



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGO

“Estudio del efecto de la aplicación del fosforo de indio (InP) en células de diferentes órganos de ratones macho de la cepa CD-1, utilizando la técnica de Electroforesis unicelular alcalina, para evaluar el daño al ADN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA:

RAÚL BELTRÁN MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA



México, D.F.

Marzo de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Durante el desarrollo de este trabajo se conto con el apoyo del PAPIIT clave IN 2168093.

*Construir la felicidad es una obligación
Aunque sepamos que construimos
sobre la arena.*

Jorge Luis Borges

Dedicatoria.

A mis padres Raúl y Flor:

No tengo palabras para expresarles el agradecimiento por todo el apoyo y amor que me han dado. Necesitaría mil vidas para retribuirles y aún así sería insuficiente. Dios me premio al tenerlos como mis padres, LOS AMO.

A mi hermana Elizabeth:

Por todos los momentos felices que has traído a mi vida desde que llegaste, porque contigo encontré a una cómplice, una amiga y a la mejor crítica de mi trabajo. Gracias liz por tu cariño incondicional, TE AMO.

A mis Abuelos, Tíos, Primos y Sobrinas, este logro también es un poco de ustedes GRACIAS.

A mis amigos (en estricto orden alfabético) Alfonso, Azucena, Erik, Gabriela, Mario, Marisol, Martha, Mónica, Paula y Selene, por tantas tardes de risas que siempre llevaré gravadas en mi memoria.

Agradecimientos.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por el apoyo, tiempo y paciencia que me brindó durante la elaboración de esta tesis. Ojalá todos los alumnos tuvieran el privilegio de conocer a una persona como usted.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, por sus invaluable revisiones y comentarios del trabajo escrito así como sus enseñanzas durante el quehacer diario en el laboratorio.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano, por permitirme ser parte del laboratorio 5 e inevitablemente del FPFV.

A los miembros del jurado:

PRESIDENTE: M en C. Carlos Bautista Reyes

VOCAL: Dra. Lucila Álvarez Barrera

SECRETARIO: Dr. Mario Altamirano Lozano

SUPLENTE: Biól. Ma. Cristina Alvarado Domínguez

SUPLENTE: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al Biól. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, por ser un gran amigo y compartir un poco de su conocimiento siempre que lo necesitaba.

A las anesthesiólogas de ratón Azucena Trinidad Flores, Michel López Chaparro y Miriam Felipe Reyes por su tiempo y paciencia durante la operación a los animales.

Al Biól. Carlos Zúñiga por la ayuda que siempre me brindó durante las intensas jornadas.

A mis compañeros de laboratorio y muy en especial a Iván, Michel y Karla, por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

Índice

Abreviaturas	1
I. Resumen	2
II. Introducción.....	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 Indio	7
2.2.1 Características generales.....	7
2.2.2 Distribución en la tierra y producción	7
2.2.3 Usos.....	9
2.2.4 Toxicocinética	12
2.2.5 Carcinogénesis	14
2.2.6 Teratogénesis	15
2.2.7 Mutagénesis y Genotoxicidad	16
2.3 Fosforo de indio	17
2.3.1 Características generales.....	17
2.3.2 Obtención.....	17
2.3.3 Usos y exposición.....	17
2.4 Genética toxicológica	17
2.4.1 Electroforesis Unicelular en Gel (EUG)	18
2.5 Ratón como modelo experimental	21
III. Justificación	22
IV. Hipótesis	23
V. Objetivos	24
5.1 General.....	24
5.2 Particulares	24
VI. Material y método.....	25
6.1 Animales.....	25
6.2 Reactivos.....	25
6.3 Ensayos preliminares.....	25
6.4 Tratamiento con fosforo de indio y hemicastración.....	27

6.4.1 Dosis y administración de fosforo de indio a los ratones hemicastrados	27
6.5 Sacrificio.....	28
6.6 Viabilidad celular	29
6.7 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)	29
6.8 Análisis estadístico	31
VII. Resultados.....	32
7.1 Preliminar “A”	32
7.2 Preliminar “B”	33
7.3 Tratamientos con fosforo de indio: peso de animales, índice de peso de los órganos y viabilidad	34
7.3.1 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)	35
VIII. Discusión	46
8.1 Preliminares.....	46
8.2 Tratamiento con fosforo de indio: peso de ratones, índice de peso de los órganos y viabilidad.	47
8.2.1 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)	49
IX. Conclusiones.....	58
X. Referencias.....	59
XI. Anexos	67

Abreviaturas

ADN; Ácido desoxirribonucleico

As; Arsénico

Bi; Bismuto

cc; Centímetro cubico

Cd; Cadmio

DMSO; Dimetil sulfóxido

EDTA; Etilendiamintetracetato

Ga; Galio

Ge; Germanio

HCl; Ácido clorhídrico

Hf; Hafnio

Hg; Mercurio

IARC; International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer)

InAs; Arsenuro de indio

InCl₃; Cloruro de indio (III)

ITO; Indium-tin oxide (Óxido de indio-estaño)

K; Grado kelvin

K⁺; Ion potasio

Kj; Kilo-joule

LD₅₀; Dosis letal media

M; Molar

mg; Miligramo

µg; Microgramo

µL; Microlitro

µm; Micrómetro

Mg⁺²; Ion magnesio

ml; Mililitro

mM; Milimolar

Mo; Molibdeno

Na⁺; Ion sodio

NaCl; Cloruro de sodio

NaOH; Hidróxido de sodio

Nb; Niobio

nm; Nanómetro

Pb; Plomo

Pd; Paladio

pH; Potencial de hidrógeno

ppm; Partes por millón

Pt; Platino

Sb; Antimonio

Se; Selenio

Ta; Tántalo

Te; Telurio

Ti; Titanio

Tl; Talio

Tris; Base trizma

W; Tungsteno

Zr; Circonio

I. Resumen

El indio (In) es un elemento que forma parte del grupo III-A de la tabla periódica. Los compuestos de indio son utilizados en la industria de la fabricación de semiconductores, pantallas de cristal líquido, celdas solares e incluso en aleaciones con otros metales en la odontología, como consecuencia de esto su producción a nivel mundial se ha incrementado. Los antecedentes muestran que el In produce una gran variedad de tipos de daño sobre el pulmón de ratas y ratones además de producir efectos carcinógenos en animales de laboratorio principalmente por la exposición prolongada de partículas en aerosol de fosforo de indio. Es por ello que la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) en 2006 clasificó al indio como probable carcinógeno en humanos, dentro del grupo 2A ó 2B.

En este trabajo se evaluó el efecto producido por la aplicación del fosforo de Indio (InP) sobre el ADN de células de diferentes órganos de ratones macho de la cepa CD-1, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

Se trabajaron cuatro grupos de animales: 0 (testigo), 5, 10 y 20 mg de InP por animal, aplicado vía sonda gástrica y suspendido en 0.3 ml de aceite, por 24 horas. De todos los animales se obtuvieron muestras de sangre de la cola y se hemicastraron antes del tratamiento (testículo derecho), con la finalidad de que cada ratón fuera su propio testigo.

Al sacrificio de los ratones se obtuvo el pulmón, estomago, testículo izquierdo, hígado, corazón y sangre de corazón; los órganos fueron pesados y se obtuvieron muestras para evaluar viabilidad y determinar el daño al ADN. Los resultados encontrados, no mostraron diferencia en los pesos de los animales y de los órganos antes y después del tratamiento. Respecto a la viabilidad celular, en promedio fue mayor al 80% tanto en los grupos tratados como en el testigo.

En el grupo tratado con 5 mg de InP, el número de células con daño de pulmón y testículo (células pequeñas) presentaron incremento significativo, mientras que, en el grupo de 10

mg, el incremento se observó en células de sangre, pulmón y corazón. Para el grupo de 20 mg además de los órganos anteriores también se incrementó el porcentaje de células dañadas obtenidas del hígado. Con las dosis y el tiempo empleado en este trabajo podemos concluir que el fosforo de indio tiene efecto genotóxico y que el número de órganos que presentan células con daño aumenta conforme se incrementa la dosis, sin observarse cambios en el peso de los animales o cambios en la viabilidad de los órganos analizados.

II. Introducción

2.1 Antecedentes

Desde hace más de 10,000 años el hombre conoce las propiedades de los metales, algunos como el plomo, mercurio y probablemente el antimonio, fueron descubiertos antes de los romanos y sus usos fueron extendiéndose, en particular con los alquimistas (Fergusson, 1990). A lo largo de la historia han jugado un papel importante en el desarrollo de las civilizaciones y en la actualidad su incorporación en las nuevas tecnologías ha contribuido substancialmente a mejorar la calidad de vida.

Sin embargo, la intensa actividad industrial, la quema de combustibles y la manufactura de algunos productos tecnológicos provocó que estos incrementaran su concentración, aumentando el riesgo de exposición y con ello la posibilidad de producir daños a la salud humana, además de ser parte de la contaminación ambiental (Cuadro1) (Vercruyssen, 1984).

Cuadro 1. Perturbación del medio ambiente por metales pesados.

Elemento	Escala de perturbación			Almacenado en el ambiente	Toxico a la salud
	Global	Regional	local		
Pb	♣	♣	♣	a, sd, w, h, su	*
As	⌘	♣	♣	a, sd, su, w	*
Cd	©	♣	♣	a, sd, su, w	*
Hg	©	♣	♣	a, sd, su	*
Sb	©	♣	♣	a, sd	*
Se	©	⌘	♣	a	E
Tl	?	?	♣	em, su	(*)
In	?	?	♣	a, su, em	(*)

Abreviaturas y símbolos: ♣ Alta perturbación, ⌘ Posible perturbación, © Alta concentración, ? No existe información; a= aire, sd= sedimentos, w= agua, h= hielo, su= suelo, em= estudios de emisión; * toxico en exceso, E= esencial pero tóxico en exceso, (*) tóxico pero con pocos datos, (Modificado de Fergusson, 1990).

Alrededor de dos terceras partes de los elementos químicos que existen en la naturaleza se clasifican como metales, gran parte de ellos tienen funciones importantes dentro de los organismos como iones inorgánicos esenciales (por ejemplo: Na⁺, K⁺, Mg⁺²) o bien son

esenciales pero tóxicos en concentraciones elevadas como el cobre, selenio, zinc, níquel y cobalto (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999).

Otros como el plomo, mercurio, cadmio o plata se conocen como metales pesados ya que su densidad es mayor a 5 mg/ml, estos elementos poseen las siguientes características: son relativamente abundantes en la superficie terrestre, se extraen y usan en cantidades razonables; las poblaciones tienen contacto con ellos, poseen la capacidad de perturbar significativamente los ciclos biogeoquímicos y son muy tóxicos para los humanos cuando se encuentran en concentraciones elevadas (Fergusson, 1990).

La minería es una de las actividades que incrementa la concentración de los metales en el ambiente, estos contaminan al integrarse a la vegetación que se encuentra en los alrededores del sitio de extracción, de ahí, herbívoros y carnívoros los adquieren, acumulándolos en su organismo y distribuyendo la contaminación con los desechos. Es por ello que dentro de la cadena alimenticia los organismos fotosintéticos son las principales vías de acceso de los metales pesados hacia los animales y de ahí al ser humano (Roberts y Johnson, 1978; Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999).

En la industria se cree que las fábricas altamente automatizadas y con escasa interferencia humana generan nula contaminación del agua, aire o suelo; esta concepción es falsa, ya que existen múltiples ejemplos de daños a la salud (Himmelstein y Levy, 1986). Entre estos se encuentran los grandes volúmenes de químicos generados durante la fabricación de semiconductores y que han sido reconocidos como tóxicos, los cuales incluyen los gases corrosivos de fosfuro, el ácido perclórico; solventes como los glicoles de éter y una gran cantidad de compuestos organometálicos, muchos de los cuales aparecen en formas inusuales, o bien, metales cuyo uso se ha intensificado como es el caso del Ga, Ge, Hf, In, Mo, Nb, Pd, Pt, Ta, Te, Ti, W, y Zr (Clarkson *et al.*, 1988).

La mayoría de estos elementos, suelen entrar a la célula por los mismos sistemas de captación que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999). Por ejemplo, Algunos compuestos del vanadio, cromo, molibdeno, arsénico y selenio con estados de oxidación alto, usan los sistemas de transporte normalmente

utilizados por el fosfato o el sulfato para cruzar la membrana celular, una vez en el interior, inhiben enzimas involucradas en procesos catalíticos importantes (Wetterhahn, 1981). Además, el arsénico y selenio son capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas y los metabolitos de estos metales pueden formar complejos con pequeñas moléculas o ácidos nucleicos y en consecuencia inhibir su capacidad de funcionar correctamente (Wetterhahn, 1981).

En la actualidad el ritmo de vida modifica las necesidades elementales y promueve el remplazo cada vez más acelerado de electrónicos viejos por nuevas tecnologías. Por ejemplo, el remplazo de televisiones que contienen tubos de rayos catódicos por televisiones de plasma y pantallas de cristal líquido. Esto genera una alta cantidad de contaminantes, especialmente el plomo, el cual posee la capacidad para producir cambios en el ambiente y severos efectos en la salud (Lim y Schoenung, 2009).

La necesidad de estos materiales, presenta el enorme reto de entender su toxicidad sobre los organismos y su interacción con el ambiente. Muchos son usados en diversos procesos como los tecnológicos, entre los que destaca el uso cada vez más frecuente del indio.

2.2 Indio

2.2.1 Características generales

El elemento indio (In) forma parte del grupo III-A de la tabla periódica, junto con el aluminio, galio y talio. Es maleable y de color blanco-plateado, tiene muchos usos, pero es empleado principalmente como componente de las pantallas de cristal líquido. Además, es utilizado de manera cada vez más extensa en la fabricación de semiconductores como fosforo de indio (InP) (Jorgenson y George, 2004).

El In fue descubierto en 1863 por Reich y Richter, posee un número atómico de 49 y peso atómico de 114.8 g/mol (Cuadro 2) (Fergusson, 1990) su propiedad más notable es su alta maleabilidad, incluso en temperaturas criogénicas. Este metal no es oxidado por aire a temperaturas normales, no se disuelve con sustancias alcalinas, agua hirviendo, o con la mayoría de ácidos orgánicos aunque, se disuelve en ácidos minerales (Jorgenson y George, 2004). Sus principales estados de oxidación son 1+, 2+ y 3+, solamente los compuestos de In^{3+} son estables en sistemas acuosos (Chagnon, 2005).

El In puede combinarse con metales alcalinos, metaloides, metales preciosos, el grupo del hierro y tierras raras para formar compuestos intermetálicos, así como con elementos no metálicos. Es también una parte importante como dopante en los semiconductores de antimonio (InSb), arsénico (InAs) y fosforo (InP) (Jorgenson y George, 2004). Se conocen 43 isómeros y 24 isótopos de indio. En la naturaleza se encuentran dos isótopos, uno de los cuales, el ^{113}In es muy estable, y el otro, ^{115}In , es ligeramente radioactivo con una vida media de 6×10^5 años (Castronovo y Wagner, 1971; Jorgenson y George, 2004).

2.2.2 Distribución en la tierra y producción

El In es un metal relativamente raro, el promedio de abundancia en la superficie de la tierra es de aproximadamente 0.24 ppm siendo el elemento número 61 en abundancia (Jorgenson y George, 2004; Sinclair *et al.*, 2006). Está presente en el agua de desecho usada durante la refinación y obtención de la mayoría de los metales y como subproducto de la fundición y refinamiento de ciertos sulfuros de zinc, hierro o cobre (Carson *et al.*, 1986).

Cuadro 2. Algunas propiedades físicas relevantes del indio

Símbolo	In
Número Atómico	49
Peso atómico	114.8 g/mol
Resistencia eléctrica	8.37 microhm-cm a 20°C
Densidad	7.31 g/cc a 20°C
Punto de fusión	156.6°C
Punto de ebullición	2080°C
Calor latente de fusión	28.47 KJ/Kg
Calor latente de vaporización	1959 KJ/Kg
Calor específico	0.233 KJ/(Kg*K)
Abundancia relativa de isótopos (% de peso)	
In¹¹³	4.23
In¹¹⁵	95.77

(Tomado de Chagnon, 2005).

La producción mundial de indio se ha incrementado gracias a la importancia económica como elemento incluido en aplicaciones de alta tecnología pues esta ha pasado de 50 toneladas en 1982 a 200 toneladas entre 1995 y 1999, para finalmente ubicarse en un rango más o menos estable de 300 toneladas. En 2002 los mayores productores de este elemento fueron China, Francia, Japón, Canadá, Bélgica, Rusia y Perú con 85, 65, 60, 45, 40, 15 y 5 toneladas, respectivamente (IARC, 2006). Para el año 2007 la demanda mundial de indio ascendió a más de 1300 toneladas (Figura 1).

Tres cuartos de la producción se destinan a la fabricación de películas delgadas de óxido de indio-estaño. Aproximadamente el 80% se da en Japón pero cantidades significativas de este material se producen en China, la República de Corea y Taiwán (Tolcin, 2007).

En América los países productores son Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá y Perú. En México no existe extracción y producción de In, aunque es generado como contaminante en la refinación del zinc, el cual es un metal muy importante para la industria nacional ya que su extracción fue de alrededor 39,101 toneladas en mayo de 2010 (INEGI, 2010).

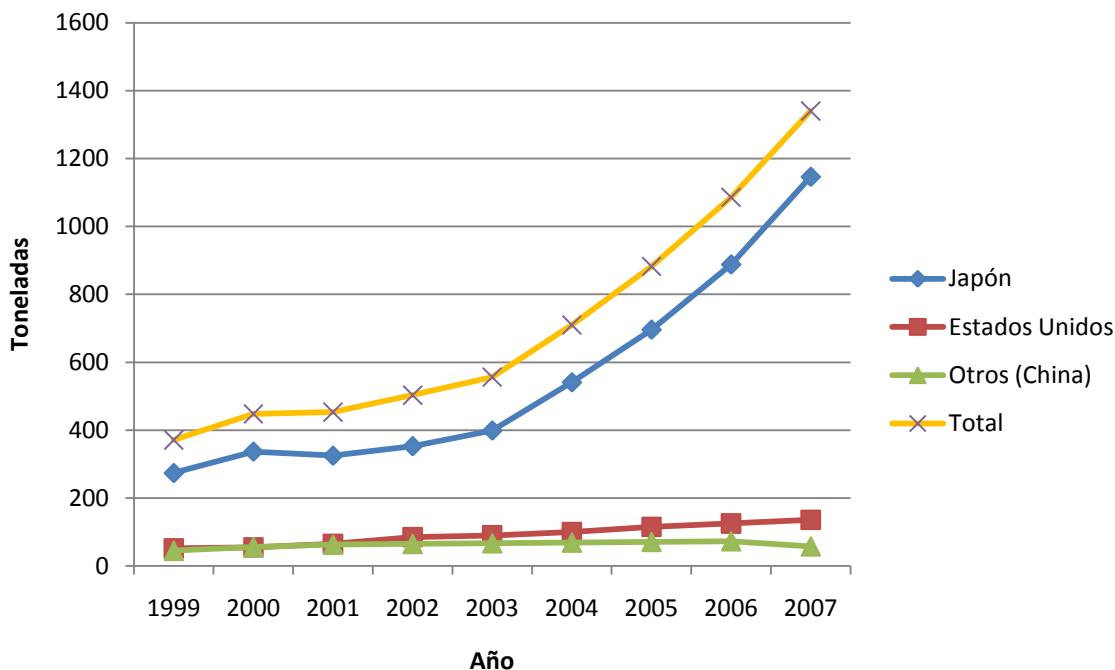


Figura 1. Demanda mundial de indio (1999-2007)

Sin embargo en nuestro país se utilizan diversos productos manufacturados con este metal como en componentes de los celulares, las pantallas de cristal líquido, las computadoras y pantallas de plasma. En 2004 la industria electrónica en México representó 0.9% del valor agregado nacional, 4.8% de la industria manufacturera y empleó 298,000 trabajadores de manera directa. Los principales sectores de la industria electrónica en México son electrónicos de consumo, computadoras personales y equipo de telecomunicación. Más del 75% de las empresas están localizadas en estados fronterizos del norte del país, principalmente en Baja California y Chihuahua (Centro de estudios de competitividad, 2005).

2.2.3 Usos

Las propiedades de enlace del In son únicas y especiales comparado con otros materiales como el vidrio y cerámicos, lo que le permite moldearse fácilmente bajo presión y aún a temperaturas extremadamente bajas, de ahí que sea utilizado en una gran variedad de productos, desde soldaduras y aleaciones, hasta componentes electrónicos y semiconductores (Cuadro 3) (Jorgenson y George, 2004).

2.2.3.1 Soldaduras y aleaciones.

Las aleaciones de In con metales preciosos como la plata mejoran la calidad, reducen las grietas en la estructura e incrementan la resistencia a la fatiga térmica además, inhiben la pérdida de oro en algunos aparatos eléctricos (Jorgenson y George, 2004).

Otras aleaciones como las de indio-antimonio, arsénico y fósforo son usadas en los detectores infrarrojos (Carson *et al.*, 1986). La aleación indio-cadmio-plata forma parte de las varillas de control en los reactores nucleares ya que absorbe los neutrones libres (Fowler, 1986).

La naturaleza dúctil y las propiedades de fundición del In han encontrado uso en las aleaciones con oro y paladio en amalgamas para trabajo dental (Jorgenson y George, 2004).

Cuadro 3. Algunos usos del indio y sus compuestos

Compuesto	Uso	Propósito
Indio (In)	<ul style="list-style-type: none">• Aleaciones en la odontología.• Industria de las soldaduras• Recubrimiento de automóviles• Lámparas de sodio• Otros	Aproximadamente 5% de la aleación es indio Producir soldaduras de alta calidad. Impedir la oxidación Varillas de control nuclear
Óxido de indio (In ₂ O ₃)	<ul style="list-style-type: none">• Vidrio	Usado para dar color. A la luz se obtiene un color café oscuro, dependiendo de la cantidad empleada.
Radioisótopos de indio (¹¹¹ In)	<ul style="list-style-type: none">• Médico	Tratamiento de cáncer y escaneo de órganos.

(Modificado de Marshall, 1991)

2.2.3.2 Pantallas

Gran parte de la producción se destina a la fabricación de óxido de indio-estaño (ITO, *Indium Tin Oxide*). El ITO puede ser parte del vidrio o plástico en forma de delgadas capas, que actúan como un conductor eléctrico transparente o de reflectores infrarrojos. Esta tecnología es utilizada en la manufactura de las pantallas de cristal líquido (LCD, *Liquid Crystal Display*), pantallas de plasma, pantallas táctiles, paneles solares, pantallas de computadora, algunos relojes, teléfonos celulares y ventanas inteligentes (Jorgenson y George, 2004; Tolcin, 2007). Las ventanas de los aviones o parabrisas de los automóviles son cubiertas con óxido de indio-estaño para impedir el empañado y en algunos casos la formación de hielo (Jorgenson y George, 2004).

El óxido de indio posee fuertes propiedades de conductividad eléctrica, reflexión del calor y transparencia. Combinado con 10% de óxido de estaño mejora estas propiedades pero tiene un efecto menor en su transparencia, lo que hace a esta aleación, una excelente película que convierte los datos de forma eléctrica a óptica en las pantallas de plasma y LCD (Jorgenson y George, 2004). Entre otros usos del óxido de indio-estaño se encuentran la incorporación en lámparas de sodio de baja presión y colectores solares (Jorgenson y George, 2004).

2.2.3.3 Semiconductores y componentes electrónicos

El In es usado como un agente dopante en los arsenuros de galio y germanio o en semiconductores de los grupos III-V, con elementos como el antimonio, arsénico y fósforo. El arsenuro-fósforo de indio-galio, indio-antimonio, arsenuro de indio, arsenuro de indio-galio y fósforo de indio se utilizan para la fabricación de semiconductores contenidos en los diodos de emisión de luz (LED, *Light Emit Diode*), para las comunicaciones por fibra óptica y los chips de computadora (Tolcin, 2007).

Además, estos semiconductores son usados en las celdas fotovoltaicas, paneles solares, circuitos integrados optoelectrónicos y fotodetectores. El fósforo de indio ha demostrado tener una alta frecuencia electrónica, mayor que la del silicón o el arsenuro de galio, por lo

que es usado en laser de fibra óptica y detectores de longitud de onda de 1000 nm o más (Jorgenson y George, 2004).

2.2.3.4 Otros usos

En medicina, los radioisótopos de compuestos como el tricloruro de indio o hidróxido de indio son usados en el tratamiento de tumores y escaneo de órganos (Fowler, 1986; Gilbert *et al.*, 1978). Particularmente el ^{111}In es usado en el escáner de leucocitos (Jorgenson y George, 2004). Esta es una prueba de imagen que muestra la distribución de leucocitos en el cuerpo y que puede ser utilizada en regiones anatómicas específicas para detectar inflamación e infección (Jani *et al.*, 2007).

Finalmente los compuestos de indio se incorporan en las baterías alcalinas selladas porque reducen la acumulación de gas hidrógeno y de hecho es una buena forma de remplazar la función de compuestos tóxicos de mercurio (Jorgenson y George, 2004).

2.2.4 Toxicocinética

2.2.4.1 Exposición

La exposición humana a este elemento puede ocurrir durante la elaboración de diferentes compuestos de In, la limpieza y el mantenimiento de los reactores, en la fabricación de semiconductores; en la disposición de desechos en la industria electrónica, como resultado de la utilización de isotopos para el escaneo de órganos y en el tratamiento de tumores (Clarkson *et al.*, 1988; Flora, 2000).

En el ambiente se puede encontrar en los tejidos de plantas y animales destinadas para el consumo humano, aunque este metal está por debajo de los rangos de detección de 0.01 mg/kg. Se ha reportado que algas, pescado y mariscos tienen concentraciones en rango de 0.4-7 y hasta 10-15 mg/kg. El promedio diario de consumo para humanos ha sido estimado en 8 a 10 μg de In por día (Smith, 1978 citado en Fowler, 1986).

El agua es un recurso en el que es poco probable la exposición humana, aunque, los tubos de hierro galvanizado, usados en plomería, pueden contener trazas de este elemento. Las concentraciones en agua de beber no han sido reportadas (Carson *et al.*, 1986).

Elevados niveles en el aire han sido cuantificados en varias localidades como El Paso Texas, Kellogg, Idaho y el oeste de Helena en Montana. Sitios rurales y urbanos en los Estados Unidos de América y Europa frecuentemente tienen 0.04 hasta 0.2 ng de In por metro cúbico. Concentraciones por arriba de 43 ng han sido reportadas en las cercanías de fábricas metalúrgicas (Smith, 1978 citado en Fowler, 1986).

En la industria la principal vía de entrada de los compuestos de In en trabajadores es por inhalación, aunque otra posibilidad es la ingestión accidental de grandes cantidades que puede derivar en toxicidad (Flora, 2000).

2.2.4.2 Absorción y distribución.

La principal vía de entrada de los compuestos de In en las personas expuestas laboralmente es a través del tracto respiratorio (Tanaka *et al.*, 2010^a) donde se ha visto que el principal órgano dañado es el pulmón. Experimentalmente al ser administrado a ratas por vía intratraqueal cerca del 4% de la dosis es absorbida y acumulada también en este órgano, cuando se da por vía oral el In es pobremente absorbido por el tracto gastrointestinal (entre el 0.1 al 2% de la dosis) (Carson *et al.*, 1986; Zheng *et al.*, 1994).

La distribución en los tejidos está ampliamente determinada por su estado de oxidación, la dosis empleada y la ruta de administración (Carson *et al.*, 1986). En ratones inyectados intravenosamente con un radioisótopo (¹¹⁵In) en forma de tricloruro de indio este elemento es transportado en la sangre unido a la transferrina (Castronovo y Wagner, 1973). El In y sus derivados se acumulan en el pulmón, testículo, hígado, bazo, corazón, sistema reticuloendotelial (incluido el sistema linfático) médula ósea y riñón causando daño en los túbulos proximales de las nefronas (Castronovo y Wagner, 1971; Castronovo y Wagner, 1973; Kabe *et al.*, 1996), aunque también se encuentra en pelo y piel en menor concentración (Zheng *et al.*, 1994)

2.2.4.3 Efectos Celulares

A nivel celular, se ha reportado que el indio produce cambios en la estructura del retículo endoplásmico y en su actividad enzimática, esto, después de administrar intravenosamente a ratas 10, 20 y 40 mg de tricloruro de indio y sacrificarlas 16 horas después. Las enzimas del citocromo P-450 hemo-dependientes y otras relacionadas con la ruta del hemo son afectadas por la administración de este elemento (Fowler *et al.*, 1983) al parecer, esto forma parte de la repuesta general de la célula ante el daño por este agente (Woods y Fowler, 1981; Fowler *et al.*, 1983; Conner *et al.*, 1995).

Además los iones de In^{3+} inhiben otras enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de la vía del hemo como la ferroxidasa y la deshidrogenasa. Estos iones también poseen la capacidad de reaccionar con algunos grupos químicos (fosfato, carboxilo y amino) de los fosfolípidos que se encuentran las membranas biológicas y con los grupos fosfato no completamente esterificados en los nucleótidos (Carson *et al.*, 1986).

2.2.4.4 Eliminación

En animales se ha observado que la principal ruta de eliminación es por las heces seguida de la orina, independientemente de la forma química del metal o la vía de administración. El 53% del óxido de indio administrado a ratones vía intravenosa se elimina por las heces, mientras que, el fosforo de indio administrado a ratas vía oral o intratraqueal, cerca del 73% de la dosis se recupera en las heces y solo el 0.02% se elimina en la orina (Zheng *et al.*, 1994). Aunque el indio iónico inyectado intravenosamente es eliminado principalmente por esta última vía (Castronovo y Wagner, 1971).

2.2.5 Carcinogénesis

El In ha demostrado tener efectos carcinógenos en animales de laboratorio principalmente por la exposición prolongada de partículas en aerosol de fosforo de indio. En un estudio de dos años conducido por el Programa Nacional de Toxicología de los EUA con ratas y ratones por inhalación de este compuesto (NTP, 2001) la exposición causó un incremento en la incidencia de carcinomas en los bronquios y alveolos en ratones macho, además de

producir adenomas y carcinomas hepatocelulares y del intestino delgado. En ratas aumentó la incidencia de feocromocitomas malignos en la glándula adrenal, leucemia, así como fibroma de piel y carcinoma en la glándula mamaria de ratas hembra.

Estudios sub-agudos y sub-crónicos con óxido de indio-estaño y fosforo de indio en hámster han demostrado efectos carcinogénicos al incrementar la incidencia de células con hiperplasia alveolar y bronquial, proliferación fibrótica y metaplasia en el pulmón (Tanaka *et al.*, 2002).

Es por ello que la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés, IARC, 2006) ha clasificado al indio como probable carcinógeno en humanos dentro del grupo 2A o 2B debido a que existe evidencia de sus potencial carcinogénico en animales de laboratorio aunque en humanos la toxicidad pulmonar se manifiesta principalmente por neumonía intersticial y proteinosis alveolar no existen datos claros sobre sus posibles efectos carcinogénicos (Tanaka *et al.*, 2002; IARC, 2006, Hamaguchi *et al.*, 2008).

Hasta mayo de 2010 se han reportado 10 casos de daño en el pulmón por la exposición a compuestos de indio (Omae *et al.*, 2010). Siete de estos casos fueron trabajadores japoneses que desarrollaron neumonía intersticial, dos casos de proteinosis alveolar y pulmonar en trabajadores en los Estados Unidos de América y finalmente un trabajador chino que desarrollo proteinosis alveolar. Todos los casos de estudios epidemiológicos indican que la exposición a compuestos solubles de In causa daño intersticial y enfisema en el pulmón, por lo que a estos padecimientos se les da el nombre de “pulmón de indio” (Omae *et al.*, 2010).

2.2.6 Teratogénesis

En hámster hembras al día 8 de gestación Ferm y Carpenter (1970) administraron por vía intravenosa 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 mg/kg de tricloruro de indio, en estos experimentos este compuesto provocó una alta incidencia de malformaciones en las extremidades incluidas fusiones, retraso en el crecimiento y en pocos casos polidactilia.

Chapin *et al.* (1995) determinaron el incremento significativo en muertes intrauterinas de fetos en ratones hembra tratadas con tricloruro de indio (InCl_3). En un estudio comparativo entre ratas y ratones con InCl_3 (Nakajima *et al.*, 2000) se demostró un decremento en el peso y un incremento en las malformaciones gruesas en fetos de ratas, mientras que en ratones, el indio no causó ninguna malformación gruesa pero sí una marcada disminución en el peso fetal. En otro estudio más reciente los mismos autores (Nakajima *et al.*, 2007) trataron ratas preñadas con tricloruro de indio (0.1, 0.2 y 0.3 mg/kg) por una administración intravenosa al día 10 de gestación, el examen de los fetos por la técnica de tinción dual para evaluar las anomalías esqueléticas y del cartílago mostraron incremento significativo en las malformaciones en el esqueleto dependiente de la dosis a partir de 0.2 mg/kg y un aumento en la incidencia de malformaciones del cartílago de las vertebrae, costillas y falanges a la dosis de 0.3 mg/kg.

2.2.7 Mutagénesis y Genotoxicidad

Solo los estudios llevados a cabo por el NTP (NTP, 2001) en ratones B6C3F expuestos por vía inhalación a InP por dos años encontraron el incremento significativo en las mutaciones espontáneas de dos oncogenes (H-*ras* y β -catenina) relacionados con la presencia de cáncer de colon y cáncer hepático.

No existen reportes de los efectos genotóxicos del indio o sus compuestos en humanos, aunque existen algunos en animales de laboratorio.

El NTP realizó experimentos en ratones B6C3F expuestos a partículas en aerosol de InP, los resultados mostraron que las hembras no mostraron incremento en los micronúcleos de eritrocitos policromáticos. En ratones macho, se observó un pequeño incremento, aunque no significativo, en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos (NTP, 2001).

Se han presentado reportes de la genotoxicidad del In a diferentes concentraciones por medio de la técnica de aberraciones cromosómicas (AC) en líneas celulares CHL/IU. Estos

experimentos concluyeron que el metal inducía menos del 5% de aberraciones en cada tratamiento (Asakura *et al.*, 2009).

2.3 Fosforo de indio

2.3.1 Características generales

El fosforo de indio es un cristal cúbico negro con apariencia metálica, posee un punto de fusión de 1070°C y una densidad igual a 4.81 g/cm³. El InP es insoluble en agua, fluidos sintéticos o soluciones salinas pero es ligeramente soluble en ácidos minerales (NTP, 2001; IARC, 2006).

2.3.2 Obtención

El In se combina con muchos elementos no metálicos, incluido fosforo, para formar compuestos semiconductores. El fosforo de indio se obtiene por la combinación directa de sus elementos altamente purificados a elevada temperatura y presión, bajo condiciones controladas (Chagnon, 2005).

2.3.3 Usos y exposición

El InP es un semiconductor y es probablemente el más estudiado, después del silicón y el arsenuro de galio. Este es usado principalmente para la fabricación de dispositivos optoelectrónicos, porque opera con una alta eficiencia y poder. También es usado en la fabricación de diodos laser, LED, transistores de hetero-unión bipolar, la integración optoelectrónica y en celdas solares (IARC, 2006).

La exposición ocurre principalmente en la industria microeléctrica, donde los trabajadores están involucrados en la producción de cristales de fosforo de indio (IARC, 2006).

2.4 Genética toxicológica

La genética toxicológica es el estudio sistemático de cómo los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente afectan el sistema genético de los organismos causando daño al ADN, aberraciones estructurales en los cromosomas o en general

mutaciones en el genoma así como la consecuencia para las futuras generaciones (Andrae y Speit, 2008).

A lo largo de esta disciplina se han desarrollado más de 200 sistemas de prueba, tanto *in vitro* como *in vivo* y dividido en cuatro grupos dependiendo el nivel de detección del daño genético:

- Grupo I: todas aquellas pruebas que detectan posible daño al ADN a nivel molecular, proporcionan información suficiente para clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.
- Grupo II: Incluye las pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de una forma directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismos, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos.
- Grupo III: Son todos aquellos sistemas que permiten establecer los efectos directos o indirectos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.
- Grupo IV: Recopila una serie de ensayos a largo plazo, que hace evidente el efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados (Moutschen, 1985).

Estos sistemas abarcan desde organismos unicelulares simples hasta organismos multicelulares complejos e incluyen sistemas que identifican genotoxicidad en células somáticas y células germinales (Andrae y Speit, 2008).

2.4.1 Electroforesis Unicelular en Gel (EUG)

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas en el campo de la toxicología. Una de ellas es la prueba de Electroforesis unicelular en gel bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$), o “ensayo cometa”, desarrollada por Singh *et al.* (1988), la cual combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para detectar rompimientos de cadena sencilla en el ADN, sitios álcali sensibles y entrecruzamientos con las típicas técnicas de células individuales de los ensayos citogenéticos (Tice *et al.*, 1996).

Östling y Johanson en 1984 fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgel para detectar daño al ADN a nivel de células individuales. En su técnica las células eran embebidas en gel de agarosa, las laminillas eran lisadas con detergentes y una alta cantidad de sales. Así el ADN liberado era sometido a una corriente eléctrica bajo condiciones neutras donde las células con un incremento en los rompimientos de cadena doble, incrementaban la migración hacia el ánodo (Tice *et al.*, 2000).

Posteriormente, Singh *et al.* Introdujeron una técnica en microgel involucrando la electroforesis bajo condiciones alcalinas para detectar daño en células individuales. A este pH se incrementa la migración de los rompimientos de cadena sencilla, rompimientos asociados con sitios incompletos de reparación y sitios alcali sensibles. Dado que la mayoría de los agentes genotóxicos inducen más rompimientos de cadena sencilla o sitios alcali sensibles que rompimientos de cadena doble, esta versión del ensayo ofreció un incremento en la sensibilidad para detectar daño genético (Fairbairn *et al.*, 1995; Tice *et al.*, 2000).

En comparación con otras pruebas de genotoxicidad el ensayo cometa presenta las siguientes ventajas:

1. Ha demostrado sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN.
2. Requiere un número pequeño de células por ensayo (aprox. 10,000 células).
3. Tiene un bajo costo con respecto a las técnicas citogenéticas convencionales.
4. Es fácil de aplicar a prácticamente cualquier tejido, células aisladas y cultivos.
5. Se pueden llevar a cabo estudios con pequeñas cantidades de la sustancia a prueba.
6. El corto periodo de tiempo necesario para completar un ensayo.
7. Los datos obtenidos son a nivel de células individuales.

8. El ensayo puede evaluar daño al ADN en células sin proliferación (Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000).

Durante la metodología de la electroforesis unicelular, un pequeño número de células son suspendidas en una delgada capa de gel de agarosa sobre un portaobjetos esmerilado. Posteriormente las membranas celulares son lisadas por medio de una solución de detergentes con una alta concentración de sales a un pH de 10, después, las laminillas se sumergen en una solución de amortiguadora (pH>13) donde son sujetas a un tiempo denominado de desenrollamiento del ADN y luego se someten a electroforesis, bajo condiciones alcalinas, en donde la corriente eléctrica atrae la carga del ADN de tal manera que lo relaja y los fragmentos migran. Las células con un incremento del daño al ADN, incrementan la migración desde el núcleo hacia el ánodo, con lo cual, este adquiere la forma de un cometa (Figura 1) (Speit y Hartmann, 1999; Fairbairn *et al.*, 1995).

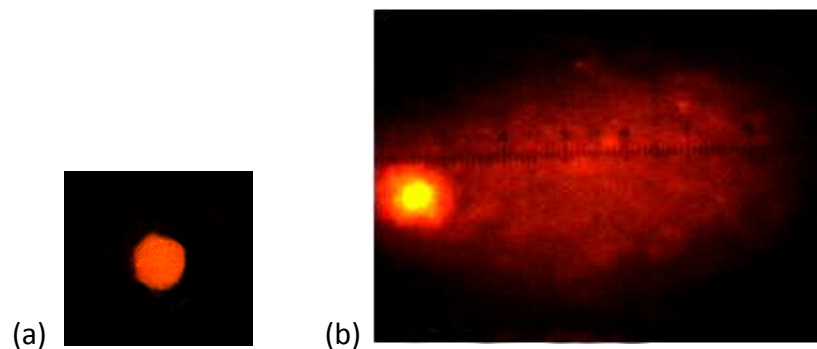


Figura 2. Núcleo de célula sin daño (a) y núcleo de célula con daño (b) la cual toma la forma de cometa. Células pulmonares de ratones tratados con 10 mg de InP y procesadas de acuerdo a la metodología de EUG.

La prueba en general tiene aplicaciones potenciales en ensayos de radiación, reparación por escisión al ADN, entrecruzamientos del ADN, daño oxidativo, apoptosis y genética toxicológica. La gran sensibilidad del ensayo cometa y su habilidad para detectar daño genético en células individuales lo han destinado a convertirse en una herramienta de predicción de genotoxicidad rápida de compuestos de interés. Este sistema puede proporcionar información acerca de la genotoxicidad, así como también da información

sobre la capacidad de un compuesto para alterar la reparación, la cual puede ser tan perjudicial como el inducir un daño directo (Fairbairn *et al.*, 1995).

2.5 Ratón como modelo experimental

La elección de una especie para las pruebas de toxicidad está basada en la consideración de un amplio número de variables. Idealmente, si la prueba de toxicidad es destinada a proveer información de la seguridad o uso seguro de una sustancia en humanos, las especies para analizar deberán ser lo más similar posible en cuanto a su cinética toxicológica (Andress, 1992).

El ratón de laboratorio *Mus musculus* es un mamífero pequeño que tiene una gran cantidad de ventajas como animal de prueba: son pequeños, relativamente baratos, de fácil obtención y manejo, además de tener un periodo de gestación y un ciclo de vida corto (Cuadro 4) (Andress, 1992).

Cuadro 4. Algunos datos biológicos del ratón (*Mus musculus*)

Peso del adulto	Macho 20-40 g Hembra 18-40 g
Número cromosómico (diploide)	40
Tiempo de Vida	1.5-3 años
Pubertad (promedio)	42 días
Tiempo de gestación	19-21 días

(Modificado de Wolfensohn y Lloyd, 1994).

Se han creado un gran número de cepas de este mamífero que actualmente constituyen el 60 al 80% de los animales utilizados en la investigación, gracias principalmente, a los conocimientos que se tienen sobre su fisiología, genética, al fácil manejo y mantenimiento.

III. Justificación

El In es un elemento que forma parte del grupo III-A de la tabla periódica. Los compuestos de este metal son utilizados en la industria de la fabricación de semiconductores, pantallas de cristal líquido, celdas solares e incluso en aleaciones con otros metales en la odontología, como consecuencia de esto su producción a nivel mundial se ha incrementado.

Sin embargo, existen pocos reportes acerca de sus efectos en animales de laboratorio y en humanos, pruebas en modelos *in vivo* con ratas, ratones y hámster expuestos a indio vía inhalación mostraron signos de toxicidad (inflamación pulmonar y fibrosis) así como carcinogénesis. Además la aplicación de estos compuestos produjeron efectos a nivel reproductivo y teratogénicos, entre ellos se encuentran daño a nivel testicular en hámster, disminución en el peso fetal en ratones e incremento en algunos tipos de malformaciones gruesas en ratas.

La exposición ambiental esta poco documentada, sin embargo, la exposición laboral se da principalmente en la industria microelectrónica donde los trabajadores están en contacto con cristales de indio. Hasta el momento se han reportado 10 casos de daño pulmonar por la exposición ocupacional a estos compuestos.

Respecto al daño que este metal puede producir sobre la molécula de ADN es muy escasa la información. Por todo lo anterior en el presente trabajo se evaluó el efecto del fosfuro de indio sobre el ADN de las células de diferentes tejidos y órganos de ratones macho hemicastrados de la cepa CD-1 utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

IV. Hipótesis

El fosforo de indio está catalogado como probable carcinógeno en humanos por la IARC, sin embargo, son pocos los estudios reportados donde se evalúe el efecto del InP sobre el material genético utilizando modelos biológicos de prueba *in vivo* como el ratón. En algunos trabajos con animales de laboratorio el indio mostró toxicidad al inducir inflamación pulmonar, fibrosis y además carcinogénesis. Por lo que se espera que al administrar fosforo de indio a ratón macho de la cepa CD-1 este compuesto produzca un aumento en la toxicidad celular y daño a la molécula de ADN, medido a través de la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

V. Objetivos

5.1 General

- Evaluar el efecto del fosforo de indio sobre el ADN de las células de diferentes órganos y tejidos de ratones macho hemicastrados de la cepa CD-1, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

5.2 Particulares

- Evaluar el efecto producido por la hemicastración, en el número de células con daño y la migración del ADN entre las células sanguíneas y testiculares, al comparar los datos obtenidos antes y después de la cirugía, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina.
- Evaluar la viabilidad en las células de pulmón, sangre, testículo, hígado, estómago y corazón de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía sonda gástrica con 5, 10 ó 20 mg de InP por animal, y evaluado 24 horas después.
- Cuantificar el número de células con daño y estimar la migración al ADN en células sanguíneas y testiculares, utilizando el mismo organismo antes del tratamiento y compararlo con los resultados obtenidos después de la administración de 5, 10 ó 20 mg de fosforo de indio.
- Cuantificar el número de células con daño y estimar la migración al ADN en las células de pulmón, hígado, estómago y corazón de ratón macho de la cepa CD-1, después de la aplicación de 5, 10 ó 20 mg de InP por 24 horas.

VI. Material y método

6.1 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 de dos a tres meses de edad, con un peso de 26.01 hasta 46.1 g, mantenidos bajo condiciones de bioterio y con libre acceso de agua y alimento. Los animales fueron pesados antes y después del tratamiento en una balanza digital (Ohaus, modelo SC2020)

6.2 Reactivos

Para su aplicación, el fosforo de indio (InP, CAS: 22398-80-7 Sigma Chemical Co., Saint Louis MO. EUA, Pureza: 99.998%) fue finamente molido con la ayuda de una varilla de vidrio en un tubo de ensayo.

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis MO. EUA, a excepción del cloruro de sodio, peróxido de hidrógeno y etanol que fueron obtenidos de JT. Baker de México, la solución amortiguadora de fosfatos proporcionada por GIBCO Invitrogen Co. EUA y la heparina obtenida de la Industria farmacéutica Pisa, México.

6.3 Ensayos preliminares

Con el fin de observar el efecto de la hemicastración en el número de células con daño y la migración del ADN se realizaron dos experimentos previos:

Ensayo preliminar "A"

Ratones sin tratamiento y sin introducción de sonda gástrica:

Dos grupos de animales hemicastrados se mantuvieron en reposo por una y dos semanas posteriores a la cirugía (3 animales por periodo de tiempo), al término, se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvo una muestra de sangre por punción cardiaca, además, se extrajo el testículo restante realizando los pasos posteriormente descritos para preparar las láminas para electroforesis (Figura 2).

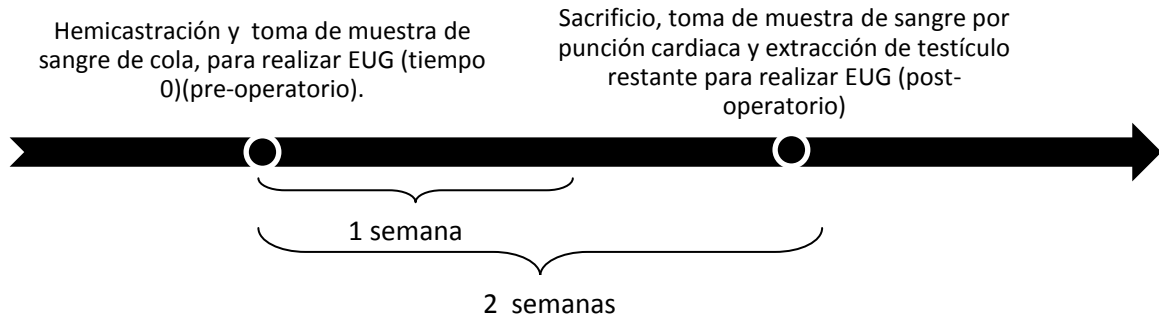


Figura 3. Protocolo preliminar “A” ratones hemicastrados, sin tratamiento y sacrificados 1 y 2 semanas después de la cirugía

Ensayo preliminar “B”

Ratones tratados con agua vía sonda gástrica:

Dos grupos de animales hemicastrados se mantuvieron en reposo por 24 horas, transcurrido este tiempo se administró 0.3 ml de agua por animal vía sonda gástrica. Los animales (3 por grupo) se sacrificaron 24 y 72 horas después de la administración del agua, obteniendo una muestra de sangre por punción cardiaca y una muestra de testículo para realizar las preparaciones para electroforesis unicelular (Figura 3).

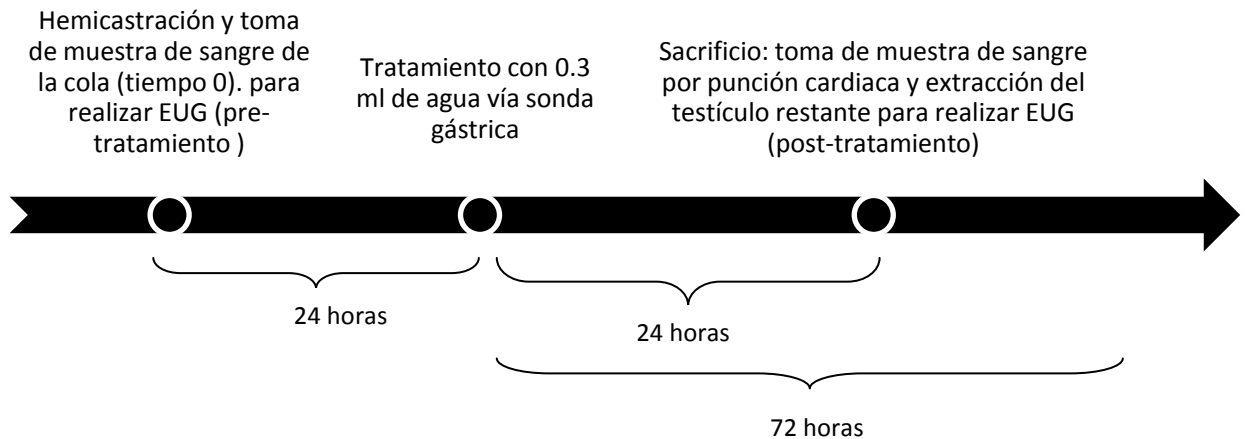


Figura 4. Protocolo preliminar “B” de ratones tratados con agua y sacrificados 24 ó 72 horas después de la administración.

6.4 Tratamiento con fósforo de indio y hemicastración.

Para evaluar el daño basal en células sanguíneas y células germinales, utilizando el mismo organismo antes y después del tratamiento con fósforo de indio, a cada ratón se le tomó una muestra de sangre y se realizó una hemicastración. Para esto, veinticuatro horas antes de iniciar el tratamiento con InP a cada animal se le extrajo una muestra de sangre de cola (50 μ L aproximadamente) la cual se colocó en un tubo eppendorf previamente heparinizado. Se utilizaron 40 μ L para realizar viabilidad y 10 μ L para preparar láminas para electroforesis, por duplicado.

Posteriormente a esta toma de muestra, los animales se sometieron a cirugía para retirar el testículo derecho. En todos los casos el órgano se pesó en una balanza digital y se procedió a macerarlo mecánicamente con tijeras en 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) precalentada a 37°C con el fin de que se obtuviera una suspensión celular la cual, se dejó reposar por 5 minutos en baño maría para que los trozos de tejido más grandes precipitaran. De esta suspensión se tomaron 2 ml que fueron centrifugados a 6000 revoluciones por minuto (rpm) por 6 minutos. Al finalizar, del concentrado celular se tomó una alícuota de 40 μ L para viabilidad y una alícuota de 10 μ L para preparar las láminas de electroforesis por duplicado.

6.4.1 Dosis y administración de fósforo de indio a los ratones hemicastrados

Se utilizaron tres grupos de ratones hemicastrados (6 por cada grupo) a los cuales se les administró 5, 10 ó 20 mg de InP, esto corresponde a 1/16, 1/8 y 1/4 de la LD₅₀ de indio de acuerdo con Asakura *et al.*, 2008. El InP fue suspendido en 0.3 ml de aceite de maíz y aplicado vía sonda gástrica.

Dado que el modelo de ratón como su propio testigo no pudo ser utilizado a los órganos restantes (hígado, pulmón, corazón y estómago) se contó con un grupo testigo vehículo (12 ratones) al los cuales se les tomó una muestra de sangre de cola y se hemicastraron, con estas muestras se realizó viabilidad y láminas para ensayo cometa. Estos animales solo se trataron con 0.3 ml de aceite de maíz vía sonda gástrica (Figura 4).

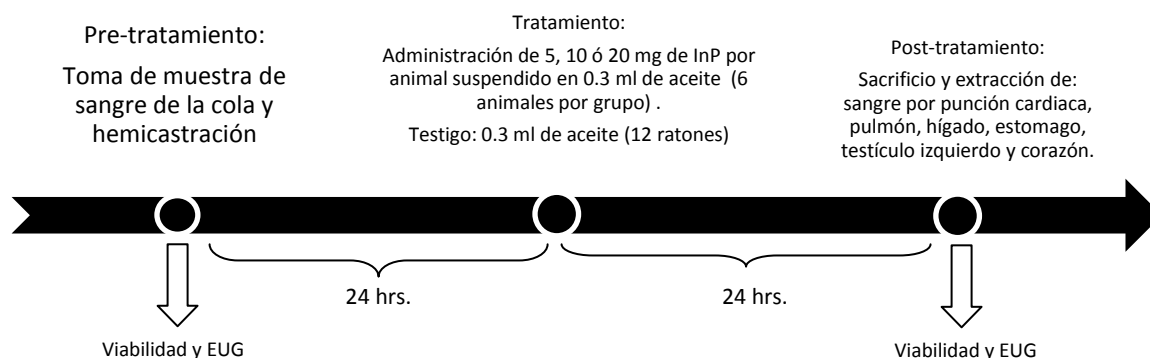


Figura 5. Protocolo de administración de InP en ratones macho CD-1.

6.5 Sacrificio

Luego de 24 horas todos los animales (vehículo y tratamiento) se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvo una muestra de sangre por punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada, las muestras se trataron de igual manera que aquellas obtenidas de la cola, realizando viabilidad y láminas para electroforesis.

El pulmón, corazón, testículo izquierdo e hígado fueron extraídos y pesados en una balanza digital. El peso de los órganos se tomó como un índice porcentual en relación con el peso del organismo en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del animal}} \times 100$$

Los órganos se lavaron en PBS con el fin de retirar el exceso de sangre, al finalizar se colocaron en 3 ml de PBS limpio a 37°C y se maceraron mecánicamente. En el estómago primero se retiró el exceso de alimento y se lavó con PBS antes de macerar.

Todos los órganos se dejaron reposar por 5 minutos en baño maría, para que los trozos de tejido más grandes precipitaran. De la suspensión celular se tomaron 2 ml que fueron

centrifugados a 6000 rpm por 6 minutos. Al finalizar, del concentrado celular se tomó una alícuota de 40 μL para viabilidad y una alícuota de 10 μL para preparar las láminas de electroforesis que se realizaron por duplicado por cada órgano.

6.6 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó según el método de Strauss (1991), para lo cual, inmediatamente después de la obtención de la suspensión celular, se mezclaron 40 μL del botón celular obtenido con 20 μL de una mezcla 1:1 de 5-6 diacetato de carboxifluoroceína (concentración 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y bromuro de etidio (concentración 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta solución se dejó incubar por un periodo de 10 minutos a 37 °C, transcurrido este tiempo, se agregaron 500 μL de PBS y se centrifugaron a 6000 rpm por 6 minutos, al término se eliminó el sobrenadante, este paso se repitió una vez más. Finalmente, del botón celular obtenido se tomó una alícuota de 10 μL y se colocó en un portaobjetos limpio para su observación en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm. Se evaluaron 100 células por órgano y por animal a 400 aumentos, registrando el número de células vivas (fluorescencia verde) y células muertas (fluorescencia naranja).

6.7 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)

Para el ensayo cometa se utilizaron portaobjetos totalmente esmerilados los cuales fueron preparados previamente con una primera capa de agarosa de punto regular de fusión al 1%, esta capa se dejó secar al aire. Posteriormente, 75 μL de una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) fue mezclada con 10 μL de células. Cada laminilla previamente preparada fue cubierta con esta mezcla, colocando un cubreobjetos para distribuirla uniformemente hasta su solidificación (5 minutos a 4°C), cuando el gel solidificó, el cubreobjetos fue retirado y se agregó una tercera capa (75 μL) de agarosa de bajo punto de fusión y se colocó nuevamente un cubreobjetos, dejando solidificar bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Transcurrido este tiempo el cubreobjetos fue retirado y las láminas se sumergieron en una solución de lisis (2.5 M de NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% Triton X-100 y 10% de DMSO pH 10) a 4°C por un periodo de 24 horas.

Después de este tiempo, las láminas se colocaron en una cámara horizontal de electroforesis y fueron cubiertas con una solución buffer de NaOH a pH>13 (10 N NaOH y 200 mM de EDTA). Las laminillas se incubaron en esta solución por un periodo de 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios alcali sensibles, luego, se sometieron a una corriente eléctrica a 25 Volts, 300 miliamperes por 20 minutos. Los pasos anteriores se llevaron a cabo con luz indirecta y a temperatura ambiente. Al finalizar, las láminas fueron lavadas tres veces con una solución neutralizante (0.4 M Tris-HCl pH 7.5) durante 5 minutos en cada cambio y se deshidrataron en etanol al 70 y 96% por 5 minutos. El secado se completó al aire y las preparaciones fueron almacenadas hasta su evaluación.

Durante la realización de la electroforesis unicelular se contó con testigos positivos preparados de la siguiente forma: Una muestra de sangre de la cola o de punción cardiaca (40 μ L) fue colocada en un tubo eppendorf y se mezcló con 300 μ L de PBS precalentado a 37°C, posteriormente la solución se mezcló con 50 μ L de H₂O₂ (concentración 100 mM) por 10 minutos a 4°C. Al finalizar las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 6 minutos y con el botón obtenido se realizaron láminas para electroforesis por duplicado. Se corrieron dos láminas de testigo positivo por ensayo.

Para evaluar el daño al ADN con la electroforesis unicelular las laminillas ya corridas fueron codificadas y se tiñeron con 50 μ L de bromuro de etidio (concentración 20 μ g/ml) para su observación a 400 aumentos en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm.

Para los ensayos preliminares se contó el número de núcleos con daño y la longitud de la migración del ADN, esta última se midió con una escala ocular adaptada a un microscopio de fluorescencia. En los protocolos de tratamiento con fosforo de indio y aceite, además de lo anterior, se clasificó el grado de daño en 5 categorías dependiendo de la relación de la cabeza del cometa y la cola: “sin daño”, aquellos núcleos que no presentaban migración del

ADN; “daño bajo” a la migración de hasta 1 núcleo de largo, “daño medio” migración de hasta 2 núcleos de largo; migración de más de 2 núcleos de largo “daño alto” y cuando virtualmente todo el ADN había migrado a la región de la cola “daño severo” (Altamirano-Lozano *et al.*, 1999; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003).

Por cada ratón y tratamiento se evaluaron en sangre, pulmón, hígado y corazón 100 núcleos, en testículo 120 (60 núcleos de células grandes y 60 de pequeñas) y en estomago 50.

6.8 Análisis estadístico

Para evaluar la viabilidad, el promedio de peso y migración del ADN se utilizó la prueba t de student. Para el número de células con daño se utilizó la prueba Z de diferencia de proporciones mientras que, el grado de daño, fue evaluado con la prueba no paramétrica de rangos para muestras independientes U de Mann-Whitney. A excepción de la prueba Z de diferencia de proporciones, las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa libre en la red SPSS para Windows versión 17.

VII. Resultados

7.1 Preliminar “A”

El cuadro 5 muestra la comparación en el número de células con daño y la migración del ADN de las células sanguíneas y testiculares antes o después de la hemicastración y sin tratamiento. No se observan diferencias en el número de células con daño o en el promedio de la migración del ADN después de una o dos semanas de la cirugía.

Cuadro 5. Número de células con daño y migración del ADN en células sanguíneas y testiculares de ratones sin tratamiento, sacrificados una o dos semanas después de la hemicastración.

Número de animales		Pre-operatorio			Tiempo después de la hemicastración	Post-operatorio		
		Sangre	Testículo			Sangre	Testículo	
			Grandes	Pequeñas			Grandes	Pequeñas
3	Número de células con daño/total de células (%)	1/300 (0.3)	3/180 (1.6)	1/180 (0.5)	1 semana	3/300 (1.0)	0/180 (0.0)	0/180 (0)
	Migración (µm)	0.04 ± 0.62	0.22 ± 1.81	0.11 ± 1.49		0.19 ± 1.93	0.00	0.00
3	Número de células con daño/total de células (%)	2/300 (0.6)	4/180 (2.2)	4/180 (2.2)	2 semanas	4/300 (1.3)	4/180 (2.2)	4/180 (2.2)
	Migración (µm)	0.04 ± 0.58	0.40 ± 2.96	0.55 ± 3.76		0.17 ± 1.68	0.46 ± 3.44	0.35 ± 2.60

El promedio de la migración del ADN está calculado tomando el total de las células revisadas. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. Los resultados están representados por la media ± DE (desviación estándar).

7.2 Preliminar “B”

Los grupos administrados con 0.3 ml de agua por sonda gástrica y sacrificados 24 ó 72 horas después, se presentan el cuadro número 6, donde se observa que en los periodos de tratamiento no existen diferencias significativas en el número de células con daño o en la migración del ADN.

Cuadro 6. Número de células con daño y migración del ADN en células sanguíneas y testiculares de ratones tratados con agua vía sonda gástrica y sacrificados 24 ó 72 horas después de iniciado el tratamiento.

Número de animales		Pre-operatorio			Tiempo después de iniciado el tratamiento	Post-operatorio		
		Sangre	Testículo			Sangre	Testículo	
			Grandes	Pequeñas			Grandes	Pequeñas
3	Número de células con daño/total de células (%)	7/300 (2.3)	3/180 (1.6)	2/180 (1.1)	24 horas	4/300 (1.3)	2/180 (1.1)	5/180 (2.7)
	Migración (µm)	0.23 ± 1.67	0.32 ± 2.60	0.15 ± 1.48		0.11 ± 1.02	0.15 ± 1.53	0.27 ± 1.76
3	Número de células con daño/total de células (%)	4/300 (1.3)	4/180 (2.2)	4/180 (2.2)	72 horas	7/300 (2.3)	2/180 (1.1)	1/180 (0.5)
	Migración (µm)	0.17 ± 1.57	0.41 ± 2.96	0.34 ± 2.45		0.54 ± 3.79	0.24 ± 2.32	0.07 ± 1.04

El promedio de la migración del ADN está calculado tomando el total de las células revisadas. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. Los resultados están representados por la media ± DE (desviación estándar).

7.3 Tratamientos con fosforo de indio: peso de animales, índice de peso de los órganos y viabilidad

El promedio de peso de los animales antes y después del tratamiento así como el índice de peso de los órganos se presenta en el cuadro 7. No existen cambios en el peso de los animales a 24 horas de tratamiento con InP, ni tampoco en el índice porcentual de los órganos. En el caso del testículo y el peso de los animales se comparó antes y después del tratamiento, para los demás órganos esta comparación está dada con el grupo testigo de aceite (0 mg de InP).

Cuadro 7. Índice de peso en órganos y promedio de peso de animales tratados con diferentes dosis de InP.

Número de animales	Pre-tratamiento		Tratamiento en mg de InP por animal	Post-tratamiento				
	Peso de ratón (g)	Índice de peso Testículo		Peso de ratón (g)	Testículo	Hígado	Pulmón	Corazón
12	35.27 ± 7.37	0.35 ± 0.07	0	35.81 ± 7.54	0.33 ± 0.07	4.91 ± 0.74	0.73 ± 0.10	0.48 ± 0.04
6	37.05 ± 2.13	0.32 ± 0.04	5	37.53 ± 2.15	0.31 ± 0.05	5.31 ± 0.73	0.60 ± 0.11	0.50 ± 0.05
6	32.87 ± 6.01	0.34 ± 0.05	10	33.33 ± 6.02	0.32 ± 0.04	4.82 ± 0.43	0.66 ± 0.11	0.48 ± 0.04
6	32.75 ± 7.63	0.39 ± 0.12	20	32.62 ± 8.77	0.39 ± 0.13	3.87 ± 0.67	0.74 ± 0.13	0.49 ± 0.10

Los resultados están representados por la media ± DE (desviación estándar)

El cuadro 8 se presenta el promedio del porcentaje de células viables por órgano en cada uno de los tratamientos con InP. Se observa que en todos los casos el porcentaje de células es mayor a 80, tanto en los grupos tratados como en el control. Las comparaciones estadísticas se realizaron antes y después del tratamiento en el caso de sangre y testículo, para los demás órganos se comparó con el grupo testigo (0 mg de InP, solo aceite), ningún dato mostró diferencia significativa.

Cuadro 8. Porcentaje de células viables por órgano, antes o después del tratamiento con InP.

Número de animales	Pre-tratamiento		Tratamiento en mg de InP por animal	Post-tratamiento					
	Sangre	Testículo		Sangre	Testículo	Estomago	Hígado	Pulmón	Corazón
12	95.37 ± 3.80	90.97 ± 6.12	0	92.50 ± 5.58	80.69 ± 10.01	90.04 ± 4.36	89.72 ± 10.63	83.40 ± 9.82	91.74 ± 7.72
6	95.72 ± 3.56	90.90 ± 4.05	5	93.39 ± 5.16	88.56 ± 3.18	91.77 ± 5.22	80.61 ± 10.60	80.41 ± 5.75	92.09 ± 2.37
6	95.37 ± 4.75	88.28 ± 3.28	10	98.09 ± 2.57	90.83 ± 9.59	93.67 ± 3.98	97.78 ± 1.90	85.55 ± 12.76	94.23 ± 10.34
6	92.58 ± 9.01	88.02 ± 5.92	20	98.52 ± 1.13	86.52 ± 7.48	96.30 ± 2.57	86.72 ± 8.25	94.95 ± 3.71	93.81 ± 5.06

Los resultados están representados por la media ± DE (desviación estándar)

7.3.1 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)

Los cuadros 9, 10 y 11 muestran el número de células con daño y la migración del ADN en los diferentes órganos de ratón macho CD-1 tratados con 0, 5, 10 ó 20 mg de InP por 24 horas.

El cuadro 9 muestra los valores en células sanguíneas en el mismo ratón antes y después del tratamiento de InP. En esta se observa un aumento en el número de células con daño en todas las dosis empleadas, en comparación con los valores obtenidos antes de la aplicación del compuesto. El porcentaje de células con daño y el promedio de la migración del ADN fueron estadísticamente significativos a la dosis 10 y 20 mg.

Cuadro 9. Número de células sanguíneas con daño y migración del ADN antes y después del tratamiento con diferentes dosis de InP

Número de animales		Pre-tratamiento	Tratamiento en mg de InP por animal	Post-tratamiento
6	Número de células con daño/total de células (%)	24/600 (4.0)	5	40/600 (6.6)
	Migración (μm)	0.51±3.56		0.87±3.56
6	Número de células con daño/total de células (%)	12/600 (2.0)	10	25/600 (4.1)*
	Migración (μm)	0.33±2.35		0.68±3.47**
6	Número de células con daño/total de células (%)	10/600 (1.6)	20	28/600 (4.6)*
	Migración (μm)	0.23±1.83		0.87±4.28**

El promedio de la migración del ADN está calculado tomando el total de las células revisadas. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. La migración del ADN esta dada en media ± DE (desviación estándar). * $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento, aplicando la prueba Z de proporciones. ** $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento, aplicando la prueba t de student.

En la cuadro 10 se presenta el número de células con daño y la migración del ADN en células grandes y pequeñas del testículo del mismo ratón antes y después del tratamiento. En este cuadro es posible observar un incremento en el número de células pequeñas con daño estadísticamente significativo a la dosis más baja empleada (5 mg) al igual que con el promedio de migración del ADN, aunque en las dosis consecutivas este incremento ya no se presenta.

Cuadro 10. Número de células testiculares con daño y migración del ADN de ratones CD-1 antes y después del tratamiento con diferentes dosis de InP

Número de animales		Pre-tratamiento		Tratamiento en mg de InP por animal	Post-tratamiento	
		Grandes	Pequeñas		Grandes	Pequeñas
6	Número de células con daño/total de células (%)	8/360 (2.2)	7/360 (1.9)	5	13/360 (3.6)	14/360 (3.8)*
	Migración (µm)	0.27 ± 1.83	0.16 ± 1.14		0.62 ± 3.66	0.57 ± 3.17**
6	Número de células con daño/total de células (%)	15/360 (4.1)	18/360 (5)	10	8/360 (2.2)	11/360 (3.05)
	Migración (µm)	0.89±4.66	0.88 ± 4.13		0.43 ± 2.87	0.54 ± 3.48
6	Número de células con daño/total de células (%)	16/360 (4.4)	19/360 (5.2)	20	21/360 (5.8)	18/360 (5)
	Migración (µm)	0.93 ± 5.00	0.75 ± 3.50		0.94 ± 4.43	0.66 ± 3.10

El promedio de la migración del ADN está calculado tomando el total de las células revisadas. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. La migración del ADN esta dada en media ± DE (desviación estándar). * $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento, aplicando la prueba Z de proporciones. ** $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos antes del tratamiento, aplicando la prueba t de student.

Para las células grandes del testículo no se observaron efectos en el número de células con daño o en la migración del ADN en ninguna de las dosis empleadas.

El número de células con daño y la migración del ADN de hígado, Estomago, Pulmón y Corazón se presenta en el cuadro 11, las comparaciones en este caso se realizaron entre las dosis de InP y el grupo de 0 mg por animal.

Cuadro 11. Número de células con daño y migración del ADN en órganos de ratones de la cepa CD-1 tratados con diferentes dosis de InP

Órgano		TRATAMIENTO			
		En mg de InP por animal			
		0	5	10	20
Estomago	Número de células con daño/total de células (%)	17/600 (2.8)	6/300 (2)	6/300 (2)	9/300 (3)
	Migración (µm)	0.48±2.99	0.26 ± 1.91	0.27 ± 1.89	0.53 ± 3.21
Hígado	Número de células con daño/total de células (%)	42/1200 (3.5)	18/600 (3)	30/600 (5)	47/600 (7.8)*
	Migración (µm)	0.55 ± 3.19	0.52 ± 3.33	0.97 ± 4.80**	1.83 ± 7.52**
Pulmón	Número de células con daño/total de células (%)	44/1200 (3.6)	40/600 (6.6)*	103/600 (17.2)*	61/600 (10.1)*
	Migración (µm)	0.77 ± 4.51	0.90 ± 3.77	5.95 ± 14.83**	1.76 ± 6.32**

Corazón	Número de células con daño/total de células (%)	48/1200 (4)	16/600 (2.6)	37/600 (6.1)*	38/600 (6.3)*
	Migración (µm)	0.61 ± 3.25	0.37 ± 2.45	1.27 ± 5.50**	1.09 ± 4.56**
Número de animales		12	6	6	6

(Continuación)

El promedio de la migración del ADN está calculado tomando el total de las células revisadas. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. La migración del ADN esta dada en media ± DE (desviación estándar). * $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 mg de InP), aplicando la prueba Z de proporciones. ** $p < 0.05$ en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo (0 mg de InP), aplicando la prueba t de student.

En la dosis más baja de InP el pulmón presenta un aumento en el número de células con daño estadísticamente significativo con respecto al grupo testigo sin incremento en la migración. Para el grupo de 10 mg el pulmón y el corazón presentan incrementos significativos en el número de células con daño y en la migración del ADN. Mientras que, el hígado, pulmón y corazón presentan un incremento estadísticamente significativo en el número de células con daño y la migración del ADN en la dosis de 20 mg.

Las figuras 6 a 10 muestran la distribución del daño dependiendo de la relación de la cola y el núcleo en los diferentes tratamientos de fosforo de indio.

En la figura 6 se muestra la distribución en células sanguíneas antes o después de la aplicación del tratamiento, en donde es posible observar un pequeño incremento en los grados de daño al comparar los datos obtenidos en el pre-tratamiento, aunque estos no fueron significativos.

Por su parte las figuras 7 y 8 muestran esta distribución en células pequeñas y grandes del testículo. Al igual que los datos anteriores se observa un incremento en el porcentaje de células con distinto grado de daño sin cambios estadísticos.

En los demás órganos las comparaciones estadísticas se realizaron con el grupo testigo tratado solo con aceite (Figuras 9 y 10), solo el pulmón presentó un incremento significativo en las células con grado alto de daño en la dosis de 10 mg (Figura 9).

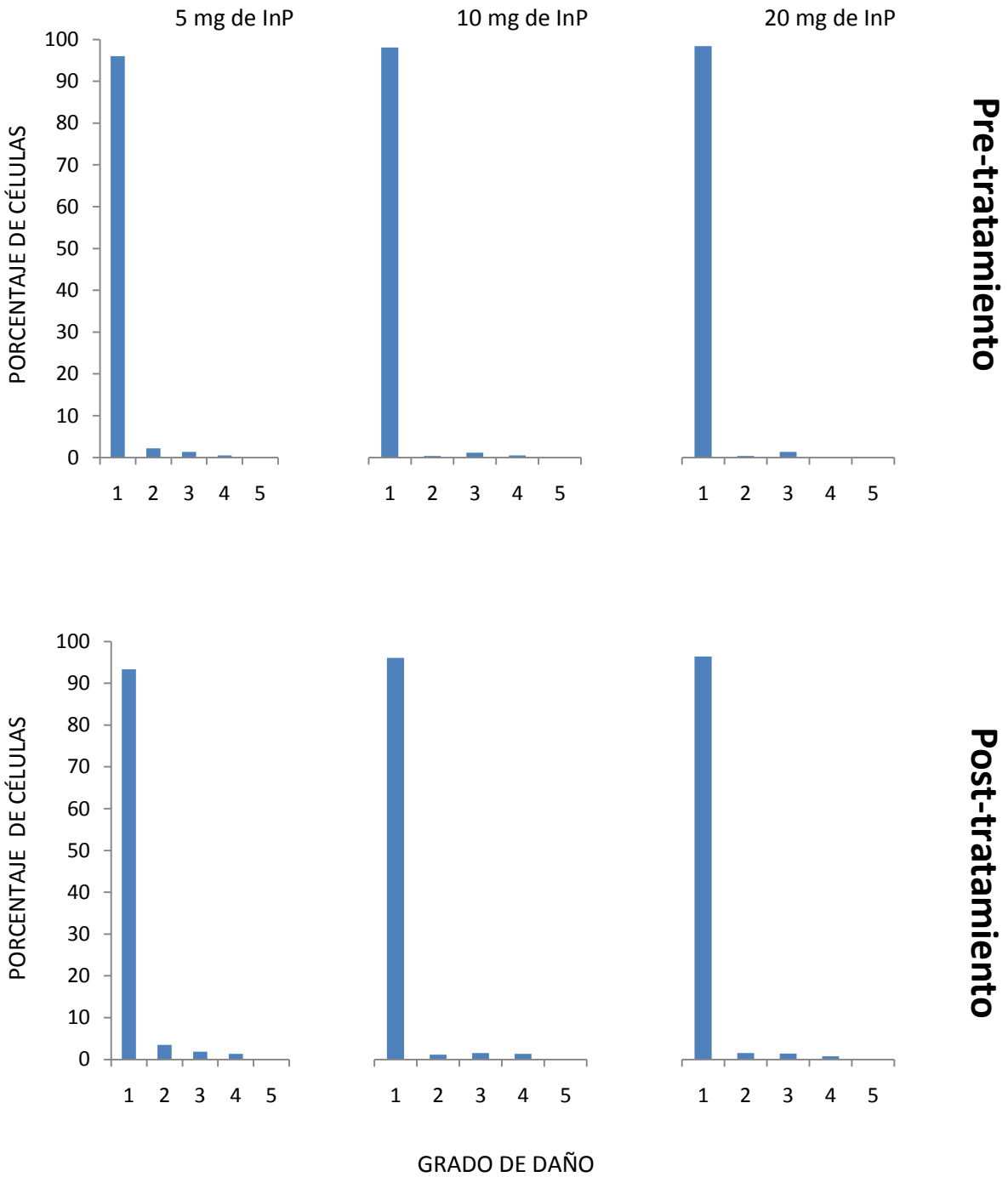


Figura 6. Distribución del grado de daño en células sanguíneas de ratón CD-1 antes y después de la administración de 5, 10 ó 20 mg de InP. La comparación estadística se realizó con los datos obtenidos en el pre-tratamiento en cada una de las dosis. 1=“sin daño”, 2=“bajo”, 3=“medio”, 4=“alto”, 5=“severo”.

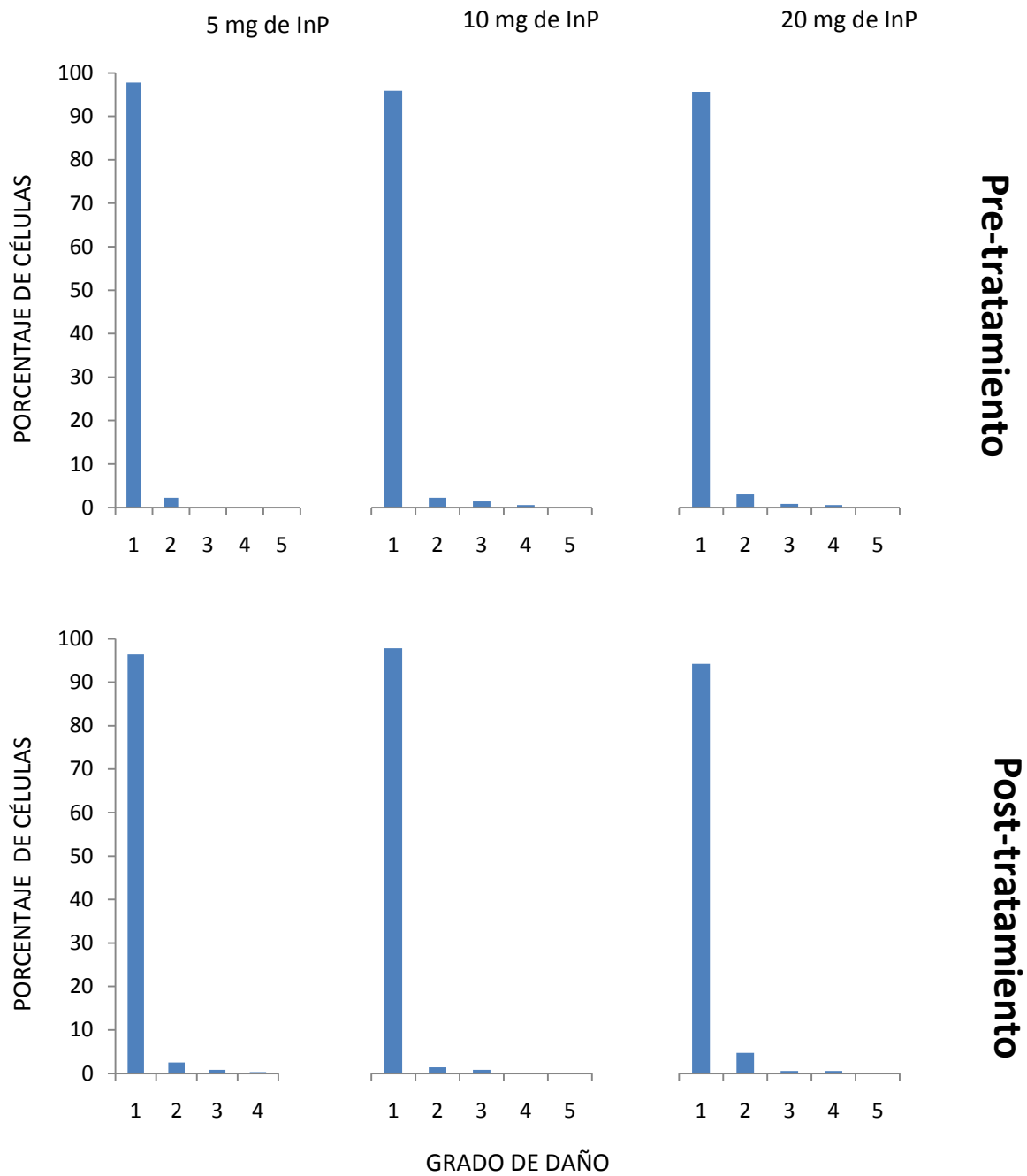


Figura 7. Distribución del grado de daño en células testiculares grandes de ratón CD-1 antes y después de la administración de 5, 10 ó 20 mg de InP. La comparación estadística se realizó con los datos obtenidos en el pre-tratamiento en cada una de las dosis. 1=“sin daño”, 2=“bajo”, 3=“medio”, 4=“alto”, 5=“severo”.

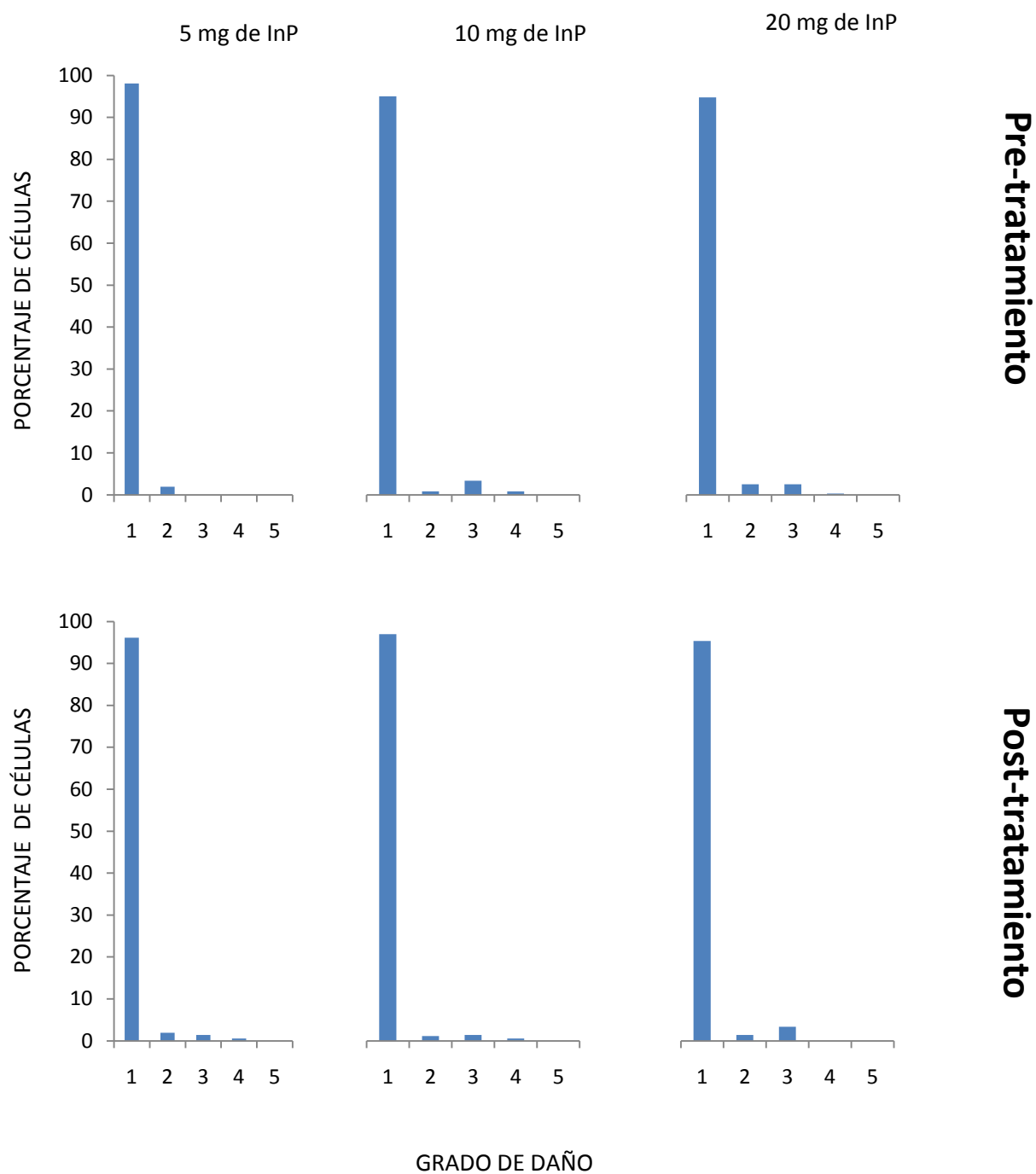


Figura 8. Distribución del grado de daño en células testiculares pequeñas de ratón CD-1 antes y después de la administración de 5, 10 ó 20 mg de InP. La comparación estadística se realizó con los datos obtenidos en el pre-tratamiento, en cada una de las dosis. 1= “sin daño”, 2=“bajo”, 3=“medio”, 4=“alto”, 5=“severo”.

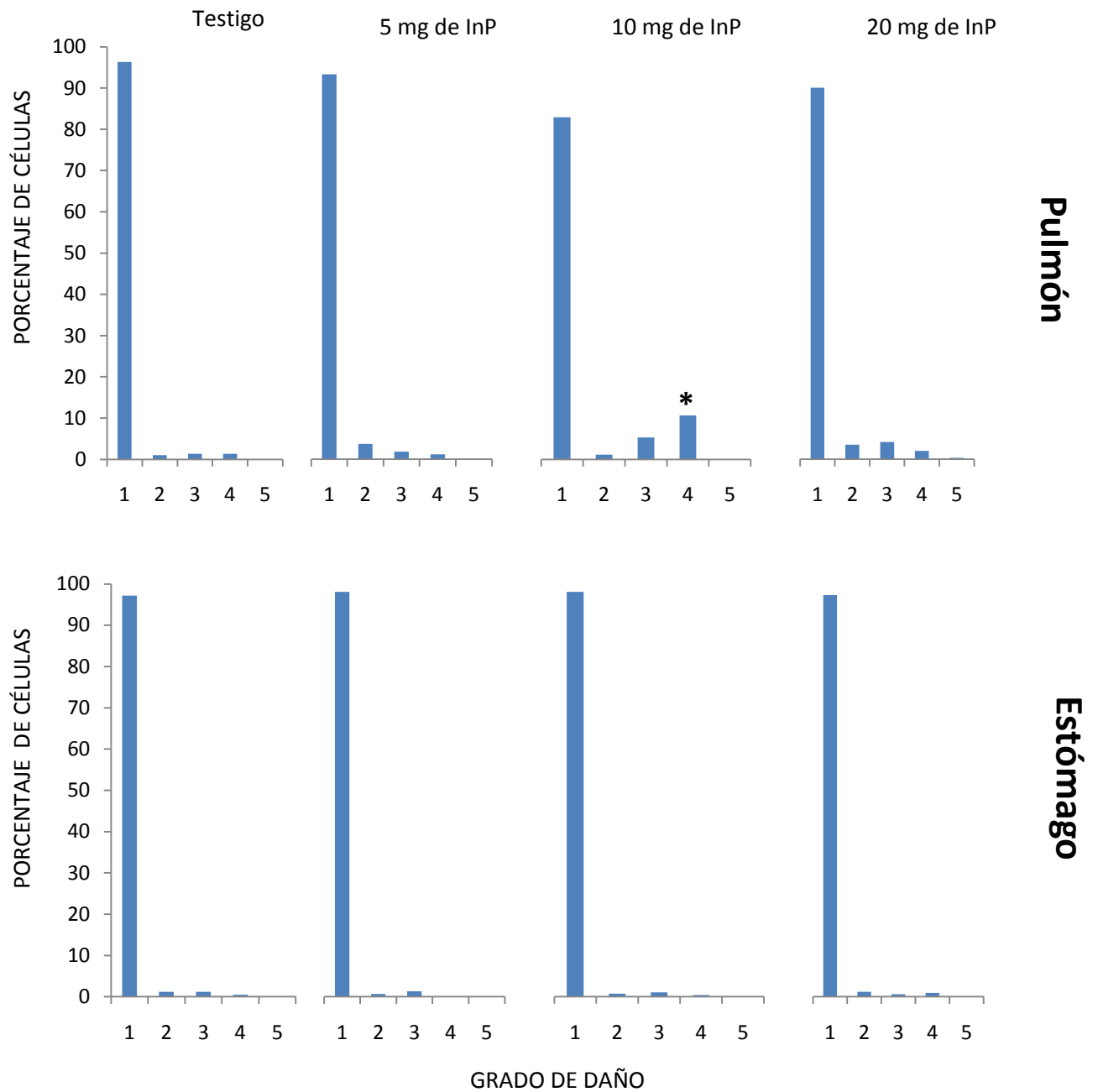


Figura 9. Distribución del grado de daño en células del pulmón y del estómago de ratones CD-1 tratados con 5, 10 ó 20 mg de InP. La comparación estadística se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo. 1= "sin daño", 2="bajo", 3="medio", 4="alto", 5="severo". * $p < 0.05$ con la prueba U de Mann-Whitney.

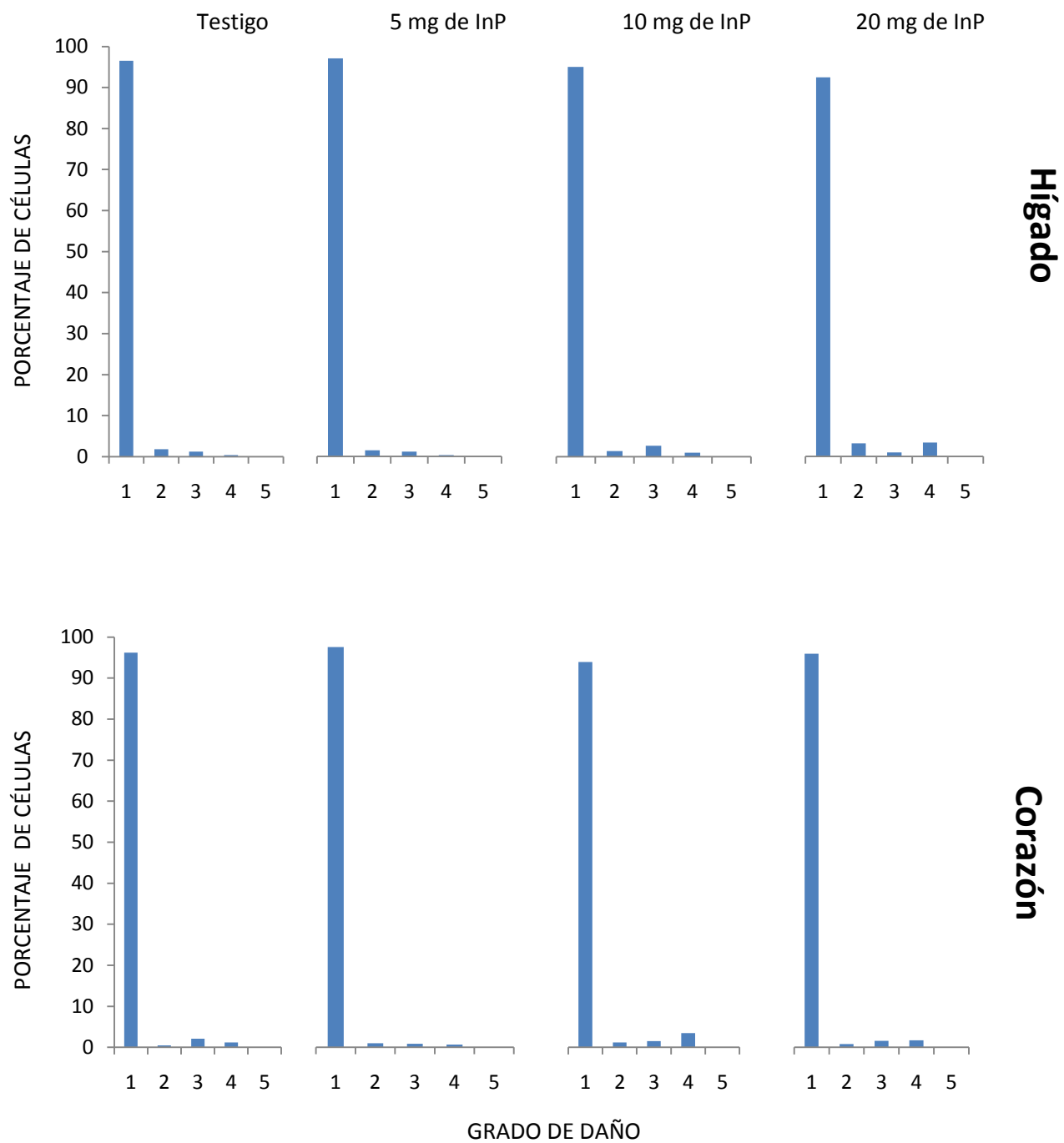


Figura 10. Distribución del grado de daño en células del hígado y del corazón de ratones CD-1 tratados con 5, 10 ó 20 mg de InP. La comparación estadística se realizó con los datos obtenidos en el grupo testigo. 1= "sin daño", 2="bajo", 3="medio", 4="alto", 5="severo".

VIII. Discusión

8.1 Preliminares.

Antes de determinar el daño provocado por el InP sobre el ADN de los diferentes órganos de ratones macho CD-1 se evaluó el daño basal al material genético en células sanguíneas y testiculares, utilizando el modelo de ratones hemicastrados como su propio testigo. Lo anterior debido a que existen reportes contradictorios del efecto de la hemicastración sobre algunos aspectos hormonales y en general del aparato reproductor del macho, por lo tanto, se decidió realizar dos experimentos preliminares que nos permitieron saber si esto modificaba los parámetros a evaluar (número de células con daño y migración del ADN).

Nuestros resultados mostraron que no hay diferencia entre los datos obtenidos antes o después de la hemicastración en los diferentes tiempos, (24 y 72 horas; una o dos semanas) (Cuadro 5 y 6) además que el estrés por la introducción de la sonda gástrica, con la que se administro agua, aceite y el InP, no repercuten en la salud general del animal. Esto concuerda con los datos obtenidos por Fawke *et al* (1972) quien observó que no se presenta hipertrofia testicular compensatoria en ratones machos hemicastrados y sacrificados 1, 2 o 3 semanas después de la cirugía, aunque si se presentó una disminución de los andrógenos producidos.

En nuestro estudio no fue cuantificada la cantidad de hormonas sexuales presentes antes o después de la hemicastración, pero es de esperarse que al igual que el trabajo anterior exista una disminución en la producción de testosterona antes de iniciar el efecto de hipertrofia, sin embargo, esto al parecer no repercute en ninguno de los parámetros medidos con el ensayo cometa, probablemente porque nosotros evaluamos en un periodo muy corto de tiempo (24 horas).

El uso de machos hemicastrados teóricamente ofrece ventajas sobre el uso de animales intactos. En estos animales es posible estudiar el efecto de alguna droga o fármaco en el crecimiento testicular durante el periodo de experimentación, mientras que, en animales

intactos solo es posible correlacionarlo con el peso corporal después del tratamiento (Fawke *et al.*, 1972), también este modelo ha sido utilizado para evaluar la reversibilidad de los efectos de algunos compuestos como el etanol sobre el aparato reproductor del ratón (Anderson *et al.*, 1985). Aunque en estudios de genética toxicológica solo los realizados por Corona-Martínez (2000) han utilizado ratones hemicastrados como su propio testigo.

8.2 Tratamiento con fosfuro de indio: peso de ratones, índice de peso de los órganos y viabilidad.

El parámetro de peso de los órganos ha sido tradicionalmente utilizado como un criterio en los experimentos toxicológicos ya que este refleja la toxicidad que puede ocasionar el compuesto químico sobre el organismo completo. Es generalmente reconocido que el peso de los órganos es uno de los indicadores biológicos más sensibles de daño orgánico, aunque, es difícil en ocasiones, asegurar que la diferencia en el peso entre los animales tratados y no tratados sea un reflejo del efecto tóxico de la sustancia a prueba o una respuesta fisiológica del animal durante el experimento (Feron *et al.*, 1973).

En nuestro estudio los datos de peso de los animales y el índice de peso de los órganos no mostraron diferencia significativa en ninguna de las dosis administradas (Cuadro 7). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kabe *et al* (1996) quienes administraron hasta 5000 mg/kg de fosfuro de indio vía oral a ratones macho ICR, luego de dos semanas de observación no existieron diferencias en el peso de los animales o en los órganos que evaluaron: pulmón, hígado, riñones, bazo y testículos.

Al igual que el reporte anterior el indio metálico administrado oralmente (2000 mg/kg) a ratas macho o hembra y sacrificados 28 días después no produjo muertes, anormalidades en el comportamiento, cambios en el peso de los animales o de algún órgano evaluado (cerebro, timo, hígado, bazo, riñón, glándulas adrenales, testículos y ovarios) (Asakura *et al.*, 2008).

Sin embargo otras rutas de exposición como la intratraqueal o inhalada producen una marcada disminución del peso corporal en hámster tratados con 6 mg/kg de peso de InP, una vez a la semana por un periodo de 16 semanas, además de incrementar en 4.7 veces

el peso relativo del pulmón (Tanaka *et al.*, 2002), estos estudios concluyeron que por vía inhalada, la cantidad de este compuesto que se acumula por la exposición prolongada en el pulmón, repercute en cambios morfológicos no solo en el órgano si no también en los animales tratados (Tanaka *et al.*, 2002).

Como muchas otras pruebas genotóxicas, el ensayo cometa puede ser sujeto de falsos positivos, en algunos casos, es difícil distinguir entre la genotoxicidad directa inducida por un químico y el daño al ADN que ocurre de manera secundaria por la citotoxicidad (Hartmann y Speit, 1997). En el caso de los químicos citotóxicos, estos son capaces de inducir un incremento en los rompimientos de cadena doble, lo que pueden confundirse al interpretar los resultados obtenidos con esta prueba. Por ello es importante que al emplear la técnica de electroforesis unicelular esta se acompañe de la evaluación de la viabilidad (Henderson *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos con las dosis y el tiempo empleado en este trabajo, muestran que la viabilidad celular no sufrió cambios significativos ya que se mantiene mayor al 80% tanto en el grupo testigo como en los tratados (Cuadro 8). En la literatura no se encontraron reportes donde se evaluó la viabilidad de células tratadas con fosforo de indio, sin embargo, estudios realizados *in vitro*, con tricloruro de indio en células T de rata, donde se evaluó la viabilidad por el método de exclusión del azul de tripano, se concluyó que el tratamiento no tiene efectos citotóxicos ya que la viabilidad se mantiene entre el 86 al 97% en cualquiera de las dosis empleadas (Bustamente *et al.*, 1997).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias en el peso de los animales, de los órganos o en la viabilidad celular al aplicar InP vía sonda gástrica, lo cual puede deberse al número de aplicaciones, la ruta de exposición o al tiempo empleado, ya que 24 horas puede ser insuficiente para producir algún efecto en los órganos y en el organismo. Además, se ha reportado que el InP tiene baja solubilidad y parece ser el compuesto menos tóxico por ingestión ($LD_{50}=5000$ mg/kg para ratón) (Kabe *et al.*, 1996), en comparación con otros compuestos solubles como el tricloruro de indio ($LD_{50}= 5$ mg/kg para ratón) o el $InNO_3$ ($LD_{50}=5.55$ mg/kg para rata) (Uemura *et al.*, 1997).

8.2.1 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)

El ensayo cometa se considera un indicador sensible para detectar daño primario en el material genético (Singh, 2000), por lo que la longitud en la migración del ADN se puede interpretar como producto de los rompimientos de cadena sencilla, sitios álcali sensibles o sitios de reparación. Además cuando se trabaja en ratones podemos utilizar este parámetro en distintos órganos de animales tratados, aunque se utilice células que no están en división (Fairbairn *et al.*, 1995).

En este trabajo los resultados mostraron un incremento en el número de células con daño en pulmón y testículo en la dosis de 5 mg por animal, sangre, pulmón y corazón en 10 y sangre, pulmón, corazón e hígado en la dosis de 20. El número de células con daño es uno de los parámetros de la técnica de electroforesis unicelular que es utilizado para evaluar el efecto genotóxico producido por agentes químicos (Sasaki *et al.*, 1997; Altamirano-Lozano *et al.*, 1999).

Otros estudios de genotoxicidad utilizando como parámetro de evaluación la frecuencia de micronúcleos (MN) mostraron que la exposición inhalada de 1, 3, 10 y 30 mg/m³ de fosforo de indio por 14 días en grupos de 120 ratones macho y hembra, no incrementa la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos policromáticos en sangre periférica (NTP, 2001). En un estudio *in vitro*, Asakura *et al.* (2009) expusieron cultivos celulares de la cepa CHL/IU a varias dosis de indio metálico por un periodo de 6 horas. Los resultados mostraron que el indio inducía menos del 5% de aberraciones cromosómicas (AC) tanto numéricas como estructurales en presencia o ausencia de activación metabólica.

Aunque son parámetros diferentes la prueba de MN y las AC, contrario a lo reportado por estos autores nosotros encontramos evidencias de genotoxicidad al analizar el número de células con daño. Hasta el momento es desconocido el mecanismo por el cual el fosforo de indio induce daño a la molécula de ADN, sin embargo se sabe que el tricloruro de indio en dosis bajas induce fragmentación de esta molécula de forma dosis dependiente y que esta se relaciona directamente con la apoptosis en cultivos de timocitos de rata y en dosis altas, es capaz de causar muerte masiva por necrosis (Bustamente *et al.*, 1997). Se ha

propuesto que el mecanismo por el cual el tricloruro de indio produce apoptosis podría involucrar alteraciones en la homeostasis o afectar el estado redox intracelular y conducir al daño oxidativo del ADN (Bustamente *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2002).

Gottschling *et al.* (2001) también estudiaron el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de cáncer en ratas expuestas a InP por inhalación. Los autores proponen que la exposición a InP provoca acumulación del compuesto en los alveolos y en el epitelio pulmonar, la presencia de macrófagos pulmonares incrementa la inflamación crónica, lo cual aumenta la presencia de especies reactivas de oxígeno al mismo tiempo que disminuye la cantidad de antioxidantes esto conduce a daño oxidativo en diferentes moléculas como el ADN, lípidos de las membranas o proteínas. La producción constante de daño oxidativo genera hiperplasia alveolar, adenoma y finalmente carcinomas metaplásicos en el pulmón.

Aunque la exposición en los trabajos mencionados anteriormente es prolongada y por diferentes vías, las especies de oxígeno reactivas pueden estar contribuyendo al incremento en el número de células con daño observado en nuestros resultados.

Si bien el InP es un compuesto con una menor solubilidad que otras sales de indio en los fluidos corporales, estudios de distribución del compuesto mostraron que en ratas macho, al administrar 10 mg/kg de peso corporal de InP vía oral, y evaluar en diferentes tiempos (24, 96 y 240 horas) al obtener muestras de sangre, médula ósea, cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, musculo, piel, testículos, estomago, intestino grueso o delgado luego de 24 horas el fosforo de indio está presente en la mayoría de los órganos (0.67% de la dosis administrada) aún considerando la pobre absorción por el tracto gastrointestinal (Zheng *et al.*, 1994). Aunque en la literatura no encontramos estudios de la distribución, absorción y eliminación del InP en ratón, el reporte anterior podría sugerir que lo mismo este sucediendo en los animales que nosotros tratamos y que la poca cantidad presente de InP en algunos órganos podría ser la responsable del daño observado, aunque nuestro tratamiento es agudo y sacrificamos 24 horas después.

Otro de los posibles mecanismos al cual puede deberse el incremento en el número de células con daño en algunos de los órganos, es de forma indirecta, muchos metales

pueden generar daño al reaccionar con algunas enzimas del metabolismo. Por ejemplo el arsenuro de galio (GaAs) inhibe la función de la enzima aminolevulinato deshidratasa al competir con el zinc por el sitio del cofactor lo que modifica la estructura de la enzima y por lo tanto su función (Woods y Fowler, 1982).

Varios de los iones radioactivos de indio son utilizados en medicina para el escaneo de órganos, por lo cual, existe un interés general sobre su unión con proteínas del suero, principalmente con la transferrina, ya que esta, es la mayor proteína de transporte del plasma.

La transferrina es una clase de glicoproteína monomérica presente en todos los vertebrados, contiene un dominio que interactúa con un sitio de unión al hierro (Battistuzzi *et al.*, 1995), aunque, se ha demostrado experimentalmente que además del hierro, esta proteína puede formar uniones con una alta afinidad a otros cationes tri o tetravalentes como el aluminio, galio e indio y servir de transporte en los sistemas *in vivo* (Harris y Messori, 2002). Algunos experimentos *in vitro* determinaron la interacción de la transferrina humana con los iones de In^{3+} y Bi^{3+} , los resultados mostraron que ambos muestran una fuerte unión a la proteína en solución, aunque esta unión tiende a ser más estable en el complejo indio-transferrina (Zhang *et al.*, 2004).

En ratones también se ha demostrado que el In establece enlaces con la transferrina del suero sanguíneo e incluso se ha propuesto que cuando entran a la circulación utilizan la maquinaria bioquímica del hierro, incluidos los receptores de membrana y que tiene la capacidad de almacenarse en el interior celular en la ferritina (Castronovo y Wagner, 1973; Harris y Messori, 2002; Gomme y McCann, 2005). Lo anterior concuerda con el hecho de que nuestros resultados mostraron un incremento en el número de células sanguíneas con daño (Cuadro 9), lo que nos indica que el fósforo de indio podría estar siendo distribuido en sangre presumiblemente por la transferrina.

Este mismo mecanismo puede explicar los resultados obtenidos en el número de células con daño en los diferentes órganos evaluados, como pulmón e hígado ya que todos los tejidos y órganos de los mamíferos tienen receptores de membrana para la transferrina,

pero estos varían considerablemente de un tipo celular a otro. Se expresan principalmente en los hepatocitos, células precursoras de los eritrocitos y la placenta, pero se encuentran en cantidades significativas en el pulmón, riñón e intestino delgado (Harris y Messori, 2002).

Respecto a los resultados obtenidos en las células testiculares, en este trabajo usamos un modelo para evaluar el daño antes y después de la aplicación de InP, los datos obtenidos de esta manera nos permitieron comparar el número de células con daño en el mismo individuo. Dentro del laboratorio ya se había utilizado este modelo de estudio, Corona-Martínez (2000) evaluó el efecto del arsenato de sodio en ratones macho CD-1, utilizando el testículo de ratones hemicastrados como su propio testigo. Sus resultados mostraron que cada individuo evaluado responde de manera diferente al tratamiento, ya que uno de los animales muestra el máximo incremento en el número de células con daño a los 60 minutos, mientras que, en 4 de los animales este máximo se presenta a los 30 minutos, esta diferencia se la atribuyeron a la capacidad de biotransformación del compuesto.

En nuestro caso no se observaron diferencias en la susceptibilidad de los organismos, pues al analizar los datos obtenidos por individuo, todos, tanto en el número de células con daño como en la migración del ADN, son similares (datos no mostrados).

En testículo, nuestro estudio mostró que solo la dosis de 5 mg incrementa el número de células con daño, mientras que, en las dosis más altas este daño no se observó, además respecto al peso de testículo no existieron cambios en ninguna de las dosis evaluadas, aunque según los estudios de Zheng *et al.* (1994) a las 24 horas de haber administrado InP vía oral debería de haber trazas de este compuesto en la mayoría de los órganos evaluados incluido el testículo.

Existen reportes que la administración intratraqueal de 3 mg/kg de InP en hámster una vez a la semana por 8 semanas y su posterior evaluación 8, 16, 40, 64 y 88 semanas, disminuye el peso del testículo y el conteo de espermatozoides en la cola del epidídimo, además de causar cambios histopatológicos en el testículo de la semana 16 a la 88 (Omura *et al.*, 2000). En otro estudio el óxido de indio-estaño, incrementa la vacuolización del

epitelio seminífero en hámster tratados con 6.0 mg/kg por un periodo de 16 semanas, aunque no modifica el peso de los testículos, vesículas seminales o epidídimo (Omura *et al.*, 2002).

Otros compuestos como el arsenuro de indio (7.7 mg/kg) administrados intratraquealmente en hámster dos veces a la semana por 16 semanas, no mostraron efectos histopatológicos tóxicos en el testículo (Omura *et al.*, 1996).

Tomando en cuenta los reportes antes mencionados se observa que la respuesta depende del compuesto empleado, la ruta de administración o el tiempo de exposición, por lo que, el poco incremento en el número de células testiculares con daño, observados en este trabajo, puede deberse al tiempo corto de administración o a la dosis. Probablemente si estas variables se incrementaran, se reflejaría en un aumento en el peso del órgano o en el número de células con daño.

Respecto a los demás órganos; en el estomago el número de células con daño no sufrió modificaciones, sin embargo, los estudios de distribución indican que es el estomago y el intestino delgado los órganos con una mayor acumulación de InP luego de una sola administración oral de 10 mg/kg en ratas y evaluado después de 24 horas (Zheng *et al.*, 1994), los autores proponen que las condiciones ácidas del estomago favorezcan la disolución del compuesto y la formación de iones de indio capaces de ser absorbidos por el intestino delgado.

Al parecer la diferencia observada con nuestros resultados puede deberse al vehículo empleado ya que el aceite que nosotros utilizamos impediría la interacción de las células de la mucosa estomacal con el compuesto y por lo tanto no se observe daño. Sin embargo, cabe aclarar que nosotros realizamos un ensayo preliminar donde se administró InP suspendido en agua, estos resultados mostraron que no existieron diferencias en el número de células con daño de ningún órgano evaluado con respecto al testigo administrado solo con agua. Esto pudiera explicarse ya que al aplicar la solución de InP en agua se observó que mucho del compuesto se quedaba en la jeringa, con lo que la dosis administrada sería muy baja para producir algún efecto.

En el hígado se incrementó gradualmente el número de células con daño hasta presentar una diferencia estadísticamente significativa en la dosis de 20 mg (Cuadro 11). En la literatura se reporta que el InCl_3 administrado a ratas por vía intravenosa reduce marcadamente los niveles del citocromo P-450 en el hígado, los autores concluyen que este efecto se asocia con la inhibición de la ruta del grupo hemo este cambio está relacionado con la actividad funcional del retículo endoplásmico y con la intervención funcional de otros organelos hepatocelulares como los lisosomas lo que lleva a un marcado incremento en el nivel de hierro dentro de estos compartimentos celulares (Fowler *et al.*, 1983).

Lo anterior pudiera explicar el daño que observamos en este órgano, ya que se sabe que el indio utiliza la maquinaria bioquímica del hierro (Harris y Messori, 2002) lo que causaría tal vez una intervención en algunos procesos metabólicos. Además, el hígado juega un papel esencial en la eliminación de muchos xenobióticos del cuerpo, lo que lo convierte en un blanco de estos.

Las células del pulmón son las que presentaron una mayor sensibilidad a la administración de InP, ya que se incrementó el daño en todas las dosis (número de células con daño) (Cuadro 11). En estudios previos de distribución, este compuesto se encuentra en el pulmón de rata 24 horas después de la administración de múltiples dosis de InP (Zheng *et al.*, 1994). Sin embargo con una sola dosis no se reporta su presencia.

Otros estudios con el mismo compuesto pero administrando vía intratraqueal o inhalada han mostrado una alta toxicidad, por ejemplo, se ha reportado que el InP produce cambios histopatológicos en el pulmón de hámster; los mayores cambios incluyen hiperplasia alveolar y bronquiolar, neumonía, enfisema y osificación metaplásica (Yamazaki *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002; Tanaka, 2004). Bajos niveles de este compuesto (1.2, 6 y 62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso) administrados intratraquealmente a ratas han elevado la actividad de la superóxido dismutasa, la lactato deshidrogenasa y han aumentado la inflamación celular en el fluido bronquioalveolar desde el día uno hasta el 8 posterior al término de las

administraciones lo que ha sugerido una manifestación temprana de inflamación (Oda, 1997).

La administración intratraqueal de una dosis de 1, 10 o 100 mg de InP por kg de peso de rata (Uemura *et al.*, 1997) produjo un incremento en la respuesta inflamatoria en el pulmón dependiente de la dosis y el tiempo, además estos experimentos concluyeron que la administración intratraqueal de fosforo de indio causa inflamación pulmonar y que la fagocitosis contribuye a la distribución de este compuesto a otros órganos. El NTP (2001) reportó que el indio causó tumores en el pulmón en ratas y ratones expuestos a partículas en aerosol en concentraciones de 0.03 mg/m^3 por 3 meses y hasta 2 años.

Otros compuestos de indio como el arsenuro de indio o el óxido de indio-estaño también han mostrado toxicidad en el pulmón, Tanaka *et al.* (2002) realizaron un estudio con ITO, el cual fue administrado intratraquealmente en hámster a dosis de 6 mg/Kg una vez a la semana por un periodo de 16 semanas, al término, los resultados mostraron un incremento en el engrosamiento de la pared alveolar, acumulación de macrófagos, incremento en el número de gotas de colesterol y un aumento en el grosor de la pleura. Por otro lado, Tanaka *et al.* (2003) administraron 8 mg/kg de arsenuro de indio a hamster dos veces a la semana por un periodo de 7 semanas, al finalizar el InAs causó hiperplasia bronquiolar y alveolar, hiperplasia celular con queratinización, inflamación y fibrosis intersticial.

En un estudio comparativo realizado con Oxido de indio-estaño y Oxido de indio en hámster administrados intratraquealmente dos veces a la semana por ocho semanas, se observaron focos de inflamación pulmonar con severa hiperplasia bronquial o alveolar, expansión de los espacios alveolares y proliferación intersticial fibrótica tanto en el grupo de oxido de indio como en el grupo de oxido de indio-estaño (Tanaka *et al.*, 2010^b). Blazka *et al.* (1994) administraron a ratas macho 0.2, 2 y 20 mg/m^3 de tricloruro de indio vía nasal por una hora, los resultados mostraron un definitivo incremento en la inflamación pulmonar en todas las dosis administradas.

En 2003 se publicó el primer caso de daño pulmonar en humanos causado por la inhalación de partículas de ITO en una fábrica de Japón. El paciente murió en 2001 por neumotórax bilateral, en el examen histopatológico se encontraron partículas dispersas en la superficie que correspondieron con restos de este metal en forma directamente relacionada con la concentración de indio en el suero, que fue de aproximadamente 290 µg/L (Valor normal= 0.1 µg/ml). Un segundo caso de daño pulmonar relacionado con la inhalación de partículas de ITO se presentó en 2005, este trabajador desarrolló fibrosis pulmonar y enfisema después de la exposición por 4 años a estas partículas (Homma *et al.*, 2003; Homma *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2010^a). Hasta mayo de 2010 se han reportado 10 casos de daño pulmonar por la exposición a varios compuestos de indio. Al cuadro sistémico desarrollado a partir de esta exposición se conoce como “pulmón de indio” (Omae *et al.*, 2010)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también confirman que el pulmón es un órgano blanco del InP con las dosis, la vía y el tiempo empleados al igual que con la administración intratraqueal e inhalada. Algunos autores han sugerido que el pulmón es susceptible por naturaleza más que cualquier otro órgano del cuerpo porque está altamente irrigado, lo que lo hace un objetivo más probable de los xenobióticos (Gottschling *et al.*, 2001).

En el corazón se presentó un incremento en el número de células con daño a la dosis de 10 mg y este se mantuvo prácticamente constante en la siguiente dosis. Aunque no existan reportes donde se evalué daño a las células del corazón si se sabe que el fosforo de indio causó daño en las arterias coronarias de ratones B6C3F1 después de la inhalación prolongada de este compuesto (2 años), entre las principales afectaciones se encuentran la arteritis, inflamación alrededor de la arteria coronaria y la aorta proximal (Moyer *et al.*, 2002).

Las Figuras 6 a 10 muestran la distribución del daño dependiendo de la relación que existe entre la cola del cometa (migración) y el núcleo (grado de daño: sin daño, bajo, medio, alto y severo), como se puede observar no existen diferencias en la distribución en

ninguno de los órganos evaluados excepto el pulmón donde se incrementaron las células con grado alto en la dosis de 10 mg. Estos datos confirman el daño producido por el fosforo de indio vía sonda gástrica en el pulmón de los ratones tratados.

IX. Conclusiones

- La hemicastración y la administración de aceite utilizando una sonda gástrica no produjo aumento en el número de células con daño ni en la migración del ADN.
- No existieron cambios en el peso de los animales, índice de peso o viabilidad celular en los organismos por lo cual la dosis y el tiempo empleado no produjeron efectos tóxicos ni citotóxicos en los ratones tratados con las diferentes dosis de InP vía sonda gástrica.
- El tratamiento con 5, 10 ó 20 mg de InP por 24 horas administrados a ratones macho CD-1 incrementó el número de células con daño en algunos órganos lo que produjo efectos genotóxicos con el tiempo y las dosis empleadas.
- El número de órganos que presentan un aumento en el número de células con daño al ADN se incrementa conforme lo hace la dosis de InP.
- El pulmón es el órgano que presentó un incremento en el número de células con daño en las tres dosis utilizadas de InP, con lo cual podemos decir que este presenta una mayor sensibilidad al tratamiento.

X. Referencias

- Altamirano-Lozano, M., Valverde, M., Álvarez-Barrera, L., Molina, B. y Rojas, E. (1999) *Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in Male Mice. II. Effects in several Mouse Tissues*. *Teratogénesis, Carcinogénesis and Mutagénesis*. 19: 243-255.
- Anderson, R.A., Willis, B.R., y Oswald, C. (1985) *Spontaneous recovery from ethanol-induced male infertility*. *Alcohol*. 2: 479-484.
- Andrae, U. y Speit, G. (2008) *In vitro test for Genotoxicity en Toxicology and risk assessment*. Greim, H. y Snyder, R. eds. John Wiley & Sons. EUA. Pp: 385-406.
- Andress, J.M. (1992) *The mouse, Toxicology en Animal models in toxicology*. Di Carlo, F.J. y Oehme, F.W., eds. Marcel Dekker Inc. Nueva York. Pp: 165-170
- Asakura, K., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., Nakano, M., y Omae, K. (2008) *Oral toxicity of indium in rats: single and 28-day repeated administration studies*. *Journal of Occupational Health*. 50: 471-479.
- Asakura, K., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., y Nakano, M. (2009) *Genotoxicity studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony*. *Journal of Occupational Health*. 51: 498-512.
- Battistuzzi, G., Calzolari, L., Messori, L., Sola, M. (1995) *Metal-induced conformational heterogeneity of transferrins: a spectroscopic study of indium (III) and other metal (III)-substituted transferrins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206: 161-170.
- Blazka, M.E., Tepper, J.S., Dolxon, D., Winsett, D.W., O'Connor, R.W. y Luster, M.I. (1994) *Pulmonary response of fischer 344 rats to acute nose-only inhalation of indium trichloride*. *Environmental Research*. 67: 68-83.
- Bustamante, J., Dock, L., Vahter, M., Fowler, B. y Orrenius, S. (1997) *The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes*. *Toxicology*. 118: 129-136.
- Carson, B.L., Ellis, H.V., y McCann, J.L. (1986) *Toxicology and biological monitoring of metals in humans including feasibility and need*. Lewis Plublishers. EUA. Pp: 115-120.

- Castronovo, F.P., y Wagner, H.N. (1971) *Factors affecting the toxicity of the element indium*. British Journal of experimental Pathology. 52: 543-559.
- Castronovo, F.P., y Wagner, H.N. (1973). *Comparative toxicity and pharmacodynamics of ionic indium chloride and hydrated indium oxide*. Journal of Nuclear Medicine. 14: 677-682.
- Centro de estudios de competitividad (2005) *La industria electrónica en México*. Disponible en: http://cec.itam.mx/docs/Electronica_Mexico.pdf. Fecha de consulta: 10/11/2010.
- Cervantes, C., y Moreno-Sánchez R. (1999) *Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos*. A.G.T. Editor, S.A. Pp: 1-11.
- Chagnon, M.J. (2005) *Indium and indium compounds* en *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology*. Vol. 14, Staff Wiley Interscience. EUA. Pp: 190-202.
- Chapin R.E., Harris, M.W., Hunter, E.S., y Davis B.J. (1995) *The reproductive and developmental toxicity of indium in the Swiss Mouse*. Fundamental and applied toxicology. 27: 140-148.
- Clarkson, T.W., Friberg, L., Nordberg G. F., y Sager P.R. (1988) *Biological monitoring of toxic metals*. Plenum Press. EUA. Pp: 46-49, 473-479.
- Conner, E.A., Yamauchi, H., y Fowler, B.A. (1995) *Alterations in the heme biosynthetic pathway from the III-V semiconductor metal, indium arsenide (InAs)*. Chemical-Biological Interactions. 96: 273-285.
- Corona-Martínez, M.A. (2000) *Efecto reprotóxico y genotóxico producido por arsenato de sodio a ratones macho CD-1*. Tesis de licenciatura. UNAM, México.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., y O'Neill, K.L. (1995) *The comet assay: a comprehensive review*. Mutation research. 339: 37-59.
- Fawke, L., Morris, A., y Brrown, P.S. (1972) *Effects of hemicastration and the subsequent administration of drugs in the mouse*. Journal of Reproduction and Fertility. 28:177-183.
- Fergusson, J. (1990) *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon Press, Gran Bretaña. Pp: 3-10.

- Ferm V.H. y Carpenter, S.J. (1970) *Teratogenic and Embryopathic effects of indium, Gallium, and Germanium*. Toxicology and Applied Pharmacology. 16: 166-170.
- Feron, V.J., Groot, A.P., Spanjers, M.T., y Til, H.P. (1973) *An evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation*. Food Toxicology. 11: 85-94.
- Flora, S.J.S. (2000) *Possible health hazards associated with the use of toxic metals in semiconductor industries*. Journal of Occupational Health. 42: 105-110.
- Fowler B.A. (1986) *Indium* en *Handbook on the toxicology of metals*. Friberg, L., Nordberg F., Vouk B. eds. Publicaciones científicas Elsevier. Pp 35-43.
- Fowler, B.A., Kardish, R.M., Woods, J.S. (1983) *Alteration of hepatic microsomal structure and function by indium chloride: Ultrastructural, morphometric and biochemical studies*. Laboratory Investigation. 48: 471-477.
- Gilbert, E.H., Glatstein, E., Goris, M.L., Earle, J.D. (1978) *Value of ¹¹¹indium chloride bone marrow scanning in the differential diagnosis of blood count depression in lymphoma*. Cancer. 41: 143-152.
- Gomme, P.T. y McCann, K.B. (2005) *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. Drugs discovery today. 10: 267-273.
- Gottschling, B.C., Maronpot, R.R., Hailey, J.R., Peddada, S., Moomaw, C.R., Klaunig, J. E., y Nyska, A. (2001) *The role of oxidative stress in indium phosphide-lung carcinogenesis in rats*. Toxicological Sciences. 64: 28-40.
- Hamaguchi, T., Omae, K., Takebayashi, T., Kikuchi, Y., Yoshioka, N., Nishiwaki, Y., Tanaka, A. Hirata, M., Taguchi, O., y Chonan T. (2008) *Exposure to hardly soluble indium compounds in ITO production and recycling plants is a new risk for interstitial lung damage*. Occupational and Environmental Medicine. 65: 51-55.
- Harris, W.R. y Messori, L. (2002) *A comparative study of aluminium (III), gallium (III), indium(III), and thallium (III) binding to human serum transferrin*. Coordination Chemistry Reviews. 228: 237-262.
- Hartmann A. y Speit, G. (1997) *The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay)*. Toxicology Letters. 90: 183-188.

- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., y Windebank, S. (1998) *The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins*. *Mutagenesis*. 13:89-94.
- Himmelstein, J.S., y Levy B.S. (1986) *Environmental health aspects of the microelectronics industry*. *Occupational Medicine*; 1: 175-193.
- Homma T., Ueno, T., Sekizawa K., Tanaka, A., Hirata M. (2003) *Interstitial pneumonia developed in a worker dealing with particles containing indium-tin oxide*. *Journal of Occupational Health*. 44: 137-139.
- Homma, T., Miyamoto, A., Sakamoto, S., Kishi, K., Motoi, N., Yoshimura, K. (2005) *Pulmonary fibrosis in an individual occupationally exposed to inhaled indium-tin oxide*. *European Respiratory Journal*. 25: 200-204.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), (2010) *Estadística mensual de la industria minerometalúrgica, Zinc. Total Nacional*. Disponible en: <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/SER1536>, Fecha de consulta: 8/08/2010.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2006) *Indium Phosphide en Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide*. Vol.86, Francia. Pp 197-220.
- Jani, A.B., Liauw, S.L., Blend, M.J. (2007) *The role of indium-111 radioimmunoscintigraphy in post-radical retropubic prostatectomy management of prostate cancer patients*. *Clinical Medicine and Research*. 5: 123-131.
- Jorgenson, J.D., George M.W. (2004) *Mineral commodity profile: Indium*. U.S. Geological Survey. Reston Virginia. Disponible en: <http://pubs.usgs.gov/of/2004/1300/2004-1300.pdf>, fecha de consulta: 22/02/2010.
- Kabe, I., Omae, K., Nakashima, H., Nomiya, T., Uemura, T., Hosoda, K., Ishizuka C., Yamazaki, K., Sakurai, H. (1996) *in vitro solubility and in vivo toxicity of indium phosphide*. *Journal of Occupational Health*. 38: 6-12.

- Lim, S.R., Schoenung, J.M. (2009) *Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays*. Journal of Hazardous Materials. 177: 251-259.
- Marshall, S. (1991) *Indium and compounds* en *Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens* Vol. 2 (G-Z). Publicaciones Noyes. EUA. Pp: 922-923.
- Moutschen, J. (1985) *Introduction to genetic toxicology*. John Wiley & Sons. EUA. Pp 1-25.
- Moyer, C.F., Kodavanti, U.P., Haseman, J.K., Costa, D.L., y Nyska, A. (2002) *Systemic vascular disease in male B6C3F1 mice exposed to particulate matter by inhalation: studies conducted by the National Toxicology Program*. Toxicological Pathology. 30: 427-434.
- Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K. y Usami, M. (2007) *Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats*. Reproductive Toxicology. 24: 409-413.
- Nakajima, M., Takahashi, H., Sasaki, M., Kobayashi, Y., Ohno, Y., y Usami, M. (2000) *Comparative developmental toxicity study of indium in rats and mice*. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 20: 219-227.
- National Toxicology Program (NTP), (2001) *Technical report on the carcinogenesis studies of indium phosphide in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation studies)*. National Toxicology Program Technical Report. Pp: 1-348.
- Oda, K. (1997) *Toxicity of a low level of indium phosphide (InP) in rats after intratracheal instillation*. Industrial Health. 35: 61-68.
- Okada, M., Watanabe, M., Lyons Y.I., Sugiura, Y., Kudo, Y., Shinji, H., Aizawa, Y. y Kotani, M. (2002) *In vitro toxicity of indium arsenide to alveolar macrophages evaluated by magnetometry, cytochemistry and morphological analysis*. Toxicology Letters. 134: 185-194.
- Omae, K., nakano, M., Tanaka A. (2010) *Indium lung- case reports and epidemiology*. International Arch Occupational and Environmental Health.

- Omura, M., Hirata M., Tanaka, A., Zhao, M., Makita, Y., Inoue N., Gotoh, K., Ishinishi N. (1996) *Testicular toxicity evaluation of arsenic containing binary compound semiconductors, gallium arsenide and indium arsenide, in hamster*. Toxicology Letters. 89: 123-129.
- Omura, M., Tanaka, A., Hirata, M., Inoue, N., Ueno, T., Homma, T. y Sekizawa, K. (2002) *Testicular toxicity evaluation of indium-tin oxide*. Journal of Occupational Health. 44: 105-107.
- Omura, M., Yamazaki, K., Tanaka, A., Hirata, Y.M., y Inoue, N. (2000) *Changes in the testicular damage caused by indium Arsenide and Indium Phosphide in Hamsters during two years after intratracheal instillations*. Journal of Occupational Health. 42: 196-204.
- Roberts, R.D. y Johnson, M.S. (1978) *Dispersal of heavy metals from abandoned mine workings and their transference through terrestrial food chains*. Environmental Pollution. 16: 293-310.
- Rodriguez-Mercado, J.J., Roldán-Reyes, E. y Altamirano-Lozano, M. (2003) *Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells*. Toxicology Letters. 144: 359-369.
- Rojas, E., López, M.C. y Valverde, M. (1999) *Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications*. Journal of Chromatography B. 722: 225-254.
- Sasaki, Y.F., Tsuda, F.I. y Nishidate, E. (1997) *Detection of chemical induced DNA Lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay)*. Mutation Research. 388: 33-44.
- Sinclair, W.D., Kooiman G.J.A., Martin D.A., Kjarsgaard I.M. (2006) *Geology, geochemistry and mineralogy of indium resources at Mount Pleasant, New Brunswick, Canada*. Ore Geology Reviews. 28: 123-145.
- Singh, N.P. (2000) *Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis*. Mutation Research. 455: 111-127.

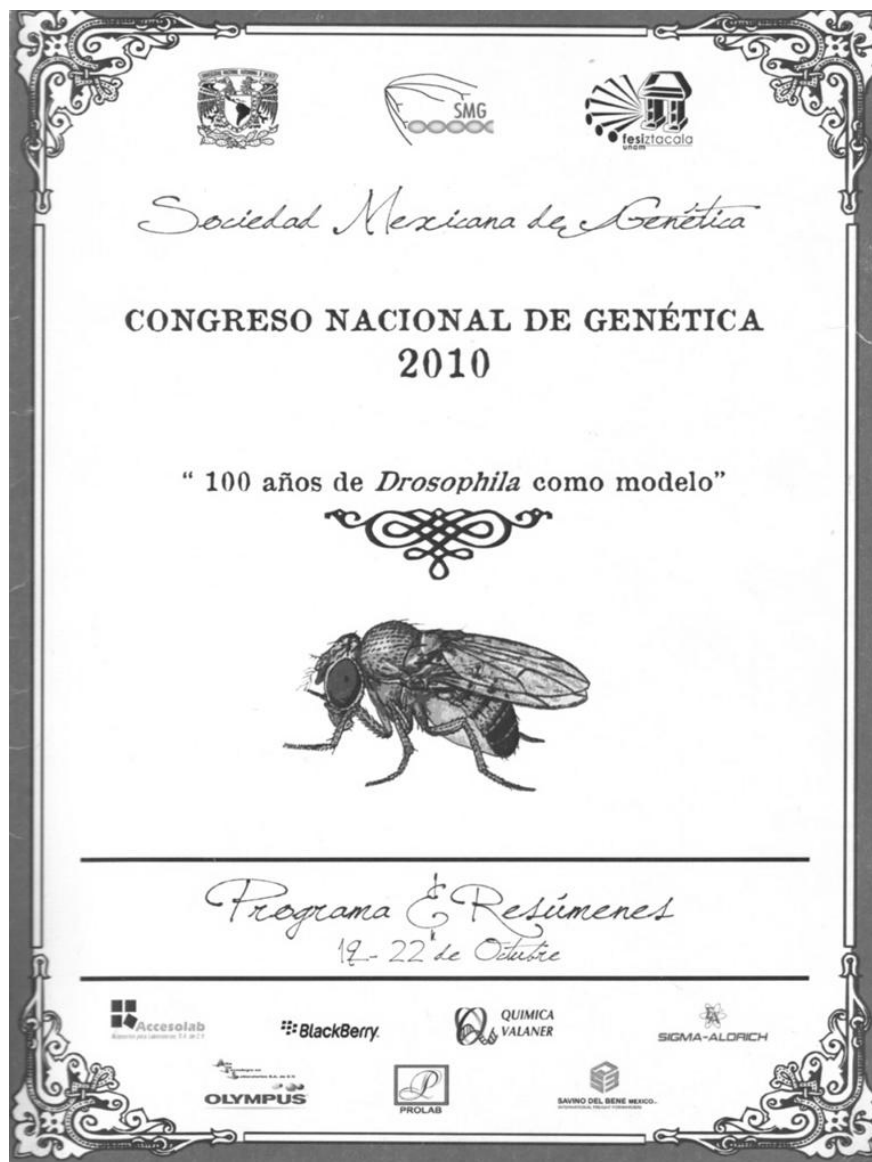
- Speit, G., Hartmann, A. (1999) *The comet assay (Single-Cell Gel Test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair* en *Methods in molecular Biology Vol. 113; DNA repairs protocols: Eukaryotic systems*. Henderson, D.S. ed. Human press, Nueva Jersey. Pp 114-123.
- Strauss, G.H.S. (1991) *Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects*. *Mutation Research*. 252: 1-15.
- Tanaka, A. (2004) *Toxicity of indium arsenide, gallium arsenide, and aluminium gallium arsenide*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 198: 405-411
- Tanaka, A., Hirata, M., Omura, M., Inoue, N., Ueno, T., Homma, T., Sekizawa, K. (2002) *Pulmonary toxicity of indium-tin oxide and indium phosphide after intratracheal instillations into the lung of hamster*. *Journal of Occupational Health*. 44: 99-102.
- Tanaka, A., Hirata, M., y Omura, M. (2003) *Pulmonary squamous cyst induced by exposure to indium arsenide in hamster*. *Journal of Occupational Health*. 45: 405-407.
- ^aTanaka, A., Hirata, M., Kiyohara, Y., Nakano, M., y Omae, K. (2010) *Review of pulmonary toxicity of indium compounds to animals and humans*. *Thin Solid Films*. 518: 2934-2936.
- ^bTanaka, A., Hirata, M., Homma, T. y Kiyohara, Y. (2010) *Chronic pulmonary toxicity study of indium-tin oxide and indium oxide following intratracheal instillation into the lungs of hamster*. *Journal of Occupational Health*. 52: 14-22.
- Tice, R., Andrews, P., Vasquez, M. (1996) *Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SGC) assay to the detection of damage in mammalian cells*. *Experimental Cellular Research* 175: 1-8.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) *Single cell gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35: 206-221.
- Tolcin, A.C. (2007) *Indium (advance release)* en *Minerals yearbook*. U.S. Geological Survey. Reston Virginia. Disponible en:

<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/indium/myb1-2007-indiu.pdf>,
fecha de consulta: 02/02/2010.

- Uemura, T., Oda, K., Omae, K., Takebayashi, T., Nomiya, T., Ishizuka, C., Hosoda, K., Sakurai, H., Yamazaki, K. y Kabe, I. (1997) *Effects of intratracheally administered indium phosphide on male fischer 344 rats*. Journal of Occupational Health. 39: 205-210.
- Vercruyse, A. (1984) *Evaluation of analytical methods in biological systems, part B. Hazardous metals in human toxicology*. Publicaciones científicas Elsevier. Holanda. Pp:
- Wetterhahn, J. (1981) *The role of metals in carcinogenesis: Biochemistry and metabolism*. Environmental Health Perspectives. 40: 233-252.
- Wolfensohn, S. y Lloyd, M. (1994) *Mouse Biological data, en Handbook of laboratory animal management and welfare*. Oxford University Press, Nueva York. Pp 114-115.
- Woods, J.S. y Fowler, B.A. (1981) *Selective inhibition of δ -Aminolevulinic acid dehydratase by indium chloride in rat kidney: biochemical and ultrastructural studies*. Experimental and Molecular Pathology. 36: 306-315.
- Yamazaki, K., Tanaka, A., Hirata, M., Omura, M., Makita, Y., Inoue, N., Sugio, K. y Sugimachi, K. (2000) *Long term pulmonary toxicity of indium arsenide and indium phosphide instilled intratracheally in Hamsters*. Journal of Occupational Health. 42: 169-178.
- Zhang, M., Gumerov, D.R. y Kaltashov, I.A. (2004) *Indirect detection of protein-metal binding: interaction of serum transferrin with In^{3+} and Bi^{3+}* . Journal of American Society for Mass Spectrometry. 15: 1658-1664.
- Zheng, W., Winter, S.M., Kattnig, M.J., Carter, D.E. y Sipes, I.G. (1994) *Tissue distribution and elimination of indium in male fischer 344 rats following oral and intratracheal administration of indium phosphide*. Journal of Toxicology and Environmental Health. 43: 483-494.

XI. Anexos

El presente trabajo fue presentado de manera parcial en el Congreso Nacional de Genética 2010, celebrado del 19 al 22 de octubre en la Ciudad de México, con el título: “Estudio del efecto de la aplicación del fosforo de indio (InP) en ratones macho de la cepa CD-1, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina”.



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL FOSFURO DE INDIO (InP) EN RATONES MACHO DE LA CEPA CD-1, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA.

Beltrán-Mendoza R., *Álvarez-Barrera L, Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Laboratorio de Teratogénesis L5-PA, UMIE-Z FES-Zaragoza, UNAM.

alvarezbarreralucila@gmail.com

El fosforo de indio (InP) es utilizado en la fabricación de semiconductores, pantallas de cristal líquido y celdas solares. Sin embargo, existen pocos reportes acerca de sus efectos en animales de laboratorio y en humanos expuestos, particularmente de su impacto sobre el material genético. Es por ello que en este trabajo se evaluó el daño del InP sobre el ADN de células de ratones macho de la cepa CD-1, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina. Se trabajaron cuatro grupos de animales: 0 (testigo), 5, 10 y 20 mg de InP por animal, aplicado vía sonda gástrica y suspendido en 0.3 ml de aceite, por 24 horas. De todos los animales se obtuvieron muestras de sangre de la cola y se hemicastraron antes del tratamiento (testículo derecho), con la finalidad de que cada ratón fuera su propio testigo. Al sacrificio de los ratones se obtuvo el pulmón, estómago, testículo izquierdo, hígado, corazón y sangre de corazón; los órganos fueron pesados y se obtuvieron muestras para evaluar viabilidad y determinar el daño al ADN. Los resultados encontrados, no mostraron diferencia en los pesos de los animales y de los órganos antes y después del tratamiento. Respecto a la viabilidad celular, en promedio fue mayor al 80% tanto en los grupos tratados como en el testigo. En el grupo tratado con 5 mg de InP, el número de células con daño de pulmón y testículo (células pequeñas) presentaron incremento significativo, mientras que, en el grupo de 10 mg, el incremento se observó en células de sangre, pulmón y corazón. Para el grupo de 20 mg además de los órganos anteriores también se incrementó el porcentaje de células dañadas obtenidas del hígado. Con las dosis y el tiempo empleado en este trabajo podemos concluir que el fosforo de indio tiene efecto genotóxico, y que el número de órganos que presentan células con daño aumenta conforme se incrementa la dosis, sin observarse cambios en el peso de los animales o cambios en la viabilidad de los órganos analizados.