



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología
Ambiental.

**“Estimación del daño en el ADN y de bases
oxidadas en linfocitos humanos tratados *in vitro*
con cloruro de galio(III) mediante el ensayo de
electroforesis unicelular en gel”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Bryan Antonio Juárez López

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

ASESOR:

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

ASESORA:

Dra. Lucila Álvarez Barrera

México, Ciudad de México, 27 de mayo 2024





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.



Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, responsable de la Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), en el laboratorio de Toxicología Genética localizado en el piso 1, del edificio de la UMIEZ de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, UNAM. Conto con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT, clave IN210324.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 Presente

Le comunico que al alumno **JUAREZ LOPEZ BRYAN ANTONIO** con número de cuenta **315281343** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **27 de Mayo de 2024** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DRA. ALVAREZ BARRERA LUCILA	
VOCAL	DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	
SECRETARIO	MTRA. ROLDAN PEREZ REYNALDA	
SUPLENTE	DR. MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL	
SUPLENTE	MTRO. ALCANTARA MEJIA VICTOR ALAN	

El título del trabajo escrito que se presenta es

"Estimación del daño en el ADN y de bases oxidadas en linfocitos humanos tratados *in vitro* con cloruro galio(III), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel"

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 CDMX, a 18 de Abril de 2024

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES ZARAGOZA

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas aquellas personas que estuvieron en mi formación académica, profesores, compañeros, amistades y familiares.

A mis amigos de la carrera con quienes compartí exámenes y aventuras inolvidables, especialmente a Shaid Kaleb Avendaño Espinoza y Elihú Alexander Hernández Rodríguez.

A mis compañeros de la UNIGEN por todas esas experiencias tan gratas y momentos de tensión dentro y fuera del laboratorio, a: Eduardo Lezama, Keyla Hernández, Alejandra Lanuza, Adair Beltrán, José Juárez y Víctor Alcántara.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, Dra. Lucila Álvarez Barrera y especialmente al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su infinita paciencia y lecciones académicas que me ayudaron a entender la ciencia y formarme como profesional e investigador.

A mi familia por siempre estar presente en los momentos difíciles y felices a lo largo de mi vida.

A mis primos Arturo Villegas y Nayeli Villegas, por ser inspiración y mis consejeros personales, hay que estar siempre juntas.

A mi mejor amigo y hermano de la vida, Edgar Isaías Ramírez Rangel, gracias por siempre estar ahí, por todas esas aventuras juntos, por acompañarme en todo el proceso y jamás bajarte del barco, ahora te toca a ti.

A mi compañera de vida Grecia Sammai Alcántara Sánchez por motivarme a siempre dar lo mejor de mí y ser mejor persona.

A mi padre por darme lecciones de vida y ayudarme a entender el mundo a su forma.

A mi mamá que desde el cielo nunca me abandonó.

Especialmente este trabajo se lo dedico y agradezco a mi madre y amiga **Elvira López Álvarez** gracias a ti soy el hombre en el que me he convertido hasta ahora, gracias por no rendirte y demostrarme que trabajando duro y con fe todo es posible, gracias por sacrificarte en distintos aspectos para poder darme la vida más digna posible y la mejor educación, gracias por ser un pilar importante en mi vida y por apoyarme en los momentos en los que ni siquiera yo me entendía, jamás me abandonaste ni me juzgaste aun cuando yo estaba equivocado, gracias por darme la infancia más linda del mundo y protegerme de la crueldad de la vida, siempre has sido una madre y mujer excepcional. Las palabras no alcanzan para demostrarte cuanto te amo y te agradezco por todo lo vivido hasta ahora, solo tú y yo sabemos todo lo que hemos pasado, por cierto, hasta hoy no he ocupado la tabla del 7 completa, te amo y gracias por siempre confiar en mí.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEORICO	1
2.1 Los Metales y su Toxicidad.....	1
2.2 Galio.....	3
2.2.1 Producción y usos del Ga	3
2.2.2 Toxicocinética de Ga	4
2.2.3 Citotoxicidad y genotoxicidad de Ga	5
2.3 Daño y Reparación del ADN.....	7
2.4 Electroforesis Unicelular en Gel.....	8
2.4.1 Detección del daño en el ADN con Fpg	11
3. JUSTIFICACION.....	12
4. HIPOTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	12
5.1 General	12
5.1.2 Particulares.....	12
6. MATERIAL Y METODO.....	13
6.1 Cultivo de Linfocitos Humanos y Tratamientos	13
6.2 Evaluación de Viabilidad Celular.....	13
6.3 Preparación de Portaobjetos con Agarosa.....	14
6.4 Evaluación de Daño en el ADN a pH > 13	15
6.5 Evaluación de Daño en el ADN a pH 9	16
6.6 Evaluación de Daño en el ADN a pH > 13 con la Enzima Fpg	16
6.7 Análisis Estadístico.....	17
7. RESULTADOS	17
7.1 Viabilidad Celular.....	17
7.2 Análisis de Daño en el ADN a pH > 13.....	18
7.3 Análisis de Daño en el ADN a pH 9.....	18

7.4 Análisis de Daño en el ADN a pH > 13 con la Enzima Fpg	23
8. DISCUSIÓN.....	27
9. CONCLUSIONES	31
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMEN

El Galio (Ga) es un metal del grupo 13 de la tabla periódica de los elementos químicos y actualmente es considerado contaminante emergente. El Ga al ingresar al organismo desplaza iones esenciales como el Fe^{3+} y de esta manera afecta la función de proteínas dependientes de este catión. Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales ejerce su toxicidad a nivel celular y genético no han sido elucidados; por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* la toxicidad celular y el daño en el ADN de linfocitos humanos tratados con cloruro de galio(III), GaCl_3 .

Se tomaron muestras de sangre periférica de tres donadores y se aislaron los linfocitos. Las células se cultivaron y trataron con 0 (testigo negativo), 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GaCl_3 durante 1 y 3 h. Al terminar el tratamiento se evaluó la viabilidad celular y se estimó el daño en el ADN utilizando la prueba de electroforesis unicelular en gel con diferentes modificaciones: a $\text{pH} > 13$, en condiciones de $\text{pH} 9$ y con la enzima de restricción formamidopirimidin ADN-glicosilasa, Fpg. En todos los experimentos, se contó con testigos positivos tratados con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los análisis se realizaron al microscopio de fluorescencia.

Los resultados muestran que los tratamientos con GaCl_3 no modifican la viabilidad celular, pero inducen daño en el ADN por rompimientos de cadena sencilla y por sitios álcali lábiles, así como rompimientos de doble cadena en el ADN en concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, este químico aumenta la formación de bases oxidadas en el ADN, en concentraciones bajas (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por lo anterior, el potencial genotóxico del Ga en el estado de oxidación +3, se debe a la inducción de daño en el ADN posiblemente por estrés oxidante que genera bases oxidadas.

ABSTRACT

Gallium (Ga) is a metal in the group 13 of the periodic table and is currently considered an emerging contaminant. When Ga enters the organism, it displaces essential ions such as Fe^{3+} and thus affects the function of proteins dependent on this cation. However, the mechanisms of action by which it exerts its toxicity at the cellular and genetic level have not been elucidated; therefore, the objective of this work was to determine in vitro the cellular toxicity and DNA damage in human lymphocytes treated with gallium (III) chloride, GaCl_3 .

Peripheral blood samples were collected from three donors, and lymphocytes were isolated from these samples. The cells were cultured and treated with 0 (negative control), 0.1, 0.5, 1, 5, 10 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GaCl_3 during 1 and 3 hours. At the end of the treatment, cell viability was assessed, and DNA damage was estimated using a single-cell gel electrophoresis assay with different modifications: at pH > 13 conditions, at pH 9 conditions, and with the restriction enzyme formamidopyrimidin DNA-glycosylase, Fpg. In all experiments, positive controls treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) were available. Analyses were performed with fluorescence microscopy.

The results show that GaCl_3 treatments did not modify cell viability but induced DNA damage by single-strand breaks and alkali labile sites, as well as double-strand breaks in DNA at concentrations of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In addition, this chemical increases the formation of oxidized bases in DNA at concentrations as low as 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Therefore, the genotoxic potential of Ga in the +3 oxidation state is due to the induction of DNA damage, possibly due to oxidative stress that generates oxidized bases.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales son elementos químicos que se encuentran en el ambiente de manera natural, forman parte de los minerales que componen la corteza terrestre y algunos se ubican dentro de los agentes tóxicos más antiguos (Ferrer, 2003). Parte de la liberación de estos al ambiente es provocada por actividades antrópicas que contaminan el suelo, agua, aire y los alimentos (Sullivan, *et al.*, 2001).

Los metales esenciales cumplen con funciones biológicas como elementos estructurales, estabilizadores, activadores de mecanismos redox, por mencionar algunas; sin embargo, algunos otros no se requieren para ningún proceso metabólico y en concentraciones poco habituales en el organismo pueden causar efectos adversos en la salud (Kurland, *et al.*, 1960; Apostoli, 2002).

Desde el punto de vista de contaminación ambiental, se bioacumulan en los sistemas biológicos alterando el funcionamiento normal de las células produciendo daños en el material genético (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Entre los no esenciales se encuentra el **galio**, Ga (Combariza, 2009; Tanaka, *et al.*, 2022).

En las últimas décadas, el Ga ha sido liberado al ambiente debido a sus aplicaciones industriales, metalúrgicas, clínicas y electrónicas, compite por sitios de acción de los iones de hierro (Fe) alterando el funcionamiento celular e induciendo toxicidad sistémica, orgánica, celular y molecular (Lopez-Lanuza, *et al.*, 2023), no obstante, los mecanismos por el cual ejerce su toxicidad no han sido descritos por completo.

2. MARCO TEORICO

2.1 Los Metales y su Toxicidad

Los metales se definen en función de sus propiedades físicas: brillo, conductividad eléctrica, conductividad térmica, resistencia, ductilidad, estructura cristalina, dureza y configuración electrónica. Están situados a la izquierda y centro de la tabla periódica en los grupos I, II, III y IV A. Los metales se consideran agentes contaminantes más antiguos, su contacto se produce mediante el aire, el agua y los alimentos, pero

normalmente su toxicidad se ha descrito por la exposición laboral (Ferrer, 2003; Tanaka, *et al.*, 2022).

La efectividad de los metales no esenciales de competir con iones metálicos que intervienen en procesos bioquímicos es de las propiedades que juega un papel importante en su toxicidad, aunada a otras como lo son el estado de oxidación y la solubilidad de sus compuestos. Al respecto, los efectos tóxicos que provocan en los seres vivos, está dada porque pueden reaccionar perdiendo uno o varios electrones de valencia (Ferrer, 2003; Cornelis y Nordberg, 2007).

Las actividades industriales, agrícolas, médicas humana y veterinaria, así también las tecnológicas, han ocasionado la liberación de algunos metales sobre el ambiente ocasionando que se rebase la capacidad de los ecosistemas para incorporarlos en los ciclos biogeoquímicos, convirtiéndolos en contaminantes ambientales (Anderson, 2020). Se conoce que la exposición continua a metales provoca lesiones degenerativas, musculares, neuronales y óseas, que culminan en enfermedades; por ejemplo, la esclerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular e incluso cáncer (Ghosh, *et al.*, 2007; Londoño-Franco, *et al.*, 2016).

Varios metales están en constante interacción con los seres vivos y en particular con el ser humano, en los que se encuentran el bismuto (Bi), cadmio (Cd), cobalto (Co), oro (Au), **galio (Ga)**, hierro (Fe), manganeso (Mn), plomo (Pb), mercurio (Hg), níquel (Ni), platino (Pt), telurio (Te), talio (Tl), estaño (Sn), uranio (U), vanadio (V) y zinc (Zn) entre otros (Bhat *et al.*, 2017). En pequeñas cantidades algunos otorgan beneficios para la salud, pero cuando las concentraciones de estos iones aumentan inducen toxicidad que afecta directamente niveles energéticos, funcionalidad del cerebro, riñones, pulmones, hígado, componentes de la sangre, huesos, médula ósea y otros tejidos (Bhat, *et al.*, 2019).

Dentro de las propiedades de los metales es que no son biodegradables, lo que les confiere la capacidad de acumularse en el cuerpo. En mamíferos se activan mecanismos de desintoxicación que captan los iones metálicos dentro de una proteína o en gránulos intracelulares que se eliminan en orina y heces fecales. Además, forman enlaces covalentes, lo que les confiere la facilidad de unirse a grupos orgánicos formando iones

y compuestos lipofílicos, que pueden interactuar con las macromoléculas celulares en el material hereditario, ADN y ARN (Briffa *et al.*, 2020).

Cuando los metales interactúan con el ADN, en sitios iónicamente atractivos, inducen lesiones o daño que producen cambios conformacionales que activan la maquinaria de reparación. Ciertos metales promueven la producción de especies reactivas de oxígeno (p. ej. peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxido), de nitrógeno (óxido nítrico) y otros oxidantes intracelulares. Algunos estudios demuestran que la toxicidad de los metales tiene respuesta en el incremento de estas especies oxidantes y la formación de radicales libres que causan diversas modificaciones en las bases nitrogenadas y, por tanto, en la estructura del ADN. Las especies oxidantes que se inducen de forma endógena por los iones metálicos, provoca alteraciones en la homeostasis celular y lesiones al ADN debido a daño en la membrana que activan diversos sistemas de iones, principalmente en mitocondrias, microsomas y peroxisomas; donde la reacción de Fenton está involucrada (Valko *et al.*, 2005; Hartwig, 2013; Lopez-Lanuza, *et al.*, 2023).

2.2 Galio

El galio (Ga) fue descubrimiento por a Paul-Emile Lecoq de Boisbaurdan en 1875 y es un metal de color plateado brillante, pertenece al grupo 13 familia IIIA y cuenta con numero atómico 31, peso atómico de 69.72, estado de oxidación +2 y +3 (siendo el último el más estable), temperatura de ebullición de 2024 °C y temperatura de fusión de 28.75 °C lo que le permite permanecer en estado líquido a temperatura ambiente.

El radio iónico octaédrico y tetraédrico del Ga^{3+} es de 0.620 y 0.49 Å, similares a los del Fe^{3+} , 0.645 y 0.47 Å, respectivamente (Chitambar, 2016; Tanaka *et al.*, 2022).

2.2.1 Producción y usos del Ga

El Ga y sus compuestos han sido explotados debido a su gran interés farmacológico, ya que este metal ha mostrado tener excelente respuesta antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria y en la regeneración ósea. Además, se descubrió que tiene propiedades semiconductoras con otros metales que componen circuitos integrados, por ello es que se encuentra en la mayoría de los aparatos tecnológicos fabricados hoy en día. Según el Servicio Geológico de Estados Unidos (USGS, por sus siglas en inglés), China es el

principal país productor de Ga, seguido por el Reino Unido y Alemania. En su mayoría es procesado como arseniuro de galio (GaAs) y nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$), para la producción de láseres, emisores de luz, magnetos, y circuitos integrados, los cuales se usan en teléfonos, computadoras, satélites de telecomunicación, entre otros productos industriales (Chitambar, 2016; USGS, 2021; López-Lanuza, *et al.*, 2023).

Este metal presenta isotopos que son utilizados para revelar placas de gammagrafía y detectar cáncer en los órganos, algunos isotopos usados son ^{67}Ga , ^{68}Ga , siendo ^{68}Ga el más efectivo, ya que revela imágenes de cáncer en mama, sistema nervioso, linfomas, cáncer renal, hepatocelular, de próstata, sarcoma y tumores gástricos (Chitambar, 2016). Kinuya, *et al.*, reportaron en el 2004 que el ^{67}Ga es captado en células tumorales. Esto se debe a que los receptores de transferrina fijan Ga, el cual se acumula dentro de los órganos.

El $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, se utiliza como agente quimioterapéutico, ha demostrado que reduce el dolor por la disolución ósea causada por la hipercalcemia de cáncer en los huesos. La afinidad del Ga por el tejido óseo se debe a la capacidad que tiene este metal para remplazar al calcio (Ca^{2+}), sin producir alteraciones importantes en los mecanismos en donde el Ca^{2+} se encuentra involucrado (Baran, 2008). Otro compuesto es el cloruro de Ga (GaCl_3), el cual ha mostrado actividad antitumoral en el tratamiento de linfomas malignos, en cáncer de vejiga y distintos carcinomas uroteliales (Tanaka, *et al.*, 2022), También es empleado en hipercalcemias debido a efectos inhibitorios sobre la resorción ósea por osteoclastos (Clarke, *et al.*, 1999).

2.2.2 Toxicocinética de Ga

El Ga tiene afinidad por proteínas fijadoras de Fe como la transferrina (Tf), la lactoferrina y la ferritina. La Tf es producida principalmente en el hígado y esencial en el transporte de Fe, contiene sitios de unión en el extremo carboxilo terminal y otro en la amino terminal; el sitio de unión del terminal carboxilo tiene gran afinidad por los iones de Fe^{3+} , mientras que el amino tiende a unirse a otros iones, la sustitución Fe^{3+} por Ga^{3+} altera las funciones biológicas efectuando efectos adversos en las células (Chitambar, 2016; Sun, *et al.*, 2023).

La similitud de estos metales, Fe^{3+} y Ga^{3+} , permite que se unan a los receptores de Tf, siendo así transportado el Ga por la circulación sistémica a todos los tejidos y órganos del cuerpo. Los receptores de transferrina se conocen como TfR1 y TfR2, el primero se expresa en células malignas como lo es en células cancerígenas de glioma, leucemia y cáncer de mama y TfR2 se expresa de manera común en células normales, los osteoclastos expresan TfR1 (Lopez-Lanuza, *et al.*, 2023). El Ga se elimina por la orina y heces. Su vía de excreción dependerá de la solubilidad del compuesto del que forme parte. La administración de GaCl_3 a ratas macho muestra que el Ga se elimina del 88 al 99 % en la orina y del 0.3 al 11 % en heces fecales; por otro lado, el citrato de galio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{GaO}_7$) se elimina el 80 % del metal a las 96 h; 72 % en la orina y 8 % en las heces fecales. En ambos casos, el Ga retenido (del 9 al 18 %) se localiza en tejido óseo (Repetto y del Peso, 2012).

2.2.3 Citotoxicidad y genotoxicidad de Ga

La efectividad de este metal sobre las células se debe a la capacidad de emular el Fe e interrumpir el metabolismo celular. Se ha observado que este elemento puede detener el crecimiento celular acelerado, el galio compite con los iones de Fe deteniendo el ciclo celular y evitando el crecimiento incontrolado (Chitambar y Zivkovic, 1987).

El galio induce muerte celular apoptótica, ya que interviene en la liberación de citocromo C asociado con la activación de caspasa 3 y de Bax, mediadores de rutas apoptóticas (Chitambar, *et al.*, 2006). Otros trabajos del mismo autor muestran en linfoblastos CCRF-CEM expuestos durante 3 h que el complejo GaM produce especies reactivas de oxígeno, eleva la caspasa 3 activa y en tiempos mayores de exposición induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial e inhibe de la proliferación celular, **Cuadro I** (Chitambar, *et al.*, 2007).

Un paso principal en la síntesis del ADN es la síntesis de ribonucleosido difosfato a desoxirribonucleótido difosfato, que es catalizada por el ribonucleótido reductasa (RnR). La RnR es un heterodímero formado por dos subunidades homodiméricas M1 y homodiméricas M2 que están bajo el control de diferentes genes, en el ciclo celular RnRM1 está presente en todas las fases del ciclo mientras que RnRM2 aparece solo al

final de G1 cuando las células entran a la fase S (Chitambar, 2016; López-Lanuza, *et al.*, 2023).

CUADRO I. EFECTOS DE TOXICIDAD CELULAR INDUCIDOS POR COMPUESTOS DE Ga EN MODELOS EXPERIMENTALES.

Nombre del compuesto (fórmula química)	Modelo	Efecto
Oxido de galio (Ga ₂ O ₃)	Rata Cepa F344	Citotoxicidad, inflamación y fibrosis en pulmón vía respiratoria.
Oxido de galio (Ga ₂ O ₃)	Rata Cepa F344	Alveolitis, hiperplasia linfoide e hiperplasia de los neumocitos.
Nitrato de galio (Ga(NO ₃) ₃)	Ratón células L1210	Interfiere con la disponibilidad del Fe e inhibe a la RnR.
Cloruro de galio (GaCl ₃)	Ratón células L1210	Inhibe la polimerización de la tubulina. Incrementa el índice mitótico.
Complejo galio transferrina (Ga-Tf)	Linfocitos humanos	Inhibe la proliferación celular en presencia de mitógenos.
Nitrato de galio (Ga(NO ₃) ₃)	Células CCRF-CEM	Sobre expresión génica de MT2A y HO-1. Disminuye el GSH y genera ERO.
Cloruro de galio (GaCl ₃)	Células mononucleares de sangre periférica	Reduce de la viabilidad, arresto en la fase S del ciclo celular. En concentraciones altas incrementa la liberación de citocinas y promueve la apoptosis.

Todos los compuestos son del Ga³⁺.

ERO, especies reactivas de oxígeno; GSH, glutatión reducido; HO-1, hemo oxigenasa-1;

MT2A, metalotioneína-2A; RR, ribonucleótido reductasa; Tf, transferrina.

Elaborado a partir de Chitambar, 2016 y López-Lanuza, *et al.*, 2023.

Para mantener la actividad de dicha proteína se requiere del suministro constante de Fe que se ve reflejada cuando entran en la fase S aumentando la actividad de receptores de Tf, proceso que se ve afectado cuando los compuestos de Ga inhiben la actividad de RnR debido a la disminución de la actividad de las subunidades RnRM2 que están estrechamente ligadas a la cantidad de Fe. En experimentos con células HL60 incubadas durante 18 h con Tf-Ga (complejo de transferrina unido a un ion Galio) mostraron decremento de dNTP (nucleótidos que ayudan a generar nuevas cadenas de ADN), en comparación con las células no tratadas, los resultados de dicho experimento muestran que el Ga no interfiere con la síntesis de la proteína RnRM2, pero si con la disponibilidad de Fe, respuesta en la que está involucrada la detención de la síntesis de ADN, sin

embargo, el mecanismo por el cual el Ga actúa no se ha elucidado por completo (Chitambar, 2016; López-Lanuza, *et al.*, 2023).

2.3 Daño y Reparación del ADN

El daño en la molécula del ADN es un suceso común en la vida de la célula, es responsable de mutaciones, crecimiento incontrolado, incluso de la muerte de la célula o del organismo. El daño sobre el ADN desencadena una serie de procesos y respuestas moleculares para reparar o bien eliminar el daño.

Dentro de las células hay distintas formas de reparar el daño en el ADN, de manera general a los procesos encargados de esta tarea se les conoce como mecanismos de reparación y actúan según el tipo de daño que presente la molécula, hay unos comisionados a daños específicos en una sola de las cadenas del ADN y hay otros encargados de resarcir ambas cadenas del mismo ADN, mientras algunos mecanismos reparan de forma directa, otros lo hacen a través de señalizaciones enzimáticas (Alberts, *et al.*, 2002). Los tipos de daño de cadena sencilla son reparados por mecanismos de escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), escisión de nucleótidos (NER) y por mal apareamiento de bases (MMR); en tanto que para el daño de cadena doble es más común la reparación por recombinación homóloga (HR) y reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). El mecanismo de reparación por BER es el responsable de retirar los nucleótidos con bases dañadas en la molécula del ADN. Estos defectos pueden ocasionar cambios en la secuencia del ADN (mutaciones), por un mal apareamiento o rotura de la cadena, involucrando unas enzimas llamadas ADN-glicosilasas las cuales escinden las bases dañadas. También existen las endonucleasas, las cuales cortan los enlaces fosfodiéster y permiten que la sustitución de nucleótidos (Alebrts, *et al.*, 2008).

El NER se encarga de remediar daño ocasionado por nucleótidos dañados y que provocan problemas para la replicación y expresar la información genética. Esto permite que un complejo enzimático pueda reconocer el daño y corte azúcares; una helicasa empuja esta región y una ADN polimerasa repara el hueco así se forman nucleótidos faltantes para la ADN-ligasa pegue los extremos y finalmente una enzima denominada

exonucleasa degrada el fragmento y este se vuelve a sintetizar, pero de forma adecuada (Cline y Hanawalt, 2003).

La reparación por unión de extremos no homólogos es el mecanismo más simple para reparar daños en cadena doble. Los extremos de las cadenas se colocan juntas y pegan. Suele considerarse como un método rápido y poco eficiente de reparación, debido a que no se garantiza la restauración de la secuencia precisa de las cadenas, sin embargo, es una ruta de reparación que a la célula le funciona debido a que es rápida, además de que este método puede actuar en cualquier fase del ciclo celular (Cline y Hanawalt, 2003). También se encuentra, la reparación por recombinación homóloga es una forma más precisa de reparar daño en la cadena doble del ADN. El genoma humano posee dos copias de cada cromosoma así este mecanismo utiliza la copia como molde y reparar el fragmento dañado. Un complejo enzimático es el encargado de unirse a la cadena recortando uno de los extremos, y se une a la cadena más larga una enzima denominada recombinasa, que invade el cromosoma hermano en el punto homólogo de la secuencia y de esta manera lo utiliza como un molde para reparar el daño, este mecanismo solo se utiliza durante la replicación del ADN cuando los cromosomas están alineados uno a lado del otro (Cline y Hanawalt, 2003).

Cuando la maquinaria de reparación llega a fallar y el ADN no es reparado de forma adecuada, desencadena procesos que generan mutaciones o aberraciones que conducen a la inestabilidad génica, así como envejecimiento o muerte celular (Jackson y Bartek, 2009).

2.4 Electroforesis Unicelular en Gel

La electroforesis unicelular en gel (EUG) o ensayo cometa, es una prueba de genotoxicidad que detecta la fragmentación de la molécula del ADN causada por daño y reparación de esta. Es una metodología que se utiliza en la evaluación del daño en el ADN de productos agentes físicos, químicos y biológicos. Tal es el caso de químicos industriales, farmacéuticos y agroquímicos analizando daño en la cadena de ADN célula por célula. El interés de este método proviene de las aplicaciones potenciales en la biomonitorización humana y ecológica evaluando la respuesta a contaminantes ambientales.

El concepto de electroforesis en microgel fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson, utilizando un pH cercano a 7 con el objetivo de evaluar rompimientos de cadena doble; seguido de Singh *et al.* (2000) quienes modificaron la técnica realizando electroforesis en condiciones de alta alcalinidad para poder desnaturalizar el ADN y durante la electroforesis poder evaluar sitios álcali lábiles, rompimientos de cadena sencilla y sitios de reparación incompleta del ADN (Hartman, *et al.*, 2003; Bajpayee, *et al.*, 2019).

El ensayo se distingue por sus ventajas entre algunas las que desatacan:

- Alta sensibilidad para detectar daño en el ADN.
- Rápido de realizar, flexible y de bajo costo.
- Se obtienen datos a nivel de célula.
- Se requiere una muestra pequeña de células.
- Se puede utilizar cualquier población celular.

Hay distintas versiones de la técnica con resultados específicos a distintos tipos de daño como el estrés oxidante donde se utilizan enzimas específicas capaces de detectar bases oxidadas y escindir las de la cadena de ADN induciendo sitios sin base (abásicos o AP, apurínico y apirimidínico), que en condiciones alcalinas (pH > 13) se traducen como rompimientos de cadena sencilla. Dentro de las enzimas capaces de detectar este tipo de daño se encuentra la endonucleasa III y la formamidopirimidin ADN- glicosilasa, Fpg (Azqueta, *et al.*, 2019).

El daño en el ADN es evaluado al microscopio óptico y los parámetros más usados (**Figura 1**) son las longitudes de los componentes del cometa, entre ellos está:

- a) El **nucleoide** (cabeza), que es la parte donde se encuentra el material genético intacto, las cadenas que no dañadas y no fueron fragmentadas.
- b) La **cauda** del cometa, que es de las más importantes debido a que dependiendo de la longitud de la migración indica el daño que dicha célula recibió; no obstante, esto también depende de la cantidad de material genético contenido, que tan denso se aprecia. Pueden observarse caudas cortas, pero intensas o caudas largas sin intensidad y viceversa, por eso es recomendable evaluar más de 100 células por tratamiento.

- c) El **cometa**, que es la longitud total, la suma de los dos parámetros anteriores, nucleoide más cauda (Kumaravel, *et al.*, 2009).

El análisis de daño también se mide mediante programas especializados que evalúan las relaciones proporcionales entre los niveles de migración del ADN y la intensidad del campo electroforético, la mayoría de los programas especializados utilizan imágenes de los cometas a evaluar; en ocasiones los parámetros electroforéticos, como el voltaje, temperatura o la recirculación hacen que el análisis del daño sea meticuloso debido a que un ligero cambio en alguno de los ya mencionados afectan el corrimiento del ADN (Collins, *et al.*, 2023).

Otra forma de analizar el daño que recibe el ADN es el índice de migración (IMg), que se expresa como el porcentaje de células en cada categoría de daño, son unidades arbitrarias representadas por números que van del 1 para células sin daño y 4 para células con daño severo o alto (Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2011).

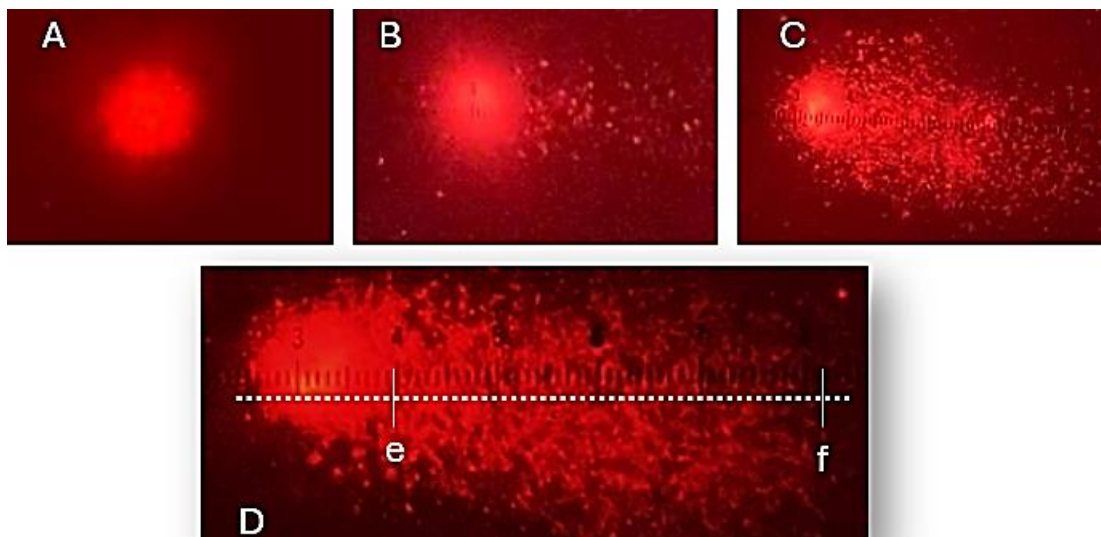


FIGURA 1. Parámetros visuales de daño en el ADN. En **A** ADN nuclear sin daño, en **B** con daño bajo, en **C** con daño medio y **D** con daño alto: **e** longitud del nucleoide o cabeza del cometa y **f** longitud de la cauda del cometa (autoría propia).

2.4.1 Detección del daño en el ADN con Fpg

El uso de enzimas específicas en la EUG, como lo es Fpg, es una modificación útil en especificidad y sensibilidad de la técnica. Se utiliza particularmente en la detección del daño oxidante en las bases del ADN (Dušinská y Collins, 1996; Collins, *et al.*, 1997). La Fpg reconoce distintas bases oxidadas, principalmente la 8-oxoguanina (**Figura 2**) y formamidopirimidina (FapyGua y FapyAde), en ese orden. Estas últimas son formas abiertas en anillos de adeninas y guaninas, también en forma metiladas como N7-metilformamidopirimidinas, 7-MeFapyGua, mediante glicosilasas (Rabow y Kow, 1997).

Esta enzima rompe los enlaces glicosídicos que reconoce e incide de las purinas oxidadas en la cadena de ADN que se traducen sitios AP y que en condiciones alcalinas se convierten en rompimientos de cadena sencilla, que se muestra en el incremento en la cantidad de ADN en la cuada de las células sometidas a la electroforesis alcalina (Collins, *et al.*, 2008).

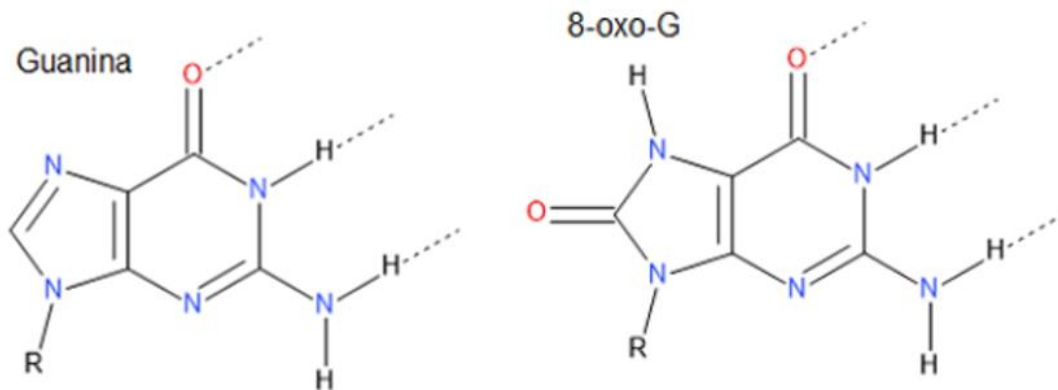


FIGURA 2. Estructura química de la base nitrogenada guanina y en su forma oxidada, 8-oxoguanina.

La importancia de detectar este tipo de daño es porque las proteínas encargadas de emparejar bases nitrogenadas confunde la 8-oxoguanina provocando sustituciones (adenina) y al momento de replicarse el ADN la cadena con la purina oxidada se replica fijando timina en la cadena opuesta, lo que concluye como mutación génica en caso de no ser reparado adecuadamente (Liao, *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACION

Se conoce que el Ga y sus compuestos son tóxicos y perjudiciales para la salud humana. Parte de sus efectos están relacionados con procesos metabólicos en los que intervienen cationes esenciales como el Fe, en la producción de especies reactivas de oxígeno, a pesar de las aplicaciones médicas que benefician en ciertos tratamientos. Sin embargo, el mecanismo de acción por los cuales ejerce su toxicidad aún no ha sido elucidado por completo, por lo que es importante investigar la forma en que el Ga induce daño en el ADN, lo que lleva a la siguiente pregunta.

¿El Galio induce rompimientos en el ADN y estos son producto del estrés oxidante?

4. HIPOTESIS

Se conoce que el Ga está relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno, las cuales ocasionan daño a las biomoléculas. Por lo que, la exposición *in vitro* de linfocitos humanos a distintas concentraciones de cloruro de galio(III), este inducirá rompimientos de cadena sencilla, de cadena doble y por oxidación de bases en el ADN.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar *in vitro* el daño en el ADN de linfocitos humanos tratados con cloruro de galio(III).

5.1.2 Particulares

- Evaluar la viabilidad celular en linfocitos humanos tratados con 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 µg/mL de cloruro de galio(III) durante 1 y 3 h.
- Estimar el daño en el ADN de cadena sencilla con el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH > 13.
- Estimar el daño al ADN de cadena doble con el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH 9.

- Estimar el daño por bases oxidadas en el ADN de linfocitos humanos utilizando la enzima de restricción Fpg y la electroforesis a pH > 13.

6. MATERIAL Y METODO

La mayoría de los reactivos usados fueron de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), al menos que se indique lo contrario.

6.1 Cultivo de Linfocitos Humanos y Tratamientos

Se eligieron tres donadores clínicamente sanos y sin toxicomanías o enfermedades recientes, a cada uno se le extrajeron 6 mL de sangre por venopunción con el método Vacutainer® (Becton Dickinson, México), posterior a la extracción se colocaron 3 mL en dos tubos cónicos de 15 mL y se agregó Histopaque® 1077, en proporción 1:1. Después de centrifugar se separó la fracción que contiene los linfocitos y se lavaron dos veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer (Lumicyte, Popper manufacturing Co, New York).

Se sembraron 1×10^6 células en tubos Eppendorf en 1 mL de medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) que contenía los tratamientos de cloruro de galio(III) (GaCl_3 , Bean Twon Chemical®, CAS No.: 13450-90-3, 99.99 %). Las concentraciones aplicadas a los cultivos celulares fueron 0 (testigo negativo), 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 $\mu\text{g/mL}$ de GaCl_3 durante 1 y 3 h. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado para cada condición de electroforesis: alcalina (pH > 13), con la enzima de restricción Fpg y neutro (pH 9), como se muestra en el **Cuadro II**.

En todos los experimentos se determinó la viabilidad celular, además siempre se contó con testigos positivos tratados con 25 μM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Redel-de Haen®, CAS#: 7722-84-1, 30 %) durante 10 min.

6.2 Evaluación de Viabilidad Celular

Después de las 1 o 3 h de exposición con las distintas concentraciones de GaCl_3 se tomó una muestra de 20 μL de cada tubo con tratamiento y sin tratamiento, se realizó la tinción con diacetato de carboxifluoreceína (CFDA, 0.125 $\mu\text{g/mL}$) y bromuro de etidio (BE, 0.025

µg/mL). Para lo cual, a cada muestra celular se le agregó 20 µL de la mezcla de los colorantes en proporción 1:1 (Tice y Vázquez, 1998), se incubaron por 15 min a 37 °C en la oscuridad, después se realizaron dos lavados con 1 mL de medio RPMI 1640, centrifugando a 5000 rpm durante 5 min en cada lavado.

CUADRO II. TRATAMIENTOS CON GaCl₃ Y PRUEBAS PARA EVALUAR DAÑO AL ADN.

Condiciones de electroforesis		Concentración de GaCl ₃ en µg/mL ^a	Exposición
pH >13	Evaluación de rompimientos de cadena sencilla en el ADN	0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50	1 y 3 h
pH 9	Evaluación de rompimientos de cadena doble en el ADN	0, 1 y 10	3 h
pH > 13 y Fpg	Evaluación de daño por bases oxidadas en el ADN	0, 0.1, 1 y 10	1 h

^a 1 mg de GaCl₃ se disolvió en 1 mL de agua desionizada, a partir de esta solución se hicieron diluciones para obtener las concentraciones de cada tratamiento.

Se colocaron las muestras en portaobjetos y se analizaron en microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2 con filtro de excitación de 515–560 nm) se cuantificaron 100 células por cultivo (en total 200 por tratamiento), las células teñidas de verde se contaron viables y las teñidas de rojo o naranja se tomaron como no viables.

6.3 Preparación de Portaobjetos con Agarosa

Se sumergieron portaobjetos en solución limpiadora de etanol, metanol y cloroformo en una proporción 1:1:0.5 y con la ayuda de una gasa se limpió perfectamente ambos lados de los portaobjetos. Por otro lado, se prepararon dos tipos de agarosas, el primero de punto normal de fusión al 1 %, para este se pesaron 500 mg y se disolvieron en 50 mL de PBS a 60 °C. Para el segundo gel, se utilizó agarosa bajo punto de fusión al 0.5 %, se pesaron 250 mg y se disolvieron en 50 mL de PBS en constante agitación a temperatura de 40 °C aproximadamente. A cada portaobjeto se extendió con ayuda de cubreobjetos una capa homogénea de 80 µL de agarosa de punto de fusión normal.

6.4 Evaluación de Daño en el ADN a pH > 13

Se utilizó la electroforesis unicelular en gel a pH > 13 para evaluar los rompimientos de cadena sencilla en el ADN de linfocitos humanos. Después de los tratamientos y tiempos de exposición se tomaron 30 µL de cada muestra se resuspendieron en 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C y se extendieron con cubreobjetos en dos portaobjetos previamente preparados con la agarosa de bajo punto de fusión. Se dejaron en cama fría (4 °C) durante 10 min, transcurrido este tiempo se retiró cuidadosamente el cubreobjeto y se extendió una tercer capa con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión y se dejó en cama fría por otros 10 min, se retiraron los cubreobjetos y las laminillas se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM Trizma base 10 mM a pH 10, con tritón x-100 al 1 % y DMSO 10 %) por 24 h a 4 °C. Posteriormente, se realizó el lavado de las laminillas en PBS durante 5 min y en seguida se colocaron en la cámara de electroforesis horizontal (Claver Científiv, CSL-COM series, México), donde se dejó en solución de electroforesis (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM a pH >13) durante 20 min para desenrollar el ADN, transcurrido el tiempo se conectó la fuente de poder a 25 V y 300 mA durante 20 min (Consort, EV3610, Bélgica). Los pasos anteriores se realizaron en la oscuridad o con luz indirecta.

Después de la electroforesis, las laminillas se colocaron en Trizma base (0.4 mM a pH 7) por 10 min, para neutralizar la alcalinidad y posteriormente se colocaron en alcohol etílico al 70 % por 10 min, para deshidratar el gel.

Las laminillas se tiñeron con 25 µL BE (0.025 µg/mL) y su evaluación se realizó a 400X al microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2) con el filtro de excitación de 515-560 nm. Para determinar el daño al ADN, con una reglilla adaptada al ocular se midió la cabeza, la cauda y la longitud total del cometa.

Con los datos obtenidos de la longitud del cometa se calculó el IMg.

$$IMg = \frac{(a)1 + (b)2 + (c)3 + (d)4}{Total\ de\ células\ evaluadas}$$

Donde **a** representa el porcentaje de cometas sin daño, **b** el porcentaje de cometas con poco daño, **c** el porcentaje de cometas con daño medio y **d** el porcentaje de cometas con

daño alto (Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2011). El nivel de daño se representa como el porcentaje de daño que migro fuera del nucleoide a partir de la media del testigo negativo, 0 µg/mL de GaCl₃.

6.5 Evaluación de Daño en el ADN a pH 9

Para evaluar los rompimientos de cadena doble se utilizó el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH 9, para lo cual se siguieron los mismos pasos de elaboración de las laminillas descritos en la evaluación de daño en el ADN a pH > 13 (apartado 6.4), hasta la lisis celular (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM Trizma 10 Mm a pH 10, con tritón x-100 al 1 % y DMSO 10 %). Después de esta lisis se realizaron dos cambios de lisis de acuerdo con la literatura (Olive y Banath, 2006; Singh, *et al.*, 2000; Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2011). Brevemente, al terminar la primera lisis, se realizó un lavado con medio RMPI 1640 por 5 min, después se pasaron las laminillas a una segunda lisis con ribonucleasa durante 1 h (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Trizma base 10 mM y ARNasa 10 µg/mL), al término se lavaron con medio y se incubaron por 1 h en la tercera lisis a 37° C suplementada con proteinasa K (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Trizma base 10 mM y proteinasa K 40 µg/mL). Posteriormente, se realizó el lavado de las laminillas con PBS durante 5 min y en seguida se colocaron en la cámara de electroforesis horizontal, donde se reposaron 20 min en solución de electroforesis a pH 9 (acetato de sodio 300 mM, Trizma base 100 Mm), para después correr a 100 mA y 12 V durante 1 h. Al terminar el tiempo de electroforesis, las laminillas se pasaron a una solución saturada de hidróxido de sodio (NaOH 300 mM) por 15 min, después se neutralizaron con Trizma base y se deshidrataron con alcohol etílico al 70 %. Las preparaciones se tiñeron con BE y se analizaron los cometas al microscopio de fluorescencia, como se explicó previamente.

6.6 Evaluación de Daño en el ADN a pH > 13 con la Enzima Fpg

Para evaluar el daño al ADN por bases oxidadas, después de la lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM Trizma 10 Mm a pH 10, con tritón x-100 al 1 % y DMSO 10 %), las laminillas se lavaron en dos ocasiones con medio RMPI 1640 por 5 min y después se incubaron en una cámara húmeda 30 min a 37 °C con la formamidopirimidin ADN-glicosilasa (Fpg) siguiendo las indicaciones de activación del laboratorio de procedencia, Bio-lab®, Para

lo anterior, la Fpg se activó 1 h a 37 °C, se diluyó la enzima 1:16 y se aplicaron 50 µL en cada una de las laminillas. En seguida se colocaron en la cama horizontal de electroforesis y se siguieron los pasos descritos en la evaluación de daño de cadena sencilla en el ADN a pH >13 (ver apartado 6.4).

6.7 Análisis Estadístico

Se realizaron tres experimentos por prueba cada uno con su duplicado, se evaluó la viabilidad celular, el daño en el ADN y se tabularon cada una de las longitudes de los parámetros de daño: cauda y longitud del cometa, además con los datos de longitud de cometa y cauda se calculó el IMg. Los datos se presentan con la media ± error estándar de la media. Los resultados de las mediciones de los cometas fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett y para la viabilidad y el IMg se realizó la prueba de ji-cuadrada. Los valores de confianza $p < 0.05$ y 0.01 fueron considerados como diferentes estadísticamente.

7. RESULTADOS

7.1 Viabilidad Celular

Al término de los tratamientos con 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 µg/mL de GaCl₃ por 1 y 3 h, así como del testigo positivo con H₂O₂, se determinó la viabilidad celular con la tinción dual de BE y CFDA. Se evaluaron 200 células por tratamiento con su respectivo duplicado. En el **Cuadro III**, se muestran los datos de la viabilidad, por donador y en la media de todos los experimentos. Para los datos individuales, por donador, no hay cambios considerables en la viabilidad en todos los tratamientos de GaCl₃, respecto a su grupo control; mismo comportamiento que se observa al promediar los datos de los seis experimentos, **Figura 3**. No obstante, a pesar de que no hay diferencia estadística, en la concentración de 50 µg/mL de GaCl₃ disminuye ligeramente el porcentaje de viabilidad en 1 h (96 vs. 89.5) y en 3 h (93.8 vs. 88.5), respecto al grupo control.

En cuanto a los tratamientos con 25 μM de H_2O_2 por 10 min, la viabilidad de los linfocitos humanos no se modificó; lo que indica que la técnica de tinción dual se llevó a cabo de forma adecuada y el H_2O_2 no produce toxicidad celular a esas concentraciones y tiempo de exposición (Singh, *et al.*, 1988) (**Cuadro III**).

7.2 Análisis de Daño en el ADN a pH > 13

En el Cuadro IV, se muestran los datos de daño en el ADN a pH > 13 medidos como la longitud del cometa y el IMg de los linfocitos tratados con las distintas concentraciones de GaCl_3 por 1 y 3 h. También, se presentan los datos de los tratamientos con H_2O_2 . Se evaluaron 100 cometas por tratamiento de cada donador, 300 datos en promedio. En el **Cuadro IV** se observa que la longitud del cometa incrementa conforme aumenta la concentración y tiempo de exposición en cada donador, donde además se observan diferencias estadísticas en todos los tratamientos de GaCl_3 con respecto al grupo control; tendencia que se repite al promediar los datos de los seis experimentos (**Figura 3**).

En cuanto los datos del IMg, se puede observar que el porcentaje de daño que se representa en valores que van de 1 a 4 (1 para las células sin daño, 2 células poco daño, 3 células con daño medio y 4 para células con daño alto), incrementa de manera dependiente de la concentración del GaCl_3 , con diferencias estadísticas en todas las concentraciones empleadas (**Figura 4**). Los tratamientos con H_2O_2 aumentan la longitud de los cometas y el IMg como se esperaba; lo que indica que el manejo de los linfocitos y las condiciones de electroforesis se llevaron a cabo bajo las condiciones apropiadas.

7.3 Análisis de Daño en el ADN a pH 9

Para la evaluación en condiciones electroforéticas de pH 9, se eligieron la exposición a 3 h y las concentraciones de 1 o 10 $\mu\text{g/mL}$ de GaCl_3 . Concentraciones elegidas con base en los resultados de la evaluación de daño de cadena sencilla en el ADN a pH > 13, donde 1 $\mu\text{g/mL}$ aumenta el porcentaje de células de daño bajo y medio (IMg de 2.63 ± 0.37) y 10 $\mu\text{g/mL}$ de GaCl_3 aumenta el porcentaje de células con daño medio y alto (IMg de 3.16 ± 0.32).

CUADRO III. VIABILIDAD DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 1 Y 3 H CON GaCl₃.

Tratamiento de GaCl ₃ en µg/mL.	Viabilidad en %	
	1 h	3 h
Donador 1		
0 (testigo)	90.00 (91,89)	87.00 (89,85)
0.1	91.50 (92,91)	84.00 (85,83)
0.5	92.50 (90,95)	85.50 (81,90)
1	92.00 (91,93)	88.50 (90,87)
5	92.50 (93,92)	90.00 (91,89)
10	92.50 (95,90)	88.00 (85,91)
50	89.50 (89,90)	85.00 (85,85)
H ₂ O ₂	91.00 (91,91)	92.50 (92,93)
Donador 2		
0 (testigo)	99.50 (100,99)	94.50 (99,90)
0.1	88.50 (86,91)	82.50 (85,80)
0.5	90.50 (91,90)	85.00 (81,83)
1	89.00 (87,91)	92.50 (95,90)
5	92.50 (90,95)	95.00 (99,91)
10	89.50 (90,89)	96.50 (97,96)
50	85.50 (85,81)	88.50 (90,87)
H ₂ O ₂	95.00 (95,95)	91.50 (91,92)
Donador 3		
0 (testigo)	98.50 (99,98)	100.00 (100,100)
0.1	97.50 (98,97)	95.50 (99,92)
0.5	93.50 (95,92)	96.50 (98,95)
1	96.50 (96,97)	95.50 (94,97)
5	98.50 (99,98)	94.00 (93,95)
10	96.00 (94,98)	92.00 (91,93)
50	94.00 (95,93)	92.00 (91,93)
H ₂ O ₂	99.50 (100,99)	98.00 (98,98)
Media de los experimentos		
0 (testigo)	96.00 ± 3.01	93.83 ± 3.76
0.1	92.50 ± 2.64	87.33 ± 4.10
0.5	92.16 ± 0.88	89.00 ± 3.75
1	92.50 ± 2.17	92.16 ± 2.02
5	94.50 ± 2.00	93.00 ± 1.52
10	92.66 ± 1.87	92.16 ± 2.45
50	89.50 ± 2.59	88.50 ± 2.02
H ₂ O ₂	95.16 ± 2.45	94.00 ± 2.02

Los datos son la media ± error estándar de la media de 200 células por tratamiento de cada donador; viabilidad de un cultivo (viabilidad del duplicado). H₂O₂, peróxido de hidrógeno como testigo positivo 25 µM por 10 min.

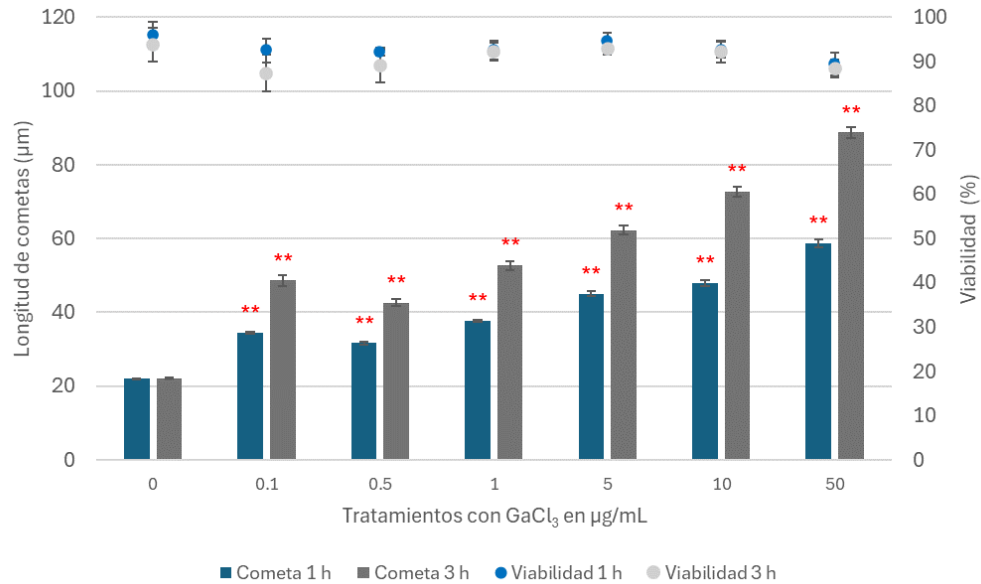


FIGURA 3. Evaluación del daño en el ADN con la prueba de EUG a pH > 13. Viabilidad (●●) y longitud del cometa (■) de linfocitos humanos tratados con 0 (testigo), 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 µg/mL de GaCl₃ durante 1 y 3 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. ** p < 0.01 comparado con el testigo (ji-cuadrada para viabilidad y ANOVA-Dunnnett para longitud del cometa).

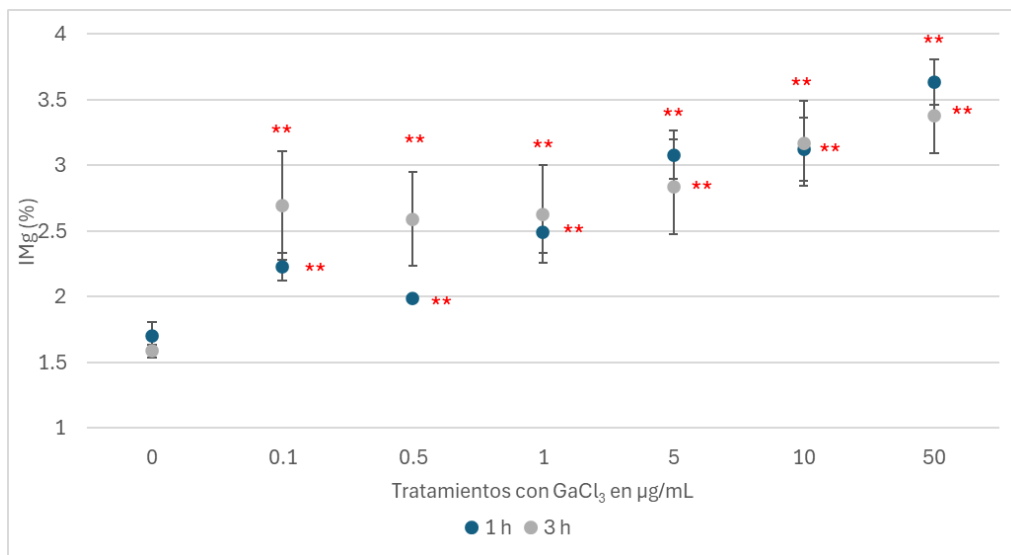


FIGURA 4. Índice de migración (IMg) del ADN con la prueba de EUG pH >13 de los linfocitos humanos tratados con 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 µg/mL de GaCl₃ durante 1 y 3 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. ** p < 0.01, comparado con el testigo (ji-cuadrada).

CUADRO IV. DAÑO EN EL ADN DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 1 Y 3 H CON GaCl₃ EVALUADO POR ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL A pH > 13.

Concentración de GaCl ₃ en µg/mL	1 h		3 h	
	Longitud del cometa (µm)	IMg (%)	Longitud del cometa (µm)	IMg (%)
Donador 1				
0 (testigo)	20.92 ± 0.22	1.38 ± 0.02	21.81 ± 0.05	1.56 ± 0.02
0.1	36.40 ± 0.67 **	2.28 ± 0.26 **	84.78 ± 0.64 **	2.44 ± 0.09 **
0.5	31.82 ± 0.40 **	2.00 ± 0.00 **	64.42 ± 0.58 **	3.71 ± 0.15 **
1	43.12 ± 0.58 **	2.62 ± 0.12 **	78.58 ± 1.71 **	3.80 ± 0.18 **
5	55.98 ± 1.09 **	3.22 ± 0.18 **	83.51 ± 1.43 **	3.95 ± 0.05 **
10	63.32 ± 1.20 **	3.52 ± 0.28 **	96.52 ± 0.84 **	4.00 ± 0.00 **
50	81.66 ± 1.08 **	4.00 ± 0.00 **	116.12 ± 0.91 **	4.00 ± 0.00 **
H ₂ O ₂	75.54 ± 0.80 **	3.99 ± 0.01 **	86.80 ± 0.86 **	4.00 ± 0.00 **
Donador 2				
0 (testigo)	23.86 ± 0.26	1.80 ± 0.00	20.78 ± 0.27	1.63 ± 0.19
0.1	35.08 ± 0.59 **	2.24 ± 0.24 **	24.84 ± 0.17 *	2.00 ± 0.00 *
0.5	29.02 ± 0.91 *	1.97 ± 0.05 **	31.54 ± 0.31 **	2.00 ± 0.00 *
1	33.94 ± 0.44 **	2.04 ± 0.04 **	33.32 ± 0.33 **	2.01 ± 0.01 *
5	42.96 ± 1.02 **	2.55 ± 0.11 **	42.32 ± 0.88 **	2.53 ± 0.01 **
10	40.12 ± 0.42 **	2.40 ± 0.04 **	56.36 ± 0.62 **	3.24 ± 0.24 **
50	52.74 ± 0.71 **	3.10 ± 0.08 **	68.78 ± 1.69 **	3.62 ± 0.00 **
H ₂ O ₂	108.48 ± 1.54 **	3.99 ± 0.01 **	88.52 ± 1.36 **	3.97 ± 0.03 **
Donador 3				
0 (testigo)	21.28 ± 0.21	1.93 ± 0.01	23.66 ± 0.20	1.57 ± 0.01
0.1	31.76 ± 0.45 **	2.17 ± 0.19 **	36.50 ± 0.83 **	2.08 ± 0.08 **
0.5	34.14 ± 0.39 **	2.00 ± 0.00 **	32.02 ± 0.26 **	2.06 ± 0.04 **
1	35.90 ± 0.39 **	2.81 ± 0.21 **	46.30 ± 0.77 **	2.08 ± 0.04 **
5	36.36 ± 0.25 **	3.47 ± 0.05 **	60.90 ± 1.03 **	2.03 ± 0.03 **
10	40.44 ± 0.58 **	3.44 ± 0.08 **	65.38 ± 1.97 **	2.26 ± 0.00 **
50	41.78 ± 0.50 **	3.80 ± 0.06 **	81.44 ± 1.95 **	2.51 ± 0.11 **
H ₂ O ₂	108.60 ± 1.53 **	4.00 ± 0.00 **	78.16 ± 0.87 **	3.98 ± 0.02 **
Medias de los experimentos				
0 (testigo)	22.01 ± 0.15	1.70 ± 0.10	22.09 ± 0.15	1.58 ± 0.05
0.1	34.40 ± 0.35 **	2.23 ± 0.10 **	48.63 ± 1.53 **	2.69 ± 0.41 **
0.5	31.66 ± 0.37 **	1.99 ± 0.01 **	42.65 ± 0.92 **	2.59 ± 0.35 **
1	37.64 ± 0.35 **	2.49 ± 0.15 **	52.73 ± 1.24 **	2.63 ± 0.37 **
5	45.07 ± 0.68 **	3.08 ± 0.18 **	62.28 ± 1.14 **	2.83 ± 0.36 **
10	47.93 ± 0.78 **	3.12 ± 0.24 **	72.72 ± 1.24 **	3.16 ± 0.32 **
50	58.67 ± 1.07 **	3.63 ± 0.17 **	88.72 ± 1.47 **	3.37 ± 0.28 **
H ₂ O ₂	97.57 ± 1.18 **	3.99 ± 0.00 **	84.47 ± 0.66 **	3.98 ± 0.01 **

H₂O₂, peróxido de hidrogeno como control positivo 25 µM por 10 min. IMg, índice de migración.

Los datos se representan con la media ± error estándar de la media de 100 células por tratamiento de cada donador.

* p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el testigo.

En el **Cuadro V** se presentan los datos obtenidos de los tratamientos con GaCl₃ utilizando la electroforesis unicelular en gel en condiciones neutras. Se evaluaron 100 cometas por tratamiento de cada donador, 300 datos en promedio. Los datos obtenidos en la longitud de los cometas y del IMg por donador muestran incremento conforme a la concentración de GaCl₃, efecto que se aprecia en el promedio de los datos en la **Figura 5** y **Figura 6**; donde la longitud del cometa de los linfocitos expuestos con 1 µg/mL de GaCl₃ oscilan en los 30.87 µm, mientras que los linfocitos tratados con 10 µg/mL de GaCl₃ están en los 38.39 µm (p < 0.01) con respecto a 23.50 µm del grupo testigo.

CUADRO V. DAÑO EN EL ADN DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 3 H CON GaCl₃ EVALUADO CON ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL A pH 9.

Concentración de GaCl ₃ en µg/mL	3 h	
	Longitud del cometa (µm)	IMg (%)
Donador 1		
0 (testigo)	21.10 ± 0.18	1.59 ± 0.18
1	23.96 ± 0.23 *	1.92 ± 0.23 **
10	26.24 ± 0.50 **	1.94 ± 0.50 **
H ₂ O ₂	54.94 ± 00.30 **	3.09 ± 0.30 **
Donador 2		
0 (testigo)	24.76 ± 0.15	1.99 ± 0.15
1	29.52 ± 0.35 *	2.00 ± 0.35
10	38.20 ± 0.23 **	2.38 ± 0.23 **
H ₂ O ₂	55.40 ± 0.52 **	3.13 ± 0.52 **
Donador 3		
0 (testigo)	24.66 ± 0.25	1.91 ± 0.25
1	39.14 ± 0.34 **	2.22 ± 0.34 **
10	50.74 ± 0.64 **	2.95 ± 0.64 **
H ₂ O ₂	56.22 ± 0.47 **	3.06 ± 0.47 **
Medias de los experimentos		
0 (testigo)	23.50 ± 0.15	1.83 ± 0.12
1	30.87 ± 0.40 **	2.04 ± 0.08 *
10	38.39 ± 0.64 **	2.42 ± 0.29 **
H ₂ O ₂	55.52 ± 0.25 **	3.09 ± 0.02 **

IMg, índice de migración; H₂O₂, peróxido de hidrogeno como control positivo 25 µM por 10 min. Los datos representan la media ± error estándar de la media de 100 células por tratamiento de cada donador. * p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el testigo.

En esta electroforesis la evaluación con H₂O₂ muestra aumento en la longitud de los cometas y el IMg, sin embargo, la longitud es menor que en los corrimientos electroforéticos a pH >13, debido a que los rompimientos de cadena doble son más pesados y migran menos.

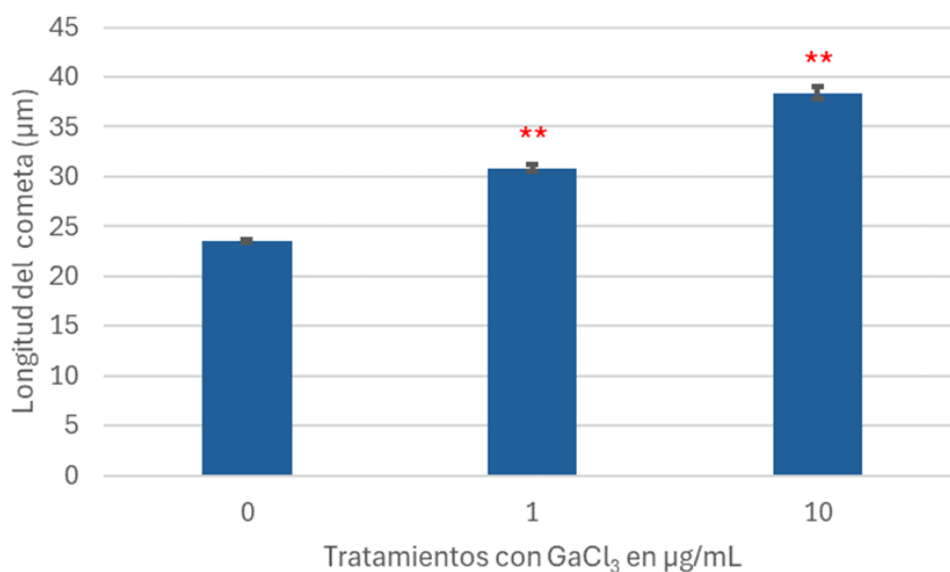


FIGURA 5. Evaluación del daño al ADN con la prueba de EUG a pH 9. Longitud de daño de ADN (■) de linfocitos humanos tratados con 0 (testigo), 1 o 10 μg/mL de GaCl₃ durante 3 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. ** p < 0.01 comparado con el testigo (ANOVA-Dunnett).

7.4 Análisis de Daño en el ADN a pH > 13 con la Enzima Fpg

Los resultados del análisis de daño en el ADN de los linfocitos humanos tratados 0, 0.1, 1 o 10 μg/mL durante 1 h con GaCl₃ evaluado por la electroforesis unicelular en gel a pH >13 y enzima de restricción Fpg se muestran en el **Cuadro VI**. Los parámetros de daño evaluados fueron la longitud del cometa, longitud de la cauda e IMg.

La Fpg detecta y escinde las bases oxidadas, las cuales forman sitios AP que bajo condiciones alcalinas se generan rompimientos de cadena sencilla en el ADN. Los datos corresponden a la evaluación de 100 células por donador (300 por concentración de

GaCl₃). En el **Cuadro VI**, se observa que los valores de la longitud del cometa y la cuaa son mayores en presencia de Fpg con respecto a su testigo y a los valores de los núcleos sin enzima, tanto por donador como cuando se analiza la media de los experimentos **Figura 7**, con un comportamiento dependiente de la concentración del compuesto metálico.

Para la prueba con enzima el IMg aumenta de 1.98 de testigo hasta 3.32 de la concentración de 10 µg/mL en tanto que la prueba sin enzima los valores son de 1.64 y de 2.72, respectivamente (**Cuadro VI, Figura 8**), lo que demuestra que en los testigos este aumento se debe a la actividad oxidante propia de la célula, denominado daño endógeno o basal. Con respecto a los tratamientos de H₂O₂ los datos de los parámetros evaluados de la prueba con Fpg y sin enzima no muestran cambios considerables (por ejemplo, el IMg sin enzima 3.99 vs. 3.99 con Fpg). Esto se debe a que el H₂O₂ genera estrés oxidante y consecuentemente daño en las cadenas de ADN y oxidación de bases, por lo tanto, el daño evaluado con y sin enzima se enmascara.

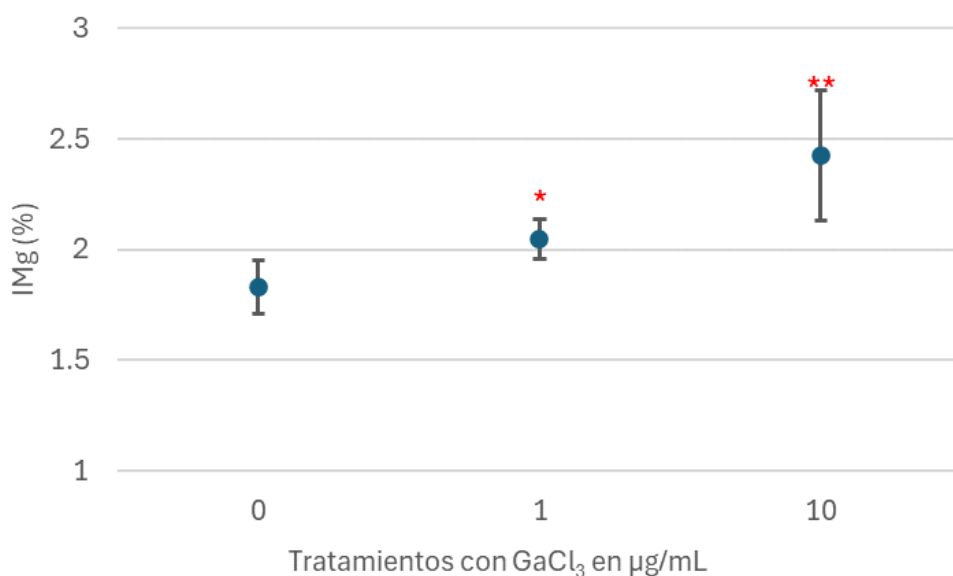


FIGURA 6. Índice de migración (IMg) del ADN con la prueba de EUG pH 9 de los linfocitos humanos tratados con 0, 1 o 10 µg/mL de GaCl₃ durante 3 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. * p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el testigo (ji-cuadrada).

CUADRO VI. DAÑO EN EL ADN DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS DURANTE 1 H CON GaCl₃ EVALUADO POR ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL CON FPG.

Concentración de GaCl ₃ en µg/mL	1 h					
	Longitud del cometa (µm)		Cauda (µm)		IMg (%)	
	Sin Fpg	Con Fpg	Sin Fpg	Con Fpg	Sin Fpg	Con Fpg
Donador 1						
0 (testigo)	27.12 ± 0.24	26.50 ± 0.23	0.16 ± 0.05	0.58 ± 0.09	2.00 ± 0.24	2.00 ± 0.23
0.1	29.50 ± 0.25	43.96 ± 0.34 **	3.86 ± 0.15 *	24.72 ± 0.28 **	2.00 ± 0.25	2.83 ± 0.34 **
1	38.30 ± 0.32 **	65.06 ± 0.46 **	13.50 ± 0.18 **	41.86 ± 0.43 **	2.19 ± 0.32 *	3.80 ± 0.46 **
10	46.52 ± 1.63 **	86.58 ± 0.64 **	20.84 ± 1.60 **	63.86 ± 0.63 **	2.93 ± 0.27 **	4.00 ± 0.64 **
H ₂ O ₂	75.54 ± 0.80 **	86.85 ± 0.85 **	56.30 ± 0.72 **	65.76 ± 0.82 **	3.99 ± 0.80 **	4.00 ± 0.85 **
Donador 2						
0 (testigo)	20.76 ± 0.11	27.00 ± 0.17	0.04 ± 0.02	0.28 ± 0.06	1.40 ± 0.11	2.00 ± 0.17
0.1	23.50 ± 0.19 *	35.06 ± 0.27 **	2.66 ± 0.16 *	7.84 ± 0.20 **	1.94 ± 0.19 **	2.04 ± 0.27 **
1	30.92 ± 0.25 **	35.38 ± 0.56 **	9.56 ± 0.21 **	11.20 ± 0.45 **	3.00 ± 0.25 **	2.16 ± 0.56 **
10	36.04 ± 0.28 **	39.68 ± 0.28 **	14.96 ± 0.23 **	17.52 ± 0.22 **	3.00 ± 0.28 **	3.00 ± 0.28 **
H ₂ O ₂	108.48 ± 1.54 **	108.48 ± 1.54 **	87.10 ± 1.52 **	87.10 ± 1.52 **	3.99 ± 1.54 **	3.99 ± 1.54 **
Donador 3						
0 (testigo)	21.20 ± 0.19	31.62 ± 0.32	0.02 ± 0.02	0.18 ± 0.05	1.53 ± 0.19	1.96 ± 1.53
0.1	24.40 ± 0.20 *	41.74 ± 0.42 **	2.28 ± 0.11 *	11.08 ± 0.26 **	1.98 ± 0.20 **	2.70 ± 0.98 **
1	27.32 ± 0.34 *	47.56 ± 0.52 **	5.76 ± 0.34 **	18.92 ± 0.35 **	2.00 ± 0.34 **	2.88 ± 1.18 **
10	35.82 ± 0.57 **	48.84 ± 0.48 **	17.08 ± 0.38 **	29.16 ± 0.36 **	2.25 ± 0.57 **	2.96 ± 1.34 **
H ₂ O ₂	108.60 ± 1.55 **	108.60 ± 1.55 **	87.14 ± 1.53 **	87.14 ± 1.53 **	3.99 ± 1.55 **	3.98 ± 1.52 **
Medias de los experimentos						
0 (testigo)	23.03 ± 0.20	28.37 ± 0.19	0.07 ± 0.02	0.34 ± 0.04	1.64 ± 0.18	1.98 ± 0.01
0.1	25.80 ± 0.19 **	40.25 ± 0.29 **	2.93 ± 0.09 *	14.54 ± 0.44 **	1.97 ± 0.01 **	2.52 ± 0.24 **
1	32.18 ± 0.31 **	49.33 ± 10.76 **	9.60 ± 0.23 **	23.99 ± 0.79 **	2.39 ± 0.30 **	2.94 ± 0.47 **
10	39.42 ± 0.33 **	58.36 ± 11.20 **	17.09 ± 0.19 **	36.84 ± 1.16 **	2.72 ± 0.23 **	3.32 ± 0.34 **
H ₂ O ₂	97.54 ± 1.18 **	101.29 ± 0.98 **	76.84 ± 1.13 **	80.00 ± 0.096 **	3.99 ± 0.00 **	3.99 ± 0.00 **

Fpg, formamidopirimidin ADN-glicosilasa; IMg, índice de migración; H₂O₂, control positivo 25 µM 10 min. Los datos representan ± error estándar de la media de 100 células por tratamiento de cada donador. * p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el testigo.

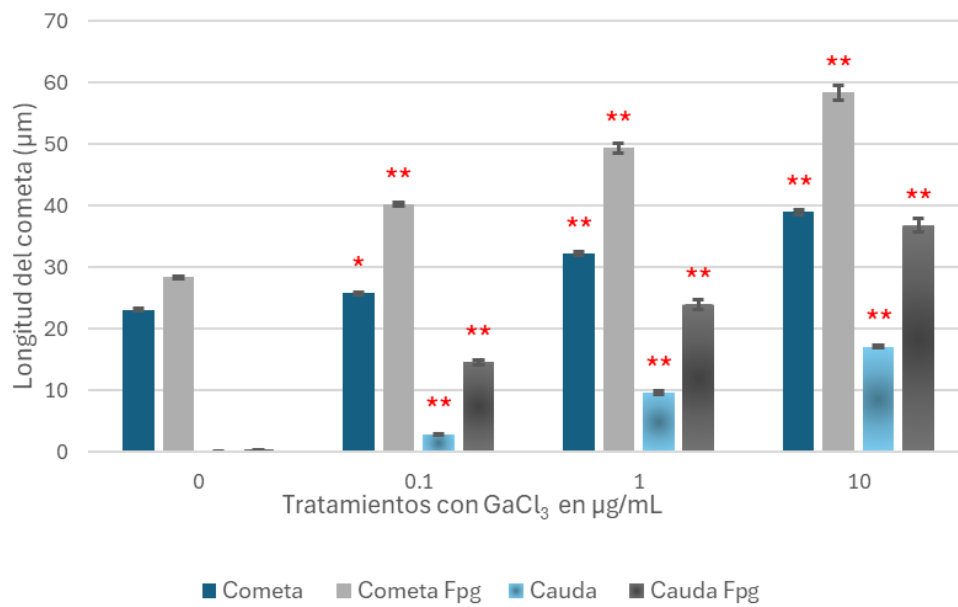


FIGURA 7. Evaluación del daño por oxidación de bases en el ADN con la prueba de EUG y la enzima Fpg. Longitud del cometa y cauda sin enzima (■) y con Fpg (■) de linfocitos humanos tratados con 0 (testigo), 0.1, 1, o 10 µg/mL de GaCl₃ durante 1 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. * p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con su testigo (ANOVA-Dunnnett).

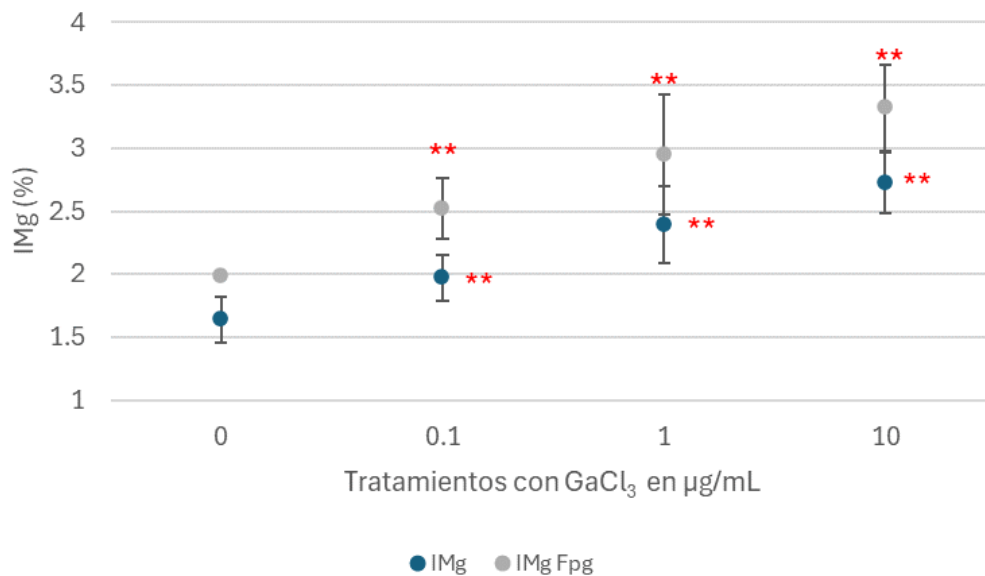


FIGURA 8. Índice de migración (IMg) del ADN con la prueba de EUG y Fpg de los linfocitos humanos tratados con 0, 1 o 10 µg/mL de GaCl₃ durante 1 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada experimento realizado por duplicado. ** p < 0.01 comparado con el testigo (ji cuadrada).

8. DISCUSIÓN

El Ga tiene múltiples usos industriales y su liberación al ambiente ha ocasionado que sus niveles se incrementen y sea considerado un contaminante emergente y consecuentemente ha ocasionado que la población este expuesta de manera constate a este metal (Chitambar *et al.*, 2006; Yang y Chitambar 2008). Además, es considerado antineoplásico por disminuir la proliferación celular, lo que lo ha colocado como candidato en terapia contra el cáncer (Sun, *et al.*, 2023). Sin embargo, uno de los mecanismos por los que ejerce su toxicidad están relacionados con la competencia por los sitios de unión al Fe y la producción de estrés oxidante. Por lo que, el objetivo de este estudio se centró en determinar el daño en el ADN por RCS, RCD, sitios álcali lábiles y oxidación de bases inducidos por GaCl₃.

La tinción dual de CFDA y BE permite conocer la alteración en la permeabilidad de la membrana celular y al mismo tiempo la actividad metabólica de la célula. Los resultados de viabilidad de los linfocitos humanos cultivados y tratados 1 o 3 h con 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 µg/mL de GaCl₃ no mostraron cambios, lo que indica que este compuesto no induce citotoxicidad en tiempos cortos de exposición. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chang *et al.* (2003), quienes en células mononucleares de sangre periféricas humana encontraron que el GaCl₃ no induce toxicidad celular a concentraciones bajas (1 o 10 µg/mL) con la prueba de sales de tetrazolio (XTT) en tratamientos de 72 h, pero sí disminuye la viabilidad hasta 60 % en concentraciones de 50 y 100 µg/mL. También, concuerdan con los resultados de Perchellet *et al.* (1999) quienes evaluaron la viabilidad con sales de tetrazolio en células L1210 tratadas con el mismo compuesto en distintos periodos de exposición a concentraciones de 16 a 625 µM (se aproximan a las concentraciones trabajadas 1 µg/mL y superan 50 µg/mL de GaCl₃, respectivamente) donde después de 48, 72 y 96 h se redujo la viabilidad 24 % a partir de 100 µM, 82 % a partir de 40 µM y 94 % a partir de 16 µM. Lo anterior, aunado a los resultados encontrados en este trabajo, indican que el GaCl₃ no modifica la viabilidad celular en tiempos menores a 24 h de exposición en concentraciones de 0.1 a 50 µg/mL en linfocitos humanos y otras líneas celulares.

Cuando se realizan determinaciones de daño al ADN con la prueba de EUG, se recomiendan realizar pruebas de viabilidad para evitar falsos positivos (Collins, *et al.*, 2023) y se requiere que los valores sean superiores al 80 %. Esto, debido a que durante el proceso de muerte celular se pueden generar rompimientos en el ADN (Tice, *et al.*, 2000).

En el análisis de daño en el ADN a pH > 13, las condiciones electroforéticas permiten que se desenrolle el material genético y el daño observado, la longitud del cometa, es producto de diferentes tipos lesiones en el ADN ya sean RCS, RCD, sitios donde ocurrió reparación y sitios álcali lábiles (sitios AP). Sin embargo, bajo las condiciones de pH > 13 estas lesiones, de manera general, son consideradas RCS y los datos obtenidos revelaron que el GaCl₃ inducen daño en el ADN el cual aumenta conforme a la concentración y tiempo de exposición, alcanzando los valores más altos de daño en la concentración de 50 µg/mL.

A diferencia de la electroforesis a pH > 13, en la versión a pH 9 el material genético no se desnaturaliza, por lo que se evalúan exclusivamente daño de cadena doble. Las condiciones de electroforesis deben ajustarse lo más cercano a la neutralidad, para no romper los puentes de hidrógeno formados entre las bases nitrogenadas y de esta manera mantener la condición de doble cadena del ADN y no afectar el estado de la molécula (Olive y Banáth, 2006). Además, en esta versión se dan tratamientos con RNAasas y proteinasas para hacer más sensible la metodología y asegurar que solo migren, durante la electroforesis, los rompimientos de ADN de doble cadena (Povirk, *et al.*, 1977; Murillo-Chinchilla, 2005). En este estudio, se encontró que el GaCl₃ induce RCD en concentraciones bajas, desde 1 µg/mL. El daño de cadena doble se considera indicador mutagénico importante. Debido a que si llegara a fallar la maquinaria encargada de reparar dicho daño puede traducirse como material incompleto o en otro caso transcribiese de manera errónea y alterar el código genético (Alberts, *et al.*, 2002).

Un posible mecanismo que está detrás del daño en el ADN por RCS y RCD, es por la inducción de estrés oxidante. El análisis de la EUG modificado con la enzima Fpg, enzima que cataliza la escisión de purinas oxidadas en el ADN, revelo en los linfocitos que los tratamientos con GaCl₃ conducen a la formación de bases oxidadas en el ADN, en

concentraciones tan bajas como 0.1 µg/mL. Además, incrementa el daño oxidante de manera dependiente de la concentración como lo reveló el IMg. De acuerdo con los resultados y con la finalidad de obtener una aproximación más certera del incremento del daño por bases oxidadas, en la **Figura 9** se muestra la estimación de este daño, lo que sugiere que parte del daño en el ADN que induce el Ga es de manera indirecta, posiblemente incrementando las especies reactivas de oxígeno y consecuentemente aumentando la oxidación de bases como la 8-OxoG, que es la base purina más frecuentemente formada por estrés oxidante. Es importante resaltar que el Ga ejerce daño en el ADN en concentraciones no citotóxicas.

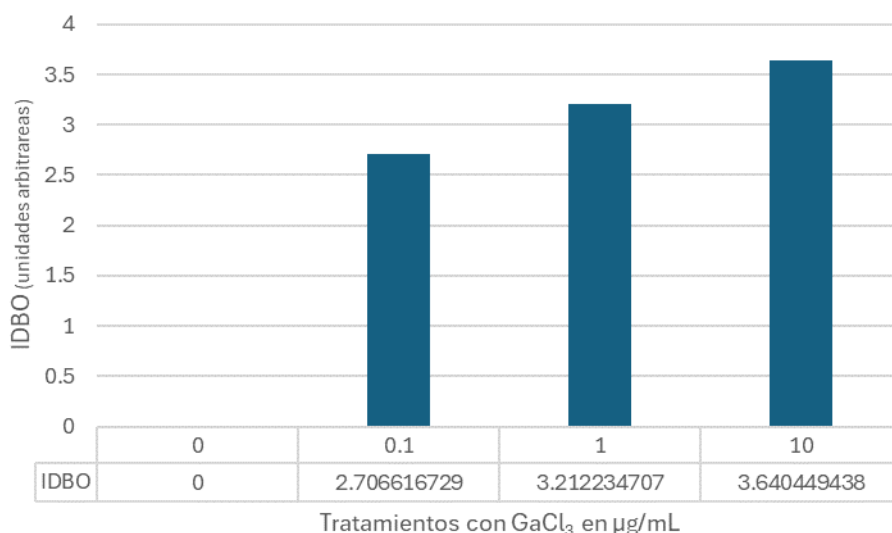


Figura 9. Estimación del incremento de daño en el ADN ocasionado por la oxidación de bases en los distintos tratamientos de GaCl₃. Se calculó el índice de daño por bases oxidadas (IDBO) mediante la resta del valor de los testigos y el valor de daño inducido por el GaCl₃ (con y sin enzima), el cual deja únicamente el valor del daño en el ADN detectado por la enzima Fpg. IDBO = (control con Fpg - control sin enzima) / (tratamiento con Fpg - tratamiento sin enzima).

La causa de la oxidación de bases en el ADN puede estar relacionada con la competencia del catión Ga³⁺ por los sitios de unión al Fe (Sun, *et al.*, 2023). Esto quizás esté ocasionando que quede más Fe³⁺ libre en el citosol, el cual está disponible para entrar en la reacción Fenton y producir de esta manera aumento de especies reactivas de

oxígeno, que son las que producen el estrés oxidante y por consecuencia la oxidación de las bases del ADN.

El estrés oxidante probablemente sea el responsable de varios de los efectos tóxicos del Ga, como lo muestran los estudios de Kelso *et al.* (2001), Chitambar *et al.* (2006) y Yang y Chitambar (2008), quienes encontraron que el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en células CCRF-CEM a concentraciones de 25 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h, que con el ensayo de microarreglos evidenciaron la expresión de metalotioneína-2A (MT2A) y hemo oxigenasa-1 (HMOX-1) en 2.8 y 11 veces, y también aumento de la fluorescencia de la diclorodihidrofluoresceína y disminución del 40 % en los niveles de glutatión reducido (GSH) y de la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en 70 %. Si la respuesta antioxidante baja, aumentan los oxidantes que tienen la capacidad de oxidar las biomoléculas y por tanto oxidar los componentes del ADN. También, es posible que el daño en el ADN observado en los linfocitos humanos tratados con GaCl_3 sea derivado de la detención de la síntesis de ADN, por la inhibición de la enzima RnR, responsable de transformar los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Chitambar *et al.*, 1988) y la falta de desoxirribonucleótidos puede interferir con la eficiencia de los mecanismos de reparación de ADN. Además, se conoce que el Ga forma complejos con los nucleótidos Ga-ATP y Ga-CTP (revisado en López Lanuza *et al.*, 2023).

La información sobre la genotoxicidad del Ga en modelos de células humanas y de otros mamíferos es escasa (López-Lanuza *et al.*, 2023). En la literatura se tiene datos de GaAs que es un compuesto elevadamente tóxico, no obstante, está formado por dos elementos considerados peligrosos de manera individual y juntos carcinógenos dentro del grupo 1 (IARC, 2006). Tampoco, hay evidencia de que el GaCl_3 o el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ induzcan intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células V79 de criceto chino expuestas por 28 h a 12.5–50 y 50–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto, respectivamente (Kuroda *et al.*, 1991). De aquí la importancia de este trabajo donde se observó que el GaCl_3 induce daño en el ADN, el cual posiblemente se debe a estrés oxidante revelado por el aumento del daño por bases oxidadas.

9. CONCLUSIONES

Los tratamientos de GaCl₃ con 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 µg/mL en tiempos de exposición de 1 y 3 h en linfocitos humanos aislados *in vitro*:

- a) No modifica la viabilidad en las concentraciones empleadas ni en los tiempos de exposición.
- b) Muestran que el Ga induce daño en el ADN por RCS y por sitios álcali lábiles.
- c) Muestran que el GaCl₃ induce RCD en el ADN en concentraciones bajas, desde 1 µg/mL.
- d) Revelan que la enzima Fpg detectó la formación de bases oxidadas en el ADN, en concentraciones bajas de 0.1 µg/mL.

En general, el Ga en el estado de oxidación +3, tiene potencial genotóxico a través de la inducción de daño en el ADN, el cual posiblemente se debe a estrés oxidante revelado por el aumento en el índice de daño por bases oxidadas. Estos resultados son importantes debido a que aún no hay alguna norma que regule el límite de la exposición al Ga como contaminante emergente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York, Garland Science, pp. 1616.
- Anderson, R. F. (2020). GEOTRACES: Accelerating research on the marine biogeochemical cycles of trace elements and their isotopes. *Annual Review of Marine Science*, 12, 49–85.
- Apostoli, P. (2002). Elements in environmental and occupational medicine. *Journal of Chromatography B*, 778(1–2), 63–97.
- Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., Collins, A. R. (2019). Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24–32.
- Bajpayee, M., Kumar, A. y Dhawan, A. (2019). The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. En: *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*, vol. 1044, pp. 237–257.
- Baran, E. J. (2008). La nueva farmacoterapia inorgánica XIX. Compuestos de galio. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(5), 776–779.
- Bhat, S. A., Hassan, T. y Majid, S. (2019). Heavy metal toxicity and their harmful effects on living organisms—a review. *International Journal of Medical Science and Diagnosis Research*, 3(1), 106–122.
- Bhat, S. A., Hassan, T., Majid, S., Ashraf, R. y Kuchy, S. (2017). Environmental pollution as causative agent for cancer-a review. *Cancer Clinical Research Reports*, 1(3), 1–8.
- Briffa, J., Sinagra, E. y Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691.
- Chang, K. L., Liao, W. T., Yu, C. L., Lan, C. C. E., Chang, L. W. y Yu, H. S. (2003). Effects of gallium on immune stimulation and apoptosis induction in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193(2), 209–217

- Chitambar, C. R. (2016). Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(8), 2044–2053.
- Chitambar, C. R. y Zivkovic, Z. (1987). Inhibition of hemoglobin production by transferrin-gallium. *Blood*, 69(1), 144–149.
- Chitambar, C. R., Matthaeus, W. G., Antholine, W. E., Graff, K. y O'Brien, W. J. (1988). Inhibition of leukemic HL60 cell growth by transferrin-gallium: effects on ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea. *Blood*, 72(6), 1930–1936.
- Chitambar, C. R., Purpi, D. P., Woodliff, J., Yang, M. y Wereley, J. P. (2007). Development of gallium compounds for treatment of lymphoma: gallium maltolate, a novel hydroxypyron gallium compound, induces apoptosis and circumvents lymphoma cell resistance to gallium nitrate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3), 1228–1236.
- Chitambar, C. R., Wereley, J. P. y Matsuyama, S. (2006). Gallium-induced cell death in lymphoma: role of transferrin receptor cycling, involvement of Bax and the mitochondria, and effects of proteasome inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2834–2843.
- Clarke, M. J., Zhu, F. y Frasca, D. R. (1999). Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 99(9), 2511–2533.
- Cline, S. D. y Hanawalt, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 361–373.
- Collins, A. R., Mitchell, D. L., Zunino, A., Wit, J. D. y Busch, D. (1997). UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(2), 152–160.
- Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M. y Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143–151.

- Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D. y Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929-989.
- Combariza, D. (2009). Contaminación por Metales Pesados en el Embalse del Muña y su Relación con los Niveles en Sangre de Plomo, Mercurio y Cadmio y Alteraciones de Salud en los Habitantes del Municipio de Sibaté (Cundinamarca) 2007. Trabajo de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Dušinská, M. y Collins, A. (1996). Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Alternatives to Laboratory Animals*, 24(3), 405–411.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. En: *Anales del sistema sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud, Vol. 26, pp. 141–153.
- Ghosh, L., Adhikari, S. y Ayyappan, S. (2007). Assessment of toxic interactions of heavy metals and their effects on accumulation in tissues of freshwater fish: A review. *Zoology and Ecology*, 25(1), 77–86.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P. y Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45–51.
- Hartwig, A. (2013). Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis?. *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 63–72.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2006). IARC Monographs, Lyon, Francia, Vol. 86, pp. 197.
- Jackson, S. P. y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
- Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., ... y Murphy, M. P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4588–4596.

- Kinuya, S., Li, X. F., Yokoyama, K., Mori, H., Shiba, K., Watanabe, N. y Tonami, N. (2004). Hypoxia as a factor for ⁶⁷Ga accumulation in tumour cells. *Nuclear Medicine Communications*, 25(1), 49–53.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. y Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53–64.
- Kurland, T., Faro, S. N. y Siedler, H. (1960). Minamata disease. The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurology*, 1(5), 370–95
- Kuroda, K., Endo, G., Okamoto, A. y Yoo, Y. S. (1991). Genotoxicity of beryllium, gallium and antimony in short-term assays. *Mutation Research*, 264(4), 163–170.
- Liao, Y. H., Yu, H. S., Ho, C. K., Wu, M. T., Yang, C. Y., Chen, J. R. y Chang, C. C. (2004). Biological monitoring of exposures to aluminium, gallium, indium, arsenic, and antimony in optoelectronic industry workers. *Journal of occupational and environmental medicine*, 46(9), 931-936.
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T. y Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145–153.
- López-Lanuza, A., Mateos-Nava, R. A., Álvarez-Barrera, L. y Rodríguez-Mercado, J. J. (2023). Metales interesantes de la familia III A: contaminación, toxicocinética y genotoxicidad del galio, indio y talio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 39, 171–201.
- Murillo-Chinchilla, A. (2005). Estandarización del protocolo del ensayo del cometa neutro. Uniandes. Última consulta 12/04/2024. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1992/22211>
- Olive, P. L. y Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1, 23-29.
- Perchellet, E. M., Ladesich, J. B., Collery, P. y Perchellet, J. P. (1999). Microtubule-disrupting effects of gallium chloride in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 10(5), 477–488.

- Rabow, L. E. y Kow, Y. W. (1997). Mechanism of action of base release by *Escherichia coli* Fpg protein: role of lysine 155 in catalysis. *Biochemistry*, 36(16), 5084–5096.
- Repetto, G. y del Peso, A. (2012). Gallium, indium, and thallium. *Patty's Toxicology*. John Wiley and Sons Ltd, 6th ed., New York. 257–354.
- Rodríguez-Mercado, J. J. y Altamirano-Lozano, M. A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(4), 173–189.
- Rodríguez-Mercado, J. J. y Altamirano-Lozano, M. A. (2013). Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 369–383.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Hernández-de la Cruz, H., Felipe-Reyes, M., Jaramillo-Cruz, E. y Altamirano-Lozano, M. A. (2015). Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium (I) acetate in human blood cells. *Environmental Toxicology*, 30(5), 572–580.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Mateos-Nava, R. A. y Altamirano-Lozano, M. A. (2011). DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1996–2002.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Mosqueda-Tapia, G. y Altamirano-Lozano, M. A. (2017). Genotoxicity assessment of human peripheral Lymphocytes induced by thallium (I) and thallium (III). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99(5–6), 987–998.
- Singh, N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 111-127.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Sullivan, J. B. y Krieger, G. R. (2001). *Clinical environmental health and toxic exposures*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, EUA. pp.1284.

- Sun, W., Qi, M., Cheng, S., Li, C., Dong, B. y Wang, L. (2023). Gallium and gallium compounds: New insights into the “Trojan horse” strategy in medical applications. *Materials and Design*, 227, 111704.
- Tanaka, A., Maples-Reynolds, N. y Fowler, B. A. (2022). Gallium and gallium semiconductor compounds. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic press, pp. 275–288.
- Tice, R., Aurel, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221.
- Tice, R. y Vasquez, M. (1998). Protocol for the application of the pH> 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Sigma (x-100)*, 503, 465-8353.
- USGS (2021) Gallium. En: Mineral commodity summaries. United States Geological Survey. Reston, Virginia, EUA, pp. 2.
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H. y Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. y Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37–56.
- Yang, M. y Chitambar, C. R. (2008). Role of oxidative stress in the induction of metallothionein-2A and heme oxygenase-1 gene expression by the antineoplastic agent gallium nitrate in human lymphoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(6), 763–772.