



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Evaluación in vivo del efecto genotóxico inducido por
exposición al acetato de talio (CH_3COOTI) en ratón hembra
CD-1 mediante la prueba de aberraciones cromosómicas”.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA DE LA LUZ BUENDÍA VALVERDE

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**

**ASESOR
M. en C. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA**



MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen	1
I. Introducción	3
1. Talio (Tl)	4
1.1. Acetato de talio(I)	5
1.2. Usos del talio(I)	6
1.3. Concentraciones en el ambiente	8
1.4. Cinética y metabolismo	9
1.5. Toxicidad en los organismos	11
2. Efectos citotóxicos y genotóxicos del Tl	12
3. Indicadores de daño al material genético	14
3.1. Aberraciones cromosómicas	14
4. Células de médula ósea como sistema de prueba	15
5. El cariotipo	16
II. Justificación	18
III. Hipótesis	19
IV. Objetivos	20
1. General	20
2. Particulares	20
V. Material y método	21
1. Reactivos	21
2. Animales	21
3. Tratamientos	21
4. Ensayo de aberraciones cromosómicas (AC)	21
5. Análisis estadístico	27
VI. Resultados	28
1. Efecto del acetato de talio(I) sobre el IM	28
2. Efecto del acetato de talio(I) sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)	28
VII. Discusión	33
VIII. Conclusiones y comentarios finales	39
IX. Referencias bibliográficas	40

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
ACE	Aberraciones cromosómicas estructurales
ACN	Aberraciones cromosómicas numéricas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CAS	Chemical Abstracts Service (número de registro como compuesto químico).
EE	Error estándar
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de protección Ambiental)
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IM	Índice mitótico
i.p.	Intraperitoneal
LD₅₀	Lethal dose médium (dosis letal media)
MN	Micronúcleos
MO	Médula Ósea
OECD	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
TI	Talio
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
IPCS	International Programme on Chemical Safety
OSHA	Occupational Safety and Health Administration

FIGURAS

Figura 1.	Aspecto físico del talio. - - - - -	5
Figura 2.	Cinética del TI en mamíferos. - - - - -	10
Figura 3.	Estructura del hueso largo típico. - - - - -	16
Figura 4.	Cariotipo de ratón. - - - - -	17
Figura 5.	Protocolo de los diferentes tratamientos. - - - - -	22
Figura 6.	Células de médula ósea de ratón. - - - - -	23
Figura 7.	Efecto del acetato de talio(I) sobre el IM de células de médula ósea de ratón hembra CD-1. - - - - -	31
Figura 8.	Porcentaje de células con aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), con brechas y sin brechas, inducidas por el acetato de talio(I). - - - - -	31
Figura 9.	Metafases de células de médula ósea de ratones hembra CD-1. - - - - -	32

CUADROS

Cuadro 1.	Propiedades físicas y químicas de los compuestos de talio.	7
Cuadro 2.	Representación de las aberraciones cromosómicas estructurales en ratón. - - - - -	24-26
Cuadro 3.	Índice mitótico y frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales de las células de médula ósea de ratón hembra de la cepa CD-1 tratados 24 horas con acetato de talio. - - - - -	30

Resumen

El talio (Tl) es un metal pesado, no esencial, considerado extremadamente peligroso por su elevada toxicidad, presenta dos estados de oxidación (Tl^+ y Tl^{3+}), que por su parecido con cationes esenciales como el potasio (K^+) puede atravesar las membranas biológicas e interferir en el metabolismo. Aunque su uso está limitado a muy pequeñas cantidades, se sigue empleando en combinación con otros elementos en la industria y en la elaboración de productos farmacéuticos.

Entre los compuestos de Tl más comunes podemos encontrar al acetato de talio(I) de fórmula CH_3COOTl , el cual se ha usado como agente depilatorio, en tratamiento para la tiña del cuero cabelludo, en la elaboración de raticidas y para el control de plagas, sin embargo, su uso en estas prácticas se ha prohibido debido a que causa intoxicación, envenenamiento y muerte.

Se conoce poco acerca de su efecto genotóxico debido a que los datos que se tienen hasta el momento no son claros ni concluyentes. Estudios *in vitro* indican que inhibe la mitosis e incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), sin embargo no se conoce si estos efectos pueden ser inducidos en algún sistema *in vivo* utilizando mamíferos. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto citotóxico y genotóxico del acetato de talio(I) en células de la médula ósea en ratones CD-1. Para lo cual se formaron 5 grupos de cinco ratones: un grupo control sin tratamiento y cuatro grupos a los que se les administró vía intraperitoneal (i.p.) 4.62, 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg del compuesto de Tl, respectivamente, transcurridas 22 h se les administró colchicina al 0.2% por la misma vía y los animales fueron sacrificados 24 h después del tratamiento con el metal. Inmediatamente después se extrajo la médula ósea de los fémur, se incubó en solución hipotónica (KCl 0.075M) por 45 minutos a 37°C, se fijo el botón celular con solución metanol-ácido acético (3:1), y se goteo en portaobjetos limpios, posteriormente se realizó la tinción de las preparaciones con Giemsa al 5% y se efectuó el análisis del índice mitótico (IM) y de las ACE en el microscopio de campo claro.

Los resultados mostraron que se reduce significativamente el IM en todas las dosis administradas. Mientras que se observó incremento de las ACE en el grupo de 18.5 mg/Kg cuando no se consideraron las brechas (regiones no teñidas en los cromosomas, llamadas lesiones acromáticas), y en los grupos de 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg cuando se consideraron las brechas. Tanto el IM como las ACE no mostraron efecto dosis-dependiente. Estos datos sugieren que el acetato de talio es capaz de interferir con el proceso normal de división celular e inducir daño cromosómico.

De acuerdo con los resultados se concluye, que el acetato de talio(I) es capaz de interferir con el proceso normal de división celular e inducir ACE, lo cual lo coloca como un agente citotóxico y genotóxico (efecto clastógeno) en el modelo de médula ósea de ratón *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

Los seres humanos estamos en contacto con los metales desde el principio de la humanidad, no se puede pensar en la evolución sin considerar el papel que han desempeñado en el desarrollo de la vida, sin embargo, algunos son considerados contaminantes, debido a que en las últimas décadas la quema de combustibles fósiles, la intensa actividad industrial, así como los diversos procesos naturales (por ejemplo las erupciones volcánicas), han incrementado su dispersión y concentración, lo que ha inducido efectos negativos en el ambiente y la salud (Moreno-Sánchez y Devars, 1999; Maluszynski, 2009). En relación a lo anterior, estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a ciertos metales y sus compuestos pueden dañar órganos y tejidos e incrementar el riesgo a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, entre otras (Rana, 2008; Lee *et al.*, 2013).

Los metales se caracterizan del resto de los elementos de la tabla periódica por ser buenos conductores de calor y electricidad, poseer alta densidad y a excepción del mercurio (Hg) tener aspecto sólido a temperaturas normales, además, de que sus sales en disolución forman cationes (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). En comparación con los no metales tienen baja electronegatividad y baja energía de ionización, por lo que es más fácil que cedan electrones a que los ganen (Chang, 2007).

Debido a sus propiedades físicas y químicas, algunos activan o inhiben moléculas que actúan en varios procesos biológicos, por tal motivo los hace esenciales en la dieta de todos los seres vivos (Rojas *et al.*, 1999). Dependiendo de la concentración, el estado de oxidación, la estructura química, la solubilidad y el tipo y tiempo de exposición, pueden modificar el metabolismo originando efectos no deseados sobre los organismos (Rojas *et al.*, 1999; Jiménez-Cisneros, 2001).

Muchos metales como el calcio (Ca), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro(Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), constituyen parte esencial en los sistemas biológicos, es decir son micronutrientes (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y el transporte

de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales, sin embargo, dependiendo de su estado de oxidación o concentración pueden inducir efectos mutágenos, genotóxicos y carcinógenos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Dentro de los metales se encuentra un grupo denominado “metales pesados”, los cuales presentan una densidad mayor a 5 g/cm^3 . Estos se encuentran libres de forma natural en algunos ecosistemas y pueden representar un serio problema ambiental, debido a que en altas concentraciones no se integran completamente a los ciclos biogeoquímicos, por lo que pueden permanecer en el ambiente, algunos de los más conocidos son el Hg, el plomo (Pb), cadmio (Cd) y talio (Tl), que en altas concentraciones son tóxicos (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Moreno-Sánchez y Devars, 1999).

1. Talio (Tl)

El Tl es un metal pesado, no esencial y considerado extremadamente peligroso por su elevada toxicidad (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). Fue descubierto accidentalmente en 1861 por William Crookes en los desechos de una planta industrial de ácido sulfúrico (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011). Su nombre proviene del griego *thallos* que significa “brote o tallo verde” y junto con el boro (B), aluminio (Al), galio (Ga) e indio (In) forman parte del grupo 13 de la tabla periódica. Es suave, maleable, de color gris metálico (**Figura 1**), tiene número atómico 81, masa atómica relativa de 204.383, densidad relativa de 11.85 g/cm^3 , punto de fusión de 303°C , una ebullición de 1457°C , y radio iónico 1.50 \AA . Presenta dos estados de oxidación Tl^+ y Tl^{3+} , siendo más estable el Tl^+ , por su parecido con cationes como el potasio (K^+) puede atravesar las membranas biológicas e interferir con el metabolismo de los organismos (WHO, 1996; Léonard y Gerber, 1997; Nriagu, 1998; Ramsden, 2007; Babić *et al.*, 2009).

El Tl y sus compuestos son utilizados en distintos procesos industriales por lo que son comercializados, entre los más usados se encuentran el acetato de talio(I), sulfato de talio(I), cloruro de talio(I), entre otros, que presentan propiedades en

común como lo es su estado de oxidación y solubilidad en agua (Cuadro I) (WHO, 1996; Léonard y Gerber, 1997; Nriagu, 1998; Ramsden, 2007; Babic *et al.*, 2009).

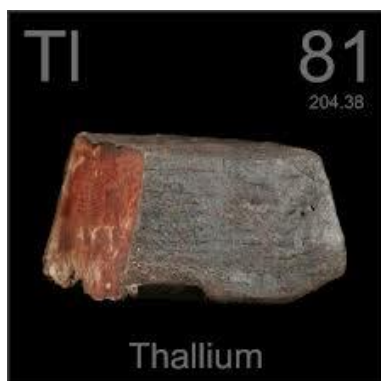


Figura 1. Aspecto físico del talio

1.1. Acetato de talio(I)

El acetato de talio(I), de fórmula CH_3COOTl , es un compuesto utilizado en la elaboración de productos farmacéuticos y en la industria química (Martí-Mercadal y Desoille, 2002), ha sido usado como agente depilatorio y en tratamiento para la tiña del cuero cabelludo, sin embargo, su uso en estas prácticas se ha prohibido debido a que causa envenenamiento y muerte (WHO, 1996; Léonard y Gerber, 1997; Nriagu, 1998), también se ha usado en la elaboración de raticidas y para el control de otras plagas (Repetto y del Peso, 2012).

El acetato de talio(I) se produce a partir del Tl metálico, más hidróxido de carbono y ácido acético, los cuales son evaporados y recristalizados en alcohol. Es una sal que forma cristales blancos, se descompone a temperaturas altas, es soluble en agua, alcohol y cloroformo e insoluble en acetona, tiene un punto de fusión de 131°C , masa atómica de 263.43 y densidad relativa de 3.765 g/cm^3 (IPCS, 1996; EPA, 2009a; Repetto y del Peso, 2012).

Es tóxico para cualquier organismo, y su dosis letal media (DL_{50}), es decir la cantidad de sustancia que causa la muerte a la mitad de los organismos de una población en un tiempo de 14 días vía intraperitoneal (i.p.) es de 37 mg/Kg para

ratón (Repetto y del Peso, 2012; EPA, 2009a) este valor es expresado en términos de masa de la sustancia suministrada por el peso del animal (OECD, 1997).

1.2. Usos del TI

De manera general desde 1920 el TI ha sido utilizado en el control de plagas de roedores, nematodos e insectos (Léonard y Gerber, 1997; Nriagu, 1998; Repetto y del Peso, 1998). Actualmente en la mayoría de los países industrializados su uso está limitado a muy pequeñas cantidades y en otros como Estados Unidos de América el uso para esta práctica está prohibido (EPA, 2009a). No obstante, se estima que la producción mundial de TI es de 10 a 15 toneladas por año (HCN, 2002).

Aunque se demostró su toxicidad poco tiempo después de ser descubierto, se ha utilizado para tratar enfermedades como la sífilis, la gonorrea, la tuberculosis y en la cosmetología como agente depilatorio (Montoya-Cabrera *et al.*, 1991; Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011). Respecto a su uso como raticida e insecticida, los preparados comerciales que se podían encontrar en nuestro país son la pasta de Zelio y el Rat Kill, fabricados a base de sulfato de TI en proporción del 2 y 1%, respectivamente (Rangel-Guerra *et al.*, 1990; Cvjetko *et al.*, 2010).

Dentro de la industria se emplea en combinación con algunos elementos como el Hg en la fabricación de termómetros de baja temperatura (-59°C); selenio (Se) para cristales especiales de alta dureza; de igual manera se ha observado que incrementa la resistencia a la corrosión de metales como el Pb, el Zn, la plata (Ag) y el antimonio (Sb) (Nriagu, 1998; Galván-Arzate *et al.*, 2005; Pourahmad *et al.*, 2010). También es utilizado como isótopo radiactivo, el ^{205}TI en la física para medir períodos de tiempo, el ^{201}TI en medicina para realizar cintigrafía de corazón, hígado, tiroides, y para el diagnóstico de melanoma. Otras aplicaciones que tiene son en la fabricación de joyería de imitación, fuegos artificiales y en los análisis mineralógicos (WHO, 1996; Villaverde *et al.*, 2004; EPA, 2009a).

Cuadro I. Propiedades físicas y químicas de los compuestos de talio

Nombre	Fórmula química	Registro CAS	Masa atómica (g/mol)	Densidad relativa (g/cm ³)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Color	Solubilidad en agua
Talio	Tl	7440-28-0	204.38	11.85	303.5	1,457	Gris metálico	Insoluble
Acetato de talio(I)	CH ₃ COOTl	563-68-8	263.43	3.765	131	Sin dato	Blanco	Muy soluble
Bromuro de talio(I)	TlBr	7789-40-0	284.29	7.557 (a 17.3°C)	480	815	Amarillo pálido	0.5g/L a 25°C
Carbonato de talio(I)	Tl ₂ CO ₃	29809-42-5	468.78	7.110	273	Sin dato	Blanco	40.3g/L a 15.5°C
Cloruro de talio(I)	TlCl	7791-12-0	239.84	7.004 (a 30°C)	430	720	Blanco	2.9 g/L a 15.5 °C
Fluoruro de talio(I)	TlF	7789-27-7	223.38	8.23 (a 4°C)	327	655	Sin color	786 g/L a 15°C
Hidróxido de talio(I)	TlOH	1310-83-4	221.39	Sin dato	139	Sin dato	Amarillo pálido	259 g/L
Oxido de talio(I)	Tl ₂ O	1314-12-1	424.77	9.52 (a 16°C)	300	1080(-O)	Negro	Insoluble
Oxido de talio(III)	Tl ₂ O ₃	1314-32-5	456.76	10.19 (22°C)	717±5	875 (-O ₂)	Negro	Insoluble
Sulfato de talio(I)	Tl ₂ SO ₄	7446-18-6	504.82	6.77	632	Descompone	Blanco	48.7 g/L a 20°C

CAS, del inglés Chemical Abstract Service: que es el número de identificación internacional de productos químicos
Tomado de WHO, 1996.

1.3. Concentraciones en el ambiente

El Tl es un metal que está ampliamente distribuido en el planeta en forma de sales, encontrándose en minerales como la crokesita, lorandita, cristita, avicenita, ellisita, silvita y polucita, como los más importantes (Léonard y Gerber, 1997; Babula *et al.*, 2008). De manera natural es liberado al ambiente por la erosión de rocas y suelo (Anderson *et al.*, 1999). En general en la corteza terrestre las concentraciones van de 0.3 a 0.6 mg/Kg (IPCS, 1996; Cvjetko *et al.*, 2010).

Las concentraciones de Tl en el aire son muy variadas, por ejemplo en las áreas no contaminadas por Tl se reporta menos de 1 ng/m³ (WHO, 1996). Sin embargo, las fábricas cementeras, donde se utilizan óxidos de hierro con alto contenido de Tl, la combustión de carbón para la producción de electricidad, la industria metalurgia ferrosa y no ferrosa, puede aumentar la concentración de Tl y alcanzar hasta 58 ng/m³ (WHO, 1996; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

En agua para beber la concentración máxima es de 2 µg/L (EPA, 2009b), en ríos de 0.001 a 1 mg/L y en el mar de 0.01 a 0.02 mg/L (WHO, 1996; Cvjetko *et al.*, 2010).

La cantidad de Tl aceptado en suelos de cultivo es 1 mg/Kg (WHO, 1996), no obstante el contenido de Tl depende en gran medida de su origen biológico, por ejemplo en terrenos superficiales se reporta de 0.1 a 2 mg/Kg, sin embargo es común encontrar concentraciones hasta de 55 mg/Kg en aquellos derivados de piedra caliza, mármol o granito, debido a que contienen cantidades notables de azufre, el cual atrae cationes de Tl (Jacobson *et al.*, 2005).

El contenido de Tl en los alimentos generalmente es bajo y depende directamente de los niveles en el suelo (Léonard y Gerber, 1997), concentraciones de 1 mg/Kg ya se considera un riesgo potencial para los cultivos (Rao *et al.*, 2008). Las leguminosas, el tabaco, los cereales y alforfón son especialmente sensibles debido a que absorben muy fácilmente este metal (Maluszynski, 2009). En frutas y verduras se ha reportado de 0.05 a 0.1 mg/kg y en setas puede haber hasta 1.2 mg/kg en peso fresco (Léonard y Gerber, 1997), en forraje para animales son menores a 1 mg/Kg (WHO, 1996).

1.4. Cinética y metabolismo

Las concentraciones de TI en el ambiente son de suma importancia, estas influyen directamente en la cantidad del metal al que estén en contacto los organismos (EPA, 2009b), una vez que entra en el cuerpo, la gravedad del envenenamiento dependerá de la cantidad de TI absorbido, la reacción inmune y la tolerancia individual de cada persona. Dependiendo del nivel y tiempo de exposición su grado de toxicidad se puede clasificar en aguda, subcrónica y crónica (Cvjetko *et al.*, 2010).

Los trabajadores de las industrias cementera y eléctrica están expuestos a polvos y humos que contiene TI, por lo que la principal fuente de exposición es la inhalación; sin embargo la población en general está expuesta principalmente por el consumo de agua para beber y alimentos, y en menor grado por el uso de materiales que en su composición tienen TI (Maluszynski, 2009). De lo anterior se deriva que las principales vías de entrada del TI al cuerpo son a través del sistema respiratorio, vía oral y epidermis, **Figura 2** (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Independiente de la vía de entrada, se conoce que los iones de TI son absorbidos de forma rápida, por ser confundido con iones esenciales como el K, y se ha propuesto que es prácticamente en su totalidad (Léonard y Gerber, 1997). Una vez dentro del organismo, el torrente sanguíneo distribuye el TI prácticamente a todos los tejidos y órganos (EPA, 2009a; Maluszynski, 2009). Se ha observado que el riñón, el tejido graso, el pulmón, el cerebro y las gónadas tienden a acumular este metal (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; EPA, 2009a), debido a que puede atravesar las barreras hematoencefálica y hematotesticular (EPA, 2009a; Repetto y del Peso, 2012). También se conoce que puede llegar al embrión o al feto debido a que cruza la barrera fetoplacentaria, **Figura 2** (Villaverde *et al.*, 2004; Eskandari *et al.*, 2011; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

EL TI es excretado lentamente en los primeros días después de la exposición, aunque puede permanecer en el organismo por semanas o meses (Repetto y del Peso, 1998; EPA, 2009a). Se elimina en el pelo, las uñas, el sudor, la saliva, las lágrimas, la leche materna, pero principalmente en la orina y en las heces, **Figura 2**

(EPA, 2009a; Repetto y del Peso, 2012; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

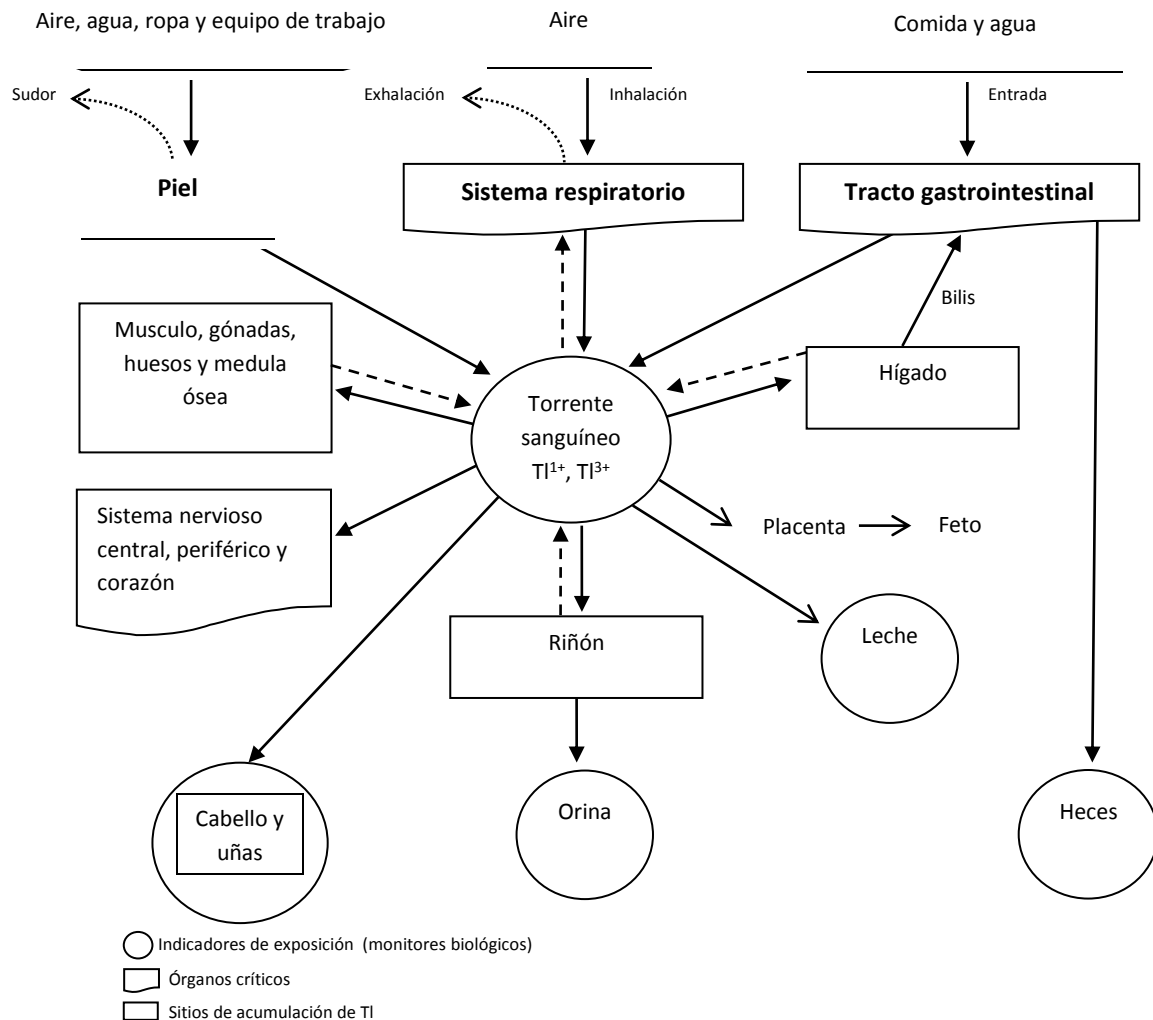


Figura 2. Cinética del TI en mamíferos. La ruta de acceso puede ser a través de la respiración, la alimentación y la piel, en el caso de individuos con exposición ocupacional la absorción puede deberse por el contacto con la ropa o instrumentos de trabajo. El TI cruza las membranas biológicas, se distribuye por la circulación sistémica a todo el cuerpo y se excreta por los fluidos corporales, el cabello, las uñas o las heces. Una porción de TI que se ha acumulado en los órganos y tejidos puede regresar gradualmente al torrente sanguíneo (Tomado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

1.5. Toxicidad en los organismos

El TI no tiene ninguna función biológica por el contrario es considerado un veneno acumulativo capaz de producir efectos adversos sobre la salud (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Los casos de intoxicación por envenenamiento de TI se han dado a conocer en varios países (Maluszynski, 2009), lo que ha llevado a realizar diversos estudios para tratar de explicar cómo este metal daña a los organismos (Cvjetko *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios acerca de la toxicidad del TI en humanos se componen primordialmente de casos clínicos que ocurrieron por ingestión accidental, envenenamiento e intento de suicidio (WHO, 1996; EPA, 2009a). En estos estudios se ha observado que la intoxicación aguda produce taquicardia, hipertensión y dermatitis, además de afectar el tracto gastrointestinal provocando cólicos, náuseas vómito, diarrea, dolor abdominal e inapetencia (EPA, 2009a; Repetto y del Peso, 2012). También se ha observado que afecta al sistema nervioso central y periférico ocasionando dolor en las extremidades, temblor, debilidad, insomnio, convulsiones, ataxia, ansiedad, pérdida de memoria, psicosis, incluso en algunos casos estado de coma y muerte (Repetto y del Peso, 1998; Ramsden, 2007; Pourahmad *et al.*, 2010).

En caso de intoxicación crónica los síntomas son muy variables y bastantes difusos lo que requiere experiencia en el diagnóstico para evitar un daño permanente (Ramsden, 2007). Dentro de las primeras horas se produce dolor abdominal y diarrea (gastroenteritis), lo que puede estar asociado por intoxicación alimentaria, en cuestión de horas se presenta hormigueo doloroso en manos y pies (polineuritis) lo que puede causar ardor y parálisis parcial, la pérdida de cabello (alopecia) es la señal más característica de intoxicación por TI (Cvjetko *et al.*, 2010). Si el envenenamiento fue durante un largo período de tiempo, aparecerán rayas blancas en las uñas (conocidas como líneas de Mess), deterioro visual debido a lesiones en las fibras nerviosas de la retina, confusión, convulsiones y alucinaciones, finalmente la degeneración del corazón, hígado y riñón y la insuficiencia cardiaca y renal provocaran la muerte (Ramsden, 2007; Repetto y del Peso, 2012).

En la mayoría de los casos de envenenamiento por TI, son por la ingestión de rodenticidas a base de TI. Se conoce que la descendencia de mujeres embarazadas e intoxicadas, con una dosis de estos compuestos, al nacer puede padecer insuficiencia respiratoria, criptorquidea bilateral, ano imperforado y niveles elevados de TI en su orina (de 60 µg de TI por litro de orina) y en los primeros años de vida evidencias de retraso psicomotor (Rangel-Guerra *et al.*, 1990).

En animales de experimentación se manifiesta una toxicidad semejante a la mencionada para el humano y otras afecciones. En ratas expuestas a una dosis aguda de 20 mg/Kg de nitrato de talio(I) vía oral, presentaron dificultad para respirar y muerte. Por otro lado, el tratamiento oral subcrónico (15 semanas) de 0 a 3.9 mg/Kg de acetato de talio(I) provocó alopecia, daño en el riñón y en algunos animales la muerte, además la inyección subcutánea aguda de 20 y 50 mg/Kg del mismo compuesto indujo inflamación del intestino delgado, colitis, así como degeneración paulatina en tejido renal, hepático y nervioso (EPA, 2009a).

Estudios de toxicidad en la rata y el embrión de pollo proporcionan evidencia de que la exposición a TI durante el desarrollo puede producir anomalías (incluyendo efectos sobre los sistemas nervioso, vascular y huesos), reducción de peso corporal en los fetos. En ratón macho se observó que la dosis oral de 0 a 3 mg/Kg de TI por día por un periodo de 6 meses disminuye la movilidad y ocasiona deformación de los espermatozoides (EPA, 2009a).

2. Efectos citotóxicos y genotóxicos del TI

Hay evidencias de como el TI afecta a los organismos, sin embargo se conoce poco acerca de la forma en que induce daño genético, lo anterior es debido a que los datos que se tienen hasta el momento no son claros ni concluyentes (EPA, 2009a; Repetto y Del peso 2012).

Entre algunos de estos estudios se encuentra el realizado en procariontes, con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* donde no se observó efecto mutagénico al tratar las bacterias con 266.39 µg/mL nitrato de talio(I) (WHO, 1996; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

En plantas, como la lenteja de agua (*Lemna minor*) y haba (*Vicia faba*), tratamientos con acetato de talio(I) de 0.05-2.63 µg/mL y de 0.5-10 µg/mL respectivamente, indujo rompimientos en el ADN y estrés oxidante (Babić *et al.*, 2009).

En células embrionarias de ratón de la cepa C57BL/6 y de rata CBA tratadas con 10 y 100 µM de carbonato de talio(I) se reportan rompimientos en el ADN y efectos citotóxicos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). Además, en células de ovario de hámster chino tratadas con 1000 µg/mL de acetato de talio(I) se encontró inhibición en la síntesis de ADN y en cultivos de linfocitos humanos reducción en la incorporación de timidina tritiada en el ADN además de disminución en la proliferación celular (Repetto y del Peso, 2012). Por otra parte en células de la médula ósea de hámster chino la administración oral de 5 o 10 mg/Kg de cloruro de talio(I) no indujo cambios en la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) (PGH, 1999).

Aunque los estudios genotóxicos *in vivo* del TI son escasos, en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental de nuestra Facultad (Lab 5 PA, UMIE-Z, UNAM) han realizado investigaciones *in vitro* para conocer la capacidad de del talio y sus compuestos para provocar toxicidad celular y genética usando como modelo células de sangre periférica de humano. En relación a lo arriba mencionado, en linfocitos humanos expuestos de 0.5 a 100 µg/mL de acetato de talio(I), se redujo el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), también se observó incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales en concentraciones menores a 10 µg/mL, sin embargo las evaluaciones de los ICH no mostraron cambios contundentes (Felipe-Reyes, 2011; Hernández-de la Cruz, 2011). Además, en el mismo modelo de linfocitos otros compuestos de TI, sulfato de talio(I) y el cloruro de talio(III) aplicado en las mismas concentraciones indujeron efectos similares, no obstante el talio en estado de oxidación I mostro ser más citotóxico y genotóxico (Mosqueda-Tapia, 2012). En otro estudio, el acetato de talio(I) fue capaz de inducir daño primario al ADN evidenciado con la prueba de electroforesis unicelular en gel (Jaramillo-Cruz, 2011).

3. Indicadores de daño al material genético

El ADN resulta constantemente dañado por factores ambientales y por procesos metabólicos de la célula, los cuales afectan la estructura primaria de la doble hélice, estas lesiones pueden ser originadas de manera endógena, por errores enzimáticos y el propio deterioro espontáneo, y exógena como la radiación UV, la ionizante, mutágenos químicos, quimioterapia, radioterapia, entre otros (Tamarín, 1996; Klug *et al.*, 2006).

Estas lesiones pueden provocar daños irreversibles en los cromosomas, entre estos se encuentran duplicaciones o deleciones de genes, o bien pérdidas o ganancias de segmentos de cromosoma incluso de cromosomas completos, así como translocaciones e inversiones que conducen a reordenamientos dentro o entre cromosomas, que finalmente pueden afectar la supervivencia celular o que conduzca a neoplasias (Klug *et al.*, 2006).

Las pruebas para evaluar la genotoxicidad son indispensables para estimar el daño que puede producir un agente al material genético, estos cambios pueden detectarse por diversos ensayos como las aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), los micronúcleos (MN), la electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) o los ICH, como los más recurridos (Anderson, 1999; Albertini *et al.*, 2000).

3.1. Aberraciones cromosómicas

La información genética tiene un delicado equilibrio, en donde la ganancia o pérdida de un cromosoma, o parte de él, en un organismo diploide conduce a menudo a la letalidad o a un fenotipo anormal. Estos cambios son conocidos como mutaciones cromosómicas o aberraciones cromosómicas (Klug *et al.*, 2006).

Las aberraciones cromosómicas se clasifican en estructurales (ACE) y numéricas (ACN). Las ACE consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones, éstas pueden producirse en una sola cromátida (cromatídica) o en ambas cromátidas (cromosómicas); las ACN se dividen en aneuploidías (ganancia o pérdida de uno o más cromosomas pero no una dotación completa) y euploidias

(donde están presentes dotaciones haploides completas de cromosomas, si son tres o más juegos se les conoce como poliploidías); estos cambios numéricos comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo (Griffiths *et al.*, 2002; Curtis *et al.*, 2008).

El ensayo de AC es uno de los más recurridos en la citogenética convencional, se considera práctico y sensible en la detección de agentes mutagénicos, así como en la inducción de rompimientos cromosómicos (clatogénesis) y es usado para evaluar el daño en la estructura del ADN que pueden inducir diversos agentes químicos, físicos y biológicos, por medio del análisis visual de los cromosomas en metafase (Dev y Tantravahi, 1982; Dean y Danford, 1985). Puede realizarse *in vitro*, en células estimuladas para entrar en división (linfocitos humanos) o *in vivo*, en células en constante proliferación (por ejemplo, la médula ósea) (Krishna *et al.*, 1986).

4. Células de médula ósea como sistema de prueba

Para llevar a cabo el análisis citogenético *in vivo* en ratón es común utilizar la médula ósea, debido a que es una excelente fuente de células potencialmente en división (Krishna *et al.*, 1986; Ganong, 2004), además su genotipo es usado en múltiples investigaciones toxicológicas ya que es uno de los pocos tejidos disponibles que sirven como modelo comparativo con el ser humano y es ideal para evaluar daño al ADN en ensayos de AC e ICH (Krishna *et al.*, 1986; Álvarez-Barrera y Altamirano-Lozano, 1999).

La médula ósea es componente importante del sistema inmune en los organismos superiores, está constituida de células multipotentes de origen hematopoyético, en ella se originan células rojas (eritrocitos), blancas (leucocitos) y plaquetas, **Figura 3**, en los primeros años de vida de los mamíferos se produce activamente en todos los huesos pero hacia la juventud sólo se presenta en los huesos largos y planos, en ella se encuentran las células madre, las cuales son responsables de formar todas las células y derivados celulares que circulan por la sangre (Ganong, 2004; Ross *et al.*, 2004).

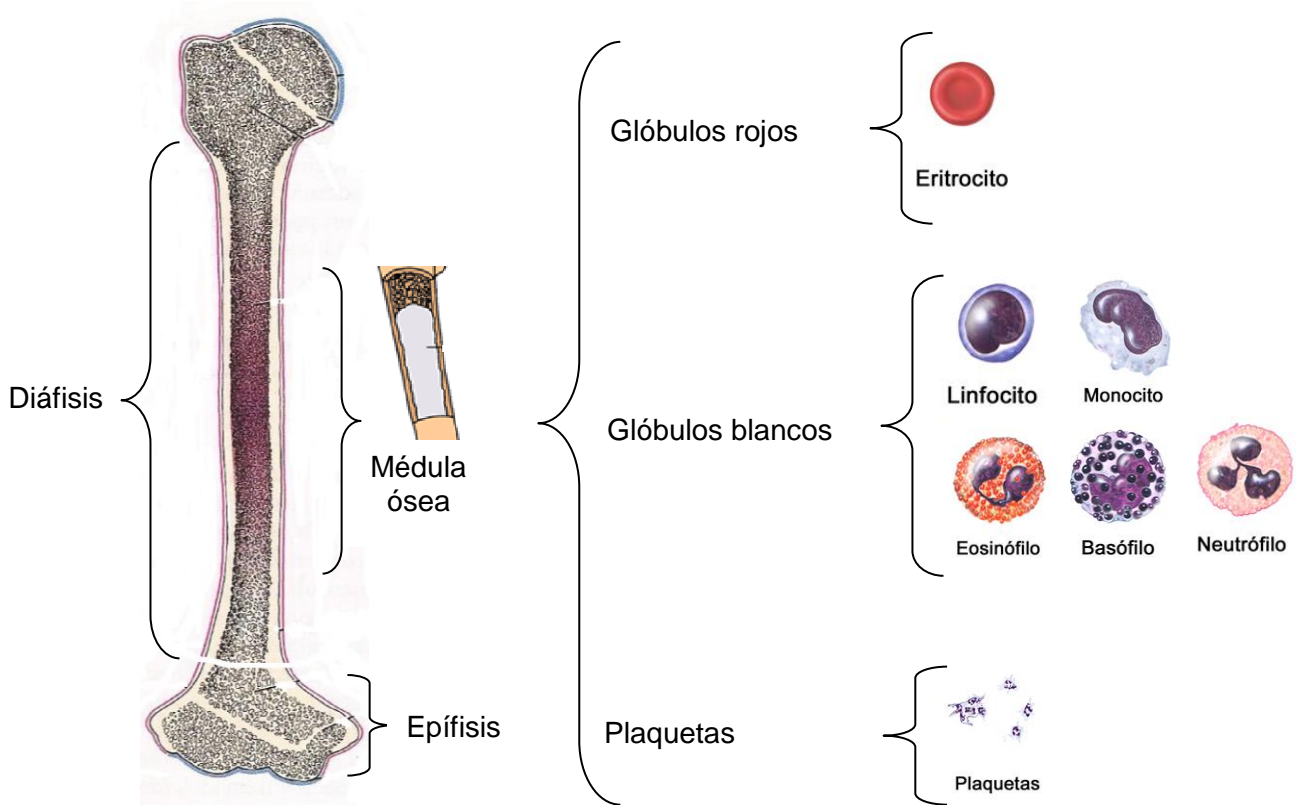


Figura 3. Estructura de un hueso largo típico, donde se muestra el lugar donde se originan las células de la médula ósea (Modificado de Ganong, 2004).

5. El cariotipo

El cariotipo es el juego completo de cromosomas que posee un organismo, suele representarse como un diagrama de los cromosomas metafásicos, basándose principalmente en su morfológica, tamaño y la posición del centrómero, es característico de cada especie y el papel que desempeña en la citogenética es fundamental para la identificación de cambios en los cromosomas (Pierce, 2005).

El análisis citogenético *in vivo* en ratón es utilizado para evaluar efectos de diferentes tratamientos experimentales y es cada vez más importante para las investigaciones genéticas reconocer su cariotipo, debido a que es esencial para identificar los reordenamientos que se producen en los cromosomas (Akeson y Davisson, 2001).

El número de cromosomas de las células somáticas es siempre par, ya que se dispone de dos juegos de cromosomas y cada cromosoma tiene su homólogo, el número de cromosomas de cada serie recibe el nombre de número haploide (n) el cual es heredado por cada uno de los progenitores. El número total de cromosomas es el número diploide (2n). Así en el ratón, n es 20 y 2n es 40. En los mamíferos los cariotipos del macho y de la hembra son diferentes. La hembra tiene dos cromosomas X (XX, homogamética) y el macho tiene un cromosoma X y otro Y (XY, heterogamético). Estos cromosomas que determinan el sexo se llaman, sexuales. El resto de los cromosomas se denominan autosomas, tal como se puede apreciar en la **Figura 4**.



Figura 4. Cariotipo, cromosomas metafásicos de ratón hembra. Tomado de UWMC Cytogenetics, laboratory, 2012.

II. JUSTIFICACIÓN

El talio es un metal tóxico para cualquier organismo, tiene la capacidad de atravesar las membranas biológicas y causar daños severos sobre la salud. Estudios sugieren que la intoxicación afecta el sistema nervioso y conduce a síntomas característicos como la pérdida de peso, alopecia, anorexia, estreñimiento, entre otros.

Al no tener ninguna función biológica, es considerado un veneno acumulativo que por su parecido a cationes esenciales como el potasio (K^+) puede interferir con el metabolismo de los organismos, sin embargo todavía se conoce poco de la forma en que actúa e induce daño genético, debido a que los datos que se tienen hasta el momento no son claros ni concluyentes.

Diferentes reportes respecto a la toxicidad del talio han evidenciado que algunos de sus compuestos son genotóxicos, estudios *in vitro* indican que interfiere con el proceso de división celular e incrementa la frecuencia de ACN y ACE, sin embargo no se conoce si estos efectos pueden ser inducidos *in vivo*, por lo tanto, la propuesta del presente trabajo es determinar los efectos citogenéticos del acetato de talio(I) en células de médula ósea de ratones de la cepa CD-1.

III. HIPÓTESIS

El TI tienen efectos genotóxicos *in vitro*, sin embargo no se sabe si se produce este efecto en sistemas *in vivo*, por lo anterior, si se administra acetato de talio(I) a ratón hembra CD-1 se inducirán cambios en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y en el IM sobre las células de médula ósea.

IV. OBJETIVOS

1. General

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del acetato de talio(I) en células de la médula ósea de ratones hembra de la cepa CD-1 tratados por 24 horas con 4.62, 9.25, 18.5, 37 mg/Kg.

2. Particulares

- Determinar el efecto del acetato del talio(I) sobre el índice mitótico en las células de médula ósea de ratones hembra.
- Evaluar el efecto del acetato de talio(I) sobre la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales en las células de médula ósea de ratones hembra.
- Determinar los valores significativos de los parámetros evaluados y establecer la posible relación dosis-efecto.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Reactivos

Se utilizó acetato de talio (CH_3COOTl , CAS 563-68-8), colchicina ($\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, CAS 64-86-8), ciclofosfamida ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$, CAS6055-19-2) marca Sigma- Aldrich Compañía de Químicos, EUA. Cloruro de potasio (KCl, CAS 7447-40-7), ácido acético (CH_3COOH , CAS 64-19-7) y metanol (CH_3OH , CAS 67-56-1) marca JT Baker México y solución de Giemsa marca Hycel de México, S.A. de C.V.

2. Animales

Se usaron ratones hembra de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal aproximado de 35 g las cuales se mantuvieron en condiciones del bioterio de la FES-Zaragoza, con temperatura, humedad y un fotoperíodo controlado (12 h luz por 12 h de oscuridad), así como alimento y agua *ad libitum*.

3. Tratamientos

Se formaron 6 grupos de 5 ratones cada uno, los cuales quedaron como sigue:

- Grupo testigo, al que no se le administro ningún tratamiento.
- Grupo testigo positivo, al cual se le administró vía intraperitoneal (i.p.) ciclofosfamida, 35 mg/Kg de peso corporal (mutágeno de acción conocida).
- Cuatro grupos tratados con diferentes dosis de acetato de talio(I) vía ip: 1/8, 1/4, 1/2 y una DL_{50} , correspondientes a 4.62, 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg de peso corporal (**Figura 5**).

4. Ensayo de aberraciones cromosómicas

Para el ensayo de AC los ratones de los seis grupos se sacrificaron 24 h después de aplicado el tratamiento. A las 22 h de iniciado el tratamiento se inyectó vía i.p. a cada animal 0.1 mL por cada 10 g de peso corporal de colchicina al 0.2% y 2 h después se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajeron ambos fémur, se obtuvo la médula ósea cortando las epífisis y haciendo pasar entre la cavidad del hueso 5 mL de solución hipotónica (KCl al 0.075 M) a 37°C, colectando de esta manera las

células en un tubo cónico de centrifuga, se resuspendió el botón celular e incubo en baño de agua a 37°C durante 45 min.

Después, se centrifugaron las muestras por 5 min a 1500 rpm y se desechó el sobrenadante. El botón celular se fijó con 5 mL de solución fría de metanol con ácido acético (en proporción 3:1) en la cual se dejaron reposar por 15 min, repitiendo este paso dos veces más con tiempos de 10 y 5 min, respectivamente. Al terminar el tiempo anterior, las muestras se resuspendieron en 0.5 mL de la solución fijadora y se gotearon sobre portaobjetos limpios. Las preparaciones se dejaron secar al aire por 24 horas y se tiñeron durante 30 min en una caja Coplin con solución de Giemsa al 5%.

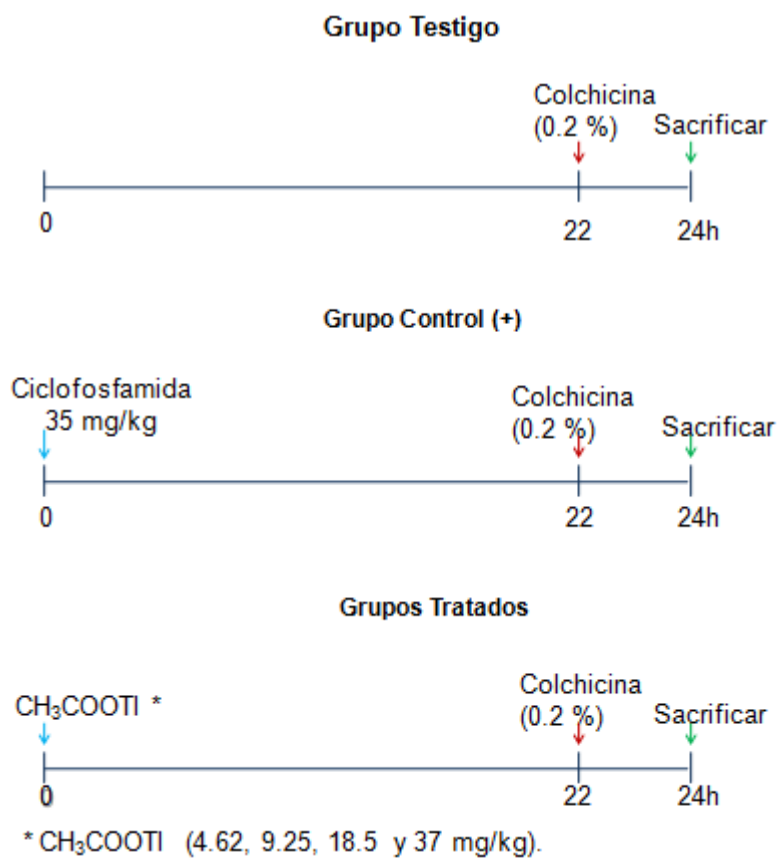


Figura 5. Protocolo que se siguió para la administración de los diferentes tratamientos aplicados en nuestro estudio a ratón hembra CD-1

Estas preparaciones se observaron en un microscopio de campo claro a 400 aumentos para poder evaluar el índice mitótico (IM), el cual se obtuvo contando el número de células en

metafase presentes en 4,000 células por ratón (**Figura 6**). Con base en estos datos se calculó el IM mediante la siguiente fórmula (Rojas *et al.*, 1992):

$$IM = (\text{No. de células en metafase} / \text{No. total de células}) (100)$$

Las aberraciones estructurales fueron evaluadas en los cromosomas de células en metafase a 1000X distinguiendo las aberraciones de tipo cromosómico y cromatídico de acuerdo con la clasificación de Venitt y Parry, 1984 (**Cuadro II**). En 100 células de médula ósea de cada ratón.

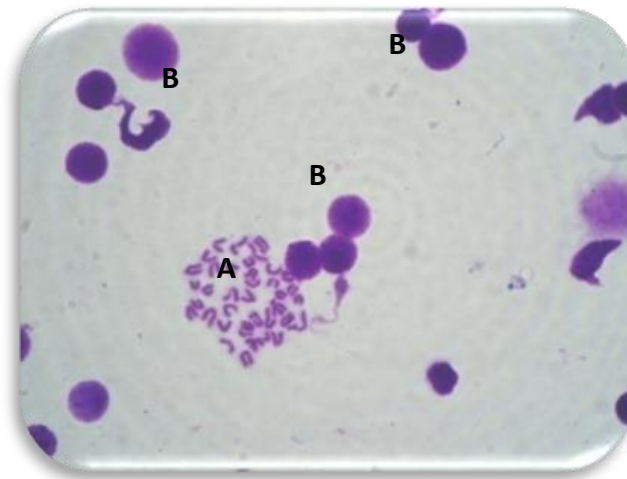







Figura 6. Fotografía de células de médula ósea de ratón hembra, observada a 1000 aumentos. En (A) metafase y en (B) interfases.

Cuadro II. Representación de las aberraciones cromosómicas estructurales en ratón

Aberración	Diagrama con símbolo	Definición y comentario
A. Tipo Cromosómico		
1. Gap (Brecha)		Involucra a ambas cromátidas de un cromosoma en un mismo lugar (<i>loci</i>) Región no-teñida o lesión acromática en un mismo locus en ambas cromátidas con poca desalineación de las cromátidas.
2. Rompimiento		Discontinuidad en el mismo locus de ambas cromátidas originando un fragmento acéntrico. El cromosoma monocéntrico anormal (acortado) puede no ser identificado. La unión hermana donde ocurre la aberración es clasificada como rompimiento tipo cromatídico.
3. Intercambio		Involucra 2 o más lesiones en un mismo o diferente cromosoma. Resulta de un intercambio asimétrico que produce un fragmento el cuál se registra como un solo evento.
3.1. Intercambio entre cromosomas.	Dicéntrico con un fragmento	
3.2. Intercambio, entre de un cromosoma		El fragmento parte del intercambio y se registra por separado. Un fragmento es asignado a cada anillo (dicéntrico).
i) Entre brazos (intercambio inter brazos)	Anillo céntrico con fragmento	
ii) Dentro un brazo (intercambio entre brazos)		La parte céntrica de este intercambio puede no ser identificada. Los anillos acéntricos son pequeños y son llamados minutas o deleción intersticial.
	Anillo acéntrico	

B. Tipo Cromatídico

1. Gap (brecha)



Implica solamente una cromátida del cromosoma excepto la isocromátida rota.

Región no teñida o lesión acromática de menor diámetro que la cromátida, donde hay un mínimo desalineamiento de la cromátida.

2. Rompimiento o deleción.



Región no teñida mayor al diámetro de la cromátida.

Fragmento alineado



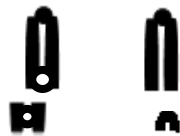
Fragmento asociado con el cromosoma original.

Fragmento desalineado

3. Rompimiento isocromatídico o deleción



Reunión incompleta o unión hermana de los extremos rotos.



Reunión incompleta (no unión). Los fragmentos alineados o desplazados se consideran una deleción *isolocus*.

4. Intercambios:

4.1. Intercambio entre cromosomas

i) Asimétricos



Se origina por rompimientos cromatídicos con distintos cromosomas, se forma un dicéntrico cromatídico y los fragmentos resultantes se unen formando figuras cuadriradales.

ii) Simétricos



No da lugar a la formación de dicéntricos cromatídicos, ni fragmentos al menos que la unión sea completa, también es llamado cuadriradial.

4.2. Intercambio dentro de un cromosoma



Entre brazos de un mismo cromosoma (intercambio)

Asimétrico: No se producen fragmentos

i) Entre brazos



Simétrico

Formando un anillo céntrico, no hay fragmentos si la reunión es completa.

ii) Dentro de un brazo (intracambio)



Minuta o deleción intersticial. El fragmento permanece asociado con el cromosoma original.

5. Isocromatídicos



Dicéntrico trirradial

Se forma un fragmento.



Trirradial monocéntrico

No se forman fragmentos si la unión es completa.

Elaborado a partir de Venitt y Parry, 1984.

5. Análisis estadístico

Para encontrar las diferencias entre el grupo no tratado y los tratados el IM se analizó empleando la prueba Z de proporciones y para el caso de las ACE se utilizó la prueba de χ^2 . En todos los casos se consideró α menor o igual a 0.05 (Kirkland, 1989).

VI. Resultados

1. Efecto del acetato de talio(I) sobre el IM

Para la evaluación del IM se tuvieron 6 grupos de animales, no expuestos (grupo testigo negativo) y expuestos a 4.62, 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg de acetato de talio(I). Además se contó con un grupo positivo tratado con 35 mg/kg de ciclofosfamida.

El IM se calculó a partir de la cuantificación de 4,000 células por ratón, es decir, 20,000 células por grupo, haciendo la distinción de células en metafase en relación a las que se encontraban en interfase **Cuadro III**. Los datos del promedio del IM muestran que el acetato de talio(I) reduce significativamente el IM en todas las dosis administradas comparado con el grupo testigo, sin embargo esta reducción no sigue una relación dosis-dependiente, **Figura 7**.

Como era de esperarse para el grupo positivo tratado con ciclofosfamida, el IM se redujo significativamente de 0.69 ± 0.05 contra 1.31 ± 0.14 del testigo negativo ($P < 0.05$).

2. Efecto del acetato de talio(I) sobre la frecuencia de ACE.

Para llevar a cabo el análisis de las ACE inicialmente se programó analizar 100 células por ratón, 500 células por grupo, sin embargo en algunos casos el número fue menor debido a que no se encontraron suficientes células para llevar a cabo el análisis cromosómico.

En el **Cuadro III**, además de IM se muestra la frecuencia de ACE, de tipo cromosómico, cromatídico y las brechas, así como la suma del total de ACE incluyendo y excluyendo las brechas, de cada animal por cada grupo. También se pueden observar el número de células con ACE (sin brechas). Los datos promedio de esta última evaluación (porcentaje de células con ACE sin brechas) se muestra en la **Figura 8**, donde se observa diferencia significativa en la dosis de 18.5 mg/Kg de acetato de talio(I) comparado con el grupo testigo negativo. No obstante, al considerar las células sin brechas y las con brechas, se encontraron diferencias estadísticas en los grupos tratados con 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg de acetato de talio(I), respectivamente.

Para el grupo testigo positivo, como era de esperarse, los cromosomas de las células de médula ósea de los ratones expuestos a 35 mg/Kg de ciclofosfamida reflejaron alto daño. Debido a la alta toxicidad y a la reducción de IM, el rango de células analizadas fue de entre 68 a 100 metafases por animal, de las cuales todas presentaban algún tipo de aberración estructural, y cerca del 80% presentaban más de 10 aberraciones por metafase y de este porcentaje más de la mitad corresponden a metafases con cromosomas pulverizados, **Figura 9 A-F**.

Cuadro III. Índice mitótico (IM) y frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) de las células de médula ósea de ratón hembra de la cepa CD-1, tratados 24 h con acetato de talio(I) (CH₃COOTI).

Tratamiento (mg/Kg)	Ratón	IM	Frecuencia de ACE						Células con ACE ^a
			Células analizadas	Tipo cromatídico	Tipo cromosómico	Brechas	Total		
						con brechas	sin brechas		
Testigo negativo	1	1.72 ± 0.05	100	0	0	0	0	0	0
	2	1.28 ± 0.21	100	1	0	0	1	1	1
	3	1.04 ± 0.10	96	0	0	0	0	0	0
	4	1.31 ± 0.24	100	0	0	1	1	0	0
	5	1.21 ± 0.10	82	0	0	0	0	0	0
CH ₃ COOTI 1/8 de la DL ₅₀ (4.62)	6	0.65 ± 0.05	100	0	0	2	2	0	0
	7	0.55 ± 0.05	100	0	0	1	1	0	0
	8	0.67 ± 0.11	100	0	0	1	1	0	0
	9	0.57 ± 0.07	100	0	0	0	0	0	0
	10	0.35 ± 0.04	100	0	0	0	0	0	0
CH ₃ COOTI 1/4 de la DL ₅₀ (9.25)	11	0.47 ± 0.04	90	1	0	2	3	1	1
	12	0.22 ± 0.08	82	0	0	2	2	0	0
	13	0.30 ± 0.03	100	1	0	3	4	1	1
	14	0.42 ± 0.09	100	0	0	1	1	0	0
	15	1.01 ± 0.04	100	1	0	0	1	1	1
CH ₃ COOTI 1/2 de la DL ₅₀ (18.5)	16	0.19 ± 0.06	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	17	0.84 ± 0.11	100	1	0	2	3	1	1
	18	0.58 ± 0.11	94	2	0	1	3	2	2
	19	0.93 ± 0.11	100	1	0	2	3	1	1
	20	0.89 ± 0.05	95	1	0	1	2	1	1
CH ₃ COOTI 1 DL ₅₀ (37)	21	1.34 ± 0.05	90	0	0	3	3	0	0
	22	1.40 ± 0.05	100	1	0	3	4	1	1
	23	0.91 ± 0.07	94	1	0	3	3	0	1
	24	0.56 ± 0.09	78	1	0	0	1	1	1
	25	1.00 ± 0.12	93	0	0	1	1	0	0

IM, representación de la media ± error estándar

Nd, No determinado por ausencia de metafases

^a No se incluyeron las células que únicamente tenían brechas

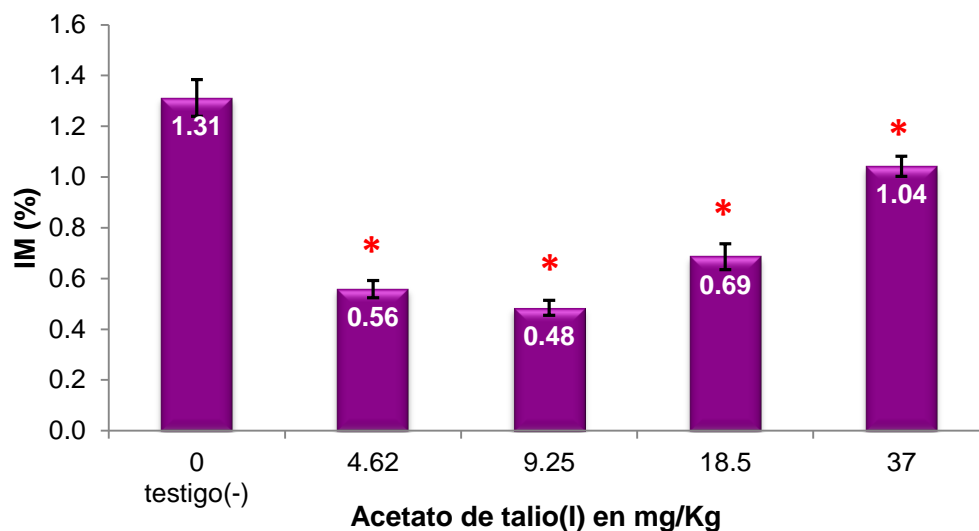


Figura 7. Efecto del acetato de talio(I) sobre el índice mitótico (IM) de las células de médula ósea de ratón hembra CD-1. Los datos están representados por la media \pm EE (* $P < 0.05$ comparado con el testigo negativo, prueba Z de proporciones).

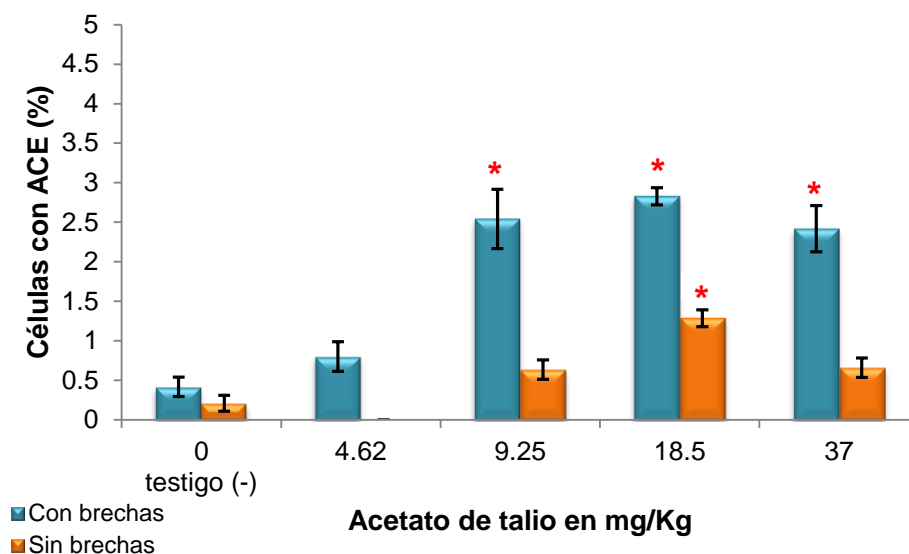


Figura 8. Porcentaje de células con aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), con brechas y sin brechas, inducidas por el acetato de talio(I). Los datos están representados por la media \pm EE (* $P < 0.05$ comparado con el grupo testigo, prueba de χ^2).

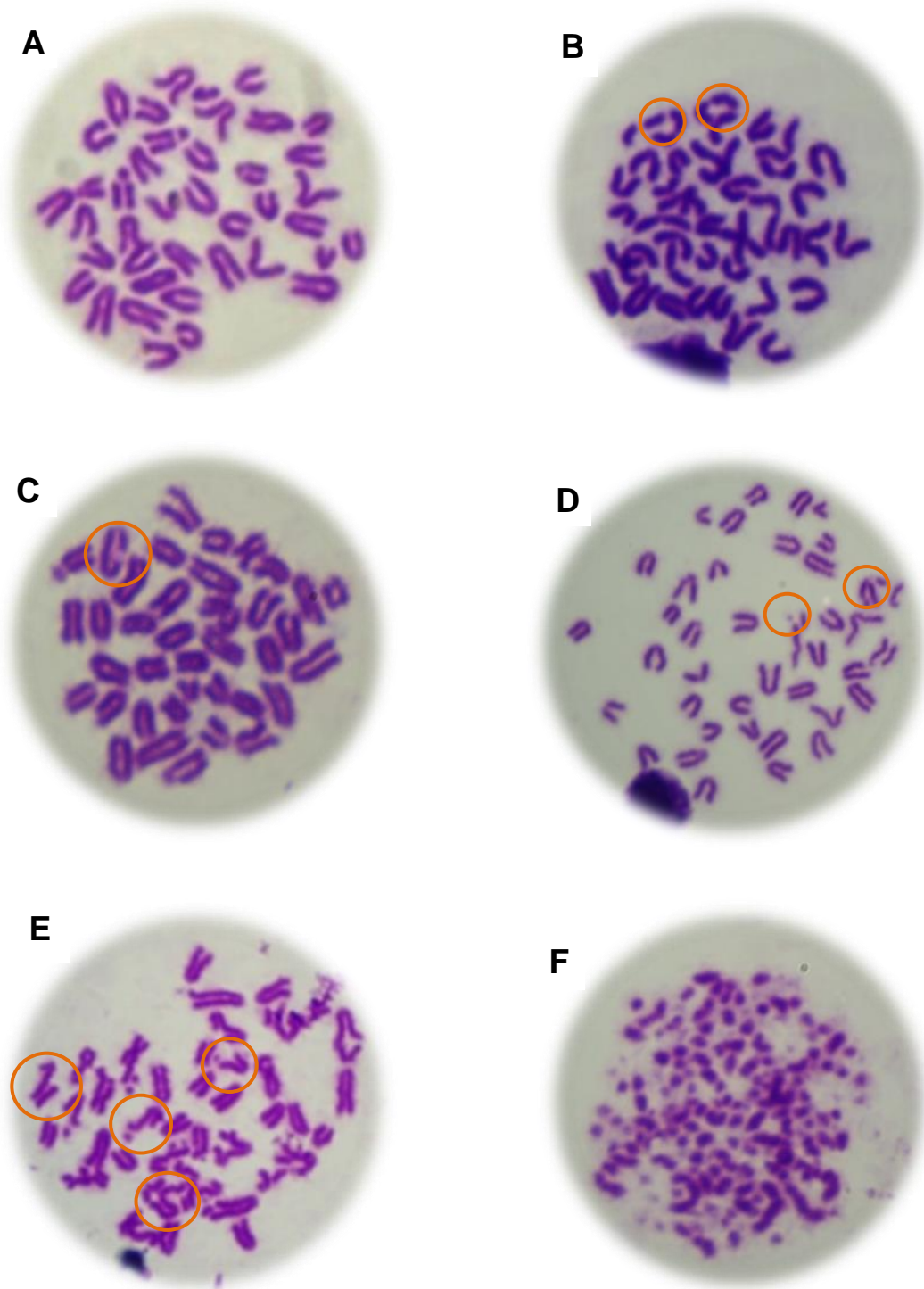


Figura 9. Metafase a 1000X de células de médula ósea de ratones hembras de la cepa CD-1 no tratados (A), expuestos 24 h con acetato de talio(I) B-D) y expuestos 24 h con ciclofosfamida (E y F). En A) cariotipo normal del ratón, en B) brecha cromatídica, en C) rompimiento cromatídico, en D) minuta y fragmento, en E) metafase con múltiples aberraciones (rompimientos, intercambios), y en F) pulverización.

VII. Discusión

Los seres vivos estamos expuestos a la acción de numerosos agentes físicos, químicos y biológicos potencialmente tóxicos, los cuales pueden provocar diversos efectos bioquímicos, genéticos, fisiológicos que conducen a diversas patologías. Los metales son un grupo importante de agentes capaces de interactuar con los organismos, las células, los componentes celulares y el material genético (Rojas *et al.*, 1999; Rodríguez-Arnaiz, 2003).

Los cambios que ocurren en la célula son importantes para la identificación de daño que puede inducirse en cualquier sistema biológico (Schwarz y Watkins, 2008). Uno de los biomarcadores más utilizados en los ensayos citogenéticos es el IM, el cual da información relacionada con cambios en la división celular que puedan ser provocados por xenobióticos (Clare y Clements, 2001). Dicho de otra manera, el IM nos indica la proporción de células que entran en mitosis (por ejemplo metafase mitótica), en relación al total de células en mitosis e interfase (Rojas *et al.*, 1992; Mateos-Nava, 2012).

Los resultados obtenidos al administrar 4.62, 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg de acetato de talio(I) a ratón hembra CD-1, muestran que el talio reduce el IM en las células de médula ósea en todas las dosis. La médula ósea es un tejido en constante proliferación por lo que cambios en el IM son indicadores de toxicidad sobre el tejido y nos permite estimar la toxicidad sobre el organismo completo. Generalmente la reducción en el IM es el resultado de diversos efectos metabólicos y celulares, que por un lado, ocasionan que la célula retrase su ciclo celular y por lo tanto requiera más tiempo para completarlo, y por otro lado, los daños en las macromoléculas y los componentes celulares ocasionen que la célula pierda su capacidad de proliferar (Clare y Clements, 2001; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010) e incluso desencadenar procesos de muerte, tal como apoptosis y necrosis (Schwarz y Watkins, 2008).

El mecanismo detallado por el cual el Tl ejerce su toxicidad no es claro, se sabe que sus efectos tóxicos son provocados principalmente por que el ion Tl^+ no es diferenciado por la célula de iones esenciales como el K^+ , debido a que su radio iónico es similar, 1.49 Å y 1.33 Å, respectivamente (Britten y Blank, 1968; Maluszynski, 2009). Esta característica en nuestro sistema posiblemente permite al Tl que sea absorbido fácilmente por las células de peritoneo, llegar al torrente sanguíneo, distribuirse a la médula ósea y otros tejidos, tal como se observó al administrar el acetato de talio(I) y otros compuestos del metal vía i.p. y oral en distintos modelos murinos (EPA, 2009a).

Si bien los trabajos en sistemas *in vivo* con Tl son escasos, este efecto de reducción de IM se ha observado en estudios previos realizados en modelos *in vitro* usando cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica expuestos con acetato de talio(I), sulfato de talio(I) y cloruro de talio(III) (Felipe-Reyes, 2011; Hernández-de la Cruz, 2011; Mosqueda-Tapia, 2012).

Algunos autores han reportado que el carbonato de talio(I) disminuye la sobrevivencia en líneas celulares de células embrionarias de ratón C57BL/6 y de rata CBA a concentraciones de 10-100 μM (Zasukhina *et al.*, 1983; PHG, 1999; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013), además, en otros modelos *in vitro* el talio disminuye la incorporación del análogo de base timidina tritiada en el ADN, lo cual indica que las células no entran en fase de S (Repetto y del Peso, 1998). Ambos eventos están relacionados y si estos suceden en nuestro modelo *in vivo*, podría explicar la disminución de la proliferación celular evaluada por el IM.

Dentro de los aspectos metabólicos que afecta el Tl se encuentra la elevada afinidad por los grupos sulfhídricos de las proteínas, la interferencia con enzimas como la piruvato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa importantes claves en la actividad mitocondrial (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011), entre otras moléculas que permiten que se mantenga la homeostasis celular y orgánica. Asimismo el Tl puede reaccionar con el glutatión provocando disminución de la

actividad antioxidante (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Nava-Ruíz y Méndez-Armenta 2011). Estos eventos puede ser los causantes en parte de los cambios en la proliferación que consecuentemente inducen toxicidad celular (Kiliç y Kutlu, 2010).

Las variaciones observadas en el IM entre los organismos del mismo grupo se deben a las variaciones interindividuales, factores intrínsecos de la cepa, tal como el metabolismo y carga genética. Las diferencias entre los grupos no tratados en relación a los tratados con acetato de talio(I) se deben a los efectos provocados por la administración del químico.

A pesar de que en este estudio no se observó efecto dosis dependiente, en los grupos tratados con TI de manera general se presentó disminución del IM y en el grupo al que se le administro una DL_{50} el efecto citotóxico fue menos acentuado, esto último en relación a las dosis que le antecede. Este efecto puede deberse, por un lado a que las células solo permiten que cierta cantidad del metal cruce al citoplasma, y por otro, que el metabolismo de la célula desencadene procesos de desintoxicación y eliminación de TI, lo cual le permite a las células continuar con su ciclo y dividirse.

El porcentaje de células con ACE es un buen indicador de genotoxicidad (Hernández-de la Cruz, 2011). El grupo tratado con 18.5 mg/Kg de acetato de talio(I) mostro incremento estadístico en el porcentaje de células con aberraciones sin incluir las brechas, mientras que, en las dosis de 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg cuando se toman en cuenta las brechas ($P < 0.05$). Las aberraciones cromosómicas observadas con mayor frecuencia fueron de tipo cromatídico, tal como rompimientos, deleciones y minutas. La frecuencia de aberraciones inducidas por el talio es baja pero como se menciona es estadísticamente significativa, lo anterior coloca al talio(I) como un agente con acción clastógena, es decir, capaz de inducir rompimientos en los cromosomas.

Al considerar las brechas (regiones no teñidas conocidas como “acromáticas”) las AC se incrementaron y se evidenciaron las diferencias estadísticas. A pesar de que algunos autores consideran las brechas como posible marcador de daño al ADN, otros no las cuantifican porque mencionan que pueden ser posibles artefactos de la técnica y su significado está en discusión (Savage, 2004). En este trabajo se decidió incluir estas lesiones debido a que varios metales incrementan su frecuencia (Rodríguez-Arnaiz, 2003) y se menciona que la formación de las regiones acromáticas son verdaderas discontinuidades en los cromosomas formadas por falta de material genético y que deben cuantificarse cuando se realizan análisis citogenéticos, ya que al omitirlas se podría perder información del daño cromosómico y de la genotoxicidad del agente químico en cuestión (Savage, 2004; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010), además en este estudio pueden ser un buen biomarcador del daño que induce el TI.

En relación a los valores de las células con aberraciones estructurales del grupo testigo, en la literatura se reporta porcentajes entre $0.5 \pm 0.60\%$ a $2.65 \pm 2.26\%$ para ratón hembra y macho, respectivamente (Loyola-Álvarez, 1998; Álvarez-Barrera y Altamirano-Lozano, 1999). Los datos encontrados en este estudio, para el grupo testigo, que fueron de $0.41 \pm 0.54\%$, están dentro del valor esperado. Esto confirma que el incremento de las ACE de los grupos tratados con acetato de talio(I), son alteraciones importantes que contribuyen a la toxicidad del TI sobre los organismos.

En la literatura, los estudios de genotoxicidad del talio empleando sistemas biológicos de prueba son escasos y contradictorios (Léonard y Gerber, 1997; Cvjetko *et al.*, 2010). Por una parte, no encuentran efectos significativos y por otro se reportan efectos positivos. Por ejemplo, el cloruro de talio(III) no induce ICH en células de médula ósea de hámster tratados por 24 horas (PHG, 1999), ni tampoco ICH o ACE en cultivos de linfocitos de una persona intoxicada con 200 mg de un veneno que contenía sulfato de talio(I), pero si MN con prueba de centrómero (Hantson *et al.*, 1997).

Otras pruebas muestran efectos importantes. El carbonato de talio(I) induce rompimientos en el ADN en células embrionarias de ratón C57BL/6 y de rata CBA (Zasukhina *et al.* 1983; PHG, 1999), efecto que también se ha observado en células de plantas expuestas al acetato de talio(I) (Babić *et al.*, 2009). Algunos estudios efectuados en laboratorio donde se realizó el presente estudio, usando el modelo *in vitro* de células de sangre periférica de humano, se encontró que acetato de talio(I) induce daño primario al ADN, además este compuesto y otras fórmulas químicas (sulfato de talio(I) y cloruro de talio(III)) incrementan la frecuencia de células con ACE (incluyendo y excluyendo brechas) (Felipe-Reyes, 2011; Hernández-de la Cruz, 2011; Mosqueda-Tapia, 2012). Estos resultados junto con los del presente estudio, confirman que el talio(I) induce genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. Dicha genotoxicidad en ambos sistemas es muy similar, es decir, incrementan ligeramente la frecuencia de ACE.

Se ha propuesto que el daño al ADN puede originarse por las radicales libres, los cuales se generan por fuentes endógenas, como los procesos fisiológicos normales dentro de los cuales se encuentra la respiración, o por fuentes exógenas como las interacciones con xenobióticos tales como los metales (Rodríguez-Arnaiz, 2003). Cuando el mecanismo de control antioxidante es rebasado por las especies reactivas, el potencial redox de la célula cambia a un estado de estrés, incrementando el potencial de daño hacia las biomoléculas tales como el ADN, los lípidos y las proteínas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Mateos-Nava, 2012).

Varios metales, incluyendo el cadmio, el arsénico y el vanadio, son genotóxicos, debido a que pueden inducir rompimientos de cadena sencilla y doble en el ADN (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010), lesiones que son consideradas importantes en la etiología de las ACE (Natarajan, 2002), y que además estos metales pueden inducir (Rodríguez-Arnaiz, 2003). En este estudio no se evaluó la respuesta antioxidante ni especies reactivas de oxígeno, sin embargo, si estos procesos

están alterados por el tratamiento con talio en los ratones, podría disminuir los niveles de glutatión, favorecer la formación de oxígeno reactivo y otros tipos de radicales que podrían reaccionar con la molécula de ADN provocándole daño primario y finalmente lesiones en los cromosomas.

VIII. Conclusiones y comentarios finales

- El acetato de talio(I) reduce significativamente el IM en todas las dosis administradas sin un efecto dosis respuesta.
- El acetato de talio(I) incrementa de manera débil pero significativa las ACE en el grupo de 18.5 mg/kg sin considerar las brechas, y en los grupos de 9.25, 18.5 y 37 mg/kg cuando se todas las ACE incluyendo las brechas.
- Los resultados anteriores demuestran que el acetato de talio(I) interfiere con el proceso normal de división celular e induce ACE, lo cual lo coloca como un agente citotóxico y genotóxico, con actividad clastógena.

IX. Referencias bibliográficas

- Albertini JR, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Emminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD y Aitio A. (2000). IPCS. Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463:111-172.
- Akeson EC y Davisson MT. (2001). Mitotic chromosome preparations from mouse cells for karyotyping. En: Current protocols in human genetics. John Wiley y Sons, Inc. EUA. 4.10.1–4.10.19.
- Álvarez-Barrera L y Altamirano-Lozano MA. (1999). Differential response to induction of chromosomal aberrations between female and male mice treated with a low dose of cyclophosphamide. *Med Sci Res* 27:193-196.
- Anderson CWN, Brooks RR, Chiarucci A, La Coste CJ, Leblanc M, Robinson BH, Simcock R y Stewart RB.(1999). Phytomining for nickel, thallium and gold. *J Geochem Explor* 67:407-415.
- Anderson D. (1999). Citogenetics. En: Ballantyne B, Marrs T y Turner P (Eds). General and applied toxicology. Vol. 2. Stockton Press. EUA. 937-951.
- Babić M, Radic S, Cvjetko P, Roje V, Pevalek-Kozlina B y Pavlica M. (2009). Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium (I)-acetate. *Aquat Bot* 91:166-172.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L y Kizek R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ Chem Lett* 6:189-213.
- Britten JS y Blank M. (1968). Thallium activation of the (Na⁺-K⁺) activated ATPasa of rabbit kidney. *Biochim Biophys* 159:160-166.
- Chang R. (2007). Metalurgia y la química de los metales. En: Química. Novena edición, Editorial McGraw-Hill. China. pp. 894-933.
- Clare G, Clements J. (2001). Industrial Genotoxicology Group (IGG): Cytotoxicity in vitro, Royal Society of Medicine, London, UK. *Mutagenesis* 16:179-182.

- Curtis H, Barnes NS, Schnek A y Massarini A. (2008). *Biología*. Séptima edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 127-189.
- Cvjetko P, Cvjetko I y Pavlica M. (2010). Thallium toxicity in humans. *Arh Hig Rada Toksikol* 61:111-119.
- Dean BJ y Danford N. (1985). Assays for the detection of Chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. En: Venitt S y Parry JM (Eds). *Mutagenicity testing a practical approach*. IRL PRESS Oxford-Washington. EUA. 187-231.
- Dev VG y Tantravahi R. (1982). Techniques for Chromosome Analysis. En: Shay JW (Ed). *Techniques in somatic cell genetics*. Plenum Publishing Corporation. EUA. 493-511.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2009a). Washington, D.C. Toxicological review of thallium and compounds. (6 de septiembre de 2013). En línea: <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/1012tr.pdf>.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2009b). National Primary Drinking Water Regulations. (23 de enero de 2013). En línea: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>.
- Eskandari MR, Pourahmad J y Daraei B. (2011). Thallium (I) and thallium (III) induce apoptosis in isolated rat hepatocytes by alterations in mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol Environ Chem* 93:145-156.
- Felipe-Reyes M. (2011). Valoración de la toxicidad de acetato de talio (CH₃COOTl) *in vitro* mediante tinción diferencial de cromátidas hermanas. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- Ganong WF. (2004). *Fisiología médica*. Decimonovena Edición. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 561-592.
- Galván-Arzate S y Santamaría A. (1998). Thallium toxicity. *Toxicol Lett* 99:1-13.
- Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos O, Maldonado P, Vázquez-Román B, Ríos C y Santamaría A. (2005). Changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol* 43:1037-1045.

- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC y Gelbart WM. (2002). Genética. Séptima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 860.
- Hantson P, Desoir R, Léonard ED y Crutzen-Faty M.C. (1997) Cytogenetic observation following thallium poisoning. *J Toxicol Environ Health* 50:97-100.
- HCN, Health Council of the Netherlands. (2002). Committee on Updating of Occupational Exposure Limits: Thallium and water-soluble thallium compounds. Health-based Reassessment of Administrative Occupational Exposure Limits. 57:1-18.
- Hernández-de la Cruz H. (2011). Evaluación del daño cromosómico e índice mitótico en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. (1996).Thallium. Environmental health criteria.Vol. 182. WHO, World Health Organization. Ginebra.
- Jacobson AR, McBride MB, Baveye P y Steenhuis TS. (2005). Environmental factors determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. *Sci Total Environ* 345:191-205.
- Jaramillo-Cruz E. (2011). Evaluación del daño al ADN en leucocitos humanos tratados *in vitro* con acetato de talio. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Jiménez-Cisneros BE. (2001). La contaminación ambiental en México, causas, efectos y tecnología apropiada. Editorial Limusa/Noriega Editores. México, pp. 62.
- Kiliç GA y Kutlu M. (2010). Effects of exogenous metallothionein against thallium-induced oxidative stress in rat liver. *Food Chem Toxicol* 48:980-987.
- Kirkland DJ. (1989). Statistical evaluation of mutagenicity test data. Press Syndicate of the University de Cambridge. Gran Bretaña, 141-154.
- Klug WS, Cummings MR y Spencer CA. (2006). Conceptos de genética. Octava edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España. 883 p.
- Krishna G, Nath J y Ong T. (1986). Murine bone marrow culture system for cytogenetic analysis. *Mutat Res* 164: 91-99.
- Lee JC, Son YO, Pratheeshkumar P y Shi X. (2013). Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Bio Med* 53: 742-757.
- Léonard A. y Gerber GB. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutat Res* 387: 47-53.

- Loyola-Álvarez R. (1998). Evaluación del índice mitótico (IM) y la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en células de médula ósea de ratón tratadas con cloruro de litio. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Maluszynski MJ. (2009). Thallium in environment. Institute of Environment Protection, Poland. *Environ Protect Nat Resources* 40:31-38.
- Martí-Mercadal JA y Desoille H. (2002). Talio. En: Medicina del Trabajo. Segunda edición. España. Editorial Masson, 305-330.
- Mateos-Nava RA. (2012). Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y CDK de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. FES Zaragoza, UNAM.
- Montoya-Cabrera MA, Saucedo-García JM, Escalante-Galindo P y López-Morales E. (1991). Intoxicación por talio que simulo lupus eritematoso sistémico en un niño. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. *G Méd Méx* 127(4):333-336.
- Moreno-Sánchez R y Devars S. (1999). Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En: Cervantes C y Moreno-Sánchez R (Eds). Contaminación ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos, AGT Editor. México. pp. 1-10.
- Mosqueda-Tapia G. (2012). Análisis citogenético en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con sulfato de talio (Tl₂SO₄) y tricloruro de talio (TlCl₃). Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Natarajan AT. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 504:3-16.
- Nava-Ruiz C. y Méndez-Armenta M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién Méx* 16(3):140-147.
- Nriagu JO. (1998). History, production and uses of thallium. En: Nriagu JO (Ed), Thallium in the environment. Vol. 29, EUA: John Wiley and Sons, Inc.1-14.
- OECD. (1997). Guideline for the testing of chemicals. Test 473: *In vitro* mammalian chromosome aberration. Paris, Francia.
- PHG. Public Health Goal. (1999) Thallium in drinking water. Office of Environmental Health Assessment. California Environmental Protection Agency. EUA.

- Pierce BA. (2005). Genética un enfoque conceptual. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 234-261.
- Pourahmad J, Eskandari MR y Daraei B. (2010). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for thallium(I) and thallium(III). *Environ Toxicol* 25:456-467.
- Ramsden DB. (2007). Thallium. En: Waring RH, Steventon GB y Mitchell SC (Eds). Molecules of death. 2da. Edición. Imperial College Press, Reino Unido. pp.415-422.
- Rana SVS. (2008). Metals and apoptosis: Recent developments. *Trace Elem Med* 22: 262-284.
- Rangel-Guerra R, Martínez-Héctor R y Villarreal-Héctor J. (1990). Intoxicación por talio, experiencia con 50 pacientes. Hospital Universitario. Universidad de Nuevo León. Servicio de Neurología. *G Méd Méx* 126(6): 487-495.
- Rao CRM, Ruiz-Chancho MJ, Sahuquillo A y López-Sánchez JF. (2008). Assessment of extractants for the determination of thallium in an accidentally polluted soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:334-338.
- Repetto G y del Peso A. (2012). Gallium, indium and thallium, En: Bingham E y Cohrssen B (Eds). Patty's toxicology. Vol. 1. Sexta edición, E.U: John Wiley and Sons, Inc. EUA. pp. 257-353.
- Repetto G y del Peso A. (1998). Human thallium toxicity. En: Nriagu JO (Ed). Thallium in the environment. Vol. 29. EUA: John Wiley and Sons, Inc. EUA. pp. 167-199.
- Rodríguez-Arnaiz R. (2003). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Cuarta edición. Fondo de Cultura Económica. México. 95 p.
- Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA. (2006). Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev Int Contam Ambient* 22(4):173-186.
- Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA. (2013). Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug Chem Toxicol* 36:369-83.
- Rodríguez-Mercado JJ, Álvarez-Barrera L y Altamirano-Lozano MA. (2010). Chromosomal damage induced by vanadio oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 33:97-102.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA y Ostrosky-Wegman P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res* 443:157-181.

- Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodríguez R y Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible end points in genetic toxicology testing. *Mutat Res* 282:283-286.
- Ross MH, Gordon, IK y Wojciech P. (2004). Histología, texto y atlas a color con Biología celular y molecular. Editorial Medica Panamericana. México. pp. 182-245.
- Savage, JR. (2004). On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogen Gen Res* 104:46-55.
- Schwarz SL y Watkins JB. (2008). Principles. En: Greim H y Snyder R (Eds). Toxicology and risk assessment: a comprehensive introduction. John Wiley and Sons, Inc. EUA. pp. 112-132.
- Tamarín RH. 1996. Principios de genética. Cuarta edición, Editorial Reverté, España. 607 p.
- UWMC, Cytogenetics laboratory, 2012. Universidad de Washington. En línea:<http://www.pathology.washington.edu/galleries/cytogallery/main.php?file=mouse%20karyotype>. (05 de octubre de 2013).
- Venitt S, y Parry JM. (1984). Mutagenicity testing a practical approach. IRL Press Limited. Inglaterra. pp 187-232.
- Villaverde MS, Hanzel CE y Verstraeten SV. (2004). *In vitro* interactions of Thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defense system. *Free Radic Res* 38:977-984.
- WHO, World Health Organization. (1996). Thallium. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria 192, Ginebra.
- Zasukhina GD, Vasilyeva IM, Sdirkova NL, Krasovsky GN, Vasyukovich LY, Kenesariev UI, Butenko PG. (1983). Mutagenic effect of thallium and mercury salts on rodent cells with different repair activities. *Mutat Res* 124:163-173.