI(III) durante diferentes tiempos, podemos comparar la toxicidad celular y genética del metal, así como conocer si la inducción del daño a la cadena de ADN es directa o indirecta.

## **OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Evaluar la toxicidad celular y sobre el ADN, en leucocitos humanos tratados *in vitro* con sulfato de TI(I) o cloruro de TI(III), empleando pruebas de viabilidad y muerte celular, así como la metodología de electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas y en la versión acelular.

### **6.2 Particulares**

Evaluar la toxicidad celular a las 2, 4 o 6 h después de la exposición a diferentes concentraciones (0.5, 1, 5, 50 y 100 µg/mL) de las sales de TI empleando la prueba de CFDA/BE o NA/BE.

Evaluar el daño al ADN de las células expuestas durante 2, 4 y 6 h a diferentes concentraciones de las sales de TI empleando la metodología de electroforesis unicelular en gel a pH >13.

Evaluar la capacidad de las sales de TI de inducir daño directo al ADN con la versión acelular de la electroforesis en gel.

## MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1 Obtención de la muestra

Se seleccionaron dos donadores no fumadores, sin antecedentes de tratamiento médico o exposición a algún agente genotóxico. Se extrajeron 3 mL de sangre periférica de cada donador por venopunción con una jeringa previamente heparinizada. A cada muestra de cada donador se le aplicaron las 4 pruebas (dos de viabilidad y dos pruebas de genotoxicidad).

### 7.2 Tratamientos

Se aplicaron tratamientos de dos sales de Tl: sulfato de Tl(I) o cloruro de Tl(III) ( $Tl_2SO_4$  y  $TlCl_3$ , respectivamente). Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1, 5, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Los tiempos de exposición fueron 2, 4, y 6 h. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado y se dividieron en grupos diferentes, los cultivos se hicieron en tubos eppendorf (dos por cada concentración y tiempo de exposición), los cuales contenían la sangre entera, medio de cultivo RPMI-1640 y la concentración del compuesto. Siempre se contó con un grupo sin tratamiento (testigo). La distribución de las pruebas se realizó de acuerdo con el **Cuadro I**.

**Cuadro I. Tratamientos con los compuestos de Tl.**

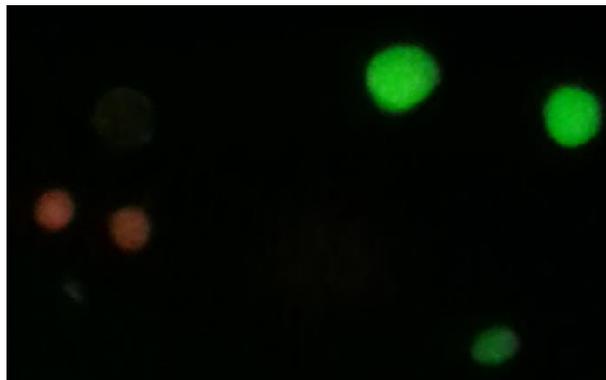
<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Tiempos de exposición en horas</b>	2, 4, y 6	2, 4, y 6	2, 4, y 6	2, 4, y 6	2, 4, y 6	2, 4, y 6
<b>Tratamientos en <math>\mu\text{g/mL}</math></b>						
<b>Sulfato de Tl(I)</b>	0 (testigo)	0.5	1	5	50	100
<b>Cloruro de Tl(III)</b>	0 (testigo)	0.5	1	5	50	100

### 7.3 Evaluación de viabilidad con CFDA/BE

A las 2, 4 y 6 h después de haber aplicado el tratamiento con Tl se tomó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  del cultivo en un tubo Eppendorf, y se mezcló con 20  $\mu\text{L}$  del colorante dual CFDA (concentración de 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y BE (concentración de 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Tice y Vázquez, 1999), se incubaron por 15 min a 37 °C en total oscuridad, pasado este tiempo se hicieron

dos lavados con 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 y se centrifugó a 4000 rpm durante 4 min para eliminar el excedente de colorante. Para la preparación de laminillas se agregaron 10  $\mu$ L de muestra en portaobjetos y se colocó un cubreobjetos.

El análisis se realizó al microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 (con filtro de excitación de 515-560 nm) en oscuridad, cuantificando al azar un total de 100 células por tratamiento y tiempo, tomando en cuenta las células viables (que tiñen de verde) y células no viables (que tiñen de rojo) (Tice y Vásquez, 1999).



**Figura 5.** Viabilidad celular por medio de la tinción dual de CFDA/BE, en verde se muestra una célula viable y en rojo una célula no viable.

#### **7.4 Evaluación de apoptosis y necrosis con NA/BE.**

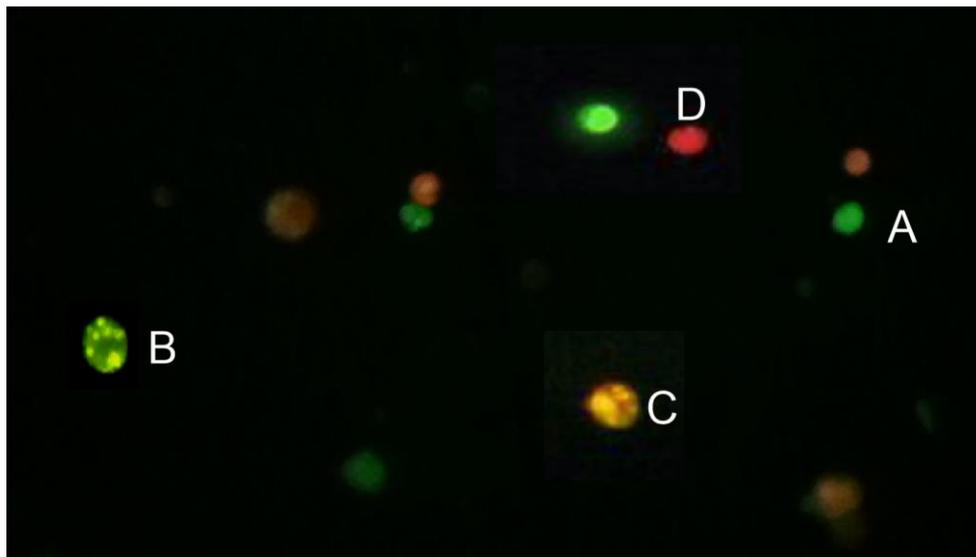
Para la prueba de viabilidad con NA/BE se siguió el procedimiento propuesto por McGahon en 1995. Se preparó una solución dual de NA (100  $\mu$ g/mL) y BE (100  $\mu$ g/mL) en PBS. A las 6 h de haber aplicado el compuesto de TI, se tomó una muestra de 25  $\mu$ L de cada cultivo, la cual se tiñó con 1  $\mu$ L de la solución dual.

La evaluación se realizó al microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2, con filtro de excitación de 515-560 nm). Para el análisis se cuantificaron 200 células, clasificando las células en cuatro categorías:

- a) Células viables: células que presenten íntegra su membrana y una coloración verde uniforme.

- b) Células con apoptosis temprana: células de color verde con fragmentos de cromatina de color verde intenso.
- c) Células con apoptosis tardía: células que tienen un color rojo con fragmentos de cromatina en color rojo intenso.
- d) Células necróticas: las cuales mostrarán una coloración roja uniforme (Figura 6).

Con los datos obtenidos se realizó el porcentaje de células que sufrieron muerte celular y se calculó el índice de muerte de acuerdo con la siguiente fórmula: índice de muerte celular = ((Células en apoptosis temprana + células en apoptosis tardía + células en necrosis) / Total de células analizadas) x 100.



**Figura 6.** Tinción dual de NA/BE. En A se aprecia célula viable, B célula apoptótica temprana, C apoptótica tardía y D célula necrótica.

### 7.5 Análisis de daño al ADN por EUG

Para la EUG se elaboraron laminillas resuspendiendo 30  $\mu$ L del cultivo celular en 150  $\mu$ L de agarosa a bajo punto de fusión al 0.5%, extendiendo esta mezcla inmediatamente en dos laminillas previamente preparadas con una capa de agarosa a punto de fusión normal, se colocaron cubreobjetos y se dejaron en cama fría (4 °C) durante 10 min.

Pasando el tiempo, se aplicó una tercer capa de agarosa de bajo punto de fusión (85  $\mu$ L) y nuevamente se dejó en cama fría, posteriormente se retiró el cubreobjetos y las laminillas se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10, con Tritón X-100 al 1 % y DMSO al 10 %) por 24 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo de lisis, las preparaciones se pasaron a la cámara de electroforesis horizontal, donde se dejó desenrollar el ADN durante 20 min en la solución de corrimiento (NaOH 300 mM y EDTA 1Mm; a pH >13), posteriormente se conectó la fuente de poder y la electroforesis se dejó 20 min a 25 V y 300 mA. Finalizado el corrimiento, las laminillas se lavaron en dos ocasiones con solución neutralizante (Tris 0.4 Mm, a pH 7.5) para después deshidratarlas con etanol al 100%. Los pasos anteriores se llevaron a cabo con luz amarilla (Tice y Vásquez, 1999).

Para el análisis del daño al ADN, en total se cuantificaron 200 células por tratamiento. Las laminillas se tiñeron con BE (concentración 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ L) y con ayuda de una reglilla adaptada al ocular del microscopio de fluorescencia, a 400 aumentos, se midió la cabeza del cometa y la longitud total del cometa; mediante la diferencia de la longitud total menos la cabeza se obtuvo el valor de la cola del cometa (migración del ADN).

## **7.6 Análisis de daño al ADN con la versión acelular de la EUG**

Para la versión acelular se siguió la metodología propuesta por Valverde *et al.*, (2001). Brevemente, las laminillas se prepararon tomando 20  $\mu$ L de la muestra de leucocitos directamente de cultivos sin tratamiento, estos se resuspendieron en 150  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión y se extendieron en una capa homogénea en dos laminillas esmeriladas previamente preparadas con una capa de agarosa a punto de fusión normal, se colocaron cubreobjetos y se dejaron en cama fría (4 °C) durante 5 min. Las laminillas se sumergieron en solución de lisis 1 (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, con Tritón X-100 al 1 % y DMSO al 10 % a pH 7) por 1 h a 4 °C en total oscuridad. Posteriormente se pasaron a una solución de lisis 2 (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 7) por 1 h a 37 °C, esta lisis contenía proteinasa K en una concentración final de 0.02 mg/mL. Al término de este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 min con PBS (pH 7.4).

Para el tratamiento con las sales de TI, las laminillas se sumergieron en 50 mL de PBS (pH 7.4) que contenía las concentraciones de 0.5 y 50  $\mu$ g/mL de sulfato de TI(I) o cloruro de TI(III) por 10 min, que se considera que es tiempo suficiente para que el ADN embebido en la agarosa interactúe con las sales de TI. Al finalizar el tratamiento se

hicieron dos lavados con PBS e inmediatamente se pasaron a la caja de electroforesis horizontal y se dejó desenrollar por 10 min en el buffer de corrimiento (300 mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA a pH >13), para después hacer pasar la corriente eléctrica durante 10 min a 0.8 V/cm. Al terminar el tiempo de corrimiento, se hicieron dos lavados con solución neutralizante a temperatura ambiente por 15 min, las preparaciones se deshidrataron con etanol y se dejaron secar al aire.

Al igual que para el análisis de la EUG alcalina se cuantificaron 200 células por tratamiento y con ayuda de una reglilla adaptada al ocular del microscopio de fluorescencia, a 400 aumentos, se midió la cabeza del cometa y la longitud total de la migración del ADN; mediante la diferencia de la longitud total menos la cabeza se obtuvo el valor de la cola del cometa.

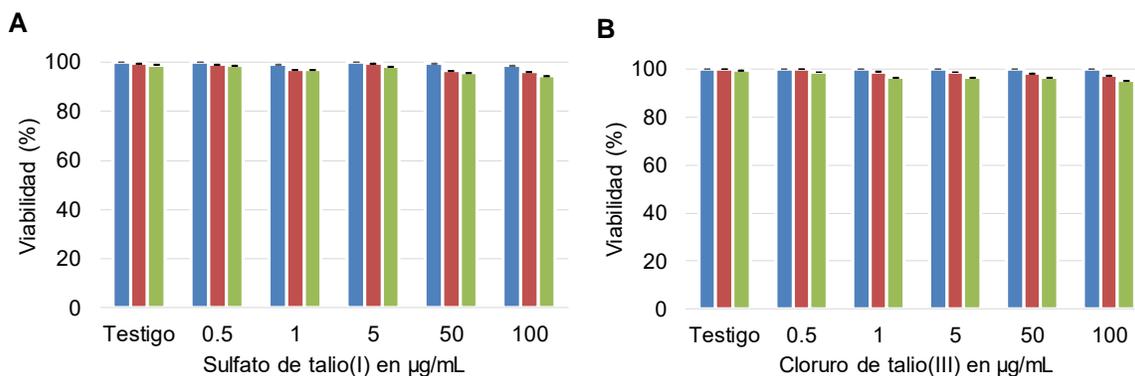
### **7.7 Análisis estadístico**

Se hicieron 4 experimentos cada uno por duplicado. Los datos se representan con la media  $\pm$  error estándar. Para valorar las diferencias estadísticas de viabilidad y daño al ADN se empleó la prueba de ANOVA seguida de Tukey y para la evaluación de apoptosis e índice de muerte se elaboró una prueba de *Ji-cuadrada*.

## RESULTADOS

### 8.1 Viabilidad

Los resultados obtenidos de los tratamientos con sulfato de TI(I) o cloruro de TI(III) con la prueba de CFDA/BE se muestran en la **Figura 7**, donde la viabilidad después de 2, 4 o 6 h de exposición fue mayor del 95 %, tanto en los tratamientos con TI(I) (Figura 7A) como los del TI(III) (Figura 7B) (también anexo A). En todos los casos se contó con un testigo sin tratamiento, donde la viabilidad osciló entre 99.5 a 100 %, y también un testigo positivo tratado con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , 150  $\mu$ M) en la cual la viabilidad disminuyó estadísticamente ( $P < 0.01$ ) cuando las células fueron expuestas durante 15 min, con valores de 90 % (los datos del testigo positivo se muestran en el Anexo A).

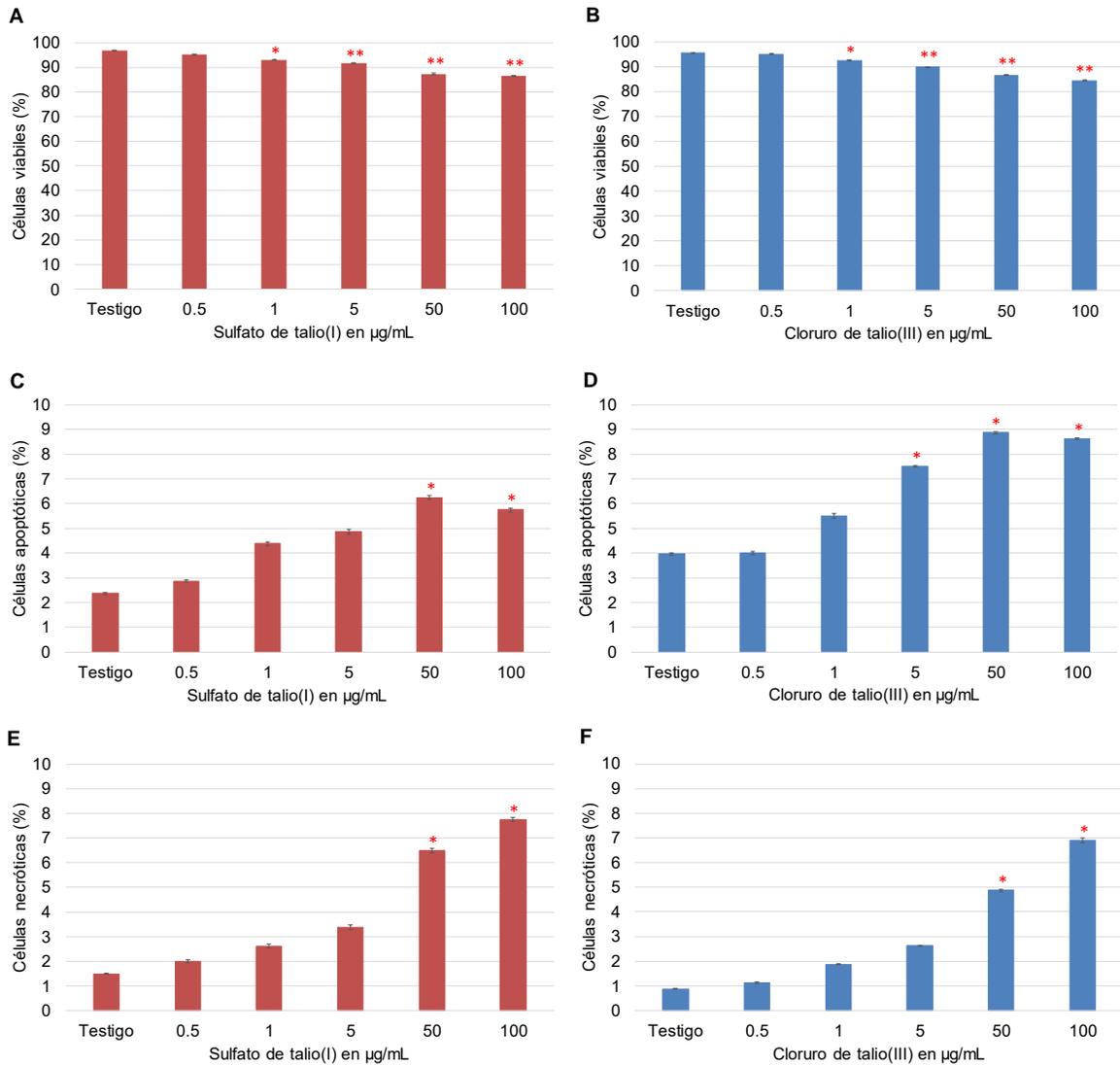


**Figura 7.** Viabilidad de leucocitos humanos tratados con sulfato de TI(I) (A) o cloruro de TI(III) (B) utilizando la técnica de CFDA/BE. Las evaluaciones se realizaron a las 2 (azul), 4 (rojo) y 6 (verde) h de exposición. En ambos casos se contó con un testigo sin tratamiento.

#### 8.1.1 Muerte celular por apoptosis y necrosis

Esta prueba se evaluó a las 6 h después de exposición con los compuestos de TI (**Figura 8.**) y la prueba de NA/BE. En la Figura 8A y 8B se puede observar que tanto el sulfato de TI(I) como el cloruro de TI(III) disminuyen significativamente la viabilidad celular en las concentraciones de 1, 5, 50 y 100  $\mu$ g/mL. Las células en apoptosis (apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías) se reportan en la Figura 8C y 8D, respectivamente (y en anexo B). En el caso del el sulfato de TI(I), se observó aumento de células en apoptosis

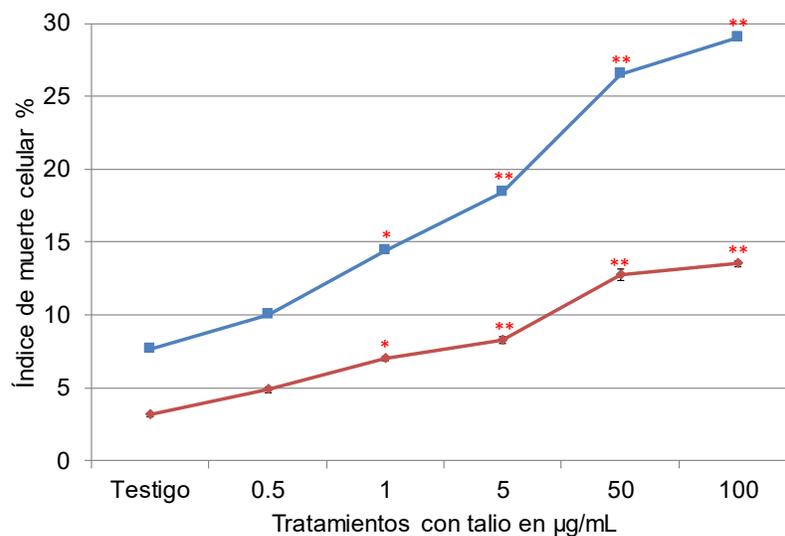
en las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , en tanto que para el cloruro de Tl(III) las diferencias estadísticas se dan desde la concentración de 5 y hasta 100  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 8.** Viabilidad y muerte celular por apoptosis o necrosis de leucocitos humanos tratados con sulfato de Tl(I) (A, C y E) o cloruro de Tl(III) (B, D y F) utilizando la técnica de NA/BE. Las evaluaciones se realizaron a las 6 h después de la exposición al talio. En ambos casos se contó con un testigo sin tratamiento. Las diferencias estadísticas se dan con \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$  comparado con su testigo; prueba de *Ji-cuadrada*.

En relación con los datos de muerte por necrosis el TI(I) y TI(III) incrementan este parámetro con una tendencia dependiente de la concentración, los datos se muestran en la Figura 8E y 8F; sin embargo, las diferencias significativas se dan en las concentraciones de 50 y 100 µg/mL para ambos compuestos.

En la **Figura 9.** se encuentra representado el índice de muerte, el cual toma en cuenta la suma de células apoptóticas tempranas y tardías, así como las células necróticas. En esta figura se puede observar el aumento de muerte celular la cual sigue un comportamiento dependiente de la concentración para los dos compuestos de TI, donde las diferencias estadísticas se aprecian a partir de la concentración de 1 µg/mL.



**Figura 9.** Índice de muerte de linfocitos humanos tratados con sulfato de TI(I) en rojo o cloruro de TI(III) en azul, utilizado la técnica de NA/BE. Las evaluaciones se realizaron a las 6 h después de la exposición a talio. En ambos casos se contó con un testigo sin tratamiento. Las diferencias estadísticas se dan con \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$  comparado con su testigo; prueba de *Ji-cuadrada*.

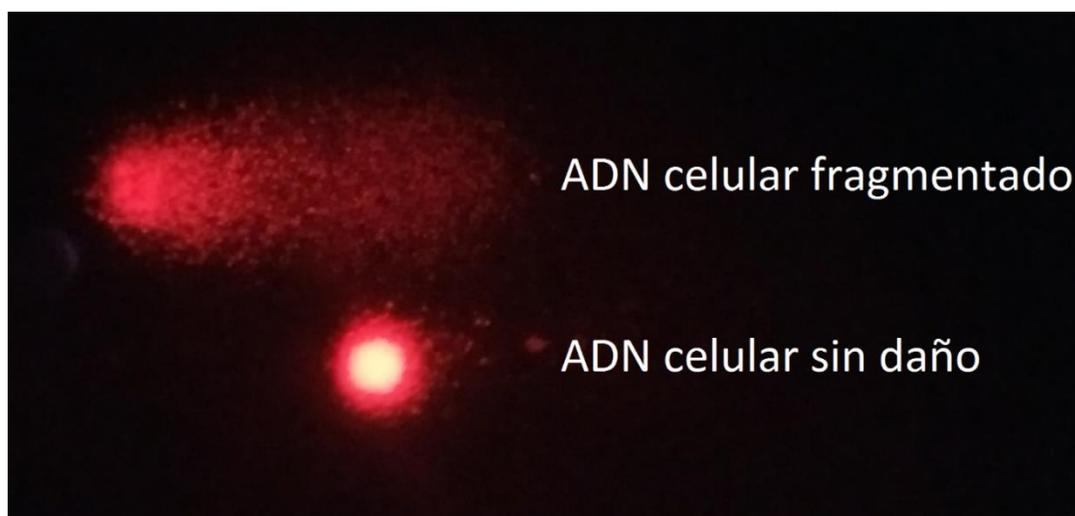
### 8.2.1 Daño al ADN

Para la electroforesis unicelular en gel, después de cada tratamiento, se prepararon las laminillas y el análisis se hizo al microscopio de fluorescencia. Con ayuda de una reglilla adaptada al ocular se midieron en total de 200 células por tratamiento y hora de

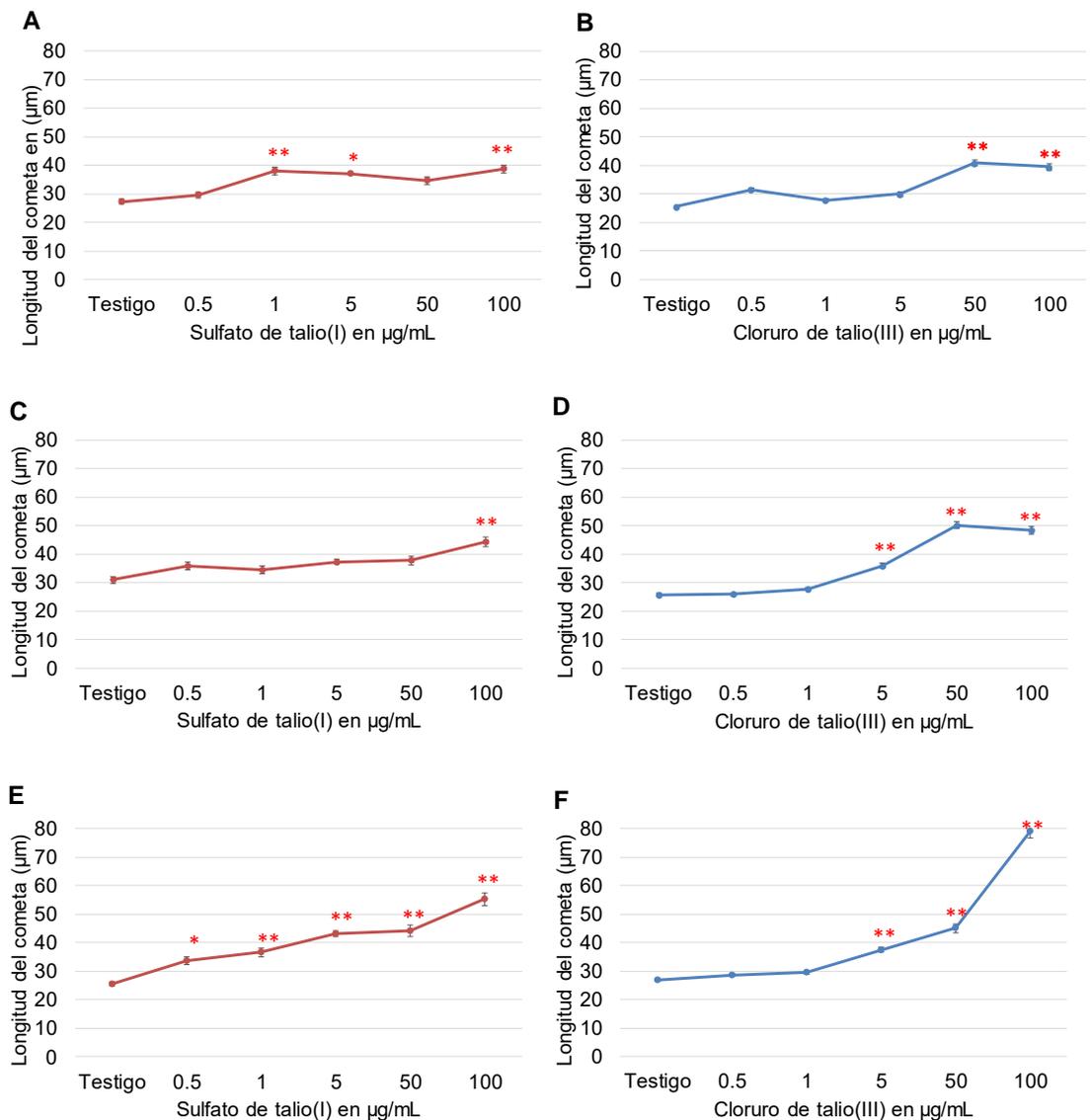
exposición, diferenciando entre células sin daño y células con daño como se muestra en la **Figura 10**.

En la **Figura 11**, se muestran los datos de la migración del ADN de leucocitos humanos tratados con sulfato de Tl(I) (11A, 11C y 11E) o con cloruro de Tl(III) (11B, 11D y 11F) a los tiempos de 2, 4 y 6 h después de la exposición, y donde los tratamientos con los dos compuestos de Tl incrementan la migración en algunas concentraciones y tiempos de exposición.

Con Tl(I), las diferencias estadísticas se observan en las concentraciones de 1, 5 y 100  $\mu\text{g/mL}$  para 2 h y solo en 100  $\mu\text{g/mL}$  para 4 h. En tanto, para el tiempo de 6 h encontramos diferencias estadísticas en todas las concentraciones, siguiendo además un efecto dependiente de la concentración. Por otro lado, a pesar de que el Tl(III) incrementa la longitud total de la cola con una tendencia dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, las diferencias estadísticas se dan en las concentraciones más altas en 2 h y a partir de 5 y hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  en 4 y 6 h de exposición.



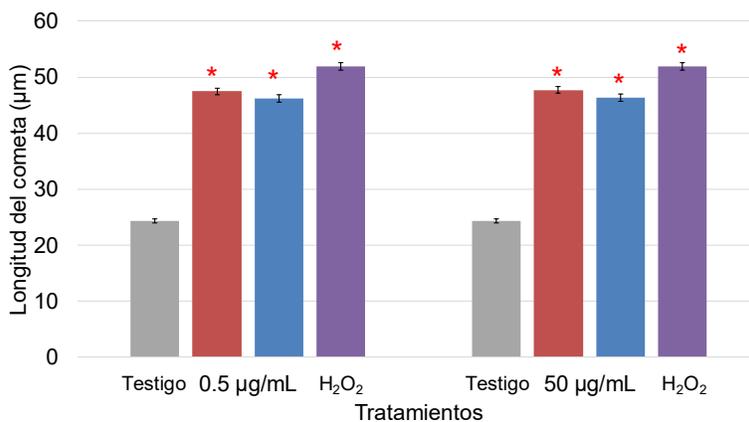
**Figura 10.** Imagen de ADN celular con daño (arriba) y sin daño (abajo) teñido con BE.



**Figura 11.** Longitud total de cometa (en µm) de leucocitos humanos tratados con sulfato de talio(I) (A, C y E) o cloruro de talio(III) (B, D y F) utilizando la técnica de la electroforesis unicelular en gel. Las evaluaciones se realizaron 2 h, 4 h y 6 h después de la exposición al talio. En ambos casos se contó con un testigo sin tratamiento. Diferencias estadísticas con \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ , con prueba de ANOVA-Tukey con respecto a su testigo.

### 8.2.2 Daño al ADN con la prueba acelular de la EUG

Esta versión de la electroforesis unicelular en gel es una modificación de la versión alcalina, la diferencia es que los tratamientos con las sales de TI se dan sobre el ADN embebido en un gel de agarosa y no sobre las células. Los resultados con esta prueba muestran incrementos significativos en las dos concentraciones seleccionadas, 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con las dos sales de TI (**Figura 12** y Anexo C). Estos incrementos se dan con la misma magnitud entre compuestos y concentraciones, es decir, no hay diferencias en la longitud del cometa (**Figura 12**) entre los dos compuestos y tampoco entre las concentraciones aplicadas.



**Figura 12.** Longitud total del cometa de leucocitos medida con la prueba de electroforesis unicelular en gel en la versión acelular. Los leucocitos fueron lisados y el ADN nuclear de cada célula, que quedó embebido en los geles, fue expuesto durante 10 min a sulfato de TI(I) (rojo), o cloruro de TI(III) (azul). Se contó con un testigo positivo (morado) tratado con 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Diferencias estadísticas con \*  $P < 0.01$ , con prueba de ANOVA-Tukey con respecto al testigo (gris).

## DISCUSIÓN

La toxicidad de los metales inicia con la entrada al organismo y la célula. El Tl tiene afinidad por los grupos amino y sulfhídrico de las proteínas y debido a que el  $(Tl^+)$  tiene similitud química con el potasio ( $K^+$ ) puede sustituir a los iones  $K^+$  modificando la actividad de la bomba de  $Na^+/K^+ATPasa$  (Britten y Blank, 1968), en tanto que el  $Tl(III)$  ( $Tl^{3+}$ ) entra a la célula por los mecanismos que utiliza el  $Fe^{3+}$  y otros cationes (Aramini *et al* 1994). Esta condición permite que el Tl cruce fácilmente las membranas celulares, se acumule e intervenga con varios procesos celulares, como el metabolismo o sobre estructuras celulares entre ellas la membrana plasmática.

En esta tesis, las evaluaciones de la viabilidad celular con los colorantes CFDA/BE, a pesar de que no fueron diferentes estadísticamente, se observa reducción en los tratamientos con Tl. Estos datos coinciden con estudios en los que aplicaron las mismas concentraciones de Tl durante 1 h, mismo efecto que se ha observado con otros metales (Rodríguez-Mercado *et al* 2011, Rodríguez-Mercado *et al* 2015). Sin embargo, otros autores encontraron reducción en la viabilidad de manera dependiente del tiempo de exposición y de la concentración, donde observaron disminución de la actividad mitocondrial y del potencial de membrana de la mitocondria al aplicar nitrato de  $Tl(I)$  y nitrato de  $Tl(III)$  a células PC12 (feocromocitoma de médula suprarrenal de rata) durante 72 h en concentraciones de 10 a 250  $\mu\text{mol/L}$  (Villaverde y Verstraeten, 2003; Hanzel y Verstraeten, 2006), equivalentes a 1.3 y 28.8  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado, los resultados de apoptosis y necrosis con la prueba de NA/BE muestran diferencias significativas en los resultados a partir de la concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  con las sales de  $Tl(I)$  y  $Tl(III)$ , siguiendo un efecto dependiente de la concentración. Esta prueba se realizó a las 6 h que fue el mayor tiempo de exposición empleado en este estudio y la ventaja que presenta esta prueba con respecto a la de CFDA/BE es que se pueden distinguir células viables de las no viables, además de las células que entran en apoptosis temprana, las cuales pueden ser consideradas viables en la prueba con CFDA por no presentar daño en la membrana. Así mismo discernir entre células con daño en membrana por apoptosis tardía de las que mueren por necrosis (McGahon *et al.*, 1995; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2019).

La morfología de las células que entran en el proceso de apoptosis muestran condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la

fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos y la rotura del ADN en fragmentos; en cambio, las que sufren necrosis se caracterizan porque las células y sus orgánulos se hinchan por una alteración en la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y el agua, estas se rompen liberando su contenido en el espacio intracelular originando una inflamación a tejidos adyacentes (Angosto, 2003; Jordán, 2003).

Se sabe que *in vitro* las concentraciones micromolares de TI(I) alteran la permeabilidad mitocondrial, abriendo los poros de transición (Korotkov y Brailovskaya, 2001; Korotkov y Lapin, 2003) promoviendo apoptosis en células de leucemia humana (Jurkat) (Bragadin *et al.*, 2003). Hanzel y Verstraeten, (2006) sugieren que la mitocondria es de los principales blancos de la toxicidad por TI, que puede afectar la función neuronal, así como conducir a la muerte de las células. Estos mecanismos de acción ayudan a explicar que exista una disminución en la viabilidad celular después de la exposición al TI, por medio de una alteración en las funciones celulares, resultando en cambios en el metabolismo que pueden conducir a apoptosis y afectar integridad de la membrana celular. En este estudio no se evaluaron las rutas apoptóticas; sin embargo, Hanzel y Verstraeten, (2009) y otros autores (Korotkov *et al.*, 2018), proponen que el TI(I) primero provoca desestabilización de mitocondrias, e inicia la liberación de iones  $Ca^{2+}$  que conducen a la activación de caspasas y la muerte celular por la vía clásica de apoptosis, mientras que el T(III) además puede desencadenar muerte por la ruta extrínseca de apoptosis (Hanzel y Verstraeten, 2009). Esto último podría explicar las diferencias en el índice de muerte, donde se observó que el cloruro de TI(III) en concentraciones altas es más citotóxico que el sulfato de TI(I).

### **Daño al ADN y estimación del daño directo al ADN**

Las pruebas de viabilidad son importantes biomarcadores en toxicología y se emplean durante la evaluación de los efectos tóxicos provocados por sustancias químicas, drogas, así como para el estudio de nuevos compuestos que se proponen de uso común. La necesidad de una prueba confiable, fácil de manejar y rápida, ha llevado al desarrollo de varios ensayos que ahora se utilizan habitualmente, y que están disponibles para detectar los efectos citotóxicos de los sistemas celulares *in vitro* e *in vivo* (Garner *et al.*, 1997). Se sugiere hacer estas pruebas de viabilidad a la par de la prueba de daño al ADN por EUG para evitar falsos positivos al evaluar (Tice *et al.*, 2000).

La EUG empleada en esta investigación es una prueba eficiente para medir el daño al ADN, entre las lesiones que detecta se encuentran rompimientos de cadena sencilla y doble, sitios sensibles al álcali (sitios AP) y sitios de reparación por escisión incompleta (Fairbairn *et al.*, 1995; Singh, 2000). Donde, la longitud de la migración del ADN es un buen indicador de daño derivado de este tipo de lesiones en la molécula de ADN y que los tratamientos con TI(I) y TI(III) inducen.

De manera general se observó incremento en la longitud del ADN cuando se aplican los compuestos de TI, efecto que se hace más evidente a las 6 h de exposición, esto concuerda con reportes previos que muestran que el acetato de TI(I) en concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL en linfocitos humanos provoca daño primario al ADN después de 1 h de exposición (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2015), efectos similares fueron encontrados en pruebas hechas en células de ratón (fibroblastos de embrión de ratón ) tratadas con concentraciones de 1 µM a 10 µM de carbonato de TI (TI<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) durante 24 h (Zasukhina *et al.*, 1983).

Se conoce que el daño al ADN puede conducir a rompimientos de cadena doble y estas lesiones inducir aberraciones cromosómicas estructurales (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2019), al respecto se ha observado que los efectos *in vitro* se producen *in vivo*, García-Rodríguez *et al.*, (2014) encontró que el sulfato de TI(I) en tratamiento agudo de 23 mg/Kg incrementa la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de ratón.

Las sales de TI podrían estar provocando daño al ADN posiblemente a que modifican, y en particular disminuyen, los niveles de enzimas antioxidantes entre las que se encuentran glutatión, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa por su afinidad con los grupos sulfhídrido (Villaverde *et al.*, 2004; Hanzel *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2007). Lo anterior, podría provocar desajuste en los antioxidantes que protegen a los leucocitos expuestos *in vitro* al TI, lo cual a su vez conduce al aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno, las cuales se conoce que a través de reacciones óxido-reducciones pueden modificar bases nitrogenadas, desoxirribosas e inducir fragmentación del ADN (González-Torres *et al.*, 2000; Jan *et al.*, 2015; Rex *et al.*, 2017).

La versión acelular de la EUG ayuda a determinar si los compuestos de TI inducen daño directamente sobre la cadena de ADN, sin involucrar al metabolismo celular; por ejemplo, los mecanismos de reparación (Sasaki *et al.*, 2017). De esta manera se puede conocer si el daño o parte del daño inducido por TI es producido directamente por la interacción del

metal con la molécula de ADN, por lo que en este trabajo se decidió utilizar una concentración que no indujera daño al ADN (0.5 µg/mL) y otra que sí (50 µg/mL), concentraciones obtenidas de los resultados de la versión clásica de EUG y a las recomendaciones de la literatura y donde los resultados de esta prueba muestran que ambas concentraciones usadas indujeron fragmentación en el material genético. Nuestros resultados no concuerdan con datos encontrados en la literatura. Rádíc 2008 y Babić 2009, que expusieron el ADN de células vegetales de haba 0.5, 1, 5 y 10 mg/mL y lenteja a 0.026, 0.056, 0.113 y 0.226 mg/mL de acetato de TI(I), y no observaron efecto genotóxico significativo en la migración del ADN, así mismo, en pruebas realizadas utilizando diferentes órganos de ratón tratados con otros metales (0.1 µM de acetato de Cd(II) o cloruro de Cd(II)) tampoco encontraron daño significativo respecto a sus testigos (Valverde *et al* 2001). Estos datos son controvertidos, no se sabe si el TI interactúa directamente con el ADN nuclear de la célula, sin embargo, pruebas bioquímicas demuestran que el TI tiene afinidad por la guanina de los ácidos nucleicos (Shelley *et al.*, 2001), lo cual estaría provocando el daño observado en el ADN aislado de leucocitos humanos de este estudio. Sin embargo, estos resultados deben manejarse con cautela y es necesario realizar más pruebas para confirmar o descartar si el TI induce daño directo al ADN.

## CONCLUSIONES

El sulfato de Tl(I) y cloruro de Tl(III) en concentraciones de 0.5, 1, 5, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en leucocitos humanos no muestra cambios en la viabilidad celular después de 2, 4 y 6 h de exposición usando la prueba de CFDA/BE, no obstante la prueba de NA/BE muestra inducción de muerte celular por apoptosis a las 6 h.

Las sales de Tl(I) y Tl(III) incrementan la longitud de la migración del ADN, efecto que sigue un comportamiento dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

Los tratamientos (5 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con las dos sales de Tl muestran incrementos en la longitud de la migración del ADN con la versión acelular de la EUG; sin embargo, se sugiere continuar haciendo pruebas para corroborar estos datos.

En resumen, los resultados del presente estudio muestran el potencial citotóxico y genotóxico del Tl en sus dos principales estados de oxidación (I y III) en leucocitos humanos expuestos *in vitro*.

## REFERENCIAS

- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A.** (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*. 463, 111-172.
- Angosto MC.** (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 69, 36-64.
- Aramini JM, Krygsman PH, Vogel HJ.** (1994) Thallium-205 and Carbon-13 NMR Studies of Human Sero- and Chicken Ovotransferrin. *Biochemistry*. 33, 3304-3311.
- Arencibia DF, Rosario LA.** (2003). Actualización del ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Revista de Toxicología*. 20, 24-41.
- 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, 166-172.
- Bachand M, Seifert AM, Messing K.** (1991). Nuclear medicine patients do not have higher mutant frequencies after exposure to thallium-201. *Mutation Research*. 262, 1-6.
- Boyd V, Cholewa OM, Papas KK.** (2008). Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2(2), 66-84.
- Bragadin M, Toninello A, Bindoli A, Rogobello MP, Canton M.** (2003). Thallium Induces Apoptosis in Jurkat Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1010, 283-291.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckleman PE y Kinneary JF.** (1996) *The merk index*. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. White house Station, New Jersey USA, Merck.
- Covarrubias SA y Peña JJ.** (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33, 7-21.

- Crookes W.** (1974). Researches on the atomic weigh of thallium. *Chemistry News*. 20, 85-86.
- Ding M, Zhang B, Lv W, Yin H, Zhang L, Ying Z y Zhang Q.** (2008). Clinical manifestations and management of acute thallium poisoning. *European Neurology* 60, 292-297.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL.** (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*. 339, 37-59.
- Fischer AB, Eikmann T.** (2002). Vorkommen und toxikologie von thallium [Occurrence and toxicology of thallium]. *Umweltmed Forsch Prax* 7, 321–327.
- Flora SJS.** (2014). Toxic metals: Healt effects, and therapeutic measures. *Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences*. 1, 48-64.
- Galván-Arzate S y Ríos C.** (1994). Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology*. 90, 63-69.
- Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Vázquez-Román B, Ríos C, et al.** (2005). *Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. Food and Chemical Toxicology*. 43, 1037-1045.
- Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Vázquez-Romá B, Ríos C y Santamaría A.** (2005). Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 1037-1045.
- Galván-Arzate S, Santamaría A.** (1998). Thallium toxicity. *Toxicology Letters*. 99, 1–13.
- García-Rodríguez MC, García-Cárdenas, GP, Montañó-Rodriguez AR y Altamirano-Lozano MA** (2014). Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio[I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. *Acta Universitaria* 24, 91-96.
- Garner DL.** (1997). Ancillary tests of bull semen quality. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 13(2), 313-330.

- Gichner T.** (2003). DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco cellular and acellular Comet assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 535, 187-193.
- González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R.** (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*. 25(1), 3-9.
- Hantson P, Desoir R, Leonard ED, Crutzen-Faty MC.** (1997). Cytogenetic observations following thallium poisoning. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 50, 97-100.
- Hanzel CE, Verstraeten SV.** (2006). Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 216, 485-492.
- Hanzel CE, Verstraeten SV.** (2009). Tl(I) and Tl(III) activate both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 236, 59-70.
- Hanzel CE, Villaverde MS, Verstraeten SV.** (2005). Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium(III) hydroxide. *Toxicology* 207, 501–510.
- Hodgson E, Leblanc GA, Meyer, SA y Smart RC.** (2004). Introduction to biochemical and molecular methods in toxicology. En: *A textbook of modern Toxicology*, Ernest Hodgson (ed.) John Wiley & Sons, Inc. USA.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety.** (1996) Thallium. Environmental health criteria. Vol. 182. World Health Organization, Geneva, Holanda.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety.** (2000). Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*. 463, 111-172.
- 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.
- Jordán J.** 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*. 22(6), 100-106.
- Jørgensen C, Buchardt BH, Fawell J, Hydes O.** (2008). Preliminary draft final report on establishment of a list of chemical parameters for the revision of the drinking water directive. European Commission, Brussels. ENV.D.2/ETU/2017/0077r.

- Kada, T., Hirano, K., Shirasu, Y.** (1980). Screening of environmental chemical mutagens by the Rec-assay system with *Bacillus subtilis*. En: de Serres, F. J., Hollaender, A. (Eds.), *Chemical mutagens: principles and methods for their detection* (pp. 149-173). New York: Plenum.
- Kanematsu N, Hara M, Kada T.** (1980). REC assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Reserch.* 77, 109-116.
- Kazantzis G.** (1986). *Thallium*. In: Friberg, L., Nordberg, G. F., Vouk, V. (Eds.), *Handbook on the toxicology of metals*. New York: Elsevier Science. pp. 549-567.
- Kazantzis G.** (2000). Cap 22: Thallium in the environment and health effects. En: *Environmental Geochemistry and Health*. pp. 275-280. Stanley Bowie (ed.), Kluwer Academic Publishers. Londres.
- Kelsey KT, Donohoe KJ, Baxter B, Memisoglu A, Little JB, Caggana M, et al.** (1991). Genotoxic and mutagenic effects of the diagnostic use of thallium-201 in nuclear medicine. *Mutation Reserch.* 260, 239–246.
- Kim JI, Park HC, Kim SJ, Chang HS, Choi HJ, Kim YH.** (2019). Assessment of left ventricular ejection fraction by thallium-201 myocardial SPECT-CT in patients with angina pectoris: comparison with 2D echocardiography. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2, 136-143.
- Korotkov SM, Brailovskaya IV.** (2001). Tl<sup>+</sup> increases the permeability of the inner membranes of rat liver mitochondria for monovalent cations. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 378, 145-149.
- Korotkov SM, Konovalova SA, Nesterov VP y Brailovskaya IV.** (2018). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 495(2), 1716.
- Korotkov SM, Lapin LV.** (2003) Thallium induces opening of the mitochondrial permeability transition pore in the inner membrane of rat liver mitochondria. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 392, 247-52.
- Landeros JF.** (2012). *Agentes mutagénicos y su daño en el ADN*. Centro Uiversitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, División de Ciencias Biológicas y Ambientales. Tesis de licenciatura Universidad de Guadalajara.

- Léonard A y Gerber GB.** (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research.* 387, 47-53.
- Lu CI, Huang CC, Chang YC, Tsai YT, Kuo HC, Chuang, YH, Chang YH y Shin, T. S.** (2007). Short-term thallium intoxication: dermatological findings correlated with thallium concentration. *Archives of Dermatology Journals.* 143, 93-98.
- Lucho CA, Álvarez M, Beltrán RI, Prieto F y Poggi H.** (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International.* 31, 313-323.
- Maycock D, Fawell J, Merrington G, Watts C.** (2008). Review of England and Wales monitoring data for which a national or international standard has been set. Defra Project Code: CEER 0703 DWI 70/2/215 WT1207.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka, WK y Green DR.** (1995). Cap 46: The end of the (cell) line. En: *Methods for the study of apoptosis in vitro.* Schwartz LM y Osborne BA (eds). Elsevier Science, Academic press Inc. USA. pp. 153-185.
- McLennan A, Turner P, Bates A y White M.** (2013). DNA supercoiling. En: *Bios instant notes molecular biology.* pp.47-50.
- Migliore L, Cocchi L, Nesti C, Sabbioni E.** (1999). Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environmental Molecular Mutagenesis.* 34, 279-284.
- Moeschlin S.** (1980). Thallium Poisoning. *Clinical Toxicology.* 17, 133-146.
- Montes S, Soriano L, R\_ios C, Monroy-Noyola A.** (2007). Endogenous thiols enhance thallium toxicity. *Archives of Toxicology.* 81, 683-687.
- Morono Y, Takano S, Miyanaga K, Tanji Y, Unno H, Hori K.** (2004). Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnology Letters.* 26:379-383.
- Mulkey JP y Oehme FW.** (1993). A review of thallium toxicity. *Veterinary and Human Toxicology.* 35 (5), 445-453.

- Nafasi S, Akbar-Saboury A, Keramat N, Neault JF y Tajmir-Riahi HA.** (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*. 827, 35-43.
- Nielsen FH.** (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 66(4), 183-191.
- Nikiforov A, Slozina N, Neronova E, Kharchenko T, Sosukin A, Scherbak S, et al.** (1999). Cytogenetic investigation of thalliumpoisoned people: pilot study. *Journal Toxicology Environmental Health Part A*. 58:465–468.
- Pohanish, R. P.** (2011). Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens, 6th ed. (pp. 2547–2552) Norwich, New York, USA: William Andrew
- Pooga M, Elmquist A, Langel Ü.** (2002). Toxicity and side effects of cell-penetrating peptides. Processes and Applications. USA. pp. 245-261.
- Prieto E, y Llópiz N.** (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 18, 34-6.
- Radić S, Cvjetko P, Glavaš K, Roje V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M.** (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Environmental Toxicology Chemistry* 28, 189–196
- Rangel-Guerra R, Martínez HR y Villareal HJ.** (1980). Intoxicación por talio: experiencia con 50 pacientes. *Gaceta Médica México* 126, 487-495.
- Repetto G y Del Peso A.** (2012). Gallium, indium and thallium. *Patty's Toxicology*. 32:257-354.
- Repetto G, Sanza P y Repetto M.** (1994). In vitro effects of thallium on mouse neuroblastoma cells. *Toxicology In Vitro* 8, 609–611.
- Rex AS, Aagaard J, Fedder J.** (2017). DNA fragmentation in spermatozoa. A historical review. *Andrology*. 5, 622-630.
- Rodríguez-Mercado JJ, Álvarez-Barrera L, Mateos-Nava RA, Rodríguez-Espitia JD y Altamirano-Lozano MA.** (2019). Induction of cytotoxicity in human cells exposed to thallium(I) and thallium(III). *Current Topic in Toxicology* 15, 17-27.

- Rodríguez-Mercado JJ, Hernández-de la Cruz H, Felipe-Reyes M, Jaramillo-Cruz E y Altamirano-Lozano MA.** (2015). Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium(I) acetate in human blood cells. *Environmental Toxicology* 30(5), 570-580.
- 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, 245-261.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mosqueda-Tapia G, y Altamirano-Lozano MA.** (2017). Genotoxicity assessment of human peripheral Lymphocytes induced by thallium(I) and thallium(III). *Toxicological and Environmental Chemistry*. 99, 987-998.
- Rodríguez-Mercado JJ, y Altamirano-Lozano MA.** (2013). Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology*. 36, 369-383.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA y Ostrosky-Wegman P.** (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutation Research* 443, 157–181.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Nakamura T.** (2017). The power of the Comet Assay to Detect Low Level Genotoxicity and AND Repair Factors Affecting its Power. *MOJ Toxicology*. 3(2), 35-42.
- Shelley B. Howerton, Chad C. Sines, Don VanDerveer, and Loren Dean Williams.** (2001). Locating Monovalent Cations in the Grooves of B-DNA. *Biochemistry*. 40, 0023-10031.
- Singh NP.** (2000). Microgels for estimation of DNA stand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*. 455(1-2), 111-127.
- Spencer PS, Peterson ER, Madrid AR y Raine CS** (1973). Effects of thallium salts on neuronal mitochondria in organotypic cord-ganglia-muscle combination cultures. *The Journal of Cell Biology*. 58, 79-95.
- Tice R y Vasquez, M.** (1999). Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cell. Integrated Laboratory Systems PO Box 13501. Research Triangle Park, NC.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC y Sasaki YF.** (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

- US EPA, US Environmental Protection Agency.** (2011<sup>a</sup>). Basic information about thallium in drink water. Washington DC.
- US EPA, US Environmental Protection Agency.** (2009). *Toxicological review of thallium and compounds*. Washington DC.
- Valverde M, Trejo C y Rojas, E.** (2001). Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis*, 16, 265-270.
- Verstraeten SV.** (2006). Relationship between thallium(I)-mediated plasma membrane fluidication and cell oxidants production in Jurkat T cells. *Toxicology*. 222, 95-102.
- Villaverde MS y Verstraeten SV.** (2003). Effects of thallium(I) and thallium(III) on liposome membrane physical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 417, 235-243.
- Villaverde SA, Hanzel EC, Verstraeten SV.** (2004). In vitro interactions of thallium with components of the glutathionedependent antioxidant defence system. *Free Radical Research* 38, 977–984.
- Wedepohl KH.** (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 59, 1217–1232.
- Wilkinson K, Ellis R, Faint S, Hetherington J, Skull A.** (1999). Dictionary of substances and their effects. London: Royal Society of Chemistry. pp. 161–173.
- Xia W, Du X, Zheng T, Zhang B, Li Y, Bassig BA, Zhou A, Wang Y, Xiong C, Li Z, Yao Y, Hu J, Zhou Y, Liu J, Xue W, Ma Y, Pan X, Peng Y y Xu S.** (2016). A case-control study of prenatal thallium exposure and low birth weight in china. *Environmental Health Perspectives*. 124, 164-169.
- Yamamoto A, Nakashima K, Kawamorita S, Sugiyama A, Miura M, Kamitai Y, Kato Y.** (2014). Protective effects of raw and cooked blackcurrant extract on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human lymphoblastoid cells. *Pharmaceutical Biology*. 52(6), 782-788.

- Yildirim M, Ikbal M, Tos T, Seven B, Pirim I, Varoglu E.** (2005). Genotoxicity of thallium-201 in patients with angina pectoris undergoing myocardial perfusion study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine.* 206, 299-304.
- Yumoto T, Tsukahara K, Naito H, Lida A, Nakao A.** (2017) A Successfully Treated Case of Criminal Thallium Poisoning. *Journal of Clinical and & Diagnostic Research.* 11(4), OD01–OD02.
- Zasukhina GD, Vasilyeva IM y Sdirkova NI.** (1983). Mutagenic effect of thallium and mercury salts on rodent cells with different repair activities. *Mutation Research.* 124, 163-173.
- Zhao G, Ding M, Zhang B, Lv W, Yin H, Zhang L, Ying Z y Zhang Q.** (2008). Clinical manifestations and management of acute thallium poisoning. *European Neurology.* 60, 292-297.
- Ziskoven R, Achenbach C, Schulten HR y Rol, R.** (1983). Thallium determinations in fetal tissues and maternal brain and kidney. *Toxicology Letters.* 19, 225-231.

## ANEXOS

Daño al ADN y viabilidad de leucocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de sulfato de Tl(I) y cloruro de Tl(III) durante 2, 4 y 6 h.

Tratamientos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sulfato de Tl(I)				Cloruro de Tl(III)			
	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	IMg	Viabilidad (%)		Longitud ( $\mu\text{m}$ )	IMg	Viabilidad (%)	
			CFDA/BE	NA/BE			CFDA/BE	NA/BE
<b>2 h</b>								
Testigo	27.17 $\pm$ 0.82	1.28 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00		25.67 $\pm$ 0.42	1.26 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	
0.5	29.59 $\pm$ 0.94	1.43 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00		31.49 $\pm$ 0.77	1.49 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00	
1	37.98 $\pm$ 1.36**	1.77 $\pm$ 0.01	99.25 $\pm$ 0.02		27.87 $\pm$ 0.57	1.33 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00	
5	31.78 $\pm$ 0.51*	1.94 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00		29.99 $\pm$ 0.85	1.39 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00	
50	34.53 $\pm$ 1.35	1.59 $\pm$ 0.01	99.5 $\pm$ 0.02		40.95 $\pm$ 1.00**	1.90 $\pm$ 0.01	100 $\pm$ 0.00	
100	38.55 $\pm$ 1.39**	1.81 $\pm$ 0.02	98.75 $\pm$ 0.04		39.50 $\pm$ 1.14**	1.83 $\pm$ 0.02	100 $\pm$ 0.00	
<b>4 h</b>								
Testigo	30.98 $\pm$ 1.10	1.49 $\pm$ 0.02	99.75 $\pm$ 0.02		25.89 $\pm$ 0.43	1.24 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	
0.5	35.84 $\pm$ 1.39	1.83 $\pm$ 0.00	99.25 $\pm$ 0.04		25.95 $\pm$ 0.47	1.21 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	
1	34.40 $\pm$ 1.33	1.67 $\pm$ 0.00	97 $\pm$ 0.12		27.91 $\pm$ 0.59	1.31 $\pm$ 0.00	99 $\pm$ 0.05	
5	37.31 $\pm$ 0.79	2.10 $\pm$ 0.00	99.5 $\pm$ 0.02		36.09 $\pm$ 0.97**	1.69 $\pm$ 0.02	99 $\pm$ 0.00	
50	37.76 $\pm$ 1.55	1.76 $\pm$ 0.02	96.5 $\pm$ 0.11		50.22 $\pm$ 1.20**	2.35 $\pm$ 0.02	98.5 $\pm$ 0.02	
100	44.21 $\pm$ 1.77**	2.04 $\pm$ 0.02	96.25 $\pm$ 0.13		48.62 $\pm$ 1.34**	2.20 $\pm$ 0.03	97.5 $\pm$ 0.02	
<b>6 h</b>								
Testigo	25.58 $\pm$ 0.71	1.29 $\pm$ 0.00	99.0 $\pm$ 0.05	97 $\pm$ 0.12	26.93 $\pm$ 0.48	1.31 $\pm$ 0.00	99.5 $\pm$ 0.02	95.5 $\pm$ 0.07
0.5	33.66 $\pm$ 1.33*	1.66 $\pm$ 0.00	98.75 $\pm$ 0.04	95.12 $\pm$ 0.18	28.65 $\pm$ 0.58	1.39 $\pm$ 0.00	99 $\pm$ 0.00	94.87 $\pm$ 0.04
1	36.62 $\pm$ 1.53**	1.74 $\pm$ 0.01	97.0 $\pm$ 0.04	93 $\pm$ 0.17	29.53 $\pm$ 0.61	1.45 $\pm$ 0.01	96.5 $\pm$ 0.15	92.62 $\pm$ 0.11
5	43.10 $\pm$ 0.98**	2.27 $\pm$ 0.00	98.50 $\pm$ 0.02	91.75 $\pm$ 0.23	37.41 $\pm$ 0.88**	1.76 $\pm$ 0.00	96.5 $\pm$ 0.15	89.87 $\pm$ 0.04
50	44.11 $\pm$ 2.00**	1.87 $\pm$ 0.02	95.75 $\pm$ 0.02	87.25 $\pm$ 0.37	45 $\pm$ 1.37**	1.91 $\pm$ 0.01	96.5 $\pm$ 0.02	86.25 $\pm$ 0.15
100	55.27 $\pm$ 2.13**	2.3 $\pm$ 0.04	94.50 $\pm$ 0.02	86.5 $\pm$ 0.21	79.04 $\pm$ 2.23**	3.00 $\pm$ 0.04	95.5 $\pm$ 0.02	84.5 $\pm$ 0.10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 min <sup>a</sup>	74.09 $\pm$ 1.95**		94.75 $\pm$ 0.03		86.53 $\pm$ 1.45**		95.87 $\pm$ 0.03	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 min <sup>a</sup>	83.82 $\pm$ 2.28**		90.25 $\pm$ 0.05**		99.53 $\pm$ 1.79**		90.12 $\pm$ 0.03**	

Los datos se presentan en media  $\pm$  error estándar.

IMg, índice de migración: es el daño al ADN tomando en cuenta las categorías de acuerdo con Rodríguez-Mercado *et al* 2011.

<sup>a</sup> Se contó con testigos positivos usando 150  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 5 o 15 min.

Las diferencias estadísticas se dan con \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  comparado con su testigo; para viabilidad e IMg prueba de  $J^2$  y para la longitud de la migración del ADN prueba de ANOVA-Tukey.

## ANEXO B

Porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas de leucocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de sulfato de Tl(I) y cloruro de Tl(III) durante 6 h y evaluadas con la prueba de NA/BE.

Tratamientos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sulfato de Tl(I)				Cloruro de Tl(III)			
	Células (%)				Células (%)			
	Viables	Apoptóticas tempranas	Apoptóticas tardías	Necróticas	Viables	Apoptóticas tempranas	Apoptóticas tardías	Necróticas
Testigo	97 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01	1.62 $\pm$ 0.01	95.5 $\pm$ 0.02	2.12 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0
0.5	95.12 $\pm$ 0.06	1.37 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.03	2 $\pm$ 0.01	94.87 $\pm$ 0.01	2.12 $\pm$ 0.02	1.87 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.01
1	93 $\pm$ 0.06*	1.5 $\pm$ 0.03	2.87 $\pm$ 0.03	2.62 $\pm$ 0.01	92.62 $\pm$ 0.03*	3.12 $\pm$ 0.02	2.37 $\pm$ 0.05	1.87 $\pm$ 0
5	91.75 $\pm$ 0.08**	2.12 $\pm$ 0.03	2.75 $\pm$ 0.05	3.37 $\pm$ 0	89.87 $\pm$ 0.01**	3.5 $\pm$ 0.02	4 $\pm$ 0*	2.62 $\pm$ 0
50	87.25 $\pm$ 0.13**	2.87 $\pm$ 0.04	3.37 $\pm$ 0.02*	6.5 $\pm$ 0.07*	86.25 $\pm$ 0.05**	4.25 $\pm$ 0.02	4.62 $\pm$ 0.02*	4.87 $\pm$ 0.02*
100	86.5 $\pm$ 0.07**	2.87 $\pm$ 0.05	2.87 $\pm$ 0.03*	7.75 $\pm$ 0.02*	84.5 $\pm$ 0.03**	4.12 $\pm$ 0	4.5 $\pm$ 0.02*	6.87 $\pm$ 0.04*

Las diferencias estadísticas se dan con \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  con respecto a su testigo; prueba de  $J^2$ .

**Daño al ADN medido con la prueba acelular de la EUG con dos concentraciones de sulfato de TI(I) y cloruro de TI(III).**

Tratamientos	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	IMg
Testigo	23.73 $\pm$ 0.19	1.42 $\pm$ 0.01
Testigo con proteinasa K	24.28 $\pm$ 0.38	1.47 $\pm$ 0.01
<b>Sulfato de TI(I)</b>		
0.5 $\mu\text{g/mL}$	47.5 $\pm$ 0.59	2.35 $\pm$ 0.01
50 $\mu\text{g/mL}$	47.7 $\pm$ 0.66	2.32 $\pm$ 0.01
<b>Cloruro de TI(III)</b>		
0.5 $\mu\text{g/mL}$	46.25 $\pm$ 0.62	2.29 $\pm$ 0.01
50 $\mu\text{g/mL}$	46.35 $\pm$ 0.67	2.29 $\pm$ 0.01
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	43.14 $\pm$ 0.73	2.15 $\pm$ 0.03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con proteinasa K</b>	51.87 $\pm$ 0.64	2.56 $\pm$ 0.00

Los datos se presentan en media  $\pm$  error estándar.  
 IMg, índice de migración.  
 Se contó con un testigo positivo tratado con 150  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
 Las diferencias estadísticas se dan con \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  con respecto a su testigo; para viabilidad e IMg prueba de  $ji^2$  y para la longitud de la migración del ADN prueba de ANOVA-Tukey.



Sociedad Mexicana de Genética AC

# Congreso Nacional de Genética 2018



*60 años de la publicación de la duplicación semiconservativa*

**La Sociedad Mexicana de Genética  
y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral  
Regional-IPN Durango**  
otorgan la presente

## CONSTANCIA

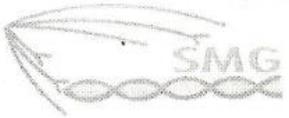
**A: Hernández Caballero Alfredo**

Por su participación

En el **Congreso Nacional de Genética 2018**, de la Sociedad Mexicana de Genética  
Efectuado del 7 al 9 de noviembre de 2018  
en el CIIDIR-IPN Durango

Dra. Edith Cortés Barberena  
Sociedad Mexicana de Genética A.C.  
Presidente (2017-2019)

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
Instituto Politécnico Nacional  
CIIDIR, Durango  
Director



Sociedad Mexicana de Genética AC

## Congreso Nacional de Genética 2018



*60 años de la publicación de la duplicación semiconservativa*

**La Sociedad Mexicana de Genética  
y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral  
Regional-IPN Durango**  
otorgan la presente

# CONSTANCIA

**A: Hernández-Caballero A, Mateos-Nava RA, Álvarez-Barrera L,  
Altamirano-Lozano MA, Rodríguez-Mercado JJ**

POR HABER OBTENIDO EL **SEGUNDO LUGAR** EN EL CONCURSO DE CARTELES DE LICENCIATURA CON EL TRABAJO:

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA TOXICIDAD A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A  
TALIO(I) Y TALIO(III)**

En el **Congreso Nacional de Genética 2018**, de la Sociedad Mexicana de Genética  
Efectuado del 7 al 9 de noviembre de 2018  
en el CIIDIR Durango

  
Dra. Edith Cortés Barberena  
Sociedad Mexicana de Genética A.C.  
Presidente (2017-2019)



  
Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
Instituto Politécnico Nacional  
CIIDIR, Durango  
Director