



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL ACETATO DE TALIO EN
D. melanogaster MEDIANTE EL ENSAYO DE MUTACIÓN Y
RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART) EN ALA, CRUZA ESTÁNDAR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A

G A R C Í A C A S T R O C A R L O S

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido.

Comité tutorial:

M. en C. Irma Elena Dueñas García.

M. en C. Luis Felipe Santos Cruz.

M. en C. Laura Castañeda Partida.

Dra. Ana María García Bores.



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México,
2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

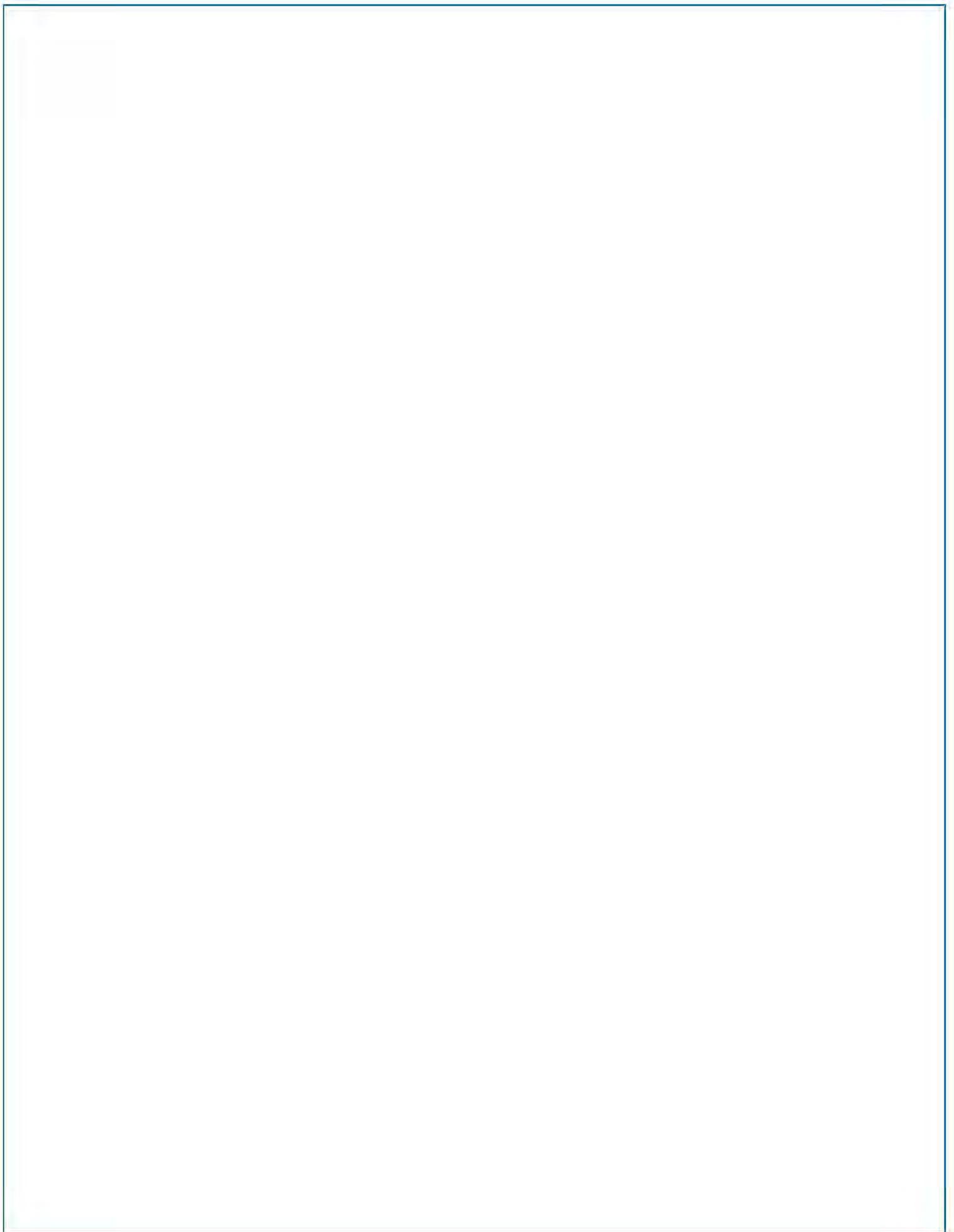


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Agradecimientos:

A Gabriela Gonzáles Gómez por la realización de la CL₅₀ para CH₃COOTI de este trabajo.

A la Facultad De Estudios Superiores Iztacala, por ser mi segunda casa.

Al Instituto Politécnico Nacional.

Especial agradecimiento al Maestro Luis y la Maestra María Eugenia por tanto apoyo y atención, tanto académicos como personales. A la Maestra Laura por su apoyo en el laboratorio. Finalmente, gracias a la Maestra Irma por escucharme y aconsejarme. Gracias a todos ustedes por recibirme en su laboratorio y ayudarme a culminar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la carrera, en especial a Carlos Ferrer, a César Arturo, Andrea Colís, Hadayancy Jiménez, Noé, Eduardo Segovia, Sonia, Yahfed, Ángeles y Ulises, pero muy en especial a Olivia Rojo Nava, gracias por ser mi amiga incondicional, por tus consejos y por decirme siempre la verdad, aunque duela, te quiero mucho.

A la familia Olmos Cabrera, a los músicos Gaby y Victor. A sus hijos Victoria y Poncho, por dejarme ser parte de su vida y por su gran amistad. Poncho, te agradezco todo el apoyo y todos aquellos momentos que hemos compartido, por tu honestidad y tus consejos. Vicky, gracias por no dejar que se me ocurra cambiar, por revelarme los beneficios del talco, pero

en especial por tus consejos, las pláticas de oficina y tu cariño. Eres una gran persona, los quiero muchísimo.

A la familia Nieto Rodríguez, gracias por abrirme las puertas de su hogar y por ser personas tan especiales en mi vida, en especial a María: gracias por estar para mí en los momentos difíciles, por quererme como lo haces, por escucharme y tratar de estar para mí a pesar de la distancia. Gracias por convertir la pena en pedacitos, y lo malo en algo bueno, probablemente no encontremos el camino, pero nos sobrarán las ganas de volar... te quiero mucho.

A todas aquellas personas que no he mencionado, pero que han tenido un papel importante en mi vida, gracias.

Dedicatorias:

Este trabajo va especialmente dedicado a mis padres Irma y Carlos.

Mamá: cada minuto que pasé trabajando en esto es fruto de tu esfuerzo como madre y si soy algo hoy en día es por ti principalmente. Gracias por la disciplina, por tus cuidados y por ser estricta cuando era preciso. Te amo inmensamente y no hay nada que agradezca más a Dios que haber podido tener a alguien como tú de madre. Eres una persona increíble y, definitivamente, eres lo mejor que tengo en la vida. Te amo con todo mi corazón.

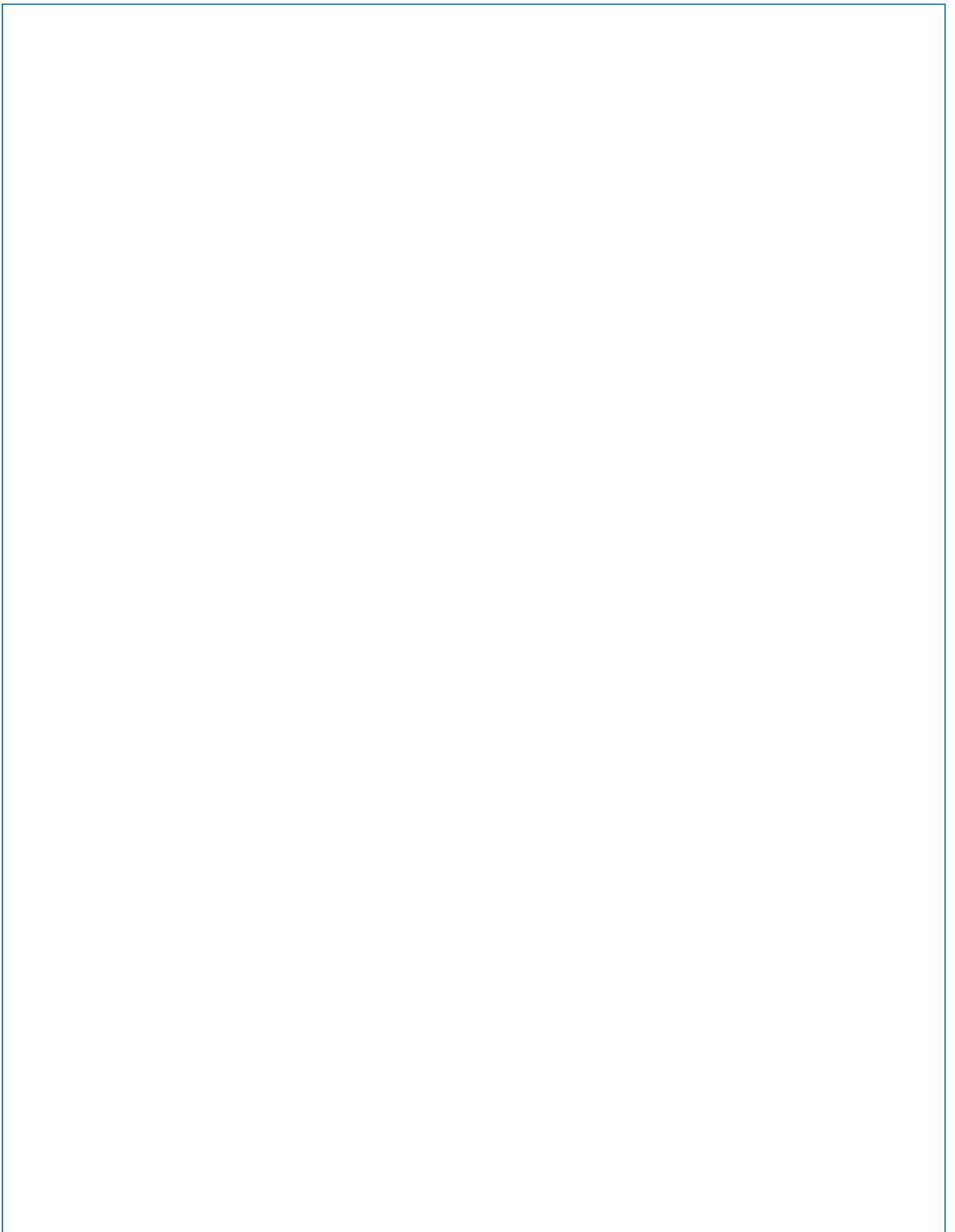
Papá, esto también es fruto de tu trabajo y esfuerzo al criarme con tu alegría y fortaleza como ejemplos. Aunque a veces parezca divagar, puedes estar seguro de que ustedes dos me dieron los mejores cimientos y de que tendré éxito en la vida.

Los amo infinitamente a ambos, son unos súper papás.

A Irma y María. Las amo muchísimo. Mi vida siempre tendrá mucho de ustedes, así que espero no olvidemos lo que significa ser hermanos. Gracias por compartir su existencia conmigo, aunque no hayan tenido opción.

A todas aquellas personas que no he mencionado, pero que han tenido un papel importante en mi vida, Gracias.

A María Romero Rojas, por tu vida, ejemplo y cariño.



CONTENIDO

Contenido	1
1 Resumen.....	1
2 Abstract.....	2
3 Introducción	3
3.1.1 Intoxicación con talio.....	4
3.2 Talio.....	5
3.2.1 Presencia en el ambiente.....	7
3.2.2 Mecánica mitocondrial y producción de ROS a causa del Talio	8
3.3 Acetato de talio (CH ₃ COOTl).....	10
4 Antecedentes	12
4.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo experimental	13
4.1.1 Ciclo de vida	13
4.1.2 SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	15
4.1.3 Cepas y Cruza Estándar (CE).....	15
5 Justificación	18
6 Objetivos	19
6.1.1 General	19
6.1.2 Particulares	19
7 Hipótesis:.....	19
8 Materiales y Métodos	19
8.1 Reactivos	19
8.2 CL ₅₀	20
8.3 SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	20
9 Análisis estadístico	22
10 Resultados.....	23
11 Discusión	30
12 Conclusiones.....	34
13 Referencias.....	34

1 RESUMEN

El talio es un subproducto de las industrias cementera, pirotécnica, eléctrica, minera y en la fabricación de lentes de alta refracción, por listar algunas. Estas industrias contaminan al aire, al suelo y al agua, y es posible encontrar al metal en frutas, cereales y vegetales cuyo contenido va de entre 0.05 a 0.1 mg/Kg de peso fresco, y se puede encontrar en cantidades superiores a los 1.2 mg/Kg de peso fresco en hongos, dependiendo del contenido de talio del suelo donde hayan sido cultivados.

Las concentraciones ambientales del talio están por debajo de los límites permisibles pero su contenido en el cuerpo puede elevarse a través del tiempo por medio de la bioacumulación. Se ha reportado que el alimento para animales con 1 mg/Kg, ha aumentado el contenido del metal en riñones hasta 0.5 mg/Kg, por lo que podría ser un problema en humanos después de un período largo de exposición. Sus sales son altamente tóxicas y pueden tener consecuencias permanentes en el sistema nervioso y/o provocar la muerte. A nivel celular, pueden reducir el potencial de membrana mitocondrial e incrementar el contenido de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*), que pueden dañar al DNA, además de que tiene afinidad por las bases nitrogenadas del mismo, provocando aductos y entrecruzamientos, y se une a los grupos sulfidrilo de las proteínas.

La genotoxicidad del talio se ha demostrado con micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos, con lo que es posible observar los efectos clastogénicos del compuesto y con la prueba de Ames para mutaciones puntuales. Sin embargo, los resultados varían en función de si los modelos biológicos son eucariontes o procariontes, además de si son tratados *in vivo* o *in vitro*, por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto genotóxico del CH₃COOTl en *Drosophila melanogaster* con el ensayo SMART en *D. melanogaster*, que es una prueba *in vivo*, que es una prueba *in vivo*, que permite observar distintos eventos genéticos como mutación y recombinación somáticas, deleciones y aneuploidías.

El experimento consistió en someter a larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*, craza estándar (CE) a concentraciones de 0.2, 2.0, 20.0 y 200.0 µM de CH₃COOTl, utilizando como control positivo CrVI 5 µM y como control negativo H₂O, con 5 repeticiones por tratamiento y se revisó la expresión de marcadores genéticos en las alas del insecto en forma de manchas, las cuales fueron registradas por tamaño (chicas o grandes) y tipo (sencilla o gemela), para después obtener su frecuencia relativa y cuantificar la genotoxicidad en base a las pruebas estadísticas Kastenbaum-Bowman, realizada con el software SMART 2.1. (Frei y Würigler, no publicado) así como la prueba

U de Mann-Whitney-Wilcoxon y la de Kolmogorov-Smirnov, realizadas con el software R, todas las anteriores para $p < 0.05$.

Se concluye que el CH_3COOTI es genotóxico a concentraciones de 2.0, 20.0 y 200.0 μM , existiendo una tendencia de concentración-respuesta, lo cual pudo ser consecuencia de la formación de aductos en las bases nitrogenadas del DNA, dañando al material genético, así como el incremento del contenido de ROS y la afinidad del metal por los grupos sulfhidrilo de proteínas como el glutatión y la superóxido dismutasa.

2 ABSTRACT

Thallium is a heavy metal which is a by-product of the cement, pyrotechnics, electrical and mining industries, it is also used for the production of low refraction lenses and low temperature thermometers manufacture and sulphuric acid production. These industries pollute water, soil and air and it is possible to find it in fruits and vegetables which thallium content varies from 0.05 to 0.1 mg/Kg fresh weight, mushrooms thallium content could be over 1.2 mg/Kg fresh weight, depending on the thallium content of the soil they were picked from.

Although thallium levels in the environment are below the maximum allowed concentration, animal feed containing as little as 0.5 mg/Kg of thallium and given over several months can raise levels in the kidney of the animal over 1 mg/kg, therefore this could become a problem for human beings when exposed over a long time period.

Most thallium can be found on the Earth's crust as salts which are colorless, tasteless, and odorless. Furthermore there is evidence they are highly toxic. This metal can damage nerves and can turn deadly if the patient is not treated on time. It is believed this can reduce the mitochondrial intermembrane potential, rising up ROS content inside the cell, which can then damage different structures and molecules, such as organelles and DNA. It is known to have certain affinity to nitrogenous bases, forming adducts, crosslinks, it is even capable of attach to proteins' sulfhydryl groups.

It also has been demonstrated to be genotoxic by performing micronuclei tests on human lymphocytes and Ames tests. Nevertheless the results differ whether they were performed on an *in vitro* on an *in vivo* model, for this reason the genotoxic effect of CH_3COOTI was studied carrying on SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) on *D. melanogaster*. It is an *in vivo* assay, with which it is possible to observe different genetic events such as somatic mutation and recombination, deletion and aneuploidy, produced by a genotoxic substance.

For the experiment *Drosophila melanogaster* third stage larvae from the standard cross (ST) were brought under 0.2, 2.0, 20.0 and 200.0 μM treatments of CH_3COOTl , using Cr VI 5 μM as the positive control and H_2O as the negative one. Each treatment had five replicates and the expression of the genetic markers on the wings of the flies was observed by means of an optical microscope as spots, which were sorted and registered according to their size (small or large) and type (single or twin). Afterwards, the relative frequency of each individual was calculated and used to run the pertaining statistical tests and the genotoxic effect of the compound was quantified. The applied statistical tests were χ^2 , performed on the SMART software, version 2.1. (Frei and Würgler, not published), and the Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney U tests performed on the statistical software R, all of them at a statistical significance of $p > 0.05$.

It was concluded that CH_3COOTl is genotoxic at 2.0, 20.0 and 200.0 μM concentrations with an upward dose-response tendency which could be explained by the formation of adducts between thallium and the nitrogenous bases of DNA, the increased ROS concentrations and the affinity of the metal for the sulfhydryl groups of certain proteins like glutathione and superoxide dismutase.

3 INTRODUCCIÓN

De las intoxicaciones causadas por metales, la provocada por el talio es una de las más graves, ya que afecta a varios órganos y tejidos (Nava y Méndez, 2011). En general, el talio es absorbido en más de un 90% a través de la piel y las mucosas de la boca. Las sales del talio que son solubles en agua son absorbidas por el tracto gastrointestinal (incluido el acetato de talio). Dosis de 10-15 mg/Kg pueden ser letales para el ser humano. El cuadro clínico de la taliotoxicosis no es muy claro y puede ser confundido con enfermedades como el síndrome de Guillain-Barré, porfiria, infarto al miocardio, neuropatía diabética, envenenamiento por arsénico o plomo, lupus eritomatoso sistémico, envenenamiento por monóxido de carbono e intoxicación por organofosfatos (Misra *et al.*, 2003): existen síntomas neurológicos y gastrointestinales, según la dosis, la vía de administración y el tiempo que haya pasado tras la intoxicación. La alopecia es el síntoma más común y está presente en el envenenamiento crónico por talio y comienza a los 10 – 15 días después de la ingestión del mismo y es completa a las tres o cuatro semanas, lo que coincide con el periodo de maduración de las nuevas células epiteliales de la papila dérmica. Después del tratamiento, el cabello vuelve a crecer pasadas las cuatro semanas y reaparece completamente después de tres meses (Matthews y Anzarut, 1968; Mulkey y Oehme, 1993).

El talio se puede acumular en el cerebro después de una administración sistémica y cruzar la barrera hematoencefálica (Ríos *et al.*, 1989). Galván – Arzate *et al.* (2000) comprobaron que incluso a dosis subletales de talio existe una respuesta a su toxicidad, la cual fue evidenciada por la

lipoperoxidación (LPO) significativa en el cerebro de ratas a una dosis de 0.8 mg/Kg, sólo en el cuerpo estriado y el cerebelo. A 1.6 mg/Kg, todas las regiones del cerebro estudiadas presentaron aumento significativo en la LPO a comparación de los controles.

Aunado al incremento de LPO como otros metales en regiones cerebrales, existe una disminución de los niveles de glutatión y de la actividad de la súper óxido dismutasa (SOD) (Galván-Arzate *et al.*, 2005).

El catión Tl^+ es semejante al K^+ , por lo que la ATPasa Na^+/K^+ no lo distingue y entra a la célula, provocando estrés oxidante y afectando diversos procesos celulares. Hanzel y Verstraeten, en 2006, compararon los efectos de los iones mono y trivalente de talio: ambos cationes redujeron de forma significativa el potencial mitocondrial de membrana y la viabilidad de las células, elevaron el contenido de H_2O_2 en mitocondria y ambos aumentaron la presencia de ROS en el citosol de las células.

También es capaz de interferir con la respiración celular: uniéndose a los grupos sulfidrilo de las enzimas mitocondriales tales como: piruvato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, siendo responsable del incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, llevando a la mitocondria a presentar edema y vacuolización con el subsecuente desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, asimismo la unión del catión Tl^+ con enzimas ricas en cisteína-queratina, que contienen el grupo sulfidrilo, incrementa su solubilidad y disminuyen su resistencia manifestándose clínicamente como las mencionadas anormalidades en la piel, en las uñas y la alopecia (Gwatleney-Brant, 2002).

3.1.1 INTOXICACIÓN CON TALIO

La taliotoxicosis comienza con algunos síntomas como dolor agudo en las extremidades inferiores y entumecimiento en la planta de los pies, éstos pueden estar acompañados de náuseas, dolor abdominal y alopecia en la región parietal (**Figura 1**), que puede agravarse en los días siguientes. Un paciente, después de haber presentado estos síntomas, puede presentar concentraciones de 223 $\mu\text{g/L}$ y 351 $\mu\text{g/L}$ en sangre y orina, respectivamente. La taliotoxicosis puede ser tratada por medio de la administración de carbón activado, azul de Prusia, vitamina B 12 por intravenosa y Lorazepam (Tersuya *et al.*, 2017). Eskandari *et al.*, en 2013, aislaron y cultivaron mitocondrias de hígado de rata. Agregaron Tl^+ al cultivo, lo que provocó un incremento inmediato en la formación de ROS, por lo que hablan de una relación entre la toxicidad del metal con el H_2O_2 .

A pesar de que los mecanismos por los que el talio actúa en el cuerpo no son bien conocidos, sí se sabe que inhibe la actividad del glutatión y sustituye al K^+ en distintos procesos (Cvjetko *et al.*, 2010). Se asume que la interacción del metal con los grupos sulfidrilo de las proteínas

mitocondriales, la salida del calcio al citoplasma y el incremento en la producción de ROS; pueden

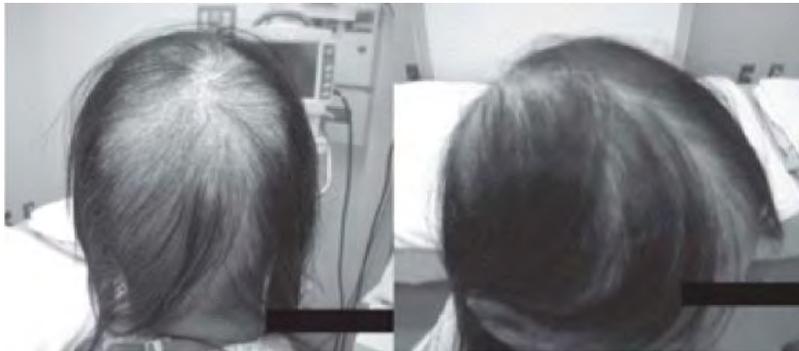


Figura 1. Alopecia total parietal en una paciente al décimo cuarto día después de que aparecieran los primeros síntomas. Tomada de: "A successfully treated case of criminal thallium poisoning". Tetsuya *et al.*, 2017. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11 (4): 01 – 02. explicar los efectos dañinos del mismo en las células y mitocondrias (Eskandari *et al.*, 2011).

3.2 TALIO

El talio es un metal pesado muy reactivo, blando y maleable de color gris que se oxida al contacto con el aire, es un elemento no esencial, pertenece al grupo III A de la tabla periódica cuyos metales son electropositivos. Forma dos tipos de compuestos: mono y trivalentes, también tiende a formar complejos estables como los de los sulfuros. Los compuestos inorgánicos del catión Tl^+ , como el acetato de talio (**Figura 2**) son más estables que los compuestos del Tl^{+++} en solución acuosa a pH neutro. Por el contrario, los compuestos covalentes son estables sólo en su forma

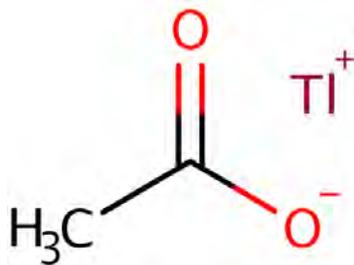


Figura 2. Acetato de talio. Tomada de: *United States Environmental Protection Agency*. Disponible en: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=HQOJMTATBXHNR>

trivalente (Mulkey y Oehme, 1993).

El talio fue descubierto por el químico inglés William Crookes tras intentar aislar selenio de los subproductos de la producción de ácido sulfúrico a partir de la quema de pirita, por medio de su línea espectral de emisión. Su nombre proviene del griego θαλλός que significa primordio o brote, debido al color verde brillante de su línea espectral de emisión (frecuencia de las ondas electromagnéticas producidas por los átomos de un elemento en estado gaseoso cuando se le comunica energía). Se encuentra escasamente en la corteza terrestre a concentraciones de 0.3 a 0.5 µg/Kg. Los minerales en los que el talio está presente de forma monovalente son pocos y son sulfuros como la cookosita, la hutchunsinita, la lorandita y la vrbaíta (Galván-Arzate y Santamaría, 1998), sin embargo, el único que lo contiene en concentraciones cuya extracción pueda ser redituable (hasta 60%) es la lorandita que es un complejo sulfuro-arseniuro de talio, anhidro. El metal se extrae a través de la industria minera, cuyos trabajadores no deben exponerse a concentraciones mayores de la concentración máxima permisible, MAC por sus siglas en inglés: *Maximum Allowed Concentration*, de 0.1 mg/m³ por cada 8 horas, a pesar de que no se le considera como un contaminante potencial. Los minerales de sulfuro son comúnmente empleados para la producción de ácido sulfúrico (Galván-Arzate y Santamaría, 1998) y durante la producción, el talio puede estar presente en las distintas fases del proceso, como en las cámaras de plomo o en las cenizas que son producto del tostado de la pirita (0.03 – 0.05% de talio) el que después se usa en la industria cementera (Liem *et al.*, 1984). Puede encontrarse en altas concentraciones en el granito y en los nódulos de manganeso y esquisto; también ha sido detectado en rocas volcánicas, meteoritos y plantas. La mayoría del talio comercial se obtiene del polvo de combustión resultante de la quema de pirita (producción de ácido sulfúrico e industria cementera) o de la fundición del plomo o zinc, o como subproducto de la extracción del cadmio (Léonard y Gerber, 1997).

Existe la evidencia de que el talio es un elemento altamente tóxico, el envenenamiento severo por este metal puede causar daño cerebral o incluso la muerte (Juan Liu *et al.*, 2107),

El talio fue utilizado en la última década del siglo XIX para reducir los sudores de los pacientes tuberculosos. El célebre dermatólogo francés Raymond Jacques Adrien Sabouraud se enteró de estos casos y comenzó a tratar la *Tinea capitis*; para lo que administraba acetato de talio de dos formas diferentes: por vía oral y por vía tópica con un ungüento de acetato de talio (CH₃COOTl) al 10% aplicado diariamente durante quince días. Después de diecinueve días de tratamiento, la alopecia se producía y el paciente era curado, sin embargo, se produjeron efectos adversos como equimosis y albuminuria (Freeman, 1927), tratamiento que provocó varias muertes e intoxicaciones (Freeman, 1927; Romero y Castro, 1948). En 1883, el metal también fue aplicado como un remedio para tratar a los pacientes con sífilis, el sulfato de talio (Tl₂SO₄) se incluyó como compuesto activo en rodenticidas desde 1920 hasta su prohibición en 1972, aunque todavía se usa

en algunos países. Hoy en día, el talio es un subproducto de industrias como la cementera, la pirotécnica, la eléctrica, la minería y en la fabricación de lentes, termómetros de baja temperatura y ácido sulfúrico, por listar algunas (Léonard y Gerber, 1997).

Las sales del talio como el sulfato, el carbonato y el acetato son muy solubles en agua lo que les confiere una alta toxicidad, pero existen otras sales del mismo como el sulfuro y el ioduro, que por ser poco solubles en agua, son menos tóxicas (Moeschlin, 1980).

3.2.1 PRESENCIA EN EL AMBIENTE

En el ambiente, el talio está presente en el agua, el suelo y la atmósfera: la concentración natural de talio en el agua de mar, por ejemplo, es de $\pm 0.01 \mu\text{g/L}$, y en agua de río de $\pm 0.04 \mu\text{g/L}$, sin embargo, concentraciones de hasta $800 \mu\text{g/L}$ han sido reportadas en aguas subterráneas localizadas cerca de vertederos de basura (Karbowska, 2016). Pequeñas cantidades de talio que se liberan por la actividad de las industrias energéticas (como las plantas en las que se usa el carbón como combustible), cementeras y fundidoras, terminan en los campos de cultivo o jardines aledaños y el talio entra a los vegetales por las raíces (EPA, s/f). La concentración de talio en los alimentos como frutas y vegetales es generalmente baja, aunque puede acrecentarse a lo largo del tiempo por bioacumulación, lo que depende directamente de las concentraciones que se encuentren en el suelo donde crecieron éstos (Sherlock y Smart, 1986); el contenido en cereales, frutas y vegetales es de alrededor de $0.05 - 0.1 \text{ mg/Kg}$ de peso fresco y los hongos pueden tener concentraciones de hasta 1.2 mg/Kg de peso fresco, dependiendo del área donde hayan sido cultivados (Seeger y Gross, 1981). Se ha observado que los animales tienden a bioacumular el metal, si son alimentados con comida cuyo contenido de talio sea de 0.5 mg/Kg puede, a lo largo de los meses, elevar los niveles del metal en el riñón a más de 1 mg/Kg (Oehme, 1978). En el humano, el cabello contiene normalmente 0.018 ppm de talio, pero concentraciones de 5 ppm pueden llegar a ser causa de envenenamiento (Léonard y Gerber, 1996).

En lugares de trabajo el límite permisible para compuestos solubles de talio, según la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, es de 0.1 mg/m^3 . En el perfil toxicológico del talio realizado por la Agencia Para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (*Agency for Toxic Substances & Disease Registry*) del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos (1992) se menciona que las exposiciones pueden ocurrir a través del aire, agua o comida; sin embargo, la probabilidad de exposición es mayor al comer alimentos como frutas y vegetales cultivados en suelos contaminados.

También se sabe que los fumadores tienen cerca del doble de talio en su organismo que las personas que no fuman, se estima que un adulto promedio consume 2 ppm de talio en la comida.

Se ha reportado también un promedio de 0.023 ppm de talio en aguas superficiales y de 0.011 ppm en aguas subterráneas, ambas en las cercanías de vertederos de sustancias peligrosas. También existen reportes de concentraciones de 1.7 ppm de talio en suelo, aunque el talio se encuentra de forma natural en el suelo a concentraciones de 0.3- 0.7 ppm. En la **Tabla 1** se muestran los límites permisibles en cuanto al contenido del metal en agua potable, suelos agrícolas, plantas terrestres, plantas comestibles, consumo oral diario y la dosis oral de referencia según la *Environmental Protection Agency* (EPA).

Tabla 1. Concentraciones límite de talio en el ambiente.

Agua potable	Límites permisibles
Suelos agrícolas	2 µg/L
Plantas terrestres	1 mg/Kg
Plantas comestibles	0.008 - 1.0 mg/Kg
Consumo oral diario	0.03 - 0.3 mg/Kg
Dosis oral de referencia (EPA)	2 µg/día
	0.056 mg/día

Tomada de *Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods* por Karbowska, 2016, *Environmental Monitoring and Assessment*, 188 (11): 640.

3.2.2 MECÁNICA MITOCONDRIAL Y PRODUCCIÓN DE ROS A CAUSA DEL TALIO

El oxígeno es un birradical ya que posee dos electrones no apareados, cada uno en un orbital π antienlazante. En la molécula, los dos electrones desapareados tienen el mismo número de spin, ésta es la forma más estable del elemento. El oxígeno es un agente oxidante, si el O_2 oxida un compuesto que no sea un radical, éste tratará de aceptar un par de electrones del compuesto que deberán de tener el mismo spin para entrar en los espacios vacíos del orbital π . Un par de electrones en un orbital no pueden cumplir con lo anterior, dado que tienen spines opuestos. Esta restricción hace que el oxígeno acepte un electrón a la vez, lo que explica por qué el oxígeno reacciona rápidamente con otros radicales por medio de la transferencia de un solo electrón y por qué es más lento para reaccionar con sustancias no radicales (Halliwell, 2006).

A partir del oxígeno se forman las ROS como el superóxido, el hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Debido a su función de producción energética, la mitocondria es considerada la mayor productora de ROS. A pesar de que estos radicales regulan varios procesos celulares como la secreción y acción de insulina, producción de hormonas del crecimiento, de citosinas, unión de proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones, entre otros; pueden resultar nocivas si se producen en exceso, dañando las estructuras celulares (Macedo-Márquez, 2012).

3.2.2.1 ROS Y TALIO

El radio iónico y la carga del Tl^+ y del K^+ son parecidos (Lenntech, 2018) y los mecanismos a través de los cuales el talio ejerce su toxicidad no son del todo conocidos, sin embargo, al entrar a la célula por medio de la ATPasa Na^+/K^+ (Spencer *et al.*, 1973) puede formar ligandos con grupos sulfhidrilo, inhibe la respiración celular, interactúa con la riboflavina y cofactores basados en riboflavina y también altera la homeostasis del Ca^+ (Repetto y del Peso, 2012).

Tanto los cationes mono y trivalentes del talio favorecen la producción de ROS. A concentraciones milimolares el Tl^+ afecta la funcionalidad de mitocondrias cultivadas y aisladas *in vitro*, abriendo los poros de transición, provocando el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la vía intrínseca de la apoptosis (Korotkov y Brailovskaya, 2001).

El H_2O_2 , producto de la dismutación del superóxido por acción de la SOD, puede cruzar las membranas biológicas y, aunque es relativamente poco reactivo, en presencia de metales de transición reducidos, su reducción parcial genera el radical hidroxilo ($^{\circ}OH$), uno de los oxidante más fuertes de la naturaleza (Halliwell, 2006). De los principales blancos de las ROS son los dobles enlaces en los lípidos (pudiendo desencadenar la LPO) y los residuos de cisteína y metionina de las proteínas (Mailloux, 2012), se pueden generar más radicales libres a partir de otros y éstos pueden reaccionar con moléculas cercanas como las proteínas de membrana, o dispersarse y entrar en contacto con el DNA (Aoyama *et al.*, en 1988).

Existe también la posibilidad de que estas alteraciones puedan desencadenar la muerte celular por vía apoptótica, la cual se caracteriza por la apertura de los poros de transición de la mitocondria, la liberación de citocromo c por las mitocondrias y la activación de caspasas 9 y 3, llevando a la muerte celular programada (Garza *et al.*, 2006).

3.2.2.2 ROS Y DNA

La alteración de las bases nitrogenadas puede conllevar a alteraciones estructurales en el DNA lo que puede provocar enfermedades como el cáncer. La guanina es la base con el menor potencial de oxidación, por lo que es frecuentemente atacada por diferentes especies reactivas. Las alteraciones en las bases del DNA, como la oxidación de la guanina, pueden resultar en lesiones mortales (Jena y Mishra, 2012). Los daños incluyen mutagénesis, entrecruzamientos entre las

bases o aductos entre las bases y las proteínas de forma que se altera la replicación y la traducción del material genético (Abdulnur y Flurry, 1976).

Existen mecanismos de reparación que permiten reparar los daños al DNA provocados por sustancias o diferentes agentes como la luz UV y factores físicos. Algunos de estos mecanismos son el de reparación de desemparejamientos (Nelson y Cox, 2006) o reparación de escisión de bases, lo que está mediado por enzimas llamadas DNA glicolasas, las cuales, tienen la propiedad de reconocer lesiones comunes en las bases nitrogenadas y remueven la base errónea, rompiendo el enlace N-glucosídico, lo que crea un sitioapurínico, comúnmente llamado AP o abásico. Puede ser una reparación pequeña cuando se trata sólo de una base o 2 a 10 bases. Posteriormente, se elimina la desoxirribosa-5'-fosfato y es sustituida por un nuevo nucleótido. Después el sitio AP se elimina por la acción de la AP-endonucleasa que corta la hebra de DNA donde está el sitio AP. La DNA polimerasa reemplaza el fragmento y se sella por la enzima DNA ligasa (Nelson y Cox, 2006).

En el caso de la escisión de nucleótidos se hidrolizan dos enlaces fosfodiéster, uno en cada lado de la distorsión, causada por el o los nucleótidos dañados. En humanos el complejo enzimático hidroliza el sexto enlace fosfodiéster de la cadena 3' y el enlace fosfodiéster en el lado 5', produciendo un fragmento de nucleótidos. Así, el fragmento de DNA es separado formando una muesca, la cual posteriormente es llenada por la DNA polimerasa-ε y después la DNA ligasa la cierra (Nelson y Cox, 2006).

Existen también los rompimientos de cadena doble, daños que se reparan por medio de la recombinación homóloga (Nelson y Cox, 2006) o la unión de extremos entre no homólogos (*Non Homologous End-Joining*).

3.3 ACETATO DE TALIO (CH₃COOTI)

Es una sal que forma cristales de color blanco, su punto de fusión es de 131°C, es muy soluble en agua fría, alcohol, cloroformo e insoluble en acetona (Repetto y del Peso, 2012).

Según bases de datos como la *Toxicology Data Network*, se clasifica al acetato de talio (CH₃COOTI) dentro del grupo "D", criterio utilizado por la *Environmental Protection Agency* (EPA); lo que significa que no es clasificable como un carcinógeno humano, justificando este hecho con la falta de información. Acerca de la carcinogenicidad en animales no existe información en IRIS (*Integrated Risk Information*) de la EPA. Sin embargo, dosis de 3.2 g de sulfato de talio, de 5 a 10 g de nitrato de talio, de 10 g de malonato tálico y tan solo 930 mg de acetato de talio, bastan para matar a un adulto (*Toxicological Data Network, s/f*).

Esta sal puede ser preparada a partir del carbonato de talio (Tl_2CO_3) añadiéndolo a una solución de etanol y ácido. Después se espera a que el CH_3COOTl cristalice y el etanol se evapore. El punto de fusión del acetato es de $131\text{ }^\circ\text{C}$, se disuelve rápidamente en agua y se disocia parcialmente en solución (Wade y Banister, 1975).

Galván-Arzate *et al.* (2005) (**Tabla 2**), evaluaron los efectos de una sola administración de acetato de talio en el cerebro de ratas Wistar a dos diferentes dosis (8 y 16 mg/Kg) por inyección intraperitoneal. Se detectaron incrementos significativos en la LPO de cinco regiones cerebrales (hipotálamo, cerebelo, córtex frontal, hipocampo y el estriatum), regiones seleccionadas por la previa documentación de su vulnerabilidad ante los efectos tóxicos del talio y al estrés oxidante (Galván-Alzate *et al.*, 2000).

La dosis letal mínima (LD_{Lo}) administrada subcutáneamente es de $500\mu\text{g/Kg}$ en ratón (Luckey, 1975), en ratas es de 41.3 mg/Kg administrados vía oral, que incluyeron síntomas como convulsiones, alteraciones gastrointestinales y hemorragia (Venugopal y Luckey, 1978). En ratas Wistar, el acetato de talio tiende a acumularse principalmente en testículos, riñón y corazón; en menor medida el hígado, pulmones, bazo y cerebro (Barroso-Moguel *et al.*, 1990).

Varios trabajos han probado los efectos genotóxicos del talio como catión y del CH_3COOTl , entre los que se encuentran la reducción del potencial de membrana, la producción de ROS, la inducción de procesos deletéreos como la lipoperoxidación (LPO), aberraciones cromosómicas estructurales y reducción de índice mitótico, a continuación se enlistan algunos de estos trabajos.

4 ANTECEDENTES

Tabla 2. Antecedentes.

Autor	Año	Trabajo
Aoyama et al.	1988	Cuantificaron la LPO en distintos órganos de hámster, provocada por talio y la cantidad de glutatión peroxidasa. Establecieron que existe correlación entre estos dos hechos.
Galván-Arzate et al.	2005	Observaron la acumulación de TI ⁺ en el cerebro y un incremento en la LPO a causa de la producción de ROS por la exposición al metal. En algunas zonas esto se correlacionó con el decremento de los niveles de superóxido dismutasa (SOD).
Yildirim et al.	2005	Encontraron diferencias significativas en aberraciones cromosómicas e intercambio entre cromátides hermanas después de 3 días de administrarse ²⁰¹ Tl. Las disminuciones del índice mitótico (IM) y replicativo fueron evidentes a los 3 días también. El isótopo ²⁰¹ Tl utilizado para imagenología del miocardio induce al daño genético.
Hanzel y Verstraeten	2006	Compararon los efectos de TI ⁺⁺⁺ con los de TI ⁺ en células adrenales de rata. Ambos cationes redujeron significativamente el potencial de membrana mitocondrial y la viabilidad de las células, elevaron el contenido de peróxido de hidrógeno en mitocondria y de ROS en el citosol. También fue capaz de inducir apoptosis por medio de la liberación del citocromo c.
Jaramillo - Cruz E.	2011	Evaluó el efecto del acetato de talio en leucocitos humanos in vitro a concentraciones 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 µg/mL con el ensayo cometa. El CH ₃ COOTl produce ligera toxicidad (aumenta la longitud de la cola en el ensayo cometa y el número de células dañadas) en tiempos cortos de exposición (1 o 2 h) y puede inducir daño al material genético a concentraciones bajas (0.5 µg/mL).
Hernández de la Cruz	2011	Estudió el daño cromosómico y la reducción del IM en linfocitos humanos tratados in vitro con CH ₃ COOTl a concentraciones de 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100µg /mL; encontró que el compuesto es capaz de disminuir el IM a las concentraciones de 0.5, 1.5 y 10 µg/mL; también de inhibir la mitosis al 100 % a concentraciones de 50 y 100 µg /mL. Encontró que el acetato de talio incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y el porcentaje de células aberrantes; es un agente citotóxico y clastogénico.
Rodríguez-Mercado et al.	2013	Evaluó el efecto citotóxico y genotóxico causado por el CH ₃ COOTl en células sanguíneas de humano someténdolas a concentraciones de 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 µg /mL, evaluándolas con aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátides hermanas y ensayo cometa a pH > 13 y 12.1. En base a sus resultados concluyeron que el acetato tiene efectos citotóxicos, citoestáticos, clastogénicos y causa daño al DNA.
Buendía-Valverde	2013	Evaluó el efecto genotóxico inducido por el acetato de talio en ratones hembras CD-1 a concentraciones de 4.62, 9.25, 18.5 y 37 mg/Kg. Redujo el IM (índice mitótico) significativamente a todas las dosis administradas, incrementó las aberraciones cromáticas estructurales a 18.5 µg /Kg, por lo que se menciona al talio como un agente citotóxico y genotóxico con actividad clastógena.

4.1 *Drosophila melanogaster* COMO MODELO EXPERIMENTAL

Drosophila melanogaster es un díptero de la familia *Drosophilidae*, cuya taxonomía se muestra en la **Tabla 3**. Se le ha empleado como organismo modelo para el estudio de la genética gracias a las investigaciones realizadas en 1909 por el Dr. Thomas Hunt Morgan. La importancia del uso de este organismo radica en que se conocen ampliamente la estructura y función de su genoma, el patrón de formación del embrión, el desarrollo y función de los órganos de los sentidos y del sistema nervioso, además de tener un ciclo de vida corto, ofrece una serie de ventajas como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad *in vivo*: es fácil de cultivar, produce descendencia abundante y su ciclo de generación es corto (Dueñas *et al.*, 2002).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *D. melanogaster* (Castañeda-Partida *et al.*, 2013).

Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Hexapoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Subclase	<i>Pterygota</i>
Orden	<i>Diptera</i>
Suborden	<i>Brachycera</i>
Familia	<i>Drosophilidae</i>
Subfamilia	<i>Drosophilina</i>
Género	<i>Drosophila</i>
Subgénero	<i>Sophophora</i>
Especie	<i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen, 1830)

4.1.1 CICLO DE VIDA

D. melanogaster es un organismo holometábolo, por lo que pasa por los estadios de embrión, larva, pupa e imago; etapas en las que pueden ser expuestos a diversos tratamientos experimentales. El ciclo de vida tiene una secuencia de eventos bajo estricto control de expresión genética. Puede durar desde 10 días a 25 ± 2 °C y 65 % de humedad relativa (HR) hasta dos semanas a 21 °C. Comienza con la ovoposición, en la que la hembra puede depositar entre 600 a 800 huevos en sus 40 – 60 días de vida (**Figura 3**). El huevo de *Drosophila* mide menos de medio milímetro de largo, es translúcido y presenta dos micrópilos que le permiten respirar y flotar en los jugos de frutas fermentadas en donde puede ser ovopositado (**Figura 4**); del huevo eclosiona la larva e inmediatamente comienza a alimentarse. La larva pasa por tres estadios: el primero a las 24 h, el segundo a las 48 y el tercero a las 72. Durante la fase larvaria, la ingesta de alimento es continua, llegando a consumir de 3 a 5 veces su peso, incrementando de 0.5 a 2.0 mg. Durante el desarrollo tardío de la larva, la metamorfosis, los discos imaginales (bolsas epiteliales de 20 a 50 células) se diferencian y forman las estructuras y tejidos presentes en el adulto (Castañeda-Partida *et al.*, 2013).

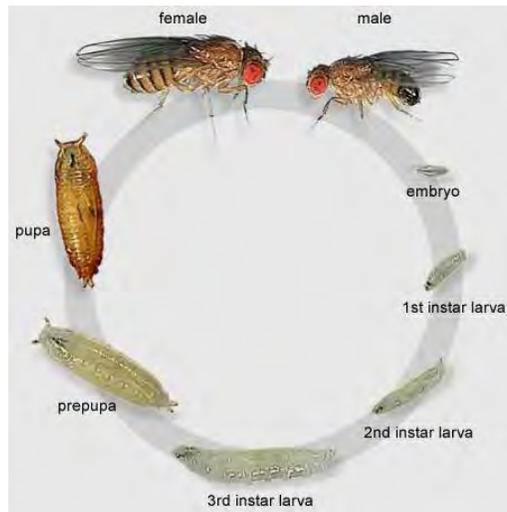


Figura 3. Ciclo de vida de *D. melanogaster* y sus diferentes etapas de desarrollo. Disponible en: <http://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>

Cinco días más tarde (240 horas) emerge el imago con un cuerpo alargado de color blancuzco y las alas enrolladas en el dorso. Después de unos minutos expande el exoesqueleto lo que permite que se endurezca al contacto con el aire y el color del mismo se oscurece; también hace fluir la hemolinfa por las venas de las alas, expandiéndolas y rigidizándose al contacto con el aire; para que sean maduros sexualmente, deben de pasar entre 6 y 8 horas en el caso de los machos, y entre 10 y 12 horas para el de las hembras (Castañeda-Partida *et al.*, 2013).

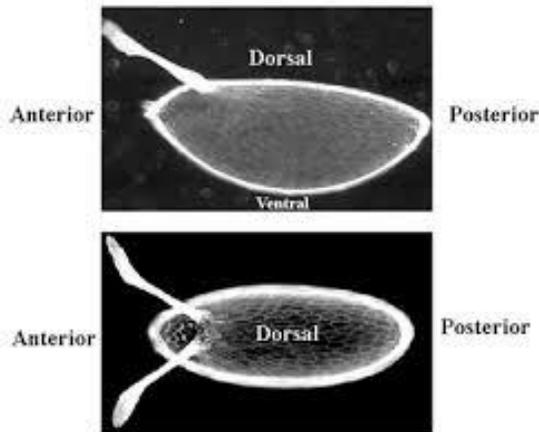


Figura 4. Vistas lateral y dorsal del huevo de *Drosophila melanogaster*, en éstas se pueden apreciar los micrópilos que permiten respirar y flotar al embrión. Disponible en: <https://www.quora.com/What-are-those-two-antenna-like-protrusions-on-the-anterior-end-of-a-Drosophila-egg>

4.1.2 SMART EN ALA DE *D. melanogaster*

El ensayo de recombinación y mutación somáticas (SMART por sus siglas en inglés: *Somatic Mutation and Recombination Test*) en ala de *D. melanogaster* ha sido diseñado para detectar daño genético de una forma certera. La prueba se aplica *in vivo*; el fundamento de la misma es que, durante el desarrollo embrionario temprano de la mosca, grupos de células llamados discos imaginales, se separan y proliferan mitóticamente durante todo el periodo larval hasta la diferenciación de las diferentes estructuras de la mosca adulta (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Es posible, a través de este ensayo, evaluar el potencial de un xenobiótico para inducir la pérdida de heterocigosis, resultado de una mutación, reordenamiento cromosómico, delección del segmento de un cromosoma o aneuploidía (pérdida del cromosoma) (Rodríguez de Andrade *et al.*, 2004).

4.1.3 CEPAS Y CRUZA ESTÁNDAR (CE).

Existen miles de cepas mutantes de *D. melanogaster*, como lo son *yellow* (*y*), de cuerpo de color amarillo; *ebony* (*e/e*), de cuerpo de color ébano, *white-ebony* (*w/e*), que posee ojos blancos y el cuerpo color ébano, y sus alelos han sido caracterizados, secuenciados y se mantienen en ceparios de distintas instituciones educativas (**Figura 5**) (Castañeda Partida *et al.*, 2013).



Figura 5. Diferentes cepas de *D. melanogaster*. a) *yellow* (*y*). b) *ebony* (*e/e*). c) *white-ebony* (*w/e*).

Disponible en: www.cellbiol.ru/book/export/html/169

Para realizar la cruce estándar (CE) se utilizaron las cepas *mwh* (*multiple wing hair*) y *flr³* / TM₃, *Bd^S* que tienen marcadores recesivos en las cerdas de las alas que están en el cromosoma 3: (1) *mwh* (*mwh/mwh*) es una mutación localizada en 3-0.3 centimorgans (cm); en homocigosis se expresa fenotípicamente como células con 3 o más cerdas en lugar de una (**Figura 6, c**); (2) *flr³* que es también una mutación autosómica en 3-38.8 cm y se expresa fenotípicamente como cerdas malformadas y cortas en forma de "flama" (**Figura 6, b**); en condición homocigota es letal, por lo que esta cepa posee el cromosoma balaceador TM₃ con inversiones múltiples que le permiten mantener los marcadores en heterocigosis. Este cromosoma balaceador se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante *Bd^S* (*Beaded Serratia*), el cual se expresa como

muecas en el borde de las alas (**Figura 7**). Ambos fenotipos, *mwh* y *flare*, se analizan en individuos transheterocigotos (*mwh +/ + flr³*) y heterocigotos (*mwh +/ + TM3 Bd⁵*) comparando las diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia y el tipo de manchas entre moscas expuestas o no al tratamiento (Graf *et al.*, 1984).

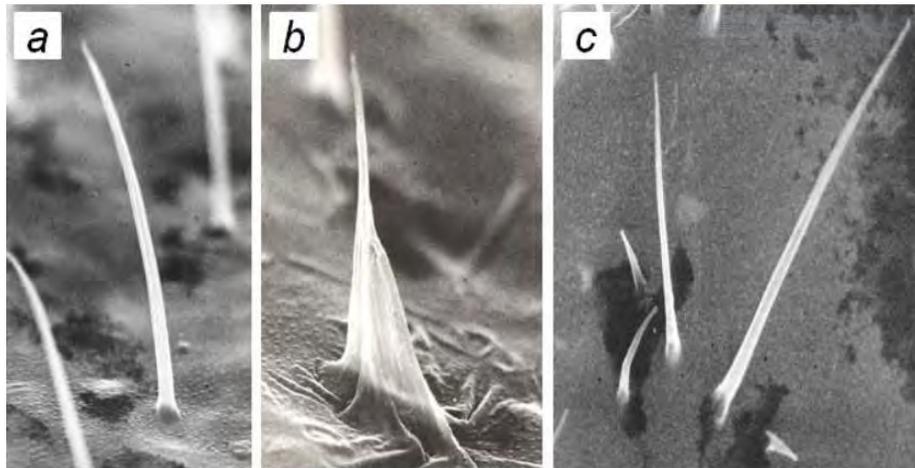


Figura 6. Microfotografías electrónicas de tricomas normales (a), tricomas con fenotipo *flr³* (b) y tricomas con fenotipo *mwh* (c). Fotografías donadas por el Dr. Ulrich Graf a Rodríguez – Arnaiz en 2002.

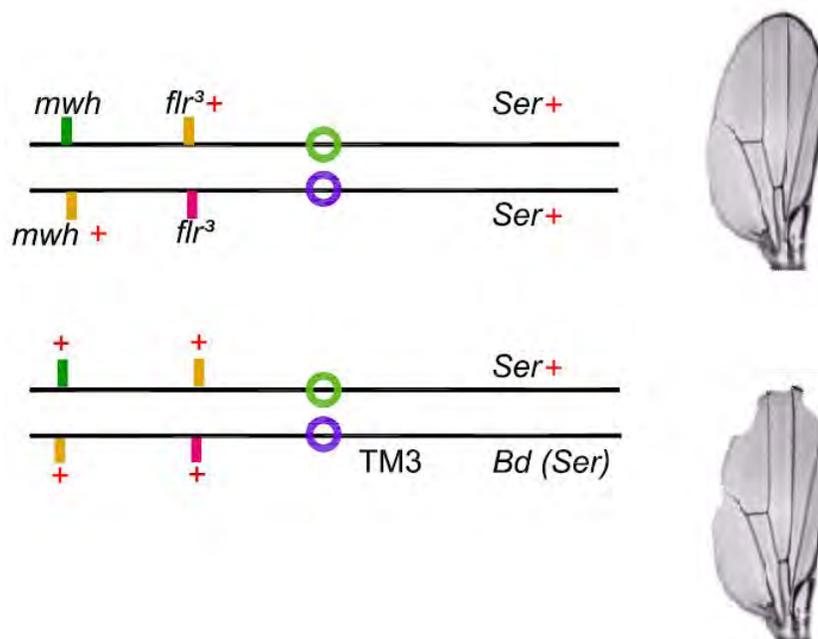


Figura 7. Tipos de fenotipos de ala que resultan de la CE con sus respectivos genotipos, autoría propia.

Las manchas que se producen son ocasionadas por diversos eventos genéticos: mutación puntual, deleciones, no disyunción y recombinación en células somáticas (Graf *et al.*, 1984). En la **Figura 8** se muestran diferentes daños y sus respectivos fenotipos, además del fenotipo normal (**Figura 8, a**) por ejemplo: La no disyunción, es la no separación de los cromosomas homólogos durante la mitosis, que, como resultado da origen a trisomías o aneuploidías en la célula. (**Figura 8, b**). La recombinación sucede con el intercambio entre cromosomas homólogos. Cuando esto sucede cerca del centrómero, se producen manchas gemelas (**Figura 8, c**), y *mwh* o tricomas normales cuando la recombinación es distal (**Figura 8, d**). La mutación puntual o génica solo afecta a un gen, el daño más común es la sustitución de un par de bases por otro (**Figura 8, e**). La deleción consiste en la pérdida de un segmento cromosómico (**Figura 8, f**) (Lewin y Aguilera, 1996; Graf *et*

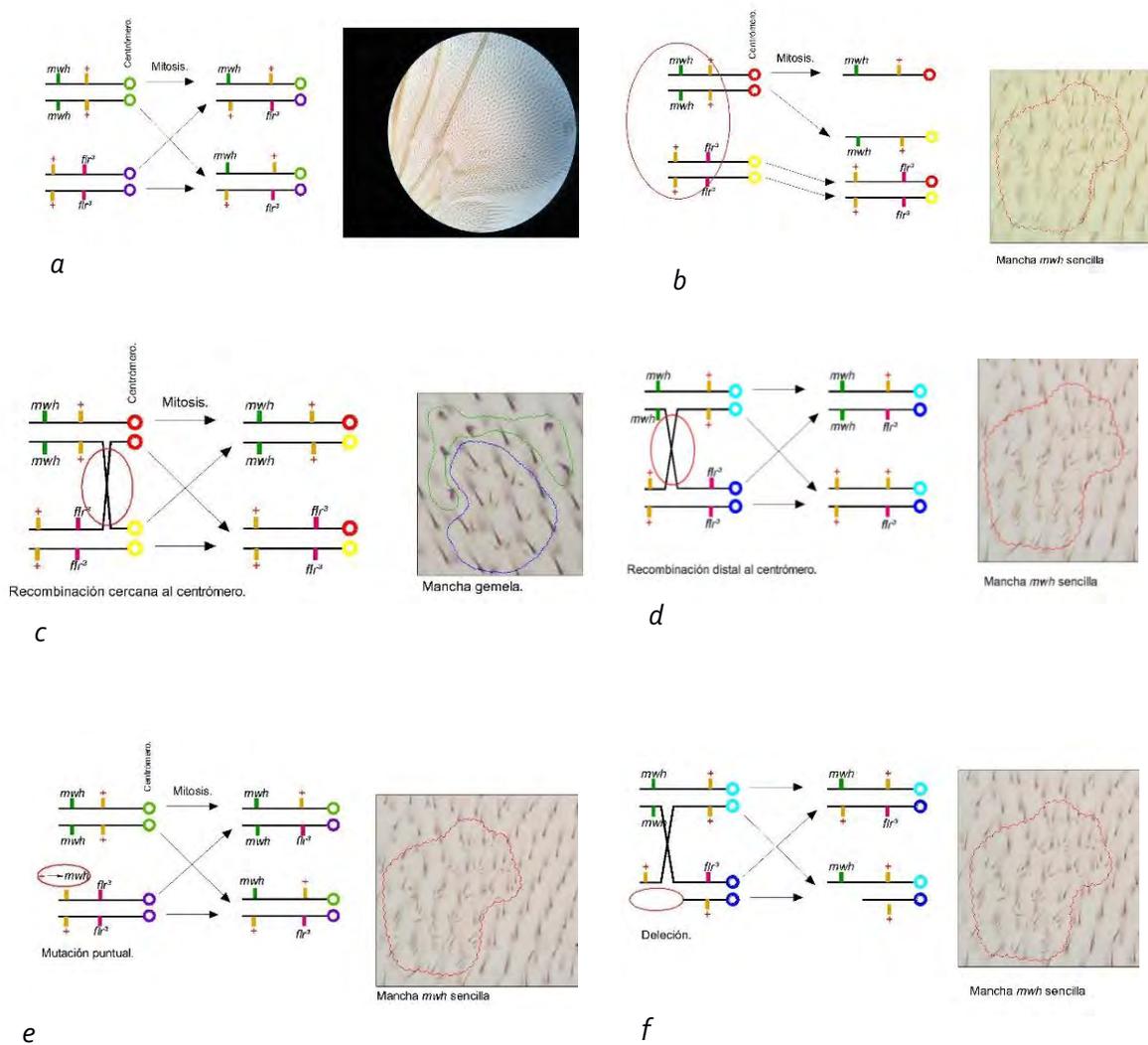


Figura 8. Eventos genéticos y genotipos: **a)** Fenotipo normal, **b)** Pérdida de heterocigosis por aneuploidía, **c)** Pérdida de heterocigosis por recombinación cercana al centrómero, **d)** Pérdida de heterocigosis por recombinación distal al centrómero, **e)** Pérdida de heterocigosis por mutación puntual, **f)** Pérdida de heterocigosis por deleción, autoría propia.

5 JUSTIFICACIÓN



Se han hecho trabajos acerca de la genotoxicidad de los compuestos del talio en cultivos *in vitro* de células de mamíferos y bacterias pero se ha comentado que en diferentes modelos biológicos, o dependiendo de si son tratados *in vivo* o *in vitro*, los efectos de este metal pueden variar, algunos experimentos se han realizado en distintos modelos biológicos: en procariontes, se ha observado la reducción del crecimiento de bacterias como *Bacillus subtilis*, en las líneas H17 y M45 tratadas con nitrato de talio a 0.001 M (266.39 µg/mL), concentración que aumentó la recombinación genética y tuvo efectos citotóxicos, aunque no provocó mutaciones en las líneas TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538 de *Salmonella typhimurium*, ni en *Escherichia coli* (Kanematsu *et al.*, 1978). Tampoco se obtuvieron efectos positivos en *Salmonella typhimurium* con CH₃COOTl a concentraciones de 3.1 µg a 29.2 µg/caja Petri (citado por Léonard y Gerger, 1997). Por esta razón se construyó la hipótesis de que el talio podría ser genotóxico y se eligió a *D. melanogaster* como modelo biológico, ya que el ensayo se realiza *in vivo* y se trata de un organismo eucarionte. También se decidió utilizar el ensayo SMART en ala, dado que posee alta robustez estadística y, a partir de él, se puede concluir con fiabilidad si el compuesto es genotóxico o no.



A pesar de que hay varios estudios que tratan la genotoxicidad del talio, el *Hazardous Substances Data Bank* (HSDB), de la *Toxicological Data Framework*, se menciona que la genotoxicidad del talio “es baja, si es que posee algún efecto de este tipo” (*Toxicological Data Network*, s.f.) y que “es posible que el talio sea un agente clastógeno, ya que la mayoría de las aberraciones estructurales son en cromátides” (citado por *Toxicological Data Network*, s.f.). Respecto al CH₃COOTl, el compuesto está clasificado como “D”, es decir: “no clasificable como un carcinógeno en humanos”. La justificación de este veredicto es que no existe información suficiente acerca de la carcinogenicidad, ni en humanos, ni en animales. No existen datos suficientes que permitan hacer una evaluación adecuada de los riesgos genotóxicos (citado por *Toxicological Data Network*, s.f.). Por lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

6 OBJETIVOS

6.1.1 GENERAL

-  Evaluar el efecto genotóxico del CH₃COOTI en larvas de *D. melanogaster* de tercer estadio, CE, mediante el ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala.
-

6.1.2 PARTICULARES

-  Determinar el daño genotóxico que el CH₃COOTI es capaz de producir, a través del ensayo SMART en ala de *D. melanogaster*.
-  Determinar si existe correlación entre la frecuencia de manchas y las concentraciones utilizadas.
-  Determinar si existe alteración en la división de las células de los discos imaginales de las alas a través del análisis de la frecuencia acumulada de clones *mwh* por los tratamientos.

7 HIPÓTESIS:

Si el CH₃COOTI es genotóxico, el ensayo SMART permitirá observar un aumento significativo en la frecuencia relativa del número de manchas/individuo.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 REACTIVOS

-  CH₃COOTI, CAS No: 563-68-8, grado de pureza: ≥ 97%, Marca Riedel de Haën proporcionado por el Dr. Juan José Rodríguez Mercado de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
-  Solución conservadora (5 mL de tegosept al 12% (EtOH) y 5 mL de ácido propiónico aforados a 1 L) (Dueñas et al., 2002).



Medio instantáneo *Drosophila* (DIM) obtenido de Carolina Biological Supply Co (Burlington, North Carolina, EUA).



Cromo (VI) óxido (CrO_3), Sigma-Aldrich® CAS No: 1333-82-0.

8.2 CL_{50}

Previamente al ensayo SMART, Ximena Huitrón (2016), obtuvo la CL_{50} con larvas de 72 ± 4 h de *D. melanogaster* de las cepas OR (R) – flare y flare. Para esto se sincronizó la edad de los adultos durante 8 h en medios de cultivo y posteriormente se colectaron los huevos durante 8 h, retirando después de ese lapso a los progenitores. Una vez pasadas 72 h de incubación se extrajeron las larvas de los frascos para transferirlas a tubos de ensayo. A cada tubo con 0.5 g de Medio Carolina se adicionaron 2 mL de CH_3COOTI a concentraciones diferentes por triplicado (1.9, 7.8, 31.2, 125, 500, 1000, 2000 y 4000 μM). Posteriormente, se colocaron 10 larvas de tercer estadio por tubo, se les incubó a 25 °C y a partir de los 10 días las moscas que emergieron fueron contadas para determinar la mortandad. Se realizó la prueba estadística ANOVA de un factor ($p < 0.5$) para comparar entre sí los experimentos y determinar la CL_{50} por regresión cuadrática cuyos resultados fueron de 911 μM .

8.3 SMART EN ALA DE *D. melanogaster*

Después de obtener la CL_{50} , realizó el ensayo SMART a las concentraciones subletales de 0.2, 2.0, 20.0 y 200 μM , la CE fue obtenida a partir de 400 hembras vírgenes de la cepa flare ($\text{flr}^3/\text{TM3}, \text{Bd}^5$) y 100 machos de la cepa mwh (mwh/mwh) (González-Gómez, 2015) donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf, del ETH, Zurich, Suiza. Se incubó la crusa a una temperatura de $25^\circ \pm 2$ °C y 65% HR y las larvas fueron colectadas durante 8 h en levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) activada con azúcar. Una vez que alcanzaron el tercer estadio (72 ± 4 h) fueron sometidas a los tratamientos de CH_3COOTI disuelto en agua milliQ. Cuando emergieron los imagos, fueron conservados en alcohol al 70% para la posterior preparación y lectura de las alas. Como control negativo se usó el disolvente H_2O , y como control positivo el CrVI (Graf *et al.*, 1992) al 5 mM como control positivo ya que, a pesar de que su forma trivalente es un nutriente esencial para los organismos, se sabe que su forma hexavalente es 500 veces más tóxico (Zhao *et al.*, 2010). Los efluentes industriales que contienen CrVI son considerados por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), desde 1982, como potentes carcinógenos que modifican la transcripción del DNA, provocando aberraciones cromosómicas (IARC, 1982). El CrVI tiene efectos mutagénicos y carcinógenos en humanos (Cheng y Dixon, 1998), así también teratogénicos (Asmatulla *et al.*, 1998). El límite permisible para el contenido de Cr VI en agua es de 0.05 mg/L y de 0.1 mg/L para descargas a aguas continentales (Tabrez, *et al.*, 2013).

Cuando la larva está en desarrollo, posee bolsas epiteliales llamadas discos imaginales, las células que ahí existen se dividirán por mitosis y formarán las distintas estructuras del adulto durante la metamorfosis. Es importante que sean larvas del tercer estadio, ya que es cuando el organismo se acerca a la metamorfosis y cuando con más voracidad se alimenta. Los discos imaginales que darán lugar a las alas, poseen alrededor de 50 células y, después de la metamorfosis, las alas están formadas por ~24,400 células cada una (Castañeda-Partida *et al.*, 2013).

Cuando alguna célula sufre los efectos genotóxicos provocados por algún compuesto antes de la mitosis, existen dos posibilidades: a) si el daño no fue suficiente para que la célula entrara a apoptosis ésta se replicará y el daño estará presente en toda célula hija, lo que se reflejaría en una mancha grande, o b) el daño fue tal que hubo muerte celular, por lo que ninguna mancha es observable. Existe la posibilidad también de que, si el daño es tardío, se generen manchas pequeñas, sin embargo, estas diferencias pueden resultar un poco ambiguas, dado que existen variaciones en el tiempo de desarrollo, el momento en que el metal entra a la célula e incluso, el hecho de que ciertas manchas tiendan a permanecer pequeñas por aneuploidía (Graf *et al.*, 1984).

8.3.1.1 PREPARACIÓN DE LAS ALAS

Para continuar con el ensayo SMART se seleccionaron las moscas transheterocigotas (fenotipo silvestre) y se disectaron las alas con cuidado, utilizando pinzas entomológicas y un pincel fino, después se enjuagaron con agua y se colocaron sobre un portaobjetos, el excedente de agua fue secado y las alas se acomodaron en 5 pares de hembras y 5 pares de machos. Posteriormente se añadió una gota de Entellan® para fijarlas; al final se les colocó un cubreobjetos para que el Entellan® se esparciera por toda la superficie, cubriendo las alas. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2 días y se les colocó una pesa encima por dos días. Después, las preparaciones fueron revisadas al microscopio con doble ciego.

8.3.1.2 OBSERVACIÓN DE LAS ALAS AL MICROSCOPIO

La revisión se hizo al microscopio óptico a 40x, sin prejuicio, y se tomó nota de cada mancha según el área en el que se encontrara (**Figura 9**), su tipo (mwh, pequeña, grande o gemela) (**Figura 10**) de acuerdo con Graf *et al.*, 1984.

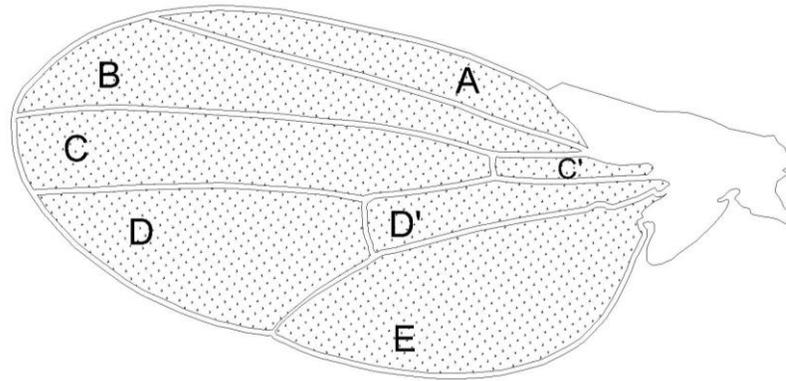


Figura 9. Ala de *D. melanogaster* dividida en sectores.

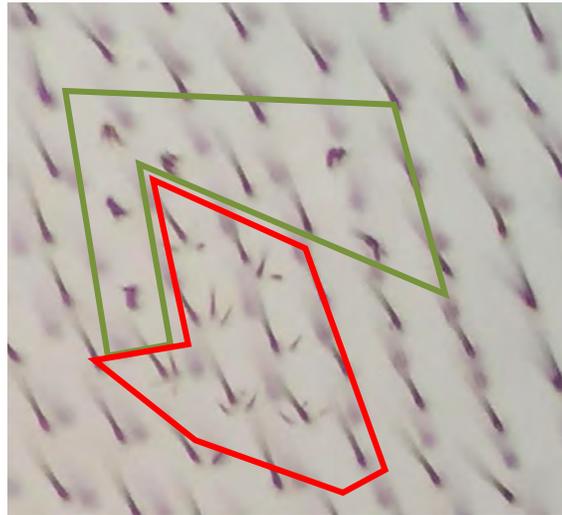


Figura 10. Fenotipo de las manchas gemelas: en el polígono verde se muestran tricomas o cerdas con el fenotipo flare y, en el rojo, el fenotipo *mwh*.

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se compararon las frecuencias relativas de las manchas encontradas mediante el análisis estadístico con el software SMART versión 2.1. (Frei y Würgler, no publicado), el cual está basado en un análisis de Kastenbaum-Bowman que contrasta frecuencias esperadas. Los resultados que se obtuvieron a partir de este análisis son: resultados positivos, débiles positivos, negativos o no concluyentes (Frei y Würgler, 1988). Para corroborar los resultados no concluyentes y los débiles positivos, se realizó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon (Frei y Würgler, 1995) en el programa estadístico R, cuyo script se muestra en la **Figura 11**, los resultados se muestran en la **Figura 13**, y los valores de p en la **Tabla 4** (la **Figura 15** y la **Tabla 4**, se encuentran en el capítulo de Resultados) en esta última, el guion (-), que aparece en algunas casillas se refiere a que en los tratamientos comparados no hubo manchas gemelas.

```

> wilcox.test(m~t, mu=0, alt="two.sided", paired=F, conf.int=T, correct=T, data=u)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: m by t
W = 1154, p-value = 2.901e-12
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 24.99996 37.99996
sample estimates:
difference in location
 33.00005

```

Figura 11. Parte del script y resultados de la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon para manchas pequeñas del control positivo (CrVI) contra el negativo (H₂O) en R®.

De la misma forma: la distribución de los clones *mwh* por tamaño se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$) (Graf *et al.*, 1984) y en la **Figura 12** se muestra parte del script. La frecuencia acumulada de las manchas *mwh* no aparece en la prueba estadística del programa SMART, sin embargo, se decidió incluirlas en la tabla por medio del software R®.

```

5 #library(nortest)
6
7 ks= read.csv(file=choose.files())
8
9 ks
10
11 boxplot(Frecuencias_acumuladas~t, main ="0.2", ylab="Frecuencias acumuladas", data=ks)
12
13 facum_H2O = ks [1:10, 2]
14 facum_0.2µM = ks[11:20,2]
15
16 windows()
17
18 plot(facum_H2O, main="H2O v.s. CH3 COOTI 0.2 µM", ylab = "Frecuencia acumulada", pch=c(0), col="")
19 par (new=T)
20 plot(facum_0.2µM, xlab="", axes=F, ylab="", pch=c(2), col="red", type="overplotted")
21
22 legend("right", legend=c("H2o", "0.2µM"), pch=c(0,2), col=c("blue", "red"))
23
24 lillie.test(ks$Frecuencias_acumuladas)

```

Figura 12. Script para realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

10 RESULTADOS

Se sometieron larvas de mosca de tercer estadio a cuatro distintos tratamientos de CH₃COOTI (0.2, 2.0, 20.0 y 200 µM), H₂O y CrVI como controles positivo y negativo respectivamente. Se comprobó que el CH₃COOTI es capaz de provocar la aparición de manchas en las alas del adulto. Esto permitió aceptar la hipótesis alternativa y rechazar la nula, lo que concuerda con Rodríguez-Mercado, 2013; Jaramillo-Cruz, 2001; Hernández de la Cruz, 2011 y Buendía-Valverde, 2013.

En la **Tabla 4** se muestran los efectos de controles y tratamientos sobre *D. melanogaster*. Para el control positivo, H₂O, se observaron frecuencias relativas inferiores a 1.00 (0.15 en manchas pequeñas, 0.7 en grandes, 0.00 en gemelas y 0.85 en totales), todas significativamente inferiores al resto de los tratamientos. Las frecuencias relativas con las que aparecen las manchas en las alas del grupo tratado con CrVI fueron significativamente mayores para todo tipo de manchas en

comparación con el resto de los grupos, y presentó las frecuencias relativas más altas de todos los tratamientos: de 11.52 para manchas pequeñas, de 17.17 para grandes, de 5.93 para gemelas y de 34.62 para totales, lo que hace evidencia los efectos mutagénicos y recombinogénicos del mismo, los cuales ya son conocidos (IARC, 1982). Es importante mencionar que estos efectos han sido comprobados en humanos (Cheng y Dixon, 1998; Asmatulla *et al.*, 1998).

En todos los grupos tratados con CH₃COOTI, todas las frecuencias relativas fueron estadísticamente significativas en manchas pequeñas (0.5 para 2.0 μM, 0.63 para 20.0 μM y 0.85 para 200 μM), excepto la concentración de 0.2 μM (0.48). Solamente a 200 μM de CH₃COOTI, la frecuencia relativa para las manchas totales (6.10) fue significativamente mayor que la de H₂O. Estos resultados demuestran que el talio tiene efectos mutagénicos y que no es recombinogénico, ya que no se observa una frecuencia relativa estadísticamente significativa en manchas gemelas.

En la **Tabla 4** se resumen los resultados de la prueba SMART y los de la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon. La frecuencia relativa está acompañada del número de manchas observadas, que se anotan entre paréntesis; éstas se obtuvieron de la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon, a estos valores les siguen los resultados de la prueba de Kastenbaum-Bowman representados con los símbolos i, w, + y -, que indican si el resultado fue inconcluso, débil positivo, positivo o negativo, respectivamente. Separados por una diagonal se muestra si los valores de la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon fueron positivos (+) o negativos (-).

Tabla 4. Frecuencias relativas del ensayo SMART, de *D. melanogaster* CE, prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon. En rojo se anotan los datos estadísticamente significativos.

^a Los resultados estadísticos se anotan de acuerdo con SMART PC/ Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Compuesto(μM)	No. De individuos.	Frecuencias relativas (número de manchas) ^a				Clones con manchas <i>mwh.</i>	Promedio de ciclos de división celular.
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.0	Manchas gemelas m = 5.00.	Manchas totales m = 2.00		
Control (-) H ₂ O	40	0.15 (6)	0.7 (28)	0.00 (0)	0.85 (34)	34	5.29
Control (+) CrVI 5 μM	29	11.52 (334) +/-	17.17 (498) +/-	5.93 (172) +/-	34.62 (1004) +/-	965	3
CH ₃ COOTI 0.2 μM	52	0.48 (25) +/-	1.71 (89) w/-	0.2 (1) i/-	2.21 (115) +/-	115	4.3
CH ₃ COOTI 2.0 μM	80	0.5 (40) +/+	1.62 (130) -/-	0.00(0) -/-	2.12 (170) -/-	170	5.19
CH ₃ COOTI 20.0 μM	51	0.63 (32) +/+	2.37 (121) -/-	0.02 (1) -/-	3.02 (154) -/-	154	4.72
CH ₃ COOTI 200 μM	41	0.85 (35) +/+	5.17 (212) w/-	0.07 (3) -/-	6.10 (250) +/+	249	5.89

(+) Positivo, (-) negativo y (m) factor de multiplicación.

En la **Tabla 5** se muestran los valores de *p*, los cuales fueron calculados con la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon y su significancia estadística coincide con los datos de la **Tabla 4**. Los valores

se consideran estadísticamente significativos siempre y cuando sean menores a 0.05, éstos se anotan en rojo y describen el efecto genotóxico del CH₃COOTI, que se refleja en el aumento de la frecuencia de manchas que aparecen tras una alteración genética; aunque su efecto no es tan acentuado como en el grupo tratado con CrVI, sí es evidentemente mayor a comparación de la frecuencia del grupo tratado con H₂O.

Tabla 5. Valores de $p < (0.05)$ para la prueba de U de Wann-Whitney-Wilcoxon. En rojo se anotan los datos estadísticamente significativos.

	Manchas pequeñas	Manchas grandes	Manchas gemelas	Manchas totales
COOH ₃ TI 0.2 µM	0.129	0.09047	0.3925	0.3156
COOH ₃ TI 2.0 µM	0.01793	0.599	-	0.1504
COOH ₃ TI 20.0 µM	0.03361	1	0.3879	0.25228
COOH ₃ TI 200.0 µM	0.0004385	0.07542	0.08193	0.01171
Control (+) CrVI 5 µM	5.5213 (10 ⁻¹²)	7.985 (10 ⁻¹³)	6.732(10 ⁻¹²)	2.214(10 ⁻¹²)

En la En la **Figura 13** se grafican las frecuencias relativas de cada uno de los tratamientos y los grupos control por tipos de mancha (pequeñas, grandes, gemelas y totales). Las frecuencias que fueron estadísticamente significativas en comparación con las del agua se marcan con un círculo amarillo en la parte superior. Los resultados de las **Tablas 4 y 5** y de la **Figura 13**, muestran que los tratamientos de CH₃COOTI fueron significativos a 2.0, 20.0 y 200 µM en manchas pequeñas y a 200 µM en manchas totales, además de que es posible observar una tendencia ascendente dosis-respuesta.

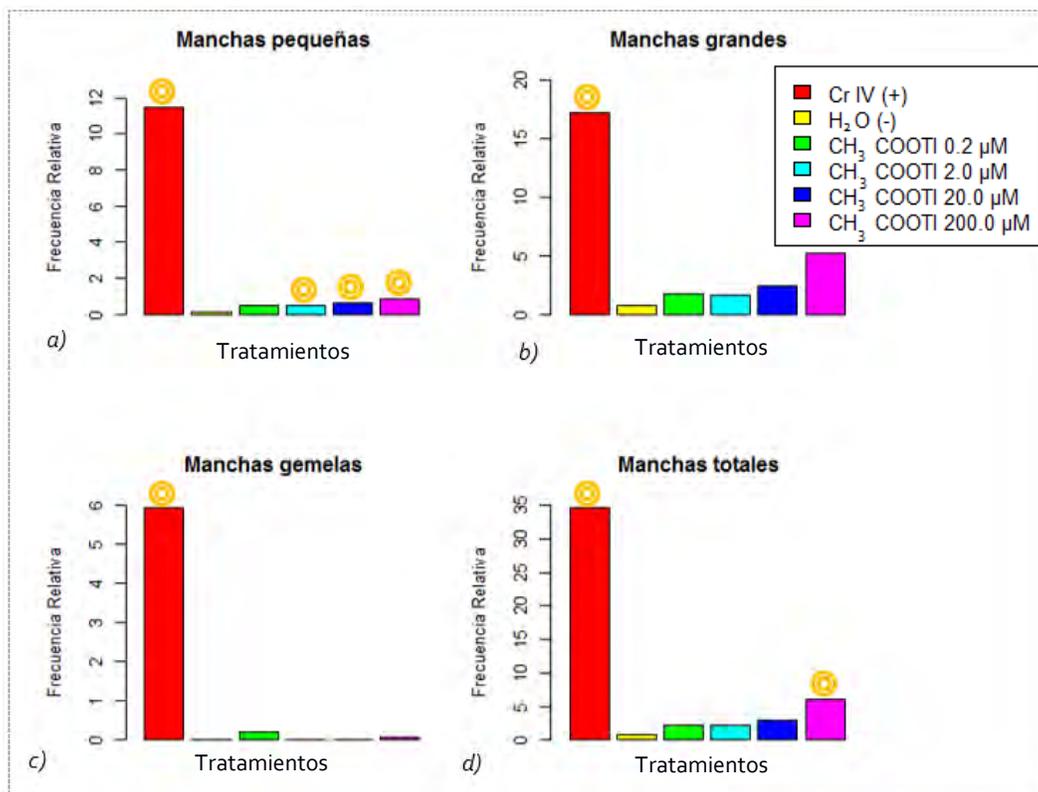


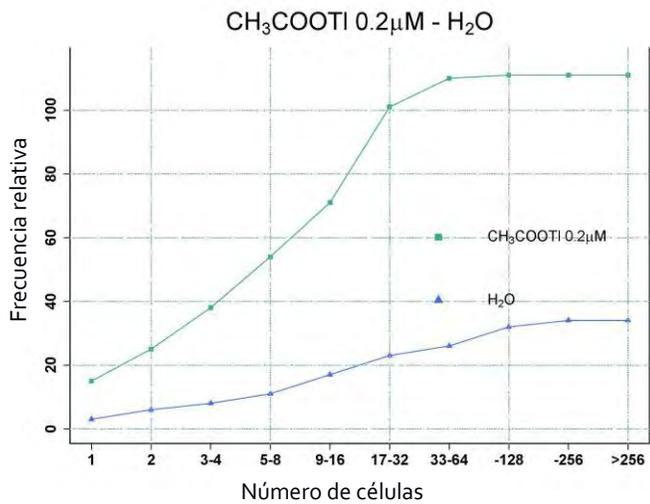
Figura 13. Tabla de frecuencias relativas/individuo para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales (ver **Tabla 5**). Los tratamientos que tuvieron diferencias significativas respecto al grupo tratado con agua se marcan por medio de un círculo amarillo.

Para el análisis de las distribuciones acumuladas de las manchas *mwh*, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S), cuyos resultados se anotan en la **Tabla 6**, es decir los valores de la máxima diferencia entre las distribuciones acumuladas del control negativo en relación con los tratamientos y el control positivo (estadístico de prueba D) y *p*. Todos los valores de *p* fueron menores a 0.05, disminuyendo a medida que la concentración aumenta, por lo que es plausible considerar una tendencia dosis-respuesta. En la **Figura 14**, se observa la relación entre las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* de cada tratamiento comparado con la frecuencia del agua, es notorio que la frecuencia mayor de clones *mwh* fue provocada por la concentración de 200 μM de CH_3COOTI .

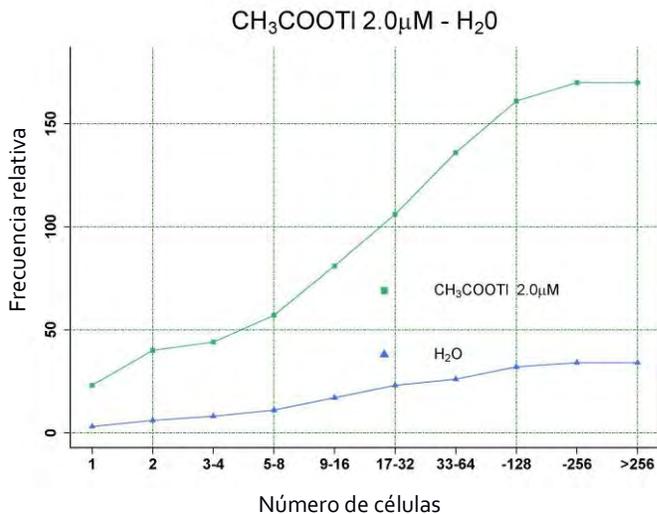
Tabla 6. Valores del estadístico de prueba “D” y $p < (0.05)$ de la prueba de K-S para la distribución acumulada de clones *mwh*. Los valores estadísticamente significativos respecto al control negativo (H_2O), se anotan en rojo.

Tratamientos.	Estadístico D	Valores de $p < (0.05)$
CH_3COOTI 0.2 μM	0.23964	0.00382
CH_3COOTI 2.0 μM	0.25381	0.001531
CH_3COOTI 20.0 μM	0.26894	0.0005371
CH_3COOTI 200.0 μM	0.28162	0.0002112
CONTROL (+) Cr(VI)	0.29683	0.00006435

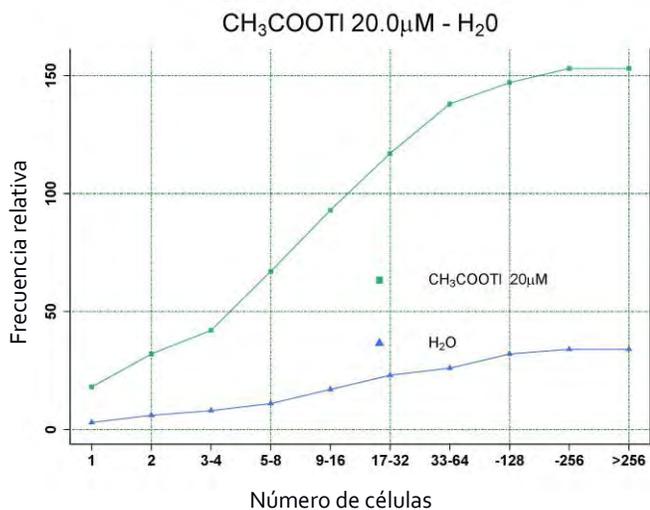
En la **Figura 15** se comparan las frecuencias acumuladas de clones *mwh* de todos los tratamientos **(a)** y se observa que el mayor efecto fue provocado por la dosis de 200 μM de CH_3COOTI , mostrando de nuevo una tendencia dosis-respuesta ascendente. También se contrasta la frecuencia de clones *mwh* del tratamiento de 200 μM con la de los controles positivo (CrVI) y negativo H_2O **(b)**, la cantidad de clones en el control positivo es mucho mayor que en el control negativo o el tratamiento de 200 μM . También es posible observar la diferencia entre los efectos del tratamiento y el control negativo, siendo evidentemente mayores los del tratamiento, pudiendo confirmar el efecto mutagénicos del CH_3COOTI .



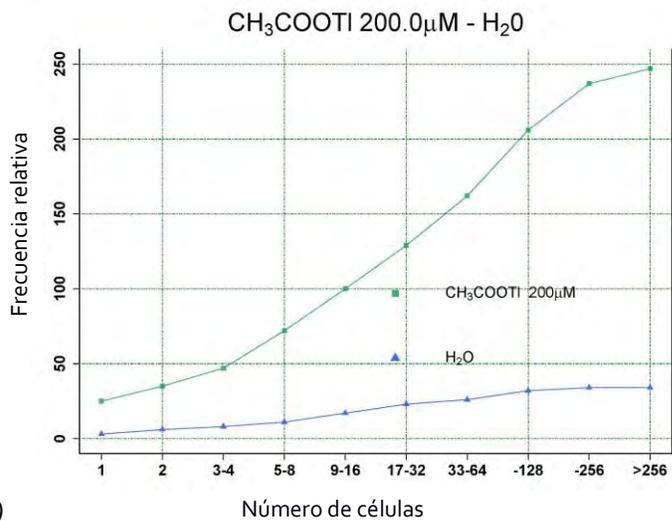
a)



b)



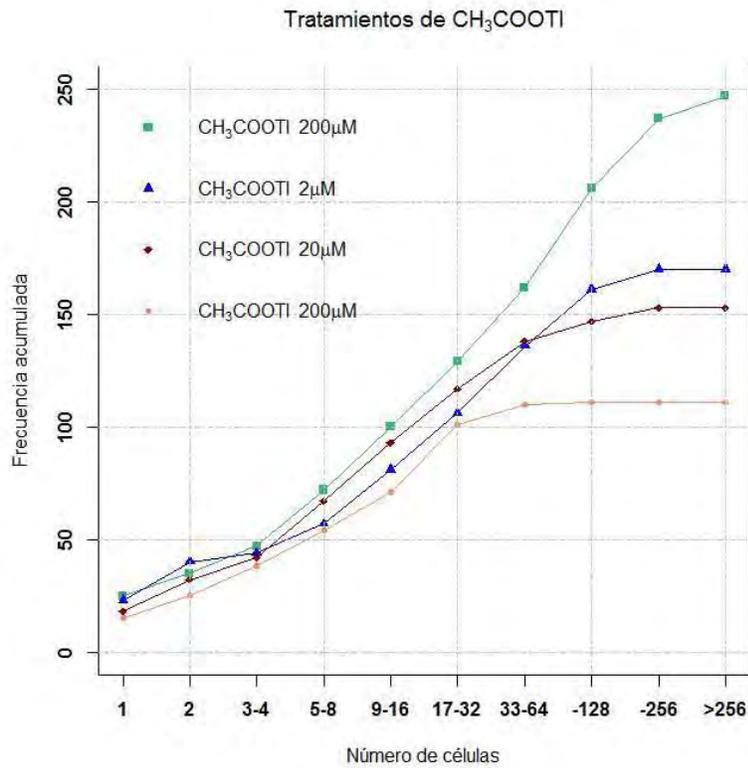
c)



d)

Figura 14. Efecto de los tratamientos de CH₃COOTI comparado con el del control negativo, H₂O.

a)



b)

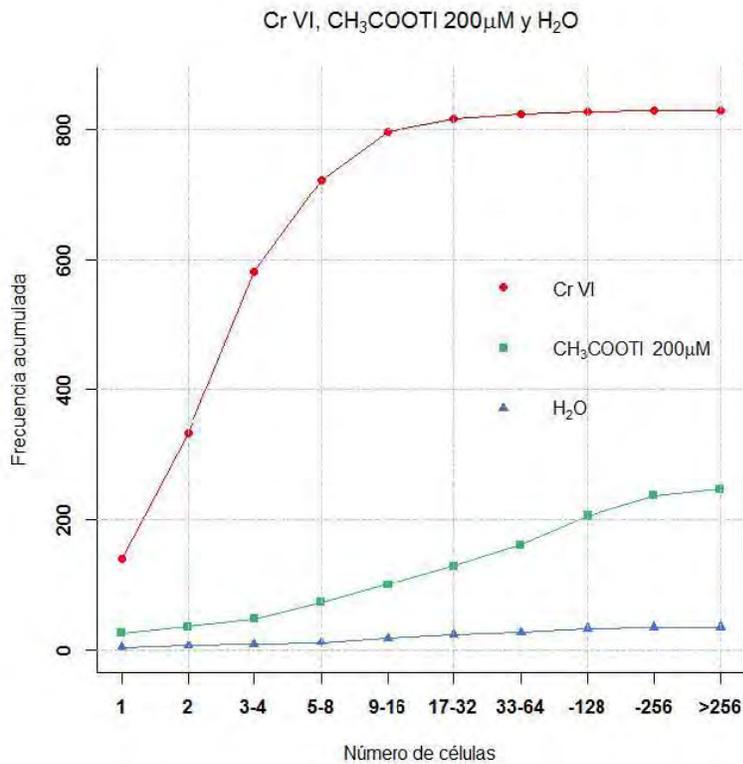


Figura 15. Comparación entre las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* en los distintos tratamientos de CH₃COOTI (a). Frecuencias acumuladas de los clones *mwh* entre los controles y el tratamiento de mayor efecto (200.0 µM, CH₃COOTI) (b).

11 DISCUSIÓN

El talio es un compuesto que es usado o es un subproducto en industrias como la cementera, la energética y la fabricación de fuegos artificiales, cristales de alta refracción, termómetros de baja temperatura y conductores; a pesar de estar presente en el ambiente en cantidades subtóxicas es un elemento que se encuentra en los alimentos y es bioacumulable, pudiendo representar un riesgo para la salud.

Las frecuencias relativas de manchas obtenidas en los tratamientos de CH_3COOTl fueron comparadas con los de CrVI , ya que es un potente carcinógeno que provoca aberraciones cromosómicas (IARC, 1982) cuyos efectos mutagénicos, carcinógenos y teratogénicos han sido confirmados en humanos (Cheng y Dixon, 1998; Asmatulla *et al.*, 1998).

El CH_3COOTl es muy soluble, incluso en agua fría (CAMEO Chemicals, 1999), por lo que los iones por los que está conformado pueden solvatarse en el anión CH_3COO^- y el catión Tl^+ . Los cationes Tl^+ y K^+ son muy semejantes en cuanto a carga (ambos +1) y radio iónico (0.95 en el talio y 1.33 en el potasio) (Galván - Arzate y Santamaría, 1998), lo que puede explicar la incapacidad de las membranas para discernir uno de otro (Harzel y Verstraeten, 2009). Los cationes de Tl^+ pueden sustituir a los cationes de K^+ en la activación de la $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$ y entrar a la célula, acumularse y llegar a mitocondria. Ahí, el metal puede disminuir el potencial de membrana mitocondrial, lo cual es crucial, ya que el gradiente electroquímico que impulsa la fosforilación oxidativa, por la que se sintetiza el ATP, depende de este potencial (Spencer *et al.*, 1973; Heim *et al.*, 2002; Barrera y Pouyou, 1974; Eskandari *et al.*, 2013).

La producción de ROS es muy sensible a cambios sutiles en el potencial electroquímico de la membrana interna mitocondrial (Aon *et al.*, 2003). Un incremento en el potencial de membrana, por ligero que sea, aumenta la producción de ROS y una reducción ligera en el mismo, tendrá el efecto contrario. Estudios recientes han demostrado que la producción de ROS por las mitocondrias aumenta y disminuye con cierta periodicidad, algunas veces es cuestión de ~20 segundos (Mailloux y Harper, 2012). Las variaciones periódicas en la generación de ROS por la mitocondria coinciden con los cambios periódicos en el potencial electroquímico de membrana (Brand y Nicholls, 2011), el cual puede ser provocado por la extrusión excesiva de protones al espacio intermembranal, por la entrada ralentizada de protones a la matriz, o por ambas; lo que llevará a un incremento en la producción de ROS. El regreso de los protones a través de la ATP sintasa (respiración acoplada) o por mecanismos de "fuga" de protones (respiración desacoplada) reducen el potencial transmembrana y, por lo tanto, la producción de ROS. Estos mecanismos de fuga, dados por proteínas como la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT por sus siglas en inglés: *Adenine Nucleotide Translocase*) y las proteínas desacoplantes 1-3 (UCP por sus siglas en

inglés: *Uncoupling Proteins*), tienen una máxima actividad sólo cuando la demanda de ATP es la baja (como cuando el músculo está en reposo). Las fugas de protones son como una válvula de alivio, ya que liberan el potencial transmembrana para limitar la producción de ROS. En la cadena de transporte electrónico, el complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa), el cual pasa electrones desde el ubiquinol al citocromo c, es frecuentemente descrito como la molécula que más ROS produce en la cadena respiratoria; esto se debe a que el citocromo c sólo puede aceptar un electrón cada vez (Miwa y Brand, 2005). Inmediatamente después de haber entrado al sitio de unión Q_o, QH₂ dona un electrón a la proteína Fe-S de Rieske, que después transfiere el electrón al citocromo c, dando como producto a QH^{o-} que después entra al ciclo Q, donde los electrones desapareados son reciclados y generan QH₂. A pesar de esta actividad "precautoria", el complejo III genera superóxidos (Croffs *et al.*, 2009). A diferencia del complejo I, el III emite ROS por ambos lados de la membrana mitocondrial interna.

Según Bell *et al.*, (2007), hubo evidencia de que Q_o es el sitio principal de producción de ROS. Hanzel y Verstraeten (2006), evaluaron la capacidad de las células para incorporar R123, que es una molécula fluorescente capaz de acumularse en la matriz mitocondrial, pero solamente cuando el potencial transmembranal es preservado. Con base en esto, pudieron concluir que el talio es capaz de reducir de forma significativa la incorporación de esta molécula y, por lo tanto, el potencial de membrana. Además, el talio es capaz de aumentar la concentración de H₂O₂, que es un subproducto de la reducción parcial del oxígeno molecular y su producción es mayor cuando la cadena de transporte de electrones se ve interrumpida, los niveles de este oxidante también aumentaron en presencia del talio. En el experimento de Hanzel y Verstraeten (2009), después de 1 hora de tratamiento, el potencial mitocondrial aún existía, por lo que concluyeron que el incremento en el contenido de H₂O₂ es un evento que precede al daño mitocondrial. Dado que H₂O₂ es una molécula pequeña de fácil dispersión, puede salir de la mitocondria hacia el citoplasma y al medio extracelular. Ellos comprobaron que, después de 24 h de cultivo, el Tl⁺ es capaz de reducir significativamente el potencial mitocondrial de membrana, además, a 100 µM aumentó significativamente el contenido de H₂O₂ y el contenido de GSH fue reducido, lo que pudo haber pasado también en el experimento realizado en el presente trabajo a la concentración de 200 µM de CH₃COOTl.

La célula tiene diversos mecanismos de defensa contra los efectos de los ROS, uno de ellos es la glutatiónilación, proceso que consiste en formar un puente disulfuro entre los grupos sulfidrilos del glutatión (GSH, tripéptido involucrado en la conservación de la homeostasis celular ante el estrés oxidante) y otro de una cisteína perteneciente a alguna proteína (Gallogly *et al.*, 2009). Este mecanismo es una respuesta al estrés oxidante y la inhibición del mismo está asociado a desórdenes neurológicos, enfermedades cardiacas y cáncer (Sabens *et al.*, 2012). Además de la

glutathionilación, niveles altos de ROS también promueven la desactivación del complejo I y de la ATP sintasa (Mailloux y Harper, 2012). La glutathionilación del complejo I reduce la producción de superóxido (Hurd *et al.*, 2008). También se favorece la “fuga” de protones a través de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3, lo que después reduce la producción mitocondrial de ROS (Mailloux *et al.*, 2012). Sin embargo, el talio es afín a los grupos sulfhidrilo (nótese que en la naturaleza se le encuentra frecuentemente en minerales de sulfuro (Galván-Arzate y Santamaría, 1998) de distintas proteínas, alterando su función, lo que sucede con el GSH y la glutatión peroxidasa, cuyos contenidos disminuyen en células tratadas con talio, dejando a la célula vulnerable ante los efectos de las ROS (Aoyama *et al.*, en 1988; Galván-Arzate *et al.*, 2005; Cvjetko *et al.*, 2010), además de desacoplar la cadena de transporte electrónico y promover la producción de ROS y reducir el potencial mitocondrial de membrana (Hanzel y Verstraeten, 2006; Gwatleney-Brant, 2002).

Además de los grupos sulfhidrilo, otro grupo afectado por las ROS son los dobles enlaces en los lípidos (lo que inicia la LPO) y los residuos de cisteína y metionina (Mailloux, 2012), también se pueden generar más radicales libres a partir de otros y éstos pueden reaccionar con moléculas cercanas como las proteínas de membrana, o dispersarse y entrar en contacto con el DNA y dañarlo (Aoyama *et al.*, en 1988).

También se sabe que el talio tiene cierta afinidad por las bases nitrogenadas del DNA, principalmente por las guaninas en el surco mayor (Howerton *et al.*, 2001). La interacción directa entre el catión y el DNA fue estudiada por Ouameur *et al.* (2003). Ellos reportaron que los iones de Tl^+ tienen afinidad también por la timina. Al momento de adherirse a estas bases nitrogenadas, genera modificaciones mayores en las bases del DNA y modificaciones menores en el esqueleto de fosfato. De acuerdo con ellos, la adherencia del talio a los surcos menor o mayor no provoca modificaciones mayores en la conformación del DNA: a concentraciones menores del metal (0.5 mM), el número de cationes adheridos fue de 10 por cada 1000 nucleótidos, mientras que a concentraciones altas (10 mM) los cationes adheridos fueron 30 por cada 1000 nucleótidos.

Las alteraciones estructurales del DNA son causadas por modificaciones en las bases, las cuales tienen que ver con mutaciones, cáncer y otras enfermedades. Dentro de las bases que conforman al DNA, la guanina es la que posee el menor potencial de oxidación y es frecuentemente atacada por diferentes especies reactivas. Las modificaciones de la guanina por su oxidación pueden representar lesiones mortales (Jena y Mishra, 2012). Este daño puede inducir mutagénesis, entrecruzamientos (*crosslinks*) entre las bases del DNA o entre el DNA y proteínas, afectando su replicación y transcripción (Abdulnur y Flurry, 1976).

Los efectos genotóxicos del talio se hicieron evidentes en la frecuencia relativa de las manchas pequeñas para todos los tratamientos y en las manchas totales para el tratamiento de 200 μM ; esto significa que el daño pudo haber sido tardío, aneuploidogénico o clastogénico (Graf *et al.*, 1984) y que existió una tendencia concentración-dependiente (**Figura 17, a**). Este daño puede explicarse por los efectos del talio sobre la mitocondria que incrementaría la producción de ROS (Eskandari *et al.*, 2013; Hanzel y Verstraeten, 2006; Gwatleney-Brant, 2002), y/o por la formación de aductos entre el talio y las bases nitrogenadas del DNA (Howerton *et al.*, 2001; Ouameur *et al.*, 2003).

También existen entrecruzamientos entre bases nitrogenadas y pentosas, todos ellos mediados mediante un enlace covalente. En el caso de los aductos formados por pentosas o bases y proteínas, se trata de lesiones voluminosas que pueden inhibir la replicación del DNA, así como su traducción y promover desórdenes en la célula (Jena, 2012). Los nucleótidos mal apareados tienen las siguientes características: desviación del alineamiento estructural normal propuesto por Watson y Crick y perturbación en la fuerza de los puentes de hidrógeno, de apilamiento y las interacciones hidrofóbicas (Chabarría *et al.*, 2011), todo esto promueve la mutagénesis (Jena, 2012).

Hantson *et al.*, (2010) evaluaron la capacidad del talio para inducir aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátides hermanas, micronúcleos y células binucleadas en linfocitos de un hombre que se envenenó con 200 mg de sulfato de talio (Tl_2SO_4). Ni el número de aberraciones cromosómicas, ni el número de intercambios entre cromátides hermanas tuvieron algún incremento estadísticamente significativo. Las células binucleadas con micronúcleos tuvieron un incremento significativo (de 10 % a 35%); Hantson y su equipo de trabajo concluyeron que estos provinieron de la pérdida de cromosomas, lo que está relacionado con la ingesta del Tl_2SO_4 y corrobora el efecto aneuploidogénico del talio.

Según nuestros datos, es posible que el CH_3COOTl únicamente sea genotóxico a concentraciones mayores a 2.0 μM , las cuales podrían ser el resultado bioacumulación por exposición prolongada a la contaminación ambiental o exposición laboral.

Jaramillo-Cruz, en 2011, comprobó que existe daño a nivel genético causado por la exposición al CH_3COOTl (Tabla 2). Evaluó el efecto del acetato de talio en leucocitos humanos *in vitro* a concentraciones 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g/mL}$ con el ensayo cometa. El acetato de talio produce ligera toxicidad celular en tiempos cortos de exposición (1 a 2 h) y a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, induce daño al material genético, lo que equivale a 0.002 μM . En el presente trabajo los daños fueron observables a partir de los 2.0 μM de concentración; esta diferencia puede deberse a la forma en la que el compuesto fue administrado, ya que en *D. melanogaster* estaba

incluido en el medio de las moscas y ellas podían comer *ad libitum*, en el experimento de Jaramillo-Cruz, el compuesto estaba incluido en el medio

12 CONCLUSIONES

El CH₃COOTI mostró efectos con diferencias significativas en los tratamientos de 2, 20 y 200 μM para manchas pequeñas en CE, y 200 μM para todo tamaño y manchas totales en CE. Estos resultados también reflejan que el efecto del compuesto es concentración-dependiente (**Figura 15, a**).

Se observa una clara relación concentración-dependiente entre el nivel de daño que provoca el CH₃COOTI, expresado en términos de frecuencia relativa, y la concentración ascendente del mismo (**Figura 14, a**).

El presente trabajo demostró que el CH₃COOTI es un compuesto que es genotóxico a concentraciones mayores de 2.0 μM, provoca daño al DNA que se refleja en la producción de manchas pequeñas en la prueba SMART. A 200 μM de concentración es genotóxico para manchas totales también.

13 REFERENCIAS

-  Abdulnur S.F., Flurry R.L. (1976). Effect of guanine alkylation on mispairing. *Nature* 264 (5584): 369-370.
-  Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2007). Toxicological Profile for Lead. U. S. *Department of Health and Human Services*.
-  Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2016). Resúmenes de Salud Pública – Talio (Thallium). Consultada en abril 2018. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs54.html
-  Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004). *Essencial Cell Biology*. New York, NY, USA. Garland Science.
-  Al Hammouri, F. A., Darwaeh, G., Said, A. y Ghosh, R. A. (2011). Acute Thallium Poisonings: Series of ten Cases. *Journal of Medical Toxicology* (7):306-311.
-  Aon, M., Cortassa, S., Marbán, E. y O'Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondria metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 2(45): 44735-44744.

-  Aoyama, H., Yoshida, M. y Yamamura, Y. (1988). Induction of lipid peroxidation in tissues of thallosmalonate-treated hamster. *Toxicology* (53): 11-18.
-  Asmatulla, Qureshi, N. and Shakoori, A. (1998). Hexavalent chromium-induced abnormalities in chick embryos. *Journal of Applied Toxicology* 18: 167-717.
-  Barroso-Moguel, R., Ríos-Castañeda, C., Villeda-Hernández, J., Méndez-Armenta, M., Galván-Arzate, S. (1990). Neurotoxicity of thallium: biochemical and morphological study of organic lesions. *Archivos de Investigación Médica* 2: 115-22.
-  Bayir H., Fadeel B., Palladino M.J., Witasp E., Kurnikov I.V., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Amoscato A.A., Jiang J., Kochanek P.M., DeKosky S.T., Greenberger J.S., Shvedova A.A., Kagan V.E. (2006). Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 (5-6): 648-59.
-  Bell, E., Klimova, T., Eisenbart, J., Moraes, C., Murphy, M., Budinger, S. and Chandel, N. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex II is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 177 (6): 1029-1036.
-  Bergeron F., Auvré F., Radicella J.P., Ravanat J.L. (2010). OH radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 5528-5533.
-  Beliles, R.P. (1994). The metals. 31. Thallium, In: J.D. Clayton and F.E. Clayton Eds., Patty's. *Industrial Hygiene and Toxicology* 2 (42): 2235-2241.
-  Brand, M. and Nicholls, D. (2012). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* 435: 297-312.
-  Brusick, D. (1987). *Principles of genetic toxicology* (2° ed.) Plenum Press. New York.
-  Bulkey, B.H., Rouleau, J., Strauss, W.H., Pitt, B. (1975). Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis: detection by thallium-201 myocardial perfusion imaging. *Journal of Medical Chemistry* 293:1113-1116.
-  Cadet J., Douki T., Ravanat J.L., Di Mascio P. (2009). Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemistry & Photobiology Sciences* 8:903-911.
-  Cameo Chemicals. (1999). Thallium acetate. Consultado en febrero de 2018. Disponible en: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/12777>

-  Cardoso A.R., Kakimoto F.K. and Kowalkowski A.J. (2013). Diet-sensitive sources of reactive oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. *PLoS One* 8 (10): e77088.
-  Castañeda-Partida, L., Heres y Pulido, Ma., Dueñas-García, I. (2013). *Drosophila melanogaster, un modelo experimental*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, México. Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
-  Croffs, A., Todd, J., Victoria, D., Kolling, D., Dikanov, S., Gilbreth, R., Lhee, S., Kuras, R. and Guergova, M. (2009). The Q-cycle reviewed: how well does a monomeric mechanism of the bc1 complex account for the function of a dimeric complex? *Biochimica et Biophysica Acta*; 1777 (7-8): 1001-1019.
-  Cvjetko, P., Cvetkoand, I. Nad Pavlica, M. (2010). Thallium toxicity in humans. *Arh Hih Rada Toksikol* 61: 111-119.
-  Czeizel A.E. (1994). Budapest registry of self-poisoned patients. *Mutation Research* 312: 157-163.
-  Douki T., Vadesne-Bauer G., Cadet J. (2002). Formation of 2'-deoxyuridine hydrates upon exposure of nucleosides to gamma radiation and UVC-irradiation of isolated and cellular DNA. *Photochemical & Photobiology Sciences* 1: 565-569.
-  Douki T., Ravanat J.L., Pouget J.P., Testar I., Cadet J. (2006). Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *International Journal of Radiation Biology* 82:119-127.
-  Dueñas I.E., Heres. M.E., Castañeda. P.L. y Graf. U. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service* 84:166.
-  Dmowski K., Rossa M., Kowalska J. y Krasnodębska-Ostręga B. (2015) Thallium in spawn, juveniles and adult common toads (*Bufo bufo*) living in the vicinity of a zinc-mining complex, Poland. *Environmental Monitoring Assessment* 187: 4141.
-  Eskandari, M., Hashayekhi, V., Aslani, M. and Hosseini, M-J. (2013). Toxicity of thallium on isolated rat liver mitochondria: the role of oxidative stress and MPT pore opening. *Environmental Toxicology* 30 (2): 232-41.
-  Ewers U. (1988). Environmental exposure to thallium. *The Science of the Total Environment* 71: 285-292.

-  Facultad de Química, UNAM. (2016). Hoja de Seguridad XIV Dicromato de Potasio. Consultado en febrero de 2018. Disponible en: : <https://quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2016/12/14dicromatok.pdf>
-  Freeman, E. T. (1927). Epilation by thallium acetate. *Irish Journal of Medical Science* 2: 318-320.
-  Gallogly M., Starke W. y Mieyal J. (2009). Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (5); 1059-1081
-  Galván-Arzate S., Pedraza-Chaverrí J., Medina-Campos O., Maldonado P., Vázquez-Román B., Ríos C., Santamaría A. (2005). Delayed effects of thallium in the rat brain: Regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food and Chemical Toxicology* 43: 1037 – 1045.
-  Galván-Arzate, S. and Santamaría, A. (1998). Thallium toxicity (Mini-review). *Toxicology Letters* 99: 1-13.
-  Garza, A., Vega, R., Soto, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor* 12(3); 57-65
-  Garza L. y Torres O. (1985). Intoxicación por talio: Evaluación Clínica y Tratamiento. *Compendium de Investigación Clínica Latinoamericana* 1: 16
-  Graf U., Würigler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. and Kale P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6: 153-188
-  Graf U., Frei H., Kägi A., Katz AJ., and Würigler FE. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 222 (4): 359-373.
-  Graf U., Soon Ok, Olvera, O. (1992). The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test to *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Research* 266 (2): 197-203.
-  Guzy R., Hoyos B., Robin E., Chen H., Liu L., Mansfield K., Simon C., Hammering U. and Schumacker P. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism* 1: 401-408.
-  Gwaltenev-Brant SM. (2002). Heavy Metals. In: Haschek WM, Rosseaux CG, Wallig AM, editors. *Handbook of Toxicologic Pathology*. New York. Academic Press 701: 32

-  Halliwell. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
-  Hantson P., Desoir R., Léonard E.D., Crutzen-Fayt M.C., Léonard A., Mahieu P. (1997). Cytogenetic observations following thallium poisoning. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50 (2): 97-100.
-  Hanzel C. y Verstraeten S. (2006). Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicology & Applied Pharmacology* 216: 485 – 449.
-  Hanzel C. y Verstraeten S. (2009). Tl (I) and Tl (III) activate both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Toxicology & Applied Pharmacology* 236; 59 – 70
-  Heim N., Wappelhorst O. and Markert B. (2002). Thallium in terrestrial environments- occurrence and effects. *Ecotoxicology* 11 (5); 369-377
-  Howerton S.B., Stines C.C., VanDerveer D. and Williams L.D. (2001). Locating monovalent cations in the grooves of β -DNA. *Biochemistry* 40; 10023-10031
-  Huang M., Krepiy D., Hu and Petering D. (2004). Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98; 775 – 785
-  Hurd T., Requejo R., Filipovska A., Brown S., Prime T., Robinson A., Fearnley M. and Murphy M. (2008). Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys – 531 and Cys-704 on the 75-kDa subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 283(36); 24801-24815
-  IARC. (1982). Monographs on the evolution of the carcinogenic risk of chemical to humans, vol 71. Supple 4. Geneva (Switzerland): World Health Organization
-  Jena M. (2012). DNA damage by reactive oxygen species: mechanisms, mutation and repair. *Journal of Bioscience* 37 (3); 503-517
-  Jaramillo-Cruz E. (2011). *Evaluación del daño al ADN en leucocitos humanos tratados in vitro con acetato de talio* (Tesis de pregrado). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México Distrito Federal.
-  Juan L., Xuwen L., Jin W., Tangfu X., Diyun C., Guodong S., Meiling Y., Holger L., Chunlin W. and Yongheng C. (2017). Thallium contamination in arable soils and vegetables around a steel plant – A newly – found significant source of Tl pollution in South China. *Environmental Pollution* (2017); 1 – 9

-  Karbowska B. (2016). Presence of thallium in the environment: sources of contamination, distribution and monitoring methods. *Environmental Monitoring and Assessment* 188 (11); 640–659
-  Kakimoto P.A., Tamaki F.K., Cardoso A.R., Marana S.R. and Kowaltowski. (2015). H₂O₂ release from the very long chain acyl CoA dehydrogenase. *Redox Biology* 4; 375 - 380
-  Léonard A. and Gerber G.B. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research* 387; 47-53
-  Liem Y., Kaiser G., Sager M., Tölg G. (1984). The determination of thallium in rocks and biological materials at ng g⁻¹ levels by differential-pulse anodic stripping voltammetry and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 158; 179–197.
-  Lundquist F., Tygstrup N., Winkler K., Mellempgaard K. and Munck-Petersen S. (1961). Ethanol Metabolism and Production of Free Acetate in the Human Liver. *Journal of Clinical Investigation* 41 (5)
-  Macedo-Márquez A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 15 (2); 97-103
-  Mailloux J., Adjeitey N., Ying J. and Harper M. (2012). Crucial yet divergent roles of mitochondrial redox state in skeletal muscle v.s. brown adipose tissue energetics. *The FASEB Journal* 26(1); 363-375
-  Mailloux R. J. and Harper Marry-Ellen. (2012). Mitochondrial proticity and ROS signalling: lesions from the uncoupling proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23 (9); 451 - 458
-  Miwa S. y Brand M. (2005). The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014-219.
-  Manzo L. and Sabbioni E. (1988). Thallium, In: H.G. Seiler, H. Sigel and A. Sigel _Eds. Handbook On Toxicity of Inorganic Compounds, Marcel Dekker, New York, 677–688.
-  Matthews J. y Anzarut A. (1968). Thallium Poisoning. *Canadian Medical Association Journal* 99; 72-75
-  Misra U.K., Kalita J., Yadav R.K., Rajan P. (2003). Thallium poisoning: emphasis on early diagnosis and response to haemodialysis. *Postgraduate Medical Journal* 79; 103-105

-  Miwa S. y Brand M. (2005). The topology of superoxide production by complex III and glicerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014-219.
-  Moeschlin S. (1980). Thallium poisoning. *Clinical Toxicology* 17 (1); 133–146.
-  Morgan T. H., (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32: 120-122
-  Mulkey J.P. and Oehme F.W. (1993). A review of thallium toxicity. *Veterinary and Human Toxicology* 35 (5); 445–453
-  Nelson D.L., Michael M.C. (2006). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Editores Omega S.A.
-  Nava-Ruíz C., Méndez-Armenta M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio. *Archivos de Neurociencias (México)* 16 (3); 140-147
-  Ouameur A.A, Nafisi Sh., Mohajerani N., Tajmir-Riahi H.A. (2003). Thallium-DNA complexes in aqueous solution. Major or minor groove binding. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* (20); 0793 - 1102
-  Passagli M. y Marinho P.A. (2012). *Toxicología Forense* (7ªed.). Campinas: Millenium.
-  Pouget J.P., Frelon S., Ravanat J.L., Testard I., Odin F., Cadet J. (2002). Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiation Research* 157: 589-595.
-  Rangel-Guerra R., Martínez R. H., Villarreal H. J. (1990). Intoxicación por Talio. Experiencia con 50 pacientes. *Gaceta Médica de México* (126); 6
-  Lenntech. (2018). Potasio-K. Consultado en marzo de 2018. Disponible en: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/k.htm>
-  Lucky T. (1975). Introduction to heavy metal toxicity, safety and homology. *Environmental Quality and Safety Supplement* (1), 1-3.
-  Oehme, F.W. (1978). *Toxicity of heavy metals in the environment*. New York, USA: Marcel Dekker.
-  Quijano C., Trujillo M., Castro L. y Trostchansky A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biology* (8); 28 – 42.
-  Reddy J. K., Hashimoto T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptative metabolic system. *Annual Review of Nutrition* (21); 193 – 230.
-  Repetto M. y Repetto G. (2009). *Toxicología Fundamental*. (4ªed.) Sevilla: Diaz de Santos.

-  Repetto G. y del Peso A. (2012). Gallium, Indium, and Thallium. In Bingham, E. And Cohrssen, B. (Ed.), *Patty's Toxicology*. Hoboken, (pp. 257 – 254) New Jersey: Wiley & Sons, Inc.
-  Ríos C., Galván-Arzate S., Tapia R. (1989). Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl_2SO_4 . *Archives of Toxicology* 63; 34-37
-  Rodríguez de Andrade H. H., Reguly, M. L. and Lehmann, M. (2004). Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Methods in Molecular Biology* 247; 389-412.
-  Rodríguez J.V. and Gómez C.M. (2012). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radical Biology and Medicine* 53 (1): 12 – 19.
-  Romero A. y Castro A. (1948). Trece casos de la tiña tratados con Acetato de Tl. *Revista Médica de Costa Rica* 197-199.
-  Sabens E., Gao X. and Mielal J. (2012). Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases – focus on S-glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling* 16(6);543-566
-  Samson-Thibault F., Madugunu G.S., Gao S., Cadet J., Wagner J.R. (2012). Analysis of cytosine modifications in oxidized DNA by enzymatic digestion and HPLC-MS/MS. *Chemical Research in Toxicology* 25:1902-1911.
-  Seeger R. and Gross M. (1981). Thallium in higher fungi. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und – Forschung* 173; 9-15
-  Silbergeld E. (1998). Toxicology. En. Stellman, M. (Ed). *Eyclopedia of Occupational Health & Safety* (4th ed.) (pp. 33.2-33.68). Geneva: International Labour Office Geneva.
-  Sherlock J. C. y Smart G. A. (1986). Thallium in foods and the diet. *Food Additives & Contaminants* 3(4): 363-70.
-  Shi L. and Tu B. (2015). Acetyl CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology* 33: 125 – 131.
-  Spencer P.S., Peterson E.R., Madrid R., Raine C.S. (2017). Effects of thallium salts on neuronal mitochondria in organotypic cord–ganglia–muscle combination cultures. *Cell Biology* 58: 79–85.
-  Spanó A. M. y Graf U. (1998). Segundo taller sobre SMART: Un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*, en la Universidad Federal de Uberlandia (MG), Brasil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 14 (12): 111 – 114.

-  St-Pierre E.I., Buckinham J.A., Roebuck S.J., and Brand M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44784 – 44790.
-  Suzuki H., Kawarabayasi Y., Kondo J., Abe T. Nishikawa K., Hashimoto T., Yamamoto T. and Kimura S. (1990). Structure and regulation of rat long-chain acyl CoA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (15): 8681 – 8685.
-  Tabrez A., Mamina N., Imran A. And Jumar A. (2013). Removal of chromium (VI) from aqueous solution using guar gum-nano zinc oxide biocomposite adsorbent. *Arabian Journal of Chemistry* 10: 2388-2398.
-  Tahara E. B., Navarrete F.D. and Kowaltowski A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine* 46 (9): 1283 – 1297.
-  Tetsuya Y., Kohei T., Hiromichi N., Atsuyoshi I. and Atsunori N. (2017). A successfully Case of Criminal Thallium Poisoning. *Journal of Clinical & Diagnostic Research* 11 (4): OD01 – OD02.
-  Tuominen K.J. Wallace J.A. (2002). Phospholipid–cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8822–8826.
-  Toxicology Data Framework. (S/A). Thallium (I) Acetate: U.S.: U.S. *National Library of Medicine*. Consultado en enero de 2018. Disponible en: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+563-68-8>
-  TOXNET (s/f). Thallium (I) acetate. Disponible en: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~7GbiUO:3>
-  TOXNET (s/f). Acetaldehyde. Consultado en abril de 2018. Disponible en: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~HtSyqR:1>
-  Tretter L. and Vizi A. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalized by α -ketoglutarate dehydrogenase. *Neurobiology of Disease* 24(36): 7778-7771.
-  Umang-Shah S. (2012). Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy & Biological Sciences* (1):43-54.
-  Vengoupal B. and Luckey T. (1978). *Toxicity of group III metals, in Metal Toxicity in Mammals*, Vol. 2, Plenum, New York: 101-127.
-  von Sonntag C. (2006). *Free-radical-induced DNA damage and its repair*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

-  Yildirim M., Ikbal M., Tos T., Seven B., Pirm I. and Varoglu E. (2006). Genotoxicity of Thallium - 201 in Patients with Angia Pectoris Undergoing Myocardial Perfusion Study. Japan. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 206: 299-304.
-  Yokoyama A., Muramatsu T., Ohmori T., Higuchi S., Hayashida, M. and Ishii, H. (1996). Esophageal cancer and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 5: 99-102.
-  Wade A. and Barnister J. (1975). *The Chemistry of Aluminum, Gallium, Indium and Thallium*. Durhan: Pergamon Press
-  Wagner J.R., Decarroz C., Berger M., Cader J. (1999). Hydroxyl-radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society* 121: 4101-4110.
-  Wedepohl K. (1991). *The composition for the upper earth's crust and the natural cycle of selected metals. Metals in natural raw minerals. Natural resources*. In: E. Merian (ed.), *Metals and their compounds in the environment, occurrence, analysis and Biological relevance*, VCH, Weinheim: 1-17.
-  World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. (1998). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer
-  Zhao Y-G., Shen H-Y., Pan S-D., Hu M-Q. and Xia Q-H. (2010). Preparation and characterization of amino-functionalized nano-Fe₃O₄ magnetic polymer adsorbents for removal of chromium (VI) ions. *Journal of Material Science* (45): 5291-301.
-  Xiao T., Guha J., Boyle D., Cong-Qiang L. and Chen J. (2004). Environmental concerns related to high thallium levels on soils and thallium uptake by plants in southwest Guizhou, China. *Science of the Total Environment* 318: 223,244.