



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias Biológicas

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología Experimental

“Efectos del talio(III) sobre el ciclo celular, el daño oxidante al ADN y el estado redox en linfocitos humanos tratados *in vitro*”

TESIS

Que para optar por el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biól. Alejandra López Lanuza

Tutor principal: Dr. Juan José Rodríguez Mercado.

FES Zaragoza, UNAM.

Comité tutor: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.

ICAyCC, UNAM.

Dr. Hugo López Muñoz.

FES Zaragoza, UNAM.

Ciudad de México, México.

Marzo, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias Biológicas

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Biología Experimental

“Efectos del talio(III) sobre el ciclo celular, el daño oxidante al ADN y el estado redox en linfocitos humanos tratados *in vitro*”

TESIS

Que para optar por el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biól. Alejandra López Lanuza

Tutor principal: Dr. Juan José Rodríguez Mercado.

FES Zaragoza, UNAM.

Comité tutor: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.

ICAyCC, UNAM.

Dr. Hugo López Muñoz.

FES Zaragoza, UNAM.

Ciudad de México, México.

Marzo, 2023.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/257/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de febrero de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS** de la estudiante **LÓPEZ LANUZA ALEJANDRA** con número de cuenta **312264813** con la tesis titulada **“EFECTOS DEL TALIO (III) SOBRE EL CICLO CELULAR, EL DAÑO OXIDANTE AL ADN Y EL ESTADO REDOX EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Vocal: DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA
Vocal: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Vocal: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de marzo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido, número de apoyo 762464.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM, proyecto IN-229220, en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, tutor principal, por su disposición y apoyo en cada momento, durante la elaboración de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Sandra Gómez Arroyo y el Dr. Hugo López Muñoz, por su participación en hacer de este un buen trabajo, por sus sugerencias y ayuda.

Agradecimientos

A los miembros de mi jurado:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dra. María Calderón Segura

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Por su apoyo y observaciones, que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Lucy y el Dr. Aníbal por sus consejos y amabilidad. Por toda la ayuda que me han prestado.

Al Dr. Juan José por aceptarme como su alumna, sus enseñanzas, sus consejos, su buen ejemplo, por el enorme apoyo moral que me ha prestado todos estos años y por su invaluable e infinita paciencia.

A todos los miembros del laboratorio de la UNIGEN, por ser increíbles y hacer de estos años una experiencia asombrosa.



Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, responsable de la Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), en el Laboratorio de Toxicología Genética ubicado en el primer piso del edificio de la UMIEZ de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Campus II, UNAM. Contó con la tutoría de la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo (ICAYCC, UNAM) y del Dr. Hugo López Muñoz (FES Zaragoza, UNAM).

Dedicatoria

A la memoria de mi padre, Francisco López De Luna, por haber cultivado en mí el amor por aprender, mi fascinación por la naturaleza y mi persistencia.

A mi madre, María Lanuza Rosas, con todo mi amor, por su apoyo incondicional, su paciencia infinita y cariño inagotables.

A mi hermana, Susana López Lanuza, por siempre estar para mí y ser un gran ejemplo de superación, de inteligencia, disciplina y fortaleza.

A mi hermana, Jessica Lorena Lanuza Cuatepotzo, por ser mi amiga, cómplice. Por hacerme sonreír en mis peores y mejores momentos, por ser mi refugio en los malos ratos.

A José, Patty, Laura y Ximena, por ser mi segundo hogar, por su apoyo y cariño.

A Éfren, por todos estos años de amistad y afecto. Por las historias. Por acompañarme y animarme, por ser paciente conmigo. Por conocerme tan bien y a pesar de eso, seguir aquí.

A Fernando, por el apoyo, las bromas, por creer y estar allí para mí.

A todos los que me han ayudado a lo largo del camino.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. MARCO TEÓRICO	7
4.1 Metales y su toxicidad	7
4.2 Talio	8
4.2.1 Producción y usos del TI	9
4.2.2 Contaminación y exposición del TI	11
4.2.3 Toxicocinética del talio	13
4.2.4 Mecanismos de toxicidad y Genotoxicidad del Tl^{3+}	15
4.3 Ciclo celular	17
4.3.1 Estimación por contenido de ADN	21
4.4 Daño al ADN y su reparación	21
4.4.1 Electroforesis unicelular	25
4.5 Estrés oxidante	27
4.5.1 Dihidrorodamina 123	29
V. JUSTIFICACIÓN	31
VI. HIPÓTESIS	32
VII. OBJETIVO	32
7.1 Objetivo general	32
7.2 Objetivos particulares	32
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	33
8.1 Reactivos	33
8.2 Separación de linfocitos y viabilidad	33
8.3 Cultivos y tratamientos	33
8.4 Evaluación del ciclo celular	34
8.5 Evaluación del daño oxidante al ADN con Fpg	34
8.6 Evaluación del estrés oxidante con DHR 123	35
8.7 Análisis estadístico	36
IX. RESULTADOS	37
9.4 Análisis del contenido de ADN	37
9.5 Análisis del daño oxidante en el ADN	41

9.6 Análisis de la producción de ERO y ERN en la célula.....	44
X. DISCUSIÓN	48
XI. CONCLUSIONES	54
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

I. RESUMEN

El talio (Tl) es de los metales considerados peligrosos por su elevada toxicidad. Tiene diferentes aplicaciones industriales, médicas y es liberado al ambiente por múltiples procesos como la actividad minera, la combustión de combustibles fósiles y la fundición de otros metales. Se le considera un “contaminante emergente” y representa un riesgo para la salud humana. Tiene dos estados de oxidación +1 y +3, donde el Tl^{1+} representa el estado más estable y también el más estudiado toxicológicamente. Por su parte, el Tl^{3+} es el que menos se ha investigado y varios aspectos de sus mecanismos de acción no han sido dilucidados, incluido su efecto sobre la proliferación celular y su potencial genotóxico. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar los efectos del tricloruro de talio(III) ($TlCl_3$) sobre el ciclo celular, su capacidad para inducir lesiones por oxidación en el ADN y producir estrés oxidativo en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Se aislaron, cultivaron y trataron linfocitos humanos de sangre periférica con $TlCl_3$. Se evaluó el ciclo celular por contenido de ADN de los cultivos expuestos a 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 $\mu g/mL$ de $TlCl_3$ durante 24, 48 y 72 h. Se obtuvo la proporción de células en las fases de G_1 , S y G_2/M por citometría de flujo. En linfocitos tratados en G_0 con 0.5, 1 y 5 $\mu g/mL$ de $TlCl_3$ durante 1 y 3 h, se estimó el daño al ADN por bases oxidadas con ayuda de la electroforesis unicelular en gel y la endonucleasa ADN-formamidopirimidin glicosilasa (Fpg). También se determinó la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por citometría de flujo y con el reactivo dihidrorodamina 123 (DHR 123) en células en G_0 tratadas con 0.5, 1 y 5 $\mu g/mL$ por 3 h. Además, en todos los experimentos se determinó la viabilidad celular por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.

En la evaluación del ciclo celular, se observó que el $TlCl_3$ indujo el arresto en G_1 en las concentraciones de 5–50 $\mu g/mL$ a las 48 y 72 h de exposición, y redujo la viabilidad con algunos tratamientos: en 5 $\mu g/mL$ después de 48 h y con 10 y 50 $\mu g/mL$ después de 72 h en comparación con el testigo. Por otra parte, en todos los tratamientos probados, el $TlCl_3$ produjo la oxidación de las bases del ADN. Finalmente, a las 3 h de exposición al compuesto, se incrementó estadísticamente la producción de especies reactivas, principalmente $ONOO^-$ y H_2O_2 en la concentración de 5 $\mu g/mL$ sin cambios en la viabilidad celular.

Los efectos producidos por el TlCl_3 indican que puede inducir estrés oxidativo en linfocitos humanos tratados *in vitro*, estrés que produce daño por oxidación de las bases del ADN y que puede tener como consecuencia el arresto del ciclo celular en la fase previa a la replicación del ADN.

II. ABSTRACT

Thallium (Tl) is one of the metals considered hazardous due to its high toxicity. It has different industrial and medical applications and is released into the environment by multiple processes such as mining, fossil fuel combustion and the melting of other metals. It is considered an "emerging pollutant" and poses a risk to human health. It has two oxidation states, +1 and +3, where Tl^{1+} is the most stable one and also the most studied toxicologically. On the other hand, Tl^{3+} has been the least researched and several aspects of its mechanisms of action have not been elucidated, including its effects on cell proliferation and its genotoxic potential. Therefore, the aim of this work was to analyze the effects of thallium(III) trichloride ($TlCl_3$) on the cell cycle, its ability to induce oxidative DNA damage and to produce oxidative stress in human lymphocytes treated *in vitro*.

Human peripheral blood lymphocytes were isolated, cultured, and treated with $TlCl_3$. The cell cycle of cultures of DNA content exposed to 0.1, 0.5, 1, 1, 5, 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$ of $TlCl_3$ for 24, 48 and 72 h was evaluated. The proportion of cells in the G_1 , S and G_2/M phases was obtained by flow cytometry. In lymphocytes treated in G_0 with 0.5, 1 and 5 $\mu\text{g/mL}$ of $TlCl_3$ for 1 and 3 h, DNA damage by oxidized bases was estimated using single-cell gel electrophoresis and DNA endonuclease-formamidopyrimidine glycosylase. The generation of reactive species of oxygen and nitrogen was also determined by flow cytometry and dihydrorhodamine 123 reagent (DHR 123) in cells in G_0 treated with 0.5, 1 and 5 $\mu\text{g/mL}$ for 3 h. In addition, cell viability was determined in all experiments by staining with acridine orange and ethidium bromide.

During the evaluation of the cell cycle, it was observed that $TlCl_3$ induced arrest in G_1 at concentrations of 5-50 $\mu\text{g/mL}$ at 48 and 72 h of exposure, in addition to reducing viability in some treatments: at 5 $\mu\text{g/mL}$ after 48 h and with 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$ after 72 h compared to the control. Moreover, in all of the treatments tested, $TlCl_3$ produced the oxidation of the DNA bases. Finally, at 3 h of exposure with the compound, the production of reactive species, mainly $ONOO^-$ and H_2O_2 at a concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ was statistically increased without changes in cell viability.

The effects produced by $TiCl_3$ indicate that it can induce oxidative stress in human lymphocytes treated *in vitro*, a stress that produces damage by oxidation of the DNA bases and that can result in cell cycle arrest in the phase prior to DNA replication.

III. INTRODUCCIÓN

Los metales son constituyentes de todos los ecosistemas, distribuidos naturalmente en el ambiente a través de los ciclos geológicos y biológicos, así como también por la actividad humana como la minería y la explotación industrial. Algunos metales llamados “esenciales” son necesarios en los seres vivos, cumplen funciones bioquímicas imprescindibles y son vitales para la supervivencia, aunque en exceso pueden ser tóxicos. Otros metales, no cumplen funciones biológicas en los organismos y pueden ser altamente tóxicos, pero se ha estado en continua exposición a ellos por sus usos y aplicaciones desde la antigüedad (Goyer y Clarkson, 1996; Gupta, 2018). Metales conocidos por su toxicidad como el plomo (Pb) y el mercurio (Hg), han sido empleados por el ser humano desde hace siglos, mientras que las aplicaciones de otros como el cadmio (Cd), fueron descubiertos más recientemente (siglo XIX) (Goyer y Clarkson, 1996).

El **talio** (Tl), junto al aluminio (Al), el galio (Ga) y el indio (In) son metales alcalinotérreos pertenecientes a la familia IIIA de la tabla periódica, los cuales son considerados peligrosos por su elevada toxicidad. Estos elementos debido a sus múltiples usos en la industria han sido intensamente explotados y los han convertido en un riesgo para la salud por su liberación al ambiente. Los estados de oxidación más comunes de los compuestos de estos metales son I y III, su estabilidad varía de acuerdo con las condiciones del medio en las que se encuentren. En el caso del Tl, los compuestos de Tl^{1+} son considerados más estables en compuestos inorgánicos y a pH neutro con respecto a los de Tl^{3+} (Fergusson, 1990), no obstante, en cuerpos de agua continental y oceánica es común encontrar iones de Tl^{3+} . Los compuestos de Tl^{3+} se emiten al ambiente principalmente en forma de óxidos y en los mares y lagos está disuelto constituyendo hidróxidos, cloruros y bromuros de talio(III), entre otros haluros (Repetto *et al.*, 2012; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017).

El Tl no posee ninguna función biológica reconocida, muestra efectos adversos sobre los ecosistemas y se ha reportado en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* que induce toxicidad celular, genotoxicidad, inmunotoxicidad, así como efectos sobre el desarrollo y la reproducción. La exposición a sus compuestos puede ser ambiental u ocupacional por lo que la entrada al organismo es principalmente a través de sistema

digestivo y respiratorio, además es también absorbido por la piel (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Repetto *et al.*, 2012; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Los efectos tóxicos del Tl y sus compuestos se han descrito en especial en su estado de oxidación I y III, siendo el primero más tóxico debido a la capacidad del ion Tl^{1+} de mimetizar al ion potasio (K^{1+}), interfiriendo con las funciones celulares que dependen de este ion e induciendo múltiples efectos citotóxicos, genotóxicos, teratogénicos y neurotóxicos que han sido registrados en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, algunos aspectos de la cinética y los mecanismos por los cuales los compuestos del Tl^{3+} ejerce su toxicidad aún no han sido estudiados ya que han recibido menos atención que los compuestos de Tl^{1+} (Repetto *et al.*, 2012; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2015, 2017, 2019; Álvarez-Barrera *et al.*, 2019).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Metales y su toxicidad

La toxicidad de los metales puede evaluarse tanto en metales esenciales, como en metales no esenciales para los organismos. Los primeros son aquellos requeridos como elementos importantes en el metabolismo y su escases o ausencia puede causar daños o alteraciones graves a las funciones vitales, mientras que los segundos son aquellos que no cumplen una función biológica reconocida y cuando están presentes pueden tener efectos tóxicos incluso a concentraciones muy bajas. Los metales esenciales también pueden generar toxicidad cuando se acumulan concentraciones no habituales en el cuerpo, como se muestra en el **Cuadro I**. Cuando se habla de la toxicidad de un metal hay que destacar que no sólo el rango de concentración, sino también la especiación y el estado de oxidación son factores cruciales que afectan a los aspectos de envenenamiento del metal en cuestión (Zoroddu *et al.*, 2019).

En los seres humanos, se describen al menos diez metales esenciales de los cuales tres son considerados “elementos masivos”, ya que son requeridos en concentraciones mayores y constituyen aproximadamente el 99 % de los metales en el cuerpo: estos son el calcio (Ca), el potasio (K) y el sodio (Na). Los otros siete: magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), zinc (Zn), hierro (Fe), cobalto (Co) y cobre (Cu), son conocidos como “elementos traza” y sus requerimientos dietéticos son mucho menores.

Los metales esenciales pueden jugar papeles imprescindibles en el organismo como reguladores osmóticos, componentes estructurales como es el caso de la biomineralización del Ca y Mg en los huesos, como mensajeros o como parte de las enzimas (metaloenzimas) en las cuales los iones metálicos pueden formar parte de los sitios activos o estabilizar a la molécula (Fraga, 2005; Gupta, 2018).

Los metales no esenciales pueden alterar el metabolismo celular propiciando estrés oxidante en las células mediante la producción de ERO, por el agotamiento o modificación de enzimas y compuestos relacionados con la defensa antioxidante, así como por su capacidad de reaccionar con algunos grupos funcionales en las proteínas o mimetizar iones metálicos esenciales (Stohs y Bagchi, 1995; Hartwig, 2013; Jaishankar *et al.*, 2014).

Cuadro I. Concentraciones normales y tóxicas de algunos metales esenciales en el humano.

Metal (símbolo)	Concentración promedio en un adulto humano de 70 Kg	Concentración sérica normal	Concentración sérica tóxica
Calcio (Ca)	1000 g	2.13–2.55 mM	> 2.55 mM
Potasio (K)	140 g	3.5–5.0 mM	> 5.5 mM
Sodio (Na)	100 g	130–145 mM	> 145 mM
Hierro (Fe)	4–5 g	1.3 µg/mL	Nd
Zinc (Zn)	2 g	0.66–1.10 µg/mL	Nd
Cobre (Co)	80–100 mg	0.75–1.45 µg/mL	Nd
Magnesio (Mg)	19 mg	0.17–0.23 µg/mL	> 0.9 µg/mL
Manganeso (Mn)	12–20 mg	< 2.4 ng/mL	Nd
Molibdeno (Mo)	5 mg	0.3–2.0 ng/mL	Nd
Cobalto (Co)	2 mg	0.0–0.9 ng/mL	> 5 ng/mL

Fuentes: Fraga (2005), Zoroddu *et al.* (2019), Mayo Clinic Laboratories (2020).
Nd, no hay datos

El talio (Tl) es un metal sin ninguna función biológica reconocida en el ser humano y ha probado ejercer diversos efectos tóxicos en los seres vivos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013), aunque los mecanismos de sus diferentes formas químicas no han sido aún esclarecidos completamente.

4.2 Talio

El Tl es un metal pesado, suave y maleable, con una densidad de 11.8 g/mL, de color azul-blanquecino en su estado puro. Es relativamente raro, con abundancia en la corteza continental de 0.49 ppm y en la corteza oceánica de 0.013 ppm. Se obtiene principalmente de los polvos de combustión resultantes de la quema de pirita, de la fundición y el refinado de Pb o Zn, durante la producción de Cd y por la extracción de lorandita (TlAsS₂, 60 % Tl). Tiene dos estados de oxidación, Tl¹⁺ y Tl³⁺, siendo el primero más estable en compuestos inorgánicos, en solución acuosa a pH neutro y el segundo

en compuestos orgánicos. Tiene dos isotopos naturales, el ^{203}Tl (30 %) y el ^{205}Tl (70 %), cuenta con al menos otros 26 isotopos artificiales con masas de entre 179 y 210 g/mol y vidas medias de entre 2.1 milisegundos ($^{201\text{m}}\text{Tl}$) a 3.8 años (^{204}Tl) (Léonard y Gerber, 1997; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

El Tl^{1+} tiene radio iónico de 1.44 Å, similar al del K^{1+} , Rb^{1+} (rubidio) y Ag^{1+} (plata) (1.33, 1.47 y 1.27 Å, respectivamente), en lo que radica su relevancia biológica, porque esta propiedad permite que el Tl ingrese al organismo sustituyendo al ion K^{1+} en distintos procesos biológicos (Douglas *et al.*, 1990; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). El ion Tl^{3+} por otra parte, es similar al Al^{3+} , tiene alta capacidad oxidante y se convierte paulatinamente al estado +1 (Peter y Viraraghavan, 2005), la mayoría de sus sales son insípidas, inoloras, incoloras y elevadamente tóxicas, otras de sus propiedades están resumidas en el **Cuadro II**.

4.2.1 Producción y usos del Tl

El Tl se obtiene como subproducto de la fundición y refinación de minerales de Cu, Pb y Zn y en emisiones por combustión. Los principales productores son China, Kazakhstan y Rusia, no obstante, no hay datos precisos de producción, la cual suele calcularse con base en el contenido de Tl en los minerales de Zn. Se han encontrado depósitos considerables en Brasil y Macedonia del Norte, aunque es difícil en la actualidad identificar depósitos que puedan explotarse económicamente (US GS, 2021).

A partir de su descubrimiento, se encontraron múltiples aplicaciones para el Tl en la medicina y en la industria. Se utilizó en el tratamiento contra sífilis, malaria y tiña del cuero cabelludo, para reducir los sudores de la tuberculosis, se añadía a productos depilatorios por su capacidad para provocar la caída del cabello y el sulfato de talio(I) (Tl_2SO_4) se empleaba a gran escala contra plagas de roedores. Durante la segunda mitad del siglo XX, tras estudiarse mejor las propiedades tóxicas de los compuestos de Tl y darse varios casos de intoxicación y envenenamiento, todas estas aplicaciones fueron prohibidas, aunque en la actualidad debido a la creciente adaptación y resistencia de los roedores a los pesticidas comunes, ha empezado a reintroducirse en dicho mercado, en contra de las recomendaciones de la Organización Mundial de la

Cuadro II. Propiedades físicas y químicas de algunos compuestos de Tl de interés toxicológico.

Nombre (fórmula química)	Estado de oxidación	Masa molecular (g/mol)	Densidad (g/cm ³)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad	Número CAS
Acetato de talio (TlCH ₃ COO)	+1	263.43	3.68	131	Nd	Soluble en agua y etanol.	563-68-8
Cloruro de talio(III) (TlCl ₃)	+3	328.75	7.0	430	Nd	Soluble en agua. Insoluble en etanol.	13453-32-2
Nitrato de talio (TlNO ₃)	+1	266.39	5.55	206	450 (Sd)	Soluble en agua. Insoluble en etanol.	10102-45-1
Nitrato de talio(III) Tl(NO ₃) ₃	+3	390.398	Nd	102-105	Sd	Soluble en agua y solventes orgánicos.	13746-98-0
Óxido de talio(III) (Tl ₂ O ₃)	+3	456.77	9.65	717	896	Insoluble en agua.	1314-32-5
Sulfato de talio (Tl ₂ (SO ₄))	+1	504.83	6.77	632	Sd	Soluble en agua: 4.87 g/100 mL a 25 °C.	7446-18-6

CAS, Chemical Abstract Service. Nd, no hay datos. Sd, se descompone.

Elaborado a partir de O'Neil (2001), Sibi *et al.* (2009), Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano (2013), CAS Common Chemistry (2021) y NCBI (2021).

Salud de 1973 (Léonard y Gerber, 1997; Galván-Arzarte y Santamaría, 1998; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). Entre las aplicaciones médicas vigentes, se encuentra la de radiofármaco (isotopo ²⁰¹Tl) en imagen de perfusión miocárdica, introduciéndose en las células permitiendo su detección en el tejido mediante tomografías (Pagnanelli y Basso, 2010; Poudyal *et al.*, 2020).

En la actualidad, el Tl se emplea principalmente en equipos eléctricos, electrónicos, optoelectrónicos, semiconductores, superconductores de óxido de talio-bario-calcio-cobre (aleación TBCCO) en la comunicación inalámbrica, en detectores de radiación, en aleaciones con mercurio para termómetros de bajas temperaturas y en cables de fibra óptica, en lentes especiales con mayor índice de refracción y densidad. Otros usos son la fabricación de tintes y pigmentos, en fuegos artificiales (colorante con destellos

verdes), en fabricación de bisutería, en la impregnación de madera y cuero. Otras aplicaciones importantes son como fungicida y bactericida. También se le emplea para incrementar la resistencia a la corrosión en algunas aleaciones con Pb, Zn, Ag y antimonio (Sb), y en reacciones químicas para la oxidación de hidrocarburos, en procesos de polimerización y epoxidación (Léonard y Gerber, 1997; Galván-Arzarte y Santamaría, 1998; Kazantzis, 2000; Peter y Viraraghavan, 2005).

4.2.2 Contaminación y exposición del TI

El TI, aunque no es un elemento abundante, se encuentra en el ambiente de manera natural en bajas concentraciones. En áreas no contaminadas, la concentración de TI en el aire es alrededor de 1 ng/m^3 y en el agua menos de $1 \text{ } \mu\text{g/L}$. Los niveles de TI considerados “aceptables” en el ser humano son menores a 1 ppm en sangre y orina, cercanos o mayores de 10 ppm en tejidos, mientras que el consumo a través de la dieta en ambientes no contaminados es menor a $5 \text{ } \mu\text{g/día}$ (Mulkey y Oehme, 1993; Kazantzis, 2000). En los últimos años ha sido considerado uno de los contaminantes prioritarios de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, basado en las descargas del metal al agua que representan riesgo para la vida acuática y humana, usando como guía los estándares de calidad del agua (US EPA, 2009; US EPA, 2014).

La contaminación por TI se origina principalmente por la actividad industrial. En Estados Unidos de América, se calcula que se liberan 1000 toneladas anualmente, 50 % en forma de lodos y desechos sólidos, 35 % como vapores y polvo y 6 % unido a otros metales no ferrosos. Los principales emisores de TI son la industria cementera y las plantas que generan electricidad por medio de la combustión de lignito o carbón del periodo Jurásico, las cuales lo liberan al ambiente en forma de polvo; lo anterior se debe a que en altas temperaturas los compuestos de TI se volatilizan y no pueden ser retenidos por los precipitadores electrostáticos. Otras fuentes son la industria metalúrgica que funden minerales de Pb, Cu y Zn que contienen TI (Kazantzis, 2000; Peter y Viraraghavan, 2005). El TI también se libera de manera natural, el intemperismo y la erosión de minerales contribuyen de manera importante en el depósito en los suelos y cuerpos de agua (Zhang *et al.*, 1998). No se tiene registro de la cantidad de TI reciclado industrialmente (UNEP, 2011).

Con los años se ha hecho más frecuente la publicación de evaluaciones de contaminación por Tl y sus riesgos, principalmente en áreas próximas a industrias que lo procesan y zonas expuestas a los desechos de éstas. En el área minera contaminada de Lanmuchang en Guizhou, en China, los suelos contienen cantidades entre 40 y 124 mg/Kg de Tl, la cual se reduce al tomar muestras cada vez más alejadas de este punto, alcanzando niveles de 0.2 a 0.5 mg/Kg del área testigo (Xiao *et al.*, 2004). Además, en Guizhou se encontró que el Tl se acumula en altas concentraciones en la lechuga (500 mg/Kg de peso en seco) en comparación con otros vegetales y, se determinó que las personas que habitan en las proximidades a este punto consumen 50 veces más Tl al día (1.9 mg/persona) que de la zona testigo (Xiao *et al.*, 2004). Esto es un indicador de que el Tl está siendo transportado por la erosión de los suelos de la zona minera a zonas aledañas y México no es la excepción, ya que en muestras de suelo tomadas en varias regiones mineras se encontraron concentraciones de hasta 184.4 mg/Kg de Tl (Aguilar-Carrillo *et al.*, 2018). Al respecto, en otro estudio de suelo usando la prueba del Consorcio de Investigación sobre Solubilidad y Biodisponibilidad se detectó Tl bio-accesible en 27 muestras tomadas en dos localidades diferentes en México, una en San Luis Potosí y otra en Guerrero (Cruz-Hernández *et al.*, 2019).

En varios análisis realizados en la ciudad de Shaoguan de la provincia de Guangdong, ubicada en China, cerca de una fundidora de Pb-Zn que ha arrojado sus desechos a los afluentes próximos por más de 50 años, se encontró que la concentración de Tl en los sedimentos en el río cercano a la fundidora (de 3.15 a 14.94 mg/Kg), en la de los alrededores (de 4.17 a 13.09 mg/Kg) y en suelos de cultivo cercanos (de 0.89 a 1.8 mg/Kg) son más elevadas que la de la zonas testigo (0.5 mg/Kg), también se halló que la mayoría de vegetales cosechados en esta región contienen niveles superiores a 0.5 mg/Kg, que es el máximo permisible en alimentos según el lineamiento de referencia de Alemania (Liu *et al.*, 2017, 2018). En Yunfu, ubicada en la provincia de Guangdong, se analizaron vegetales tomados de tierras de cultivo próximos al río Gaofeng, que arrastra los desechos mineros de pirita con Tl y se encontraron niveles de 0.16 a 20.33 mg/Kg del metal (Liu *et al.*, 2020), lo que representa riesgo eminente y constante sobre la seguridad de los consumidores. Otro estudio realizado cerca de minas de tungsteno

(W) en China, mostró que los suelos están enriquecidos con metales pesados, incluido el TI, de 0.77 a 1.61 mg/Kg (Cheng *et al.*, 2013).

Los casos de intoxicación ocurren después de la ingestión de alimentos o agua contaminada con TI, por la inhalación de polvo en los lugares de trabajo, por absorción dérmica al manipular inadecuadamente residuos con TI durante su procesamiento industrial, por contacto o inhalación de pesticidas que lo contienen e incluso por envenenamiento accidental e intencional. Debido al riesgo que representa la presencia prolongada y la concentración del TI en el ambiente natural o de trabajo, es indispensable monitorear los niveles permisibles de TI (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013; Eghtesadi *et al.*, 2019).

En la mayoría de los países la venta de TI y sus compuestos está controlada y muchos de ellos consideran los lineamientos de la US EPA como referencia del límite permisible de TI en el agua potable que es de 2 µg/L (US EPA, 2018). En China el límite es de 0.1 µg/L (MHC, 2006). Por otro lado, la norma canadiense del Consejo Canadiense de Ministros del Medio Ambiente (CCME, por sus siglas en inglés) establece el límite de TI en agua potable de 0.8 µg/L y en suelos de 1 mg/Kg. El “valor umbral límite” (TLV) en el aire de espacios laborales de acuerdo con la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA por sus siglas en inglés) en Estados Unidos y en los lineamientos de Alemania es de 0.1 mg/m³, mientras el estándar en Rusia es de 0.01 mg/m³ (CCME, 1999 a,b; Peter y Viraraghavan, 2005; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). En México, la NOM-010-STPS-2014 establece el límite de exposición en promedio ponderado en tiempo (PPT) de 0.02 mg/m³ para el TI y sus compuestos (STPS, 2014). Sin embargo, a pesar del establecimiento de límites de exposición laboral, su prohibición como pesticida, su distribución restringida y su uso limitado en la medicina, a lo largo de las últimas décadas se tienen múltiples reportes de casos de intoxicación por TI (Moore *et al.*, 1993; Afshari *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Di Candia *et al.*, 2020; Liu y Liao, 2021).

4.2.3 Toxicocinética del talio

El TI puede entrar al organismo por inhalación, ingestión o al contacto por la piel. Experimentalmente se ha demostrado que independientemente de la vía de

administración empleada (intraperitoneal, subcutánea o intravenosa), el Tl se absorbe sin dificultad y casi en su totalidad. La mayoría de las sales de Tl se absorben rápidamente y pueden ser detectables en plasma sanguíneo, en los tejidos y órganos 1 h después de la exposición. Una vez en el organismo el Tl se distribuye mediante la circulación sistémica, acumulándose en cerebro, corazón, hígado, riñones, gónadas, músculo y hueso (Galván-Arzate y Ríos, 1994; US EPA, 2009; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Una vez en la absorbidas, las sales se ionizan, los cationes del metal se liberan y en particular, el Tl^{3+} puede ser transportado efectivamente por la Tf a los tejidos y órganos diana (Harris y Messori, 2002). El Tl^{1+} por su similitud con otros cationes metálicos es introducido al interior de las células por los mismos mecanismos del K^{1+} . Pequeñas diferencias pueden observarse dependiendo de la especie química; por ejemplo, el compuesto orgánico malonato de talio(I) ($C_3H_2O_4Tl_2$) se distribuye más rápido y en mayor concentración que el compuesto inorgánico Tl_2SO_4 . En criceto sirio la administración de 12.5 mg/Kg de malonato se detecta en los tejidos 1 h después de su administración, mientras que cuando se aplica en forma de Tl_2SO_4 se requiere de 12 h (Aoyama, 1989). El Tl además se acumula preferentemente en los riñones e hígado en seres humanos, como lo demuestran algunos estudios y casos clínicos en intoxicaciones crónicas y agudas (Downs *et al.*, 1960; Smith y Doherty, 1964; Hologgitas *et al.*, 1980; US EPA, 2009).

El Tl es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, la hematotesticular y la placenta (Hoffman, 2000). En ratas, este elemento es más permeable en los cerebros de organismos jóvenes y se reduce con el establecimiento de la barrera hematoencefálica y la maduración de la capacidad de amortiguación astrogial; es decir, mientras que en organismos recién nacidos el Tl se distribuye uniformemente en el cerebro, en los adultos se concentra en regiones específicas. Un comportamiento similar se observó en los testículos, ya que ratas macho adultas acumularon menos Tl que los machos jóvenes, lo cual se puede adjudicar al desarrollo de la barrera hematotesticular (Ríos *et al.*, 1989; Galván-Arzate y Ríos, 1994). La acumulación del Tl en el corazón es atribuible al intercambio del Tl^{1+} por el K^{1+} en el músculo cardíaco (Achenbach *et al.*, 1980).

La eliminación del TI es regulada por el intestino y los riñones, ocurre en un periodo de 8 a 30 días a través de la secreción biliar a las heces y por excreción renal en la orina (Achenbach *et al.*, 1980; Moore *et al.*, 1993). Durante la secreción de iones de TI a los intestinos es posible que ocurra reabsorción enteral y durante la filtración renal puede ocasionar reabsorción glomerular (Moore *et al.*, 1993). Otras vías de eliminación son la saliva, la leche materna, las lágrimas y el depósito del metal en cabello y uñas (Richelmi *et al.*, 1980; US EPA, 2009). Algunas diferencias se establecen por la forma química del compuesto, ya que la tasa de eliminación o la ruta, fecal o renal, pueden variar. Al respecto, en criceto dorado, la administración oral o intraperitoneal de 12 mg/Kg de $Tl_2C_3H_2O_4$ o Tl_2SO_4 muestra que el compuesto orgánico tiene mejor tasa de eliminación diaria a pesar de que comparten el mismo patrón de distribución y toxicidad; por ejemplo, la administración intraperitoneal u oral de $Tl_2C_3H_2O_4$ presenta tasas diarias de eliminación de 0.086–0.5 en heces y 0.081–0.175 en orina, en tanto que la administración vía intraperitoneal u oral de Tl_2SO_4 es de 0.054–0.084 y 0.063–0.073, respectivamente (unidades en Kex) (Aoyama, 1989).

4.2.4 Mecanismos de toxicidad y Genotoxicidad del Tl^{3+}

El Tl^{3+} y sus compuestos en células de mamífero han mostrado capacidad de reducir la viabilidad, la proliferación celular e inducir muerte celular por apoptosis (**Cuadro III**) (Ponsoda *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1998; Hanzel y Verstraeten, 2006, 2009; Pourahmad *et al.*, 2010; Eskandari *et al.*, 2011; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2019). La apoptosis mediada por Tl^{3+} ha sido estudiada y está relacionada a la reducción del potencial de membrana mitocondrial, la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT por sus siglas en inglés) y al estrés oxidante (Hanzel y Verstraeten, 2006, 2009; Pourahmad *et al.*, 2010; Eskandari *et al.*, 2011).

En un estudio para el análisis de la interacción del Tl^{3+} con membranas mitocondriales, empleando membranas construidas con un fosfolípido específico de este organelo (la cariofilina) y diferentes concentraciones de $Tl(NO_3)_3$ (1–75 μM) durante 2–60 min, se encontró la reducción del potencial de membrana, peroxidación lipídica, hidrolisis de la cariofilina y disminución en la interacción cariofilina-citocromo C; lo que provocó cambios en la función de la mitocondria y la liberación del citocromo C al citosol (Molina y Verstraeten, 2008). En el estudio de Eskandari *et al.* (2011), el tratamiento con 50 μM

de $Tl(NO_3)_3$ a hepatocitos de rata y el empleo de agentes de sellado de MPT mitocondrial como la ciclosporina A, la carnitina y generadores de ATP (L-glutamina, fructosa y xilitol), incrementan la supervivencia celular por inhibición de la apoptosis, lo cual es un indicador de que este proceso de muerte está directamente implicado en la apertura de los MPT, debido a que esto puede generar la difusión del H_2O_2 mitocondrial y el citocromo C al resto de la célula.

El proceso de apoptosis también está ligado a la activación de complejas rutas enzimáticas y mensajeros, los cuales han sido evaluados *in vitro* en cultivos tratados con compuestos de Tl^{3+} (Pourahmad *et al.*, 2010). Al evaluar células PC12 tratadas con 10 a 100 μM $Tl(NO_3)_3$ se observó que se produce la oligomerización de Bax y la actividad del factor inductor de la apoptosis y la endonucleasa G, la inducción de Fas, la liberación de citocromo C de las mitocondrias y la activación de caspasas (3, 8 y 9), todos ellos elementos desencadenantes la muerte programada, pero no se observó activación la ADNasa dependiente de caspasas. De este modo, la activación de la apoptosis por Tl^{3+} mostró un efecto mixto, desencadenando la vía intrínseca y extrínseca a la vez (Hanzel y Verstraeten, 2009). Por otro lado, Eskandari *et al.* (2011) observaron que el pretratamiento con antioxidantes bloquea la activación de las caspasas (**Cuadro III**), lo que sugiere que las ERO están involucradas en el proceso de inducción de la muerte celular.

Se ha reportado que el Tl^{3+} afecta los mecanismos de defensa antioxidante de la célula (Hanzel y Verstraeten, 2006; Pourahmad *et al.*, 2010; Eskandari *et al.*, 2011). La evaluación en diversos sistemas *in vitro* ha demostrado que este catión inhibe la reducción del GSSG por la glutatión reductasa (GR) y la actividad diaforasa de esta enzima, oxida el NADPH, inhibe la glutatión peroxidasa (GPx) (Villaverde *et al.*, 2004; Hanzel *et al.*, 2005) y oxida el GSH reduciendo su disponibilidad (Villaverde *et al.*, 2004; Hanzel *et al.*, 2005; Hanzel y Verstraeten, 2006; Pourahmad *et al.*, 2010). También se observó en células PC12 tratadas con 10 a 100 μM $Tl(NO_3)_3$ producción de H_2O_2 mitocondrial y disminución del potencial de membrana del organelo (Hanzel y Verstraeten, 2006). En conjunto, la capacidad del Tl^{3+} de abatir los mecanismos antioxidantes de la célula, incrementar la concentración de ERO intracelulares y generar peroxidación lipídica, puede estar asociado a daños en membrana celular y de

la mitocondria e iniciar la muerte celular por apoptosis (Pourahmad *et al.*, 2010; Repetto y del Peso, 2012).

En cuanto a la genotoxicidad del Tl^{3+} , aún hace falta investigar acerca de sus efectos en diferentes modelos de prueba, los datos obtenidos hasta el momento son escasos. En criceto chino los tratamientos con dos aplicaciones independientes de 5 o 10 mg/Kg de $TlCl_3$ no induce intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en las células de la médula ósea (Claussen *et al.*, 1981), mientras que en cultivos de linfocitos humanos tratados con 0.5–100 $\mu\text{g/mL}$ del mismo compuesto, se observó reducción del índice mitótico (11–93 % comparado con el testigo negativo), aumento de células con fenotipo de apoptosis y necrosis (10–25 %) e incremento de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE; del 1.7–3.0 vs. 0.25 % del testigo), así como aneuploidías y asociaciones de satélites en algunas concentraciones (**Cuadro III**) (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017, 2019). En la actualidad, no se tienen datos que evalúen el potencial carcinogénico del Tl y sus compuestos.

4.3 Ciclo celular

Para analizar los efectos que los metales tienen en la célula, diferentes aspectos del metabolismo deben tenerse en cuenta. La división de la célula es dirigida por una serie de procesos en los que el material genético y otros componentes celulares son duplicados y distribuidos en dos células; lo anterior para el caso de células somáticas. Este proceso es conocido como ciclo celular, el cual se divide en cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M (**Figura 1**). El ciclo celular es un proceso asociado con el crecimiento y mantenimiento de los tejidos (mitosis), así como para la producción de gametos en las gónadas (meiosis). Dependiendo de los requerimientos del organismo, algunas células están en constante división y otras permanecen en quiescencia (G_0). El ciclo celular es regulado estrictamente por complejos enzimáticos que permiten la correcta y ordenada transición de una fase a la siguiente, ya que las células realizan la división en el momento adecuado según las señales químicas de su entorno interno y externo (Shackelford *et al.*, 1999).

El ciclo celular puede ser perturbado o detenido al ser alterados procesos celulares y cuando los orgánulos o el material genético son dañados (O'Morgan, 2007). Se ha encontrado que los compuestos metálicos tienen efectos en los orgánulos y componentes celulares, tales como la membrana celular, la membrana mitocondrial, los lisosomas, el retículo endoplásmico y el núcleo, así como compitiendo por los centros activos de enzimas que controlan procesos metabólicos como la fosforilación, desintoxicación, la replicación y la reparación del ADN, por mencionar algunos (Wang y Shi, 2001).

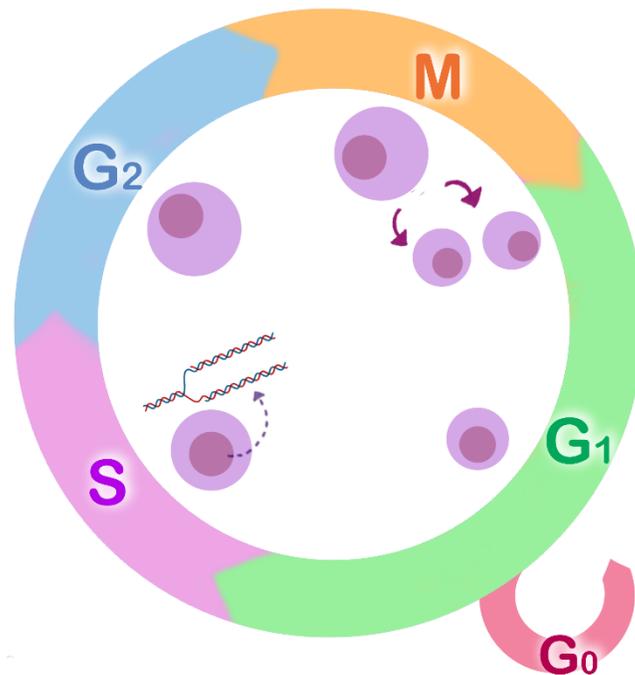


Figura 1. Ciclo celular dividido en sus diferentes fases: en la fase G₁ la célula crece y sintetiza componentes que podría requerir posteriormente, en la fase S se duplica el ADN, durante la fase G₂ la célula se prepara para dividirse, lo cual ocurre durante la fase M. Las células en fase G₀ no proliferan, pero realizan todas sus funciones.

Cuadro III. Efectos tóxicos y genotóxicos inducidos por el TI y algunos de sus compuestos en células de mamífero *in vitro* e *in vivo*.

Modelo	Compuesto	Concentración	Efecto	Referencia
Rata				
• GSH, GR y GPx purificados	Tl(OH) ₃	1–25 µM	Disminuye la cantidad de GSH disponible en ambos sistemas, por la oxidación. Además, inhibe la actividad de GPx y GR.	Hanzel <i>et al.</i> (2005)
• Células PC12	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	10–250 µM	Ambos compuestos incrementan la producción de H ₂ O ₂ mitocondrial, reducen la concentración de GSH e incrementan las ERO.	Hanzel y Verstraeten (2006)
• Células PC12	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	10–100 µM	Producen activación de las caspasas 3 y 9, y aumentan la liberación de <i>citocromo C</i> e inducen al AIF y la Endo G.	Hanzel y Verstraeten (2009)
• Hepatocitos	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	200 y 50 µM, respectivamente.	Generan ERO e interfieren con la cadena de transferencia de electrones en la mitocondria.	Pourahmad <i>et al.</i> (2010)
• Hepatocitos	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	200 y 50 µM, respectivamente.	Generan ERO y disminuyen el potencial de la membrana mitocondrial. Se activa la cascada de caspasas y se incrementa el número de células con fenotipo apoptótico.	Eskandari <i>et al.</i> (2011)
• Células PC12	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	5–100 µM	Tl ⁺ incrementa la expresión de marcadores de la progresión de G ₁ →S. Tl ³⁺ disminuye los de G ₁ →S y S.	Pino y Verstraeten (2015)
Ratón				
• Fibroblastos L929 y osteoblastos MC3T3-E1	TlNO ₃ y Tl(NO ₃) ₃	0.0001–10 mM	Producen citotoxicidad.	Yamamoto <i>et al.</i> (1998)
Criceto chino				

• Médula ósea	TiCl ₃	5 y 10 mg/Kg	Sin cambios en la frecuencia de ICH.	Claussen <i>et al.</i> (1981)
Humano				
• Enzimas purificadas: GSH, GR y GPx	TiNO ₃ y Ti(NO ₃) ₃	1–25 µM	Alteran los sistemas de defensa antioxidante: oxidación de GSH y NADPH por el Ti ³⁺ e inhibición de la actividad de GR y GPx por el Ti ⁺ y Ti ³⁺ .	Villaverde <i>et al.</i> (2004)
• Linfocitos	Ti ₂ SO ₄ y TiCl ₃	0.5–100 µg/mL	Aumentan la frecuencia de ICH, de células hiperploides y de asociaciones de satélites.	Rodríguez-Mercado <i>et al.</i> (2017)
• Linfocitos	TiCH ₃ COO, Ti ₂ SO ₄ y TiCl ₃	0.5–100 µg/mL	Citotoxicidad por incremento de células con fenotipo de apoptosis y necrosis. Disminuye la proliferación de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.	Rodríguez-Mercado <i>et al.</i> (2019)

AIF, factor inductor de la apoptosis; Endo G, endonucleasa G; ERO, especies reactivas de oxígeno; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; ICH, intercambio de cromátidas hermanas; HPRT, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; MN, micronúcleos; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; SCA, aberraciones cromosómicas estructurales.

4.3.1 Estimación por contenido de ADN

Una forma de evaluar el ciclo celular es por el contenido de ADN. Esto puede realizarse tiñendo el ADN nuclear con un colorante fluorescente estequiométrico, que se une a la molécula en proporción a su cantidad presente, como el ioduro de propidio (PI) o 7-actinomicina D (7-ADD) y después midiendo la intensidad de la fluorescencia de células individuales mediante citometría de flujo, analizando posteriormente los datos resultantes que permiten la determinación del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular (Rabinovitch, 1994, Darzynkiewicz *et al.*, 1999).

En células quiescentes, fase G_1 - G_0 , el contenido de ADN no varía, con un par homólogos para cada cromosoma, por lo cual es referido como diploide o $2c$, donde c simboliza el contenido haploide de ADN en la célula o en este caso, una copia de cada molécula de ADN de cada cromosoma. Cuando el contenido de ADN de las células es evaluado por citometría de flujo en esta fase aparece una única población (Copper, 2000).

Las células en proliferación se preparan para la replicación del ADN durante la fase G_1 , pero permanecen con dos copias de cada cromosoma ($2c$) hasta la entrada a la fase S, donde ocurre la replicación de nuevas moléculas de ADN, incrementando la cantidad hasta duplicarse de $2c$ a $4c$ y finalmente, en G_2 y M permanece como $4c$ hasta citocinesis. En la medición y análisis con citometría, los datos se representan en un histograma como número de células *versus* la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al contenido de ADN. La distribución del contenido de ADN se muestra en la **Figura 2** (Copper, 2000).

4.4 Daño al ADN y su reparación

Los iones metálicos pueden enlazarse directamente a algunos componentes celulares como el ADN y las proteínas nucleares a través de enlaces iónicos y coordinados, causando cambios de conformación estructural del ADN, así como producir daño directo o indirecto sobre estas moléculas (Wang y Shi, 2011).

La naturaleza del daño es diversa y puede afectar ciertas bases o regiones del ADN y provocar rompimientos de cadena. Por ejemplo, los sitios abásicos (AP, apurínicos o apirimídicos) son la pérdida de bases originados por reacciones de hidrólisis; este tipo

de reacciones también pueden darse por la desaminación de las bases nitrogenadas en el ADN, formando uracilo a partir de citosinas desaminadas o hipoxantina y xantina a partir de la desaminación de adenina y guanina, respectivamente. Si este tipo de daño no es detectado y corregido, puede originar errores durante la replicación del ADN por apareamiento incorrecto entre las bases (MM, por sus siglas en inglés) (Sancar *et al.*, 2004; Dexheimer, 2013).

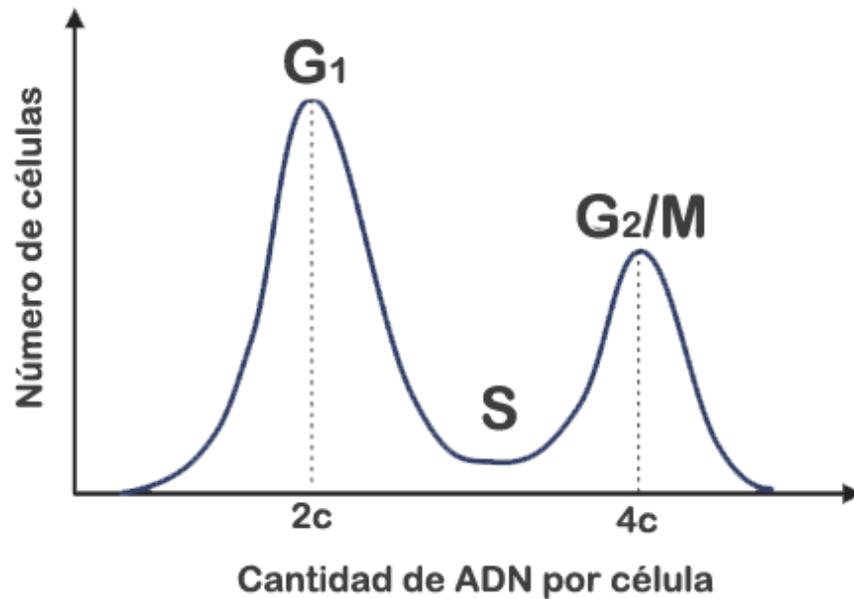


Figura 2. Distribución de la cantidad de ADN en una población de células en proliferación, donde se muestra dos picos correspondientes a células con contenidos de ADN de $2c$ y $4c$; estas células se encuentran en las fases G_1 y G_2/M del ciclo, respectivamente. Las células en fase S tienen contenidos de ADN entre $2c$ y $4c$ y se distribuyen entre estos dos picos.

Otros tipos de alteraciones en las bases son la adición de grupos alquilo (alquilaciones) y la oxidación, lo que puede generar bases potencialmente mutagénicas (Sancar *et al.*, 2004). La formación de aductos en el ADN, por ejemplo, consiste en el enlace de moléculas a las bases del ADN, los cuales afectan la topología y el metabolismo de toda la cadena, este tipo de daño puede generar secundariamente sitios AP. Los entrecruzamientos son lesiones que se originan por diferentes agentes químicos que forman enlaces covalentes entre las cadenas del ADN (constituyendo enlaces cruzados

ADN-ADN) o entre proteínas con el ADN (ADN-proteínas), las cuales desencadenan las mismas respuestas que otras lesiones debido a que impiden la replicación e incluso la transcripción. Los rompimientos de cadena sencilla o doble son lesiones provocadas por distintos agentes exógenos como la radiación ionizante o agentes químicos altamente reactivos, así como intracelularmente por la acción de nucleasas (Sancar *et al.*, 2004; Rupp, 2012; Dexheimer, 2013; Chatterjee y Walker, 2017).

Debido a la variedad de lesiones posibles, en las células eucariontes y en particular en mamíferos, también han evolucionado diversos mecanismos de reparación del material genético. Los mecanismos principales incluyen la reparación directa, la reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación de bases mal apareadas (MMR), la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), como se resume también en la **Figura 3**. Por ejemplo, la reparación directa reside en la acción de enzimas como la metilguanina ADN metiltransferasa que remueve el grupo metil-O⁶ de guaninas oxidadas por metilación (Sancar *et al.*, 2004); mientras que la BER detecta bases oxidadas, desaminadas, alquiladas o los sitios AP, donde las glicosilasas del ADN reconocen y cortan la base dañada, dejando un sitio AP que posteriormente es procesado, rellenado y ligado por endonucleasas, polimerasas y ligasas, en ese orden, utilizando en todo momento la cadena no dañada como molde (Chatterjee y Walker, 2017).

La NER, es otro mecanismo usado para remover lesiones más voluminosas como aductos o dímeros de timina, es activado por el reconocimiento de proteínas o por el bloqueo de la maquinaria de transcripción. Después de esto, el ADN tiene que ser abierto por un complejo enzimático, el factor de transcripción general IIIH (TFIIH) que contiene dos helicasas (que rompen los puentes de hidrogeno entre las bases complementarias) y otros complejos que reclutan endonucleasas (que cortan en dos secciones la cadena del ADN para generar un oligonucleótido de 24-32 bases que contiene la lesión) y polimerasas de ADN (que sintetizan ADN nuevo en la región dañada) (Houtgraaf *et al.*, 2006). En la MMR, luego de su reconocimiento, una endonucleasa genera cortes en el sitio del error y remueve las bases mal apareadas en una cadena por la acción de exonucleasas, posteriormente usa la otra cadena del ADN

como molde para rellenar con las bases correctas usando una ADN polimerasa y unir la con el otro extremo libre mediante una ADN ligasa (Rupp, 2012).

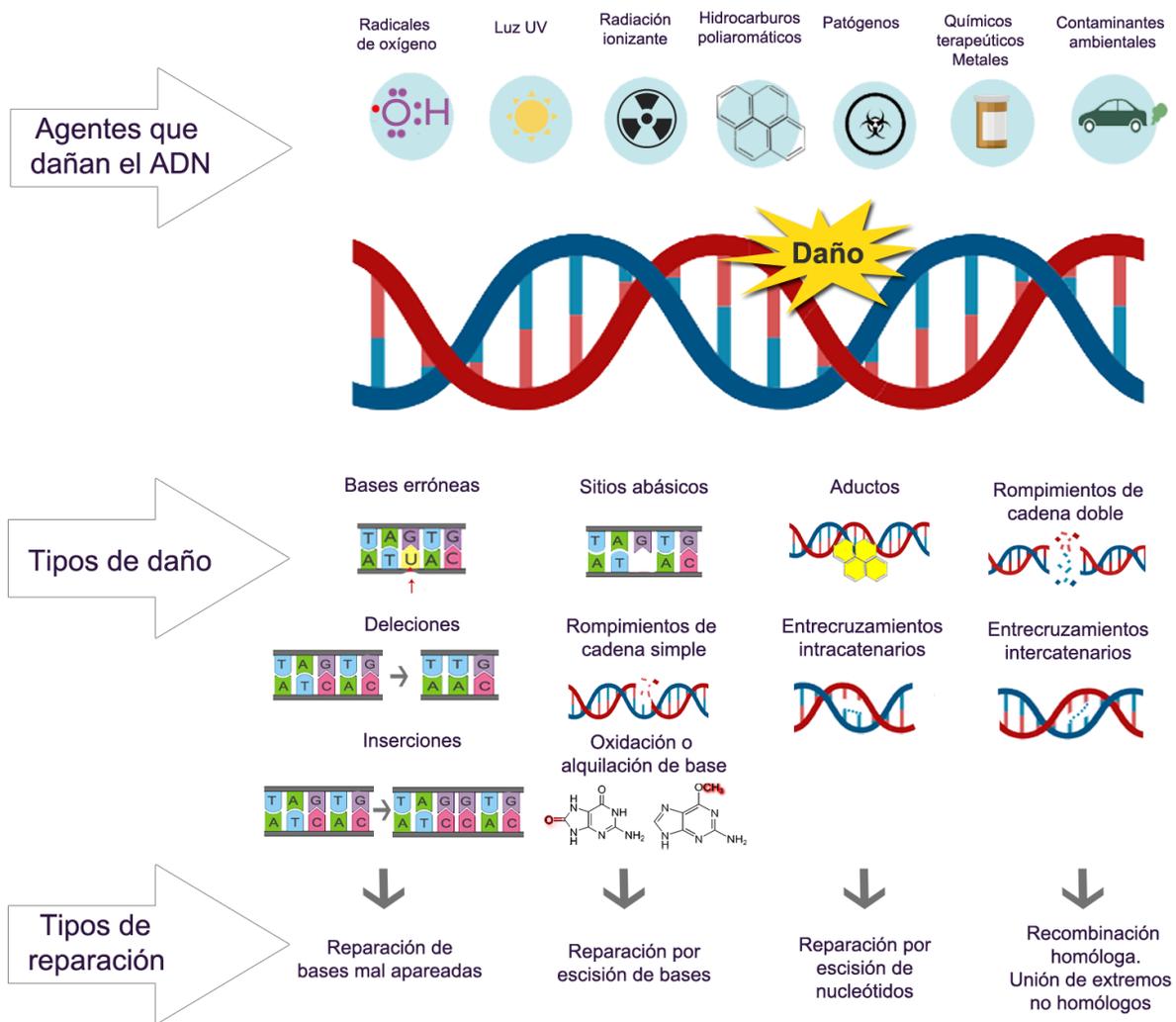


Figura 3. Principales mecanismos de reparación del ADN dependiendo el tipo de daño producido por diferentes agentes físicos y químicos. Estos mecanismos son: reparación de bases mal apareadas o MMR por sus siglas en inglés, reparación por escisión de bases o BER, reparación por escisión de nucleótidos o NER, recombinación homóloga o HR y unión de extremos no homólogos o NHEJ. (Creado con Biorender.com).

La HR y la NHEJ, reparan los rompimientos de cadena doble en el ADN que son de las lesiones más perjudiciales para la célula. La HR depende de un molde no dañado, la

cromátida hermana, para usar su información, es fiel y se restringe a las fases S y G₂ del ciclo celular, en tanto que el sistema NHEJ no depende de un molde, es más propensa a errores y puede actuar en todas las fases del ciclo celular (Ambekar *et al.*, 2017).

En la HR los extremos que rodean el rompimiento doble del ADN se procesan mediante cortes que generan extremos 3' salientes de una sola hebra, a las cuales se les remueve cualquier estructura secundaria que pueda impedir la unión de la recombinasa Rad51, la cual se encarga de buscar una secuencia homóloga en la cromátida hermana; luego Rad51 media la invasión de la cadena molde por la cadena que va a ser reparada, una ADN polimerasa se encarga de la síntesis del polinucleótido y la ADN ligasa I lleva a cabo la ligación y la formación de una estructura intermediaria de cuatro intersecciones conocida como la unión de Holliday, la cual es resuelta de tres formas distintas: la conocida disolución mediada por BLM-TopIII α , el corte asimétrico y el corte simétrico (Dexheimer, 2013).

El mecanismo NHEJ consiste básicamente en el reconocimiento de los extremos de rompimientos de cadena doble por el heterodímero Ku, el cual recluta la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PKcs) que se autofosforila y hace a los extremos más accesibles al resto de la maquinaria. Dependiendo del tipo de lesión y la complejidad, los extremos del ADN se modifican antes de unirse, por ejemplo, cortando o rellenando los extremos salientes de las cadenas rotas mediante la nucleasas y polimerasas. Finalmente, la ADN ligasa IV junto con algunos promotores conectan los extremos del ADN fracturado, terminando así con la reparación del ADN (Dexheimer, 2013; Ambekar *et al.*, 2017). Los enlaces cruzados como los ADN-ADN son reparados por mecanismos donde intervienen diferentes complejos enzimáticos en combinación con los otros sistemas de reparación como BER o NER (Sancar *et al.*, 2004).

4.4.1 Electroforesis unicelular

La electroforesis unicelular en gel (EUG) también conocida como ensayo cometa, es una técnica introducida y desarrollada a finales de los años 80 para detectar rompimientos de cadena en el ADN al nivel de células individuales. Puede ser empleada

en cualquier ensayo *in vivo* o *in vitro*, consiste en embeber las células en agarosa sobre portaobjetos, someterlas a lisis empleando sales y detergentes para remover las membranas, permitir que se diluyan el resto de los componentes solubles de la célula y retirar las histonas del ADN, dejando únicamente el material genético altamente condensado unido a una matriz nuclear como bucles superenrollados en una estructura conocida como nucleoides y luego someterlas a una electroforesis a un pH alto (> 13); dichas lesiones en el ADN provocarían la migración de fragmentos de cadena y bucles relajados hacia el ánodo, formando una imagen parecida a un cometa al evaluarse usando microscopia de fluorescencia (Collins *et al.*, 2008; Azqueta *et al.*, 2019).

Estos cometas son evaluados de manera manual o usando softwares especializados empleando múltiples parámetros medibles como la longitud o la intensidad de la cauda, o el llamado “momento de la cauda”. La intensidad de la cauda se calcula empleando la fluorescencia relativa que emiten los fragmentos de ADN migrados, mientras que el momento de la cauda se define como el producto de la longitud de la cauda y la fracción de ADN total en la cauda. Otro parámetro menos común es el “momento de la cauda de Olive”, que representa el producto del porcentaje de ADN total en la cauda y la distancia entre los centros de la masa de las regiones de la cabeza y la cauda (Mozaffarieh *et al.*, 2008). Los criterios cuya información aportada es considerada la más fiable y los más usados son la intensidad y el momento de la cauda (Sunjog *et al.* 2013).

El ensayo puede detectar rompimientos de cadena sencilla y doble, así como sitios álcali lábiles y reparación por escisión de bases incompleta que son expresados como rompimientos de cadena sencilla (Hartmann *et al.*, 2003). Entre las ventajas de esta técnica están el ser técnicamente simple, relativamente rápida y barata, además de sensible y entre sus principales inconvenientes están el número de muestras que pueden ser procesadas a la vez, limitadas por el tamaño de la cámara de electroforesis y la incapacidad de distinguir entre células muertas y severamente dañadas (Gharsalli, 2016).

Hay diferentes versiones de esta técnica que permiten delimitar la evaluación a tipos de daño específicos como las bases oxidadas producidas por estrés oxidante. Esta

versión consiste en añadir un paso posterior a la lisis de las células, incubando con endonucleasas bacterianas específicas como la ADN-formamidopirimidina glicosilasa (**Fpg**) de ADN que reacciona a la presencia de purinas oxidadas como la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua). La enzima Fpg por su actividad glicosilasa, reconoce y escinde el enlace glicosídico de las purinas oxidadas en la cadena de ADN, induciendo sitios abásicos que en las condiciones de alta alcalinidad ($\text{pH} > 13$) de la electroforesis se convierten en rompimientos de cadena sencilla. El incremento de ADN en la cauda del cometa (longitud del cometa), la intensidad o el momento de la cauda de los cometas después de incubar con esta enzima en comparación con aquellas incubadas en amortiguador indica la presencia de bases oxidadas. Este tipo de enzimas pueden ser aisladas directamente de bacterias o pueden ser compradas. Este tipo de ensayo se ha usado ampliamente en el biomonitorio humano y ecológico y ensayos de genotoxicidad de agentes químicos, contaminantes y fármacos (Collins *et al.*, 2008; Azqueta *et al.*, 2019).

4.5 Estrés oxidante

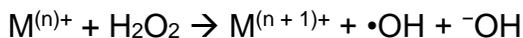
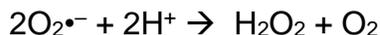
Hay evidencia de que la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) es una respuesta inducida frecuentemente por la acción de metales y juega un papel importante en oxidar biomoléculas como los componentes de los ácidos nucleicos, los lípidos de membrana o las proteínas (Galanis *et al.* 2009).

Las ERO y las ERN son productos naturales del metabolismo celular e incluyen moléculas reactivas derivadas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipobromoso (HOBr), ácido hipocloroso (HOCl), peróxidos orgánicos (ROOH), peroxomonocarbonato (HOOCO_2^-) y el ion hipoclorito (ClO^-), así como moléculas con radicales libres entre las que se encuentran el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^\bullet), hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), hidroperoxilo (HO_2^\bullet), carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), peroxilo (RO_2^\bullet), alcoxilo (RO^\bullet) y el radical dióxido de carbono ($\text{CO}_2^{\bullet-}$); además de otras derivadas del monóxido de nitrógeno (NO), como su radical (NO^\bullet), peroxinitrito (ONOO^-), peroxinitrato (O_2NOO^-) y ácido peroxinitroso (ONOOH), como las más representativas. Las ERO se producen en la mitocondria, el retículo endoplásmico, los peroxisomas, microsomas y complejos de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (complejos NOX), pero las mayores fuentes de ERO endógenas son el sistema de transporte de electrones de la

mitocondria, la vía metabólica del citocromo P450 y durante la respuesta inflamatoria (Abdal-Dayem *et al.*, 2017). Las principales fuentes de ERN por otra parte son las óxido nítrico sintasas (NOS), ya que se requiere $\text{NO}\cdot$ en el metabolismo de la L-arginina (Di Meo *et al.*, 2016).

La concentración intracelular de ERO y ERN está controlada normalmente por enzimas tales como el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) o por los antioxidantes como flavonoides, vitamina E y C, el glutatión, entre otros. No obstante, cuando la producción excesiva de estas supera las defensas antioxidantes, en las células se establece una condición de estrés (Galanis *et al.*, 2009). Dentro de los efectos que producen las ERO están atacar los grupos tiol de cisteínas de los péptidos y las proteínas, peroxidar lípidos, alterar por reacciones de óxido-reducción las bases nitrogenadas u otras estructuras como azúcares o los grupos fosfato de los nucleótidos del ADN, producir sitios AP o inducir rompimientos de cadena sencilla y doble en el ADN, por mencionar algunos (Stanczyk *et al.*, 2005). Además, las consecuencias de las ERO pueden ser daños severos en la membrana celular y mitocondrial, alteraciones en el transporte de Ca^{2+} , desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, activación de factores de transcripción, hasta desencadenamiento de muerte celular por apoptosis (Stohs y Bagchi, 1995). El estrés nitrosativo, por otra parte, está asociado a la alteración de lípidos de membrana, de proteínas y de nucleótidos en los ácidos nucleicos, como la formación de 8-nitro-guanina (8- $\text{NO}_2\text{-G}$), por nitración y rompimientos de cadena sencilla y doble en el ADN (Martínez y Andriantsitohaina, 1993).

Se ha reportado que los metales pueden potenciar la formación de especies reactivas de oxígeno, principalmente, por más de una ruta. Algunos iones metálicos como el cromo(III), cromo(VI), cobre(II), níquel(II), cobalto(II) y vanadio(IV) (Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y V^{4+} , respectivamente) han mostrado cierta similitud con el hierro produciendo reacciones similares a la de Fenton. En presencia de estos iones y los aniones superóxido se inicia una reacción en cadena que culmina en la producción del radical $\cdot\text{OH}$ (Stohs y Bagchi, 1995; Lloyd *et al.*, 1999; Jomova y Valko, 2011), como se muestra en las siguientes reacciones (donde M representa a los metales y n su estado de oxidación):



El ion superóxido, también participa en la producción del radical $\bullet OH$ por medio de la reacción de Haber-Weiss:



Además, el ion superóxido puede estar conectado a la producción de peroxinitrito al reaccionar con NO, y a su vez, también conducir a la producción del radical $\bullet OH$:



Otros metales, como el mercurio (Hg), el níquel (Ni), el plomo (Pb) y el cadmio (Cd), actúan mediante otros mecanismos como el agotamiento del glutatión y la afinidad de algunos iones metálicos por los grupos sulfhídrico (-SH) de las proteínas antioxidantes, lo que contribuye en la acumulación de ERO en las células (Stohs y Bagchi, 1995; Balali-Mood *et al.*, 2021).

Hasta ahora, aunque se sabe que el TI puede inducir la formación de ERO, se desconoce si esto ocurre mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, a través de la transición entre sus dos estados de oxidación, +1 y +3. No hay información sobre su relación con la formación de ERN.

4.5.1 Dihidrorodamina 123

La importancia de las ERO y los procesos patológicos asociados a ellas requieren mecanismos apropiados para estudiarles, detectar su producción excesiva, el desbalance de las condiciones fisiológicas normales y sus efectos en las células. Algunos de los métodos implican la detección específica de la producción de estas ERO usando sondas fluorescentes.

El compuesto dihidrorodamina 123 (DHR 123) es un compuesto empleado en la detección de ERO como el peróxido de hidrógeno y ERN como el peroxinitrito. Una vez dentro de la célula, a la cual puede difundir pasivamente, el DHR 123 es oxidado a rodamina 123 (Rh 123) (**Figura 4**), un compuesto catiónico verde fluorescente que puede acumularse y ser retenido en las mitocondrias. La oxidación no es llevada a cabo

directamente por las ERO o las ERN, pues se requiere la presencia de peroxidasas mitocondriales y en el caso del H_2O_2 , de su interacción con citocromo c y Fe^{3+} . La cantidad de rodamina puede ser posteriormente evaluada mediante fluorimetría, citometría de flujo, microscopia de fluorescencia o por espectroscopia (Royall *et al.*, 1993; Kooy *et al.*, 1994; Djiadeu *et al.*, 2017).

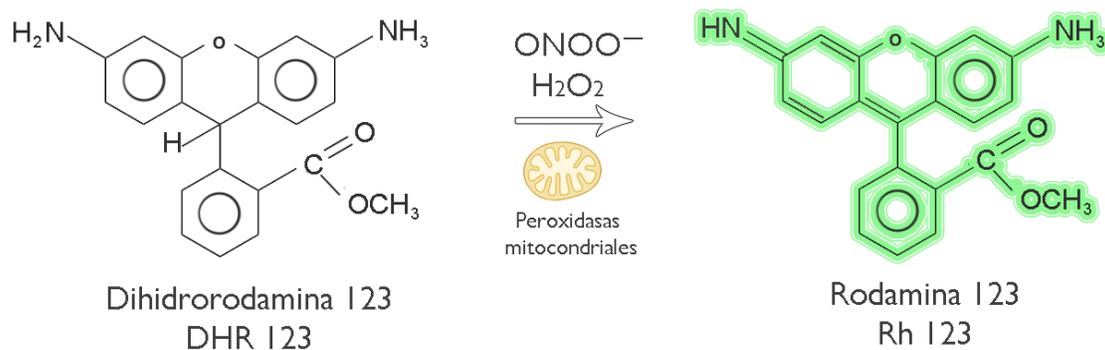


Figura 4. Estructura de la dihidrorodamina 123 y la rodamina 123. En presencia del ONOO^- o H_2O_2 y peroxidasas mitocondriales ocurre la pérdida dos electrones del DHR 123, formándose Rh 123, la molécula oxidada y fluorescente.

V. JUSTIFICACIÓN

El TI es considerado un contaminante prioritario debido al riesgo que representa para el ser humano por su elevada toxicidad. Se presenta en dos estados de oxidación, I y III. Se sabe que el Tl^{1+} es capaz de mimetizar al ion K^{1+} y altera el metabolismo celular dependiente de este catión esencial, también interactúa con los tioles de las proteínas, interviene en la fosforilación mitocondrial y produce estrés oxidante al abatir las defensas antioxidantes de la célula.

Sin embargo, diversos aspectos del mecanismo de acción del Tl^{3+} , aún no han sido investigados, por lo cual se considera importante estudiar y ampliar el conocimiento que se tiene con respecto a los compuestos químicos de este ion, entre ellos su repercusión en las fases del ciclo celular y su capacidad para generar estrés oxidante en la célula.

VI. HIPÓTESIS

El Tl^{3+} ($TlCl_3$) induce cambios en las fases del ciclo celular derivados del daño al ADN por estrés oxidante.

VII. OBJETIVO

7.1 Objetivo general

- Dilucidar el mecanismo mediante el cual el $TlCl_3$ produce genotoxicidad.

7.2 Objetivos particulares

- Evaluar la progresión de las fases del ciclo celular de los linfocitos humanos estimulados y tratados con distintas concentraciones de $TlCl_3$ (0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 $\mu\text{g/mL}$) durante 24, 48 y 72 h.
- Analizar el daño al ADN de los linfocitos humanos en G_0 tratados durante 1 y 3 h con $TlCl_3$ usando la electroforesis unicelular en gel en combinación con la enzima de restricción Fpg que identifica bases oxidadas.
- Determinar el estado oxidante de los linfocitos en G_0 tratados con $TlCl_3$ durante 24 h, empleando la evaluación de la oxidación del compuesto dihidrorodamina 123 (a rodamina 123) dentro de las células.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Reactivos

Los compuestos metálicos fueron obtenidos de la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Se usa cloruro de talio(III) ($\text{TlCl}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; CAS No. 13453-33-3 y pureza de 98 %). La mayoría de los reactivos que se usaron fueron de la misma compañía, al menos que en la metodología se indique otra marca.

8.2 Separación de linfocitos y viabilidad

Se obtuvieron 10-16 mL de sangre periférica de tres donadores varones, no fumadores y sin historia de toxicomanías, medicadas o de enfermedades recientes. Se aislaron los linfocitos por gradiente de densidad con Histopaque®-1077 y se hizo el conteo celular en la cámara de Neubauer.

Obtenidos los linfocitos, se determinó la viabilidad mezclando 10 μL de la muestra de células con 3 μL de una mezcla 1:1 de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE) en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después al microscopio de fluorescencia (filtro 510–560 nm) se obtuvo el porcentaje de células viables y no viables. Las células viables se tiñen de verde debido a que la NA es permeable a la membrana y se intercala con los ácidos nucleicos como el ADN, generando una señal fluorescente verde, mientras que las células no viables son aquellas que se tiñen de rojo debido a que el BE (un compuesto impermeable a la membrana) puede ingresar a las células cuando la membrana ha sufrido daño y se intercala con el ADN.

8.3 Cultivos y tratamientos

Se hicieron los cultivos sembrando la densidad requerida de células en el medio apropiado y se mantuvieron a 37 °C durante los tiempos de exposición programados para cada metodología. Además, se hicieron los cultivos por duplicado o triplicado por cada donador dependiendo de la técnica, se contó con cultivos sin tratamiento (testigo negativo) y cultivos tratados con un agente que produce el efecto a evaluar (testigo positivo).

Los cultivos se trataron con las diferentes concentraciones de TlCl_3 , 0.1, 0.5, 1, 5, 10 o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de acuerdo con estudios previos (Rodríguez-Mercado *et al.* 2017, 2019).

8.4 Evaluación del ciclo celular

Para conocer los efectos sobre la progresión del ciclo celular, se hicieron los cultivos sembrando 5×10^5 células en 5 mL de medio PB-Max Karyotyping (Gibco, Grand Island, NY, USA), el cual contiene fitohematoglutina para estimular la proliferación. Los tratamientos se dieron 24 h después de iniciados los cultivos y se dejaron durante 24, 48 y 72 h con las diferentes concentraciones de TiCl_3 . Transcurrido cada tiempo de exposición, las células se fijaron con etanol al 70 %, se permeabilizaron con PBS más Tritón X-100 al 0.1 %, para después realizar la tinción del ADN con yoduro de propidio (IP, 2 mg/mL). La detección del ADN se analizó en el citómetro de flujo BD FACSAria™ II (Becton Dickinson and Company, San José, CA, EUA) registrando la adquisición de 30 mil eventos por cultivo. Se empleó el contenido de ADN para establecer la proporción de células en G_1 , S y G_2/M con los programas WinMDI 2.9 de J.Trotter y Cylchred de la Universidad de Cardiff.

Como testigo positivo se empleó afidilcolina (5 $\mu\text{g/mL}$) ($\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$, CAS No. 38966-21-1), un agente que inhibe la ADN polimerasa α e induce arresto del ciclo celular en la entrada a la fase S (Toyomasu y Sassa, 2010).

Al terminar el tratamiento con el agente químico se tomó una porción de las células (10 μL) y se determinó la viabilidad celular por el método de NA-BE.

8.5 Evaluación del daño oxidante al ADN con Fpg

Para determinar el daño al ADN por oxidación de bases, se empleó la metodología de EUG con la enzima formamidopirimidina ADN-glicosidasa (Fpg, CAS 78783-53-6, pureza ≥ 90 %) que detecta purinas oxidadas.

Células sin proliferar (en fase G_0) fueron cultivadas en medio RMPI-1640 (Gibco, NY, USA) que contenía 0, 0.5, 1 o 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 . Las células fueron expuestas durante 1 o 3 h. Se obtuvieron las células por centrifugación, se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión (0.5 %), se hicieron preparaciones en portaobjetos y estas se sumergieron en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , y 10 mM Tris suplementado con 1 % Tritón X-100 a pH 10) por 24 h. Posteriormente se lavaron 3 veces durante cinco minutos en buffer de reacción, el cual contiene HEPES 40 mM, KCl 0.1 M, 0.5 EDTA, 0.2 mg/mL BSA ajustado a pH 8, se incubaron 20 min con las enzimas

Fpg (1 μ L diluido en 16 mL de buffer de reacción; concentración determinada en experimentos preliminares) preparadas de acuerdo con la recomendaciones del fabricante y se realizó la electroforesis a 300 mA y 25 V empleando un amortiguador de corrimiento (300 mM NaOH y 1 mM Na₂EDTA a pH > 13). Después las preparaciones se neutralizaron, se deshidrataron con etanol absoluto y una vez secas se tiñeron con BE (25 μ g/mL) y en microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Carl Zeiss con filtro de excitación de 515–560 nm y filtro de barrera de 590 nm) se midió el daño al ADN empleando una escala ocular o el software “comet assay IV” para obtener parámetros como longitud, intensidad de la cauda y el “momento de la cauda” (Forchhammer *et al.* 2008) en Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático, UNAM.

Para los testigos positivos se empleó H₂O₂ en concentración de 30 μ M durante 10 min en hielo, para luego hacer un lavado y permitir una hora de reparación en medio de cultivo y proceder a la preparación de las laminillas.

En todos los casos al terminar el tratamiento con el agente químico se determinó la viabilidad celular por el método de NA-BE.

8.6 Evaluación del estrés oxidante con DHR 123

Para determinar el estado redox de las células, se evaluaron las ERO y ERN por la oxidación de la dihidrorodamina 123 a rodamina 123 (C₂₁H₁₈N₂O₃, CAS No. 109244-58-8). Células sin proliferar (en fase G₀) fueron cultivadas en medio RMPI-1640 (Gibco, NY, USA) que contenía las concentraciones de los compuestos metálicos. Las células fueron expuestas durante 3 h con 0.5, 1 y 5 μ g/mL de TiCl₃. Posteriormente al tratamiento, las células se centrifugaron, se les hizo un lavado con PBS, se les añadieron 100 μ L de dihidrorodamina 123 (5 μ M) y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 30 min, se realizó un lavado con PBS y se evaluaron en el citómetro de flujo BD FACSAria™ II (Becton Dickinson and Company, San José, CA, EUA), usando el filtro Alexa Fluor 488 registrando la adquisición de 30 mil eventos por cultivo.

Para el testigo positivo, las células se trataron 15 min con 100 μ M de H₂O₂, el cual es capaz de generar estrés oxidante en las células debido a la producción de ERO.

En todos los casos al terminar el tratamiento con el agente químico se determinó la viabilidad celular por el método de NA-BE.

8.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticas para los datos de ciclo celular, daño al ADN por bases oxidadas se determinaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Dunnett, dependiendo de la homogeneidad de las varianzas. Los datos de viabilidad celular y de estrés oxidante se analizaron con la prueba de j^2 . Se consideró $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

IX. RESULTADOS

9.4 Análisis del contenido de ADN

Al mismo tiempo que se determinaron las fases del ciclo celular se evaluó la viabilidad de las células. En la **Figura 5** se muestran los resultados de la viabilidad empleando la tinción dual con NA-BE en linfocitos tratados por 24, 48 y 72 h con 0, 0.1, 0.5 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 . La viabilidad del grupo testigo en los diferentes tiempos de exposición fue $> 92\%$ y no se observaron cambios cuando los linfocitos fueron tratados por 24 h con las concentraciones del TlCl_3 ; sin embargo, a las 48 h hay tendencia a reducir la viabilidad con diferencia estadísticas en la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 (82.3 ± 3.1 vs. $93.2 \pm 3.5\%$ del grupo testigo) y a las 72 h en la concentración de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 (69.0 ± 2.1 y $65.5 \pm 2.9\%$ vs. $92.5 \pm 3.8\%$ del grupo testigo).

La estimación de las células en cada fase del ciclo celular se realizó con base en el contenido de ADN nuclear y los resultados de los linfocitos tratados con el TlCl_3 se muestran en la **Figura 6**, donde se observó tendencia a incrementar el porcentaje de células en G_1 con respecto a la concentración en todos los tiempos de exposición, además como consecuencia disminuyó el porcentaje de células en la fase S y G_2/M . A las 24 h en la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 el aumento en la fase de G_1 fue significativo, mientras que este aumento se dio a partir de la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h y a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 las 72 h de exposición. En la **Figura 7**, se muestran los histogramas representativos de la evaluación del contenido de ADN.

Con respecto al testigo positivo de afidicolina, la viabilidad se redujo ($p < 0.01$) a partir de las 48 h (80.1 ± 2.2 vs. $93.2 \pm 3.5\%$ del grupo testigo) y 72 h (78.0 ± 2.2 vs. $92.5 \pm 3.8\%$ del grupo testigo). Además, la afidicolina, un compuesto que impide la progresión del ciclo a la fase de síntesis por la inhibición de la polimerasa α , incrementó significativamente el porcentaje de células en G_1 con 89.2 ± 6.1 vs. $71.1 \pm 3.1\%$ del testigo negativo a las 24 h; 92.1 ± 3.7 vs. $71.3 \pm 4.4\%$ a las 48 h y 95.2 ± 1.8 vs. $73.2 \pm 3.5\%$ a las 72 h, además de reducir el porcentaje de células en la fase de S y G_2/M . Estos resultados no se muestran en las figuras.

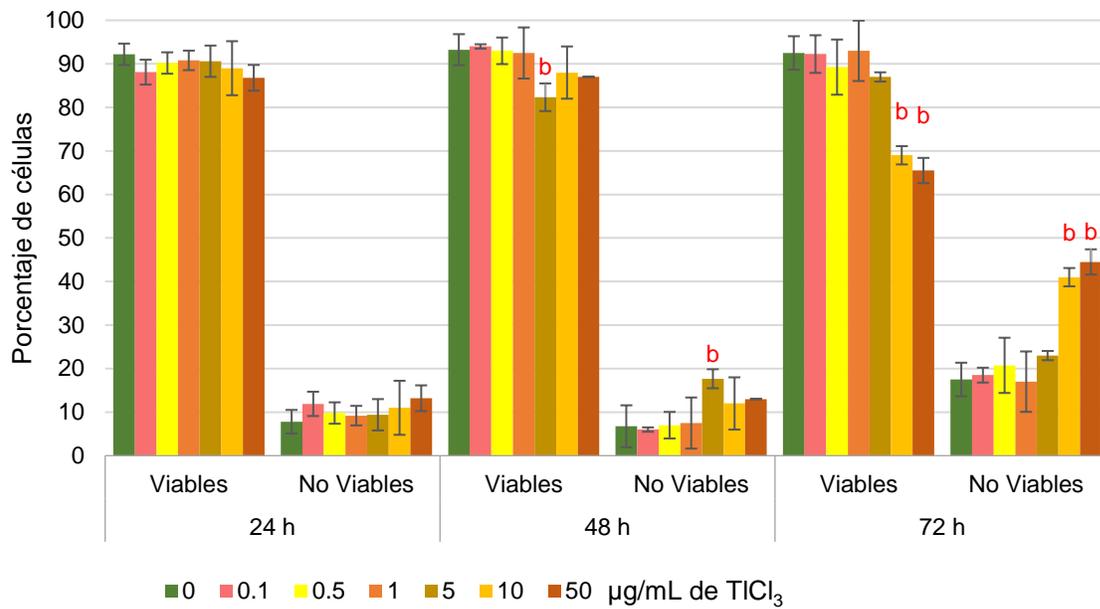


Figura 5. Viabilidad de los linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0 (testigo) 0.1, 0.5 1, 5, 10 y 50 µg/mL de TICl₃ por 24, 48 y 72 h de los experimentos de ciclo celular. Las células fueron teñidas con NA-BE y se agruparon como viables las células verdes que intercalaron su ADN con la NA y como no viables las células de coloración rojiza que incorporaron BE o con cuerpos apoptóticos evidentes. Se hicieron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado (n = 6). Cada barra representa la media ± EE. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ comparado con el testigo (prueba de j^2).

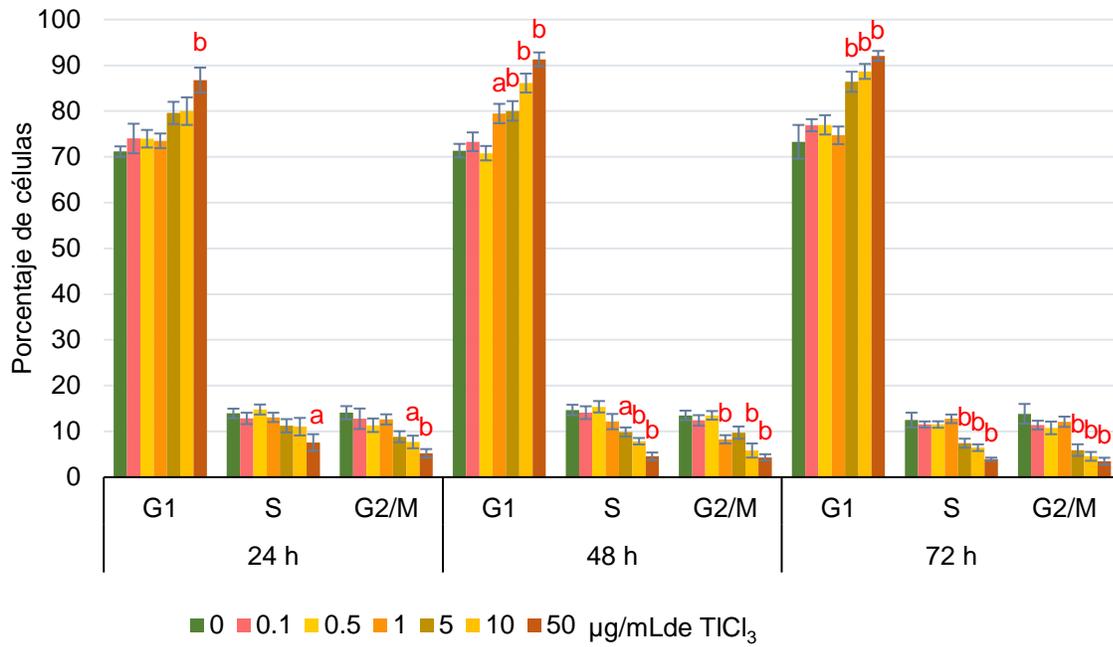


Figura 6. Estimación de las fases del ciclo celular (G₁, S y G₂/M) de linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0 (testigo) 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 µg/mL de TiCl₃ durante 24, 48 y 72 h. Las células fueron teñidas con IP y el porcentaje de células en cada fase se determinó por el contenido de ADN nuclear por citometría de flujo. Se hicieron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado (n = 9), donde se adquirieron 20 000 eventos por experimento. Cada barra representa la media ± EE. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ comparado con el testigo (prueba de ANOVA-Dunnett).

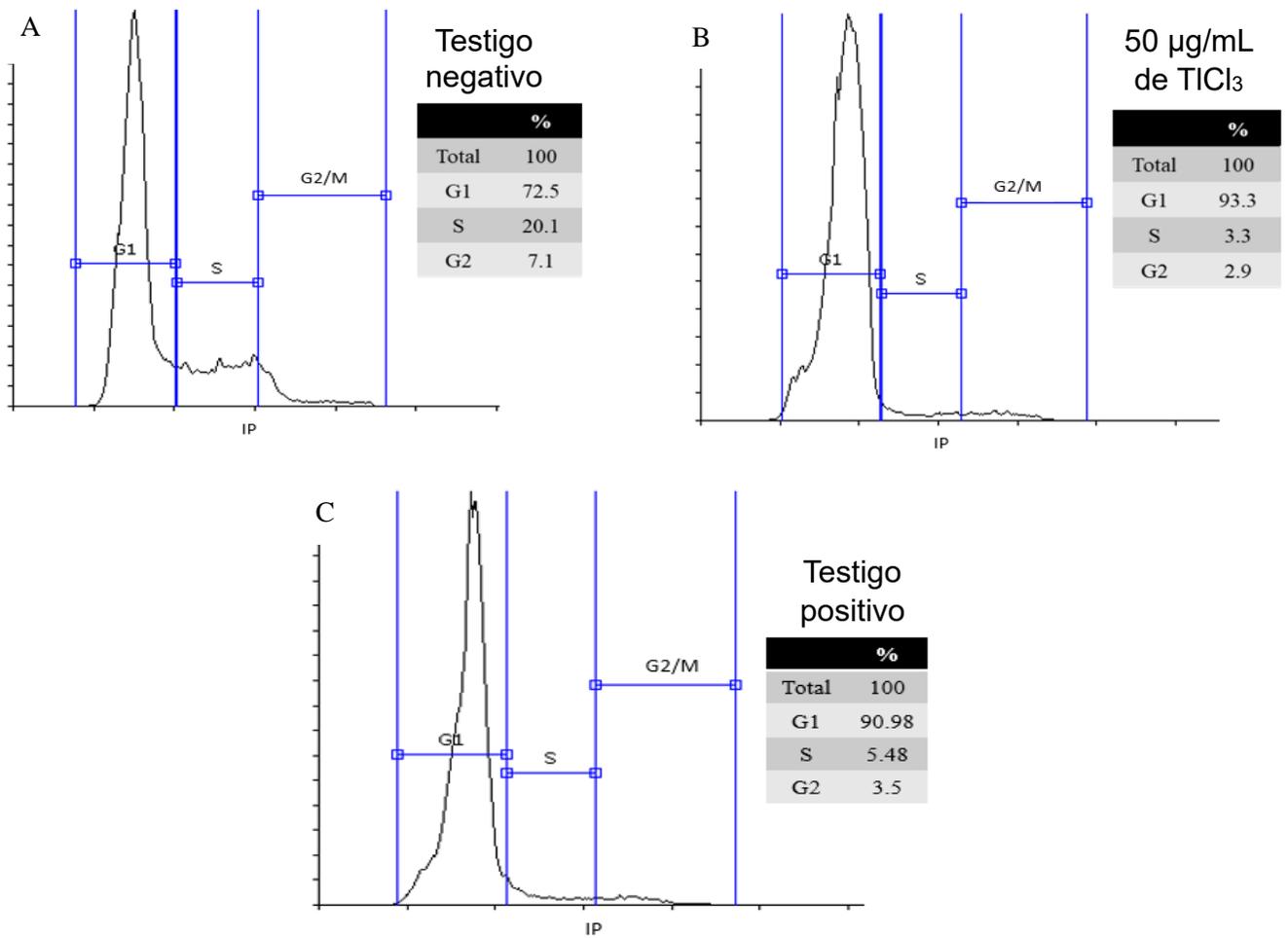


Figura 7. Histogramas representativos de la evaluación del contenido de ADN con tinción de IP. Se estimó el porcentaje de linfocitos humanos en G₁, S y G₂/M en cultivos de 48 h sin tratamiento (A, testigo negativo) y tratados con 50 µg/mL de TICl₃ (B) o 5 µg/mL de afidicolina (C, testigo positivo). Las determinaciones se hicieron por citometría de flujo y el análisis con el programa Flowing Software.

9.5 Análisis del daño oxidante en el ADN

En la **Figura 8**, se muestran los resultados de la viabilidad de las células de los experimentos del ensayo cometa modificado para detectar daño por bases oxidadas. Donde después de la exposición durante 1 o 3 h a 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 , la viabilidad se mantuvo por arriba del 90 %, sin cambios con respecto al testigo negativo.

El ensayo cometa se empleó para investigar el potencial del TiCl_3 de inducir daño al ADN por bases oxidadas. En la **Figura 9**, se muestran los resultados del daño al ADN usando la enzima Fpg y el programa “Comet assay IV”; donde la longitud, la proporción de ADN y el momento de la cauda se incrementaron con respecto a los núcleos sin enzima (SFpg). Para el ensayo cometa sin enzima y con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 a las 3 h aumentó ($p < 0.05$) la longitud del cometa (72.3 ± 2.2 vs. 63.4 ± 2.0 nm del testigo negativo) y en 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 a las 3 h mostró incremento significativo en los tres parámetros medidos: en longitud de la cauda 74.2 ± 2.0 vs. 63.4 ± 2.0 nm del testigo negativo, en intensidad de la cauda 23.9 ± 1.0 vs. 18.0 ± 0.8 % del testigo y en el momento de la cauda 7.1 ± 0.4 vs. 4.7 ± 0.3 del testigo negativo. En el ensayo con Fpg la longitud de la cauda y el momento de la cauda fueron significativos en todos los tratamientos con TI comparado con los testigos negativos; sin embargo, la intensidad de la cauda solo presentó diferencias ($p < 0.01$) en 1 $\mu\text{g/mL}$ después de 1 h de tratamiento y en las tres concentraciones usadas de TI a las 3 h.

La viabilidad celular del testigo positivo tratado durante 5 min con 25 μM de H_2O_2 fue de 71.1 ± 1.1 vs. 92.0 ± 1.6 % del testigo negativo. En la evaluación del testigo positivo para el ensayo cometa, la longitud de la cauda SFpg fue de 68.17 ± 4.3 nm, mientras que en la prueba con la enzima Fpg la longitud se incrementó significativamente a 106.1 ± 3.0 nm ($p < 0.01$) en comparación al testigo negativo de 63 ± 2 nm (estos datos no se muestran en las figuras).

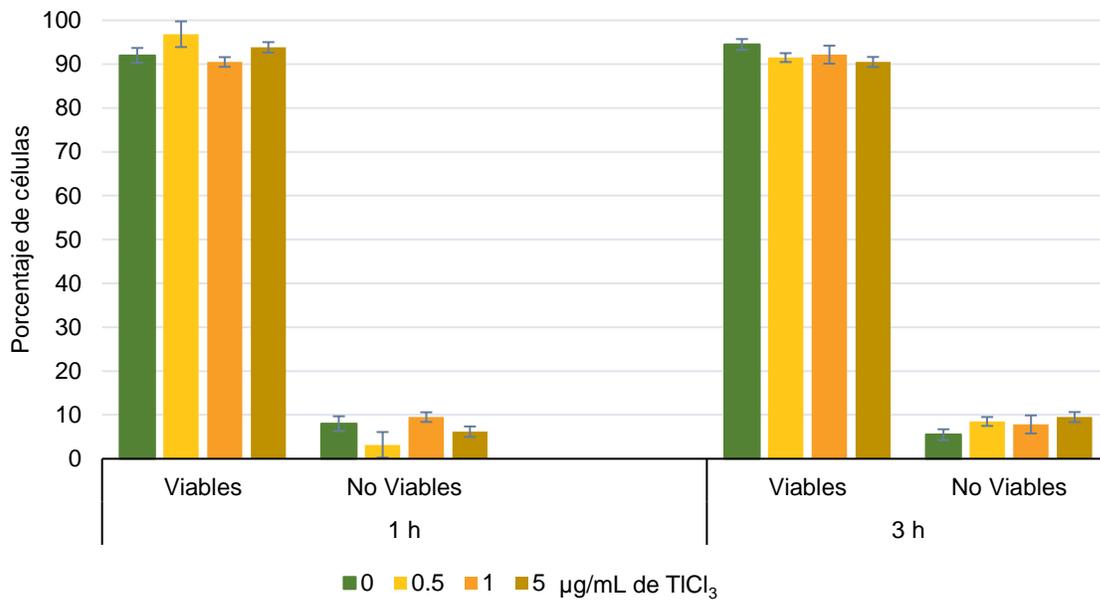
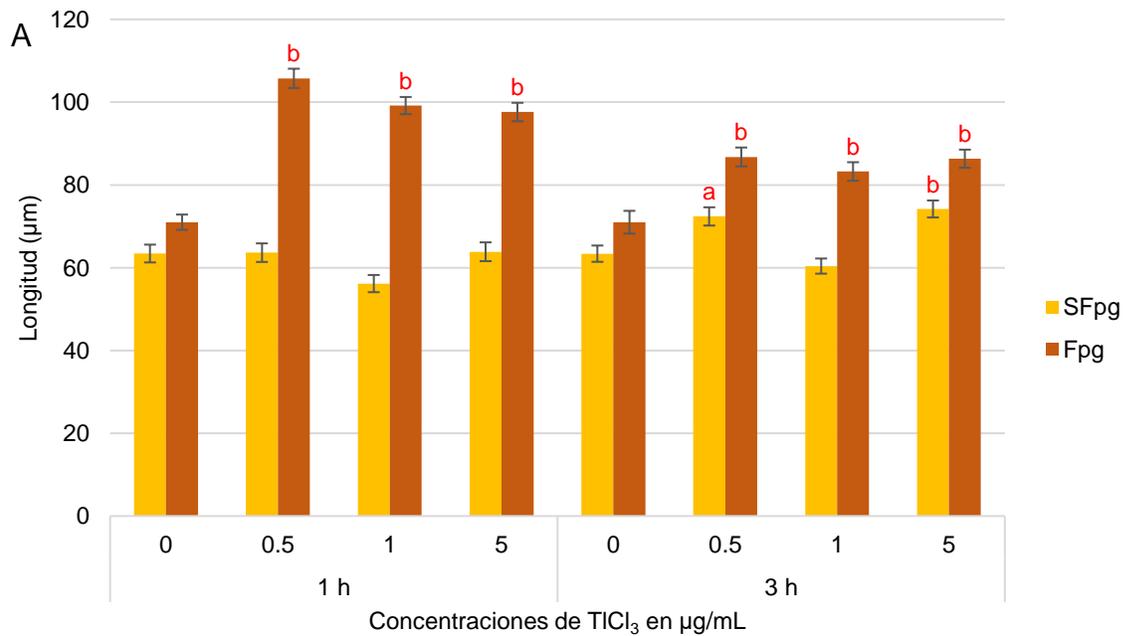


Figura 8. Viabilidad celular de los linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0 (testigo) 0.5, 1 y 5 µg/mL de $TiCl_3$ por 1 y 3 h, evaluada con NA-BE de los experimentos de daño oxidante al ADN. Cada barra representa los datos con la media \pm EE de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado ($n = 6$; 100 células analizadas por experimento). ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ comparado con el testigo (prueba de j^2).



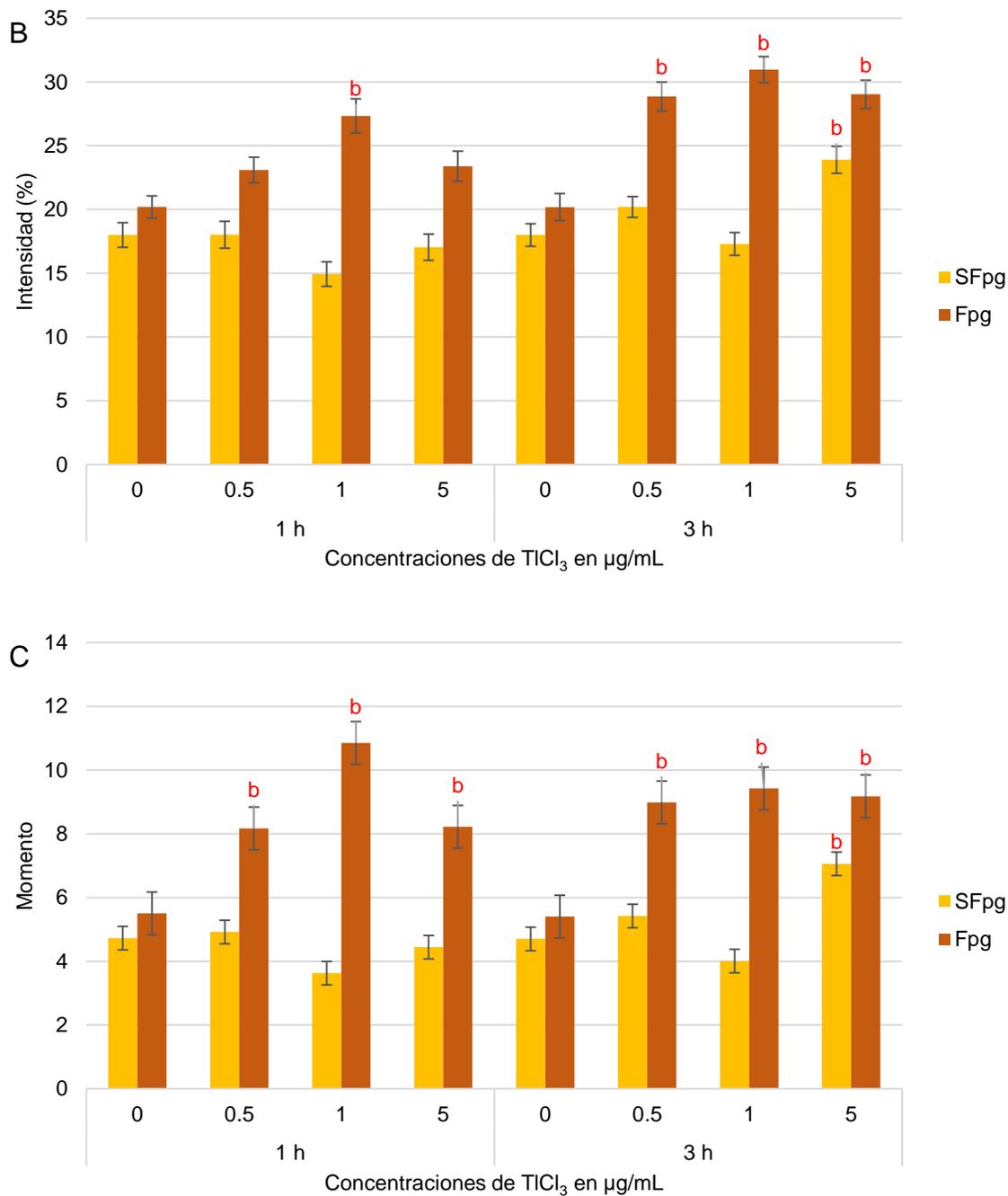


Figura 9. Estimación del daño oxidante al ADN evaluado mediante el uso de la enzima Fpg y ensayo cometa en linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0 (testigo), 0.5, 1 y 5 µg/mL de TICl₃ por 1 y 3 h. Resultados de diferentes parámetros del ensayo cometa sin enzima (SFpg) y con Fpg: la longitud de la cauda de los cometas (A), la intensidad cauda (B) y el momento de la cauda (C). Cada barra representa los datos con la media ± EE de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado (n = 6; 50 nucleoides analizados por experimento). ^a p < 0.05, ^b p < 0.01 comparado con el testigo (prueba de ANOVA-Dunnet).

9.6 Análisis de la producción de ERO y ERN en la célula

Los resultados de la viabilidad celular evaluada de forma simultánea a la prueba con DHR 123 en linfocitos expuestos 3 h con 0 (testigo) 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 , se muestran en la **Figura 10**. La viabilidad del testigo y de los cultivos expuestos al TiCl_3 se mantuvieron por encima del 90 % en todas las concentraciones.

Se evaluó la capacidad del TiCl_3 de producir ERO y ERN intracelulares, empleando DHR 123 que puede ser oxidada por especies como H_2O_2 a Rh 123, la cual puede ser analizada por su fluorescencia empleando citometría. El porcentaje de células que dieron positivo a Rh 123 aumentó en todos los tratamientos con TiCl_3 , con diferencia estadística en la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 , con 24.8 ± 4.1 vs 8.2 ± 1.5 % del testigo negativo (**Figura 11**).

Esta prueba contó con un testigo positivo tratado con 100 μM de H_2O_2 durante 10 min, en el cual se redujo la viabilidad a un 74.5 ± 2.1 % ($p < 0.01$) en comparación al 91 ± 3.2 % del testigo negativo. En la prueba con DHR 123, el tratamiento con H_2O_2 se elevó significativamente el porcentaje de células positivas a Rh 123 a 34.6 ± 3.6 vs. 8.2 ± 1.5 % del testigo negativo. Los histogramas representativos de la evaluación de la oxidación de DHR 123 a Rh 123 se muestran en la **Figura 12**.

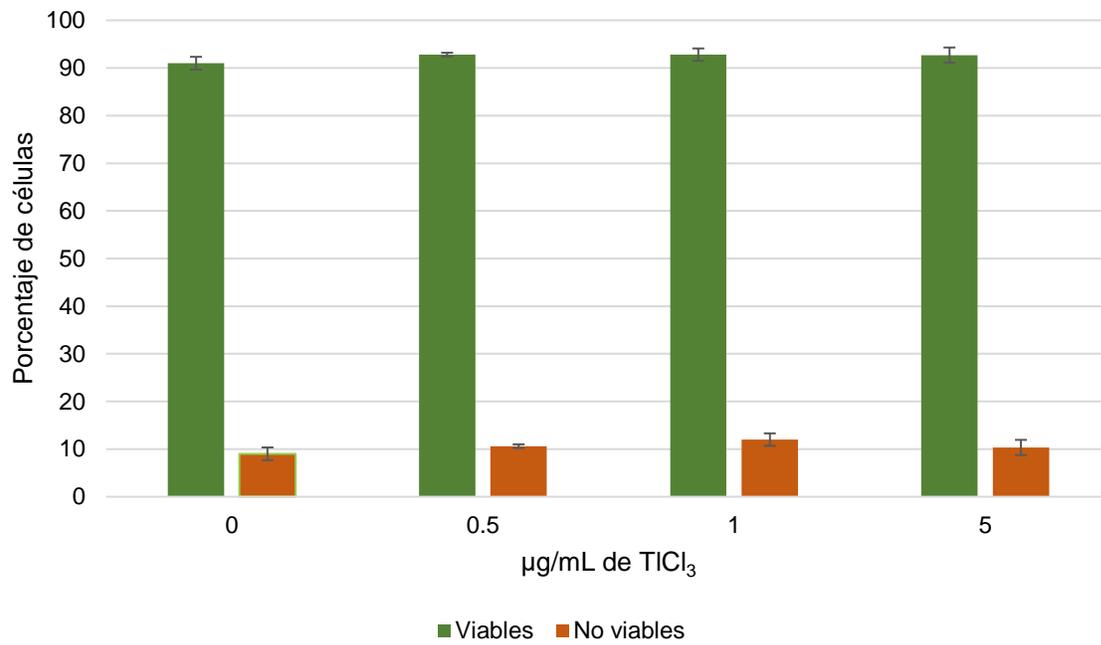


Figura 9. Viabilidad celular de los linfocitos humanos tratados *in vitro* con 0 (testigo) 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de TiCl_3 por 3 h, evaluada con NA-BE de los experimentos de producción de especies reactivas en la célula. Cada barra representa los datos con la media \pm EE de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado ($n = 6$; 100 células analizadas por experimento). ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ comparado con el testigo (prueba de χ^2).

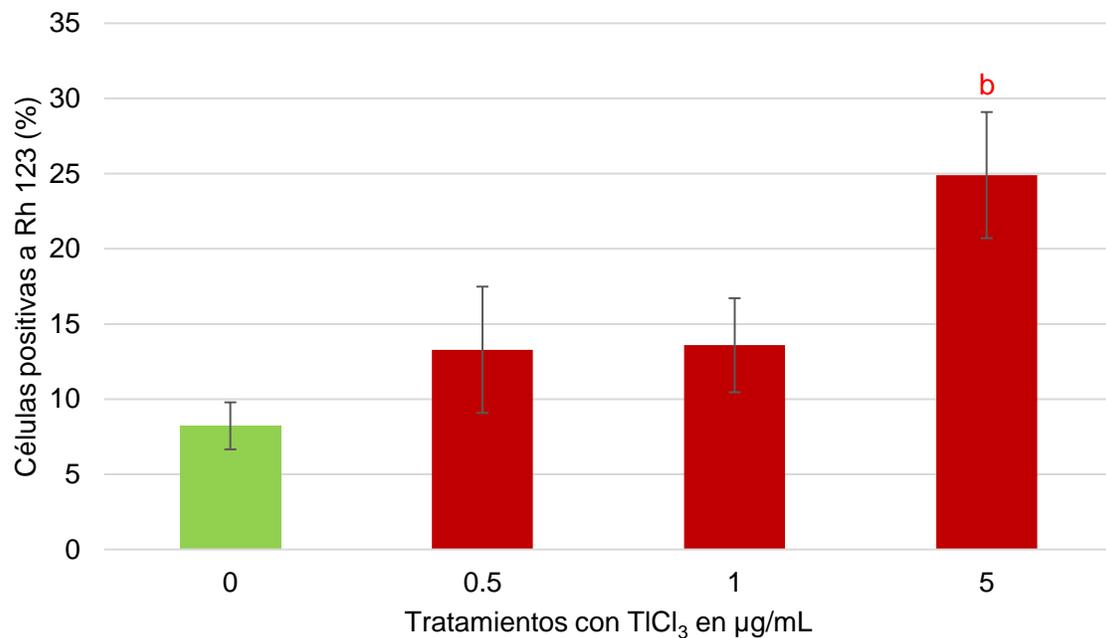


Figura 10. Porcentaje de células positivas a Rh 123 tratados *in vitro* con 0 (testigo) 0.5, 1 y 5 µg/mL de TlCl₃ por 3 h, evaluada la oxidación de DHR 123 por la acción de especies reactivas como ONOO⁻ y H₂O₂. Cada barra representa los datos con la mediana ± EE de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado (n = 6; 30 mil células analizadas por muestra). ^a p < 0.05, ^b p < 0.01 comparado con el testigo (prueba de j²).

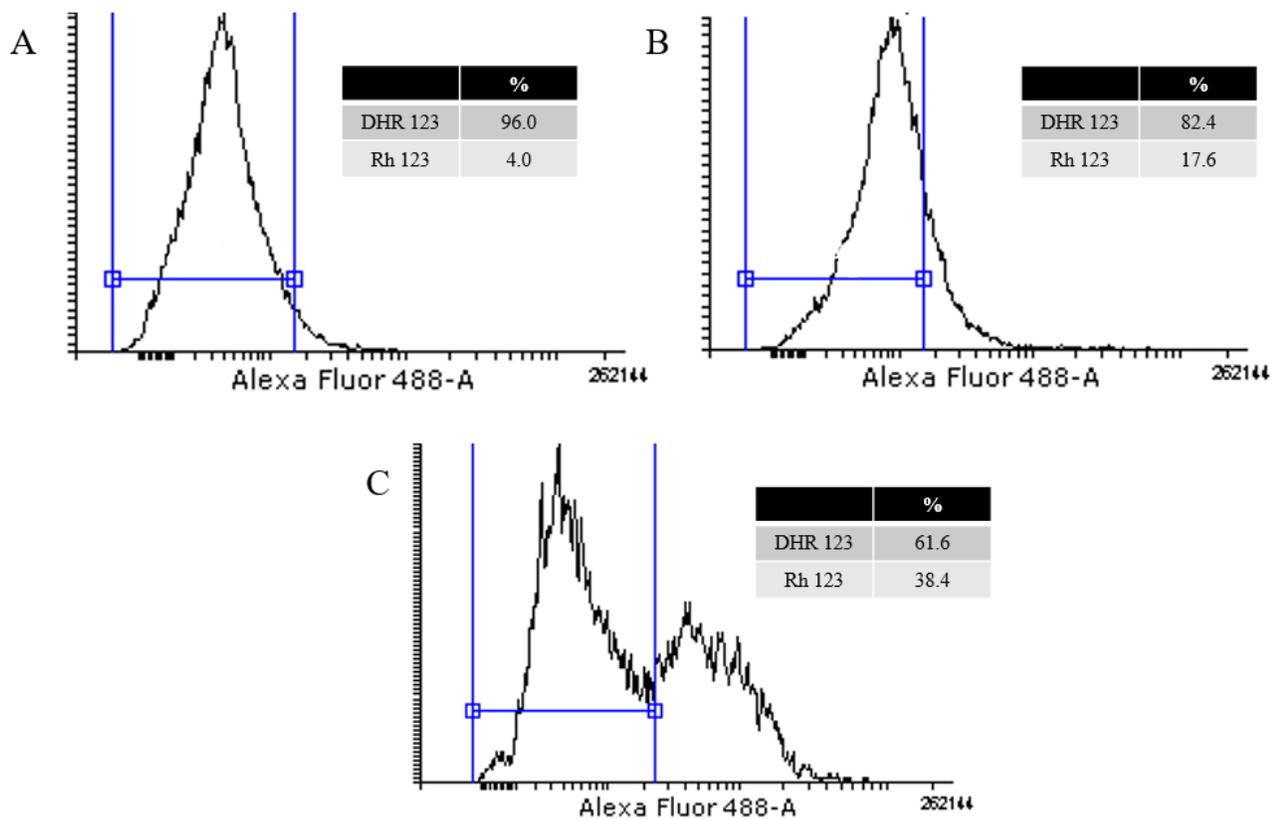


Figura 11. Histogramas representativos de la evaluación de la oxidación de DHR 123 a Rh 123 por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en linfocitos humanos tratados *in vitro* con (A) 0 (testigo negativo), (B) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiCl_3 o (C) 100 μM de H_2O_2 (testigo positivo) durante 3 h; obtenidos con el programa Flowing Software.

X. DISCUSIÓN

El Tl es un metal traza altamente tóxico y un contaminante ambiental, el cual tiene dos estados de oxidación, Tl^{1+} y Tl^{3+} , de los cuales diversos aspectos del mecanismo implicado en su toxicidad son desconocidos. La comparación entre las toxicidades de ambos cationes es importante tanto en el ámbito médico como en el ambiental, pues está ligado a las estrategias empleadas para regular su liberación por parte de instituciones de protección ambiental o para ajustar las alternativas de remediación de los medios contaminados como el agua o el suelo, donde se debe considerar si es más pertinente la oxidación o reducción del metal para minimizar el posible perjuicio a los organismos (Xu *et al.* 2019). Particularmente, el Tl^{3+} ha sido poco estudiado y no hay mucha información con respecto a su potencial genotóxico o sus posibles repercusiones en la proliferación celular, por lo que en esta tesis se evaluó el efecto del $TlCl_3$ sobre el ciclo celular, daño al ADN por bases oxidadas y el estado redox en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Cuando se realizan experimentos para conocer la toxicidad de agentes químicos se requiere conocer la viabilidad de las células después de los tratamientos para evaluar la supervivencia de los cultivos, optimizar las condiciones experimentales de ser requerido, así como para evitar dar falsos positivos en algunos ensayos (Nozhat *et al.*, 2020). La viabilidad es la proporción de células vivas y metabólicamente activas en una población, se obtiene empleando ensayos que evalúan diferentes marcadores como la integridad y funcionamiento de membranas u orgánulos específicos (Kamiloglu *et al.*, 2020). En este trabajo, se evaluó la viabilidad mediante la tinción con NA/BE en linfocitos humanos en proliferación a la par de la evaluación de la progresión de ciclo célula después de 24, 48 y 72 h de exposición a 0.1–50 $\mu\text{g/mL}$ de $TlCl_3$, donde se observó reducción significativa de la viabilidad a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h, y de 10 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h. Para las pruebas de daño oxidante al ADN y estrés oxidante en la célula, se trataron linfocitos en G_0 durante 1 y 3 h de exposición a 0.5–5 $\mu\text{g/mL}$ de $TlCl_3$, sin observarse cambios en el porcentaje de células viables en comparación a los testigos negativos.

En la literatura se ha reportado que el Tl^{3+} reduce la viabilidad de los linfocitos humanos en G_0 , en tratamientos de 8 a 24 h en concentraciones $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ de $TlCl_3$ (Rodríguez-

Mercado *et al.*, 2019), en contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se evidencia que no tuvieron efecto en concentraciones menores a los 5 $\mu\text{g/mL}$. En otros estudios se ha demostrado la citotoxicidad de especies como $\text{TI}(\text{NO}_3)_3$, induciendo fenotipo apoptótico u otros señalizadores de este proceso como la activación de la cascada de caspasas o la liberación de citocromo c en hepatocitos y células PC12 de ratas, no obstante, esto se ha producido en tiempos más cortos de exposición, entre 90 min y 48 h a concentraciones de 25–100 μM (equivalentes a 9.7–39.0 $\mu\text{g/mL}$) (Hanzel y Verstraeten, 2009; Eskandari *et al.*, 2011).

En cuanto al ciclo celular, no hay muchos antecedentes sobre cómo es afectado por el TI en sus dos estados de oxidación. En su estado de oxidación +1, se ha observado que el $\text{TI}\text{CH}_3\text{COO}$ y TI_2SO_4 reducen el índice mitótico y replicativo de células de sangre periférica humana tratadas por 24 h con 0.5–100 $\mu\text{g/mL}$ (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2015, 2019), mientras que Chia *et al.*, 2005 demostraron que el tratamiento de 24 h con $\text{TI}\text{CH}_3\text{COO}$ 10–100 μM (2.7–27.0 $\mu\text{g/mL}$) el ciclo celular de células de glioma LC6 se detiene en la fase G_2/M . En el caso del TI^{3+} , Yamamoto *et al.* (1998) determinaron que el $\text{TI}(\text{NO}_3)_3$ inhibe la proliferación en fibroblastos L929 y osteoblastos MC3T3-E1 de ratón hasta en 50 % (IC_{50} 34.9 y 23.8 μM respectivamente, equivalentes a 13.62 y 9.29 $\mu\text{g/mL}$). En otro estudio, 1–100 $\mu\text{g/mL}$ (3.2–321.8 μM) de TICl_3 por 24 h redujo el índice mitótico de las células de sangre periférica humana 17–48 % en comparación con el grupo testigo (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2019).

En este trabajo en tratamiento con 5–50 $\mu\text{g/mL}$ de TICl_3 incrementó significativamente el porcentaje de células en la fase G_1 y redujo el porcentaje de células en S y G_2/M a las 48 y 72 h de exposición de manera dependiente del tiempo y concentración. Esto concuerda con la reducción del índice mitótico observado en otros estudios (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2019), ya que este arresto en la fase G_1 podría explicar este efecto. Se desconoce el mecanismo específico mediante el cual el TI^{3+} podría estar actuando sobre el ciclo celular, dado que este puede ser afectado por diversos factores que involucran el daño o modificación de moléculas o la alteración de rutas metabólicas, como la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

Uno de los aspectos principales del ciclo celular durante su progresión es que debe resguardar la integridad genómica, incluyendo la vigilancia y reparación del daño al

ADN y la duplicación ordenada y exacta de los cromosomas durante la fase S. Aunque todos los componentes celulares son susceptibles al daño, las células son particularmente sensibles a las lesiones en el ADN.

En la fase G1 del ciclo celular de células en proliferación existe un punto de control, previo a la transición a S, que verifica que la célula haya alcanzado un tamaño adecuado, que tenga los recursos necesarios para proceder con la síntesis del ADN y la división celular y que el ADN se encuentre en condiciones para ser duplicado. Las células que son expuestas a agentes genotóxicos en esta fase del ciclo y sufren lesiones en el material genético, pueden recurrir al arresto temporal del ciclo mediado por la activación de las proteínas sensor de daño como ATM y ATR y sus efectoras, CHK1, CHK2, p53, p27 y p21, para permitir la reparación del ADN e impedir que se replique con errores, la célula se divida y propague dichos defectos a su descendencia (Shackelford *et al.*, 1999; Murray y Carr, 2018). Por lo tanto, el daño al ADN puede ser la explicación para el arresto del ciclo celular inducido por el TICl₃.

Considerando esto, la electroforesis unicelular en gel permite detectar lesiones en el ADN como rompimientos de cadena sencilla y doble, mientras que la combinación con enzimas específicas puede permitir la detección de bases oxidadas o alquiladas (Muruzabal *et al.*, 2020). La enzima ADN-formamidopirimidina glicosilasa, que reacciona con purinas oxidadas, es de las más usadas en el ensayo cometa modificado, permitiendo el estudio del mecanismo específico por el cual el TI³⁺ actúa para producir su genotoxicidad.

Los resultados del ensayo cometa estándar en este trabajo mostraron que el TICl₃ produjo rompimientos en el ADN a las 3 h de exposición con 5 µg/mL, mientras que el ensayo modificado con Fpg mostró daño oxidante en todas las concentraciones probadas (0.5, 1 y 5 µg/mL) a las 1 y 3 h en los parámetros de daño evaluados, incluyendo la intensidad de ADN en la cauda; que en la actualidad es el descriptor de daño al ADN más aceptado (Møller, 2022). Lo anterior sugiere que el TI³⁺ es genotóxico y que el mecanismo mediante el cual ejerce su efecto está relacionado principalmente a la oxidación de la molécula de ADN, aunque en concentraciones de 5 µg/mL y mayores también habría que considerarse la inducción de rompimientos de cadena,

que podrían deberse a esta oxidación y a otros procesos como la interacción del Tl^{3+} con la maquinaria de reparación del ADN o su interacción directa con esta molécula.

Los antecedentes que corroboren el potencial genotóxico del Tl^{3+} son escasos y contradictorios. Claussen *et al.* (1981) en su estudio con células de médula ósea de criceto chino, no encontraron inducción de ICH al tratar los animales con dos aplicaciones independientes de 5 o 10 mg/Kg de $TlCl_3$. Por otro lado, en linfocitos humanos tratados *in vitro* con $TlCl_3$ describieron incremento en número de células con ACE (0.5–100 $\mu\text{g/mL}$) y, aneuploidías y asociaciones satélite en algunas concentraciones (\geq a 5 $\mu\text{g/mL}$) (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017). Estos resultados, en particular los de aberraciones estructurales, concuerdan con los observados en el ensayo cometa estándar, dado que se encuentran rompimientos de cadena sencilla y doble.

No hay registros previos de que el Tl^{3+} produzca oxidación de bases en el ADN, mientras que en este trabajo se observó que el $TlCl_3$ indujo la oxidación de purinas en tiempos cortos de exposición (1 y 3 h) y a partir de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Se calcula que el ADN sufre alrededor de 2×10^4 lesiones diarias en cada célula y una porción significativa de estas lesiones son por oxidación (Cooke *et al.*, 2003; Ciccia y Elledge, 2010). De no ser reparadas, las lesiones oxidantes en el ADN pueden acumularse y alterar procesos imprescindibles como la reparación, replicación y transcripción de esta molécula. Por ejemplo, se sabe que si lesiones como 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 2,6-diamino-4-oxo-5-formamidopirimidina y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (8-oxoGua, FapydAde y FapydGua, respectivamente) no son reparadas adecuadamente, pueden desestabilizar la conformación electrónica del ADN, alterar las propiedades de apareamiento de las bases nitrogenadas y generar mayor frecuencia de mutaciones del tipo de transversión GC→AT, AT→GC. El incremento de mutaciones de esta naturaleza puede tener efectos adversos en procesos como la replicación del ADN, la progresión y regulación del ciclo celular y la segregación de cromosomas (Evans *et al.*, 2004). Estos datos, junto a la inducción de ACE reportada para el $TlCl_3$, indican que el TI incluyendo al Tl^{3+} tiene actividad mutagénica; aunque esta sea débil como lo proponen algunos autores (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

En células en división, los puntos de regulación en las fases G₁, S y G₂/M pueden pausar el ciclo para permitir la reparación del daño provocado en el ADN, o para entrar de manera permanente en la fase G₀ o desencadenar la muerte celular por apoptosis (Cooke *et al.*, 2003). Esto ofrece una posible explicación de los efectos del TiCl₃ en el ciclo celular, dado que la acumulación de lesiones oxidantes podría tener como consecuencia el arresto observado en la fase G₁, que adicionalmente fue dependiente de la concentración y tiempo de exposición, además la reducción de la viabilidad celular a las 48 y 72 h consistente con la conclusión de que, de no poder repararse, las células desencadenan procesos de muerte.

Los niveles de oxidación en el ADN dependen del balance entre el daño y la reparación de la molécula, pero también está ligado a la producción de ERO y los sistemas antioxidantes de la célula (Cooke *et al.*, 2003). Las ERO son producidas por metabolismo celular de manera natural, no obstante, la sobreproducción de éstas o la incapacidad de la célula para neutralizarlas, puede inducir un estado conocido como “estrés oxidante”, generando efectos perniciosos en otras moléculas además del material genético, como la peroxidación de membranas y la modificación o inactivación de proteínas (Valko *et al.*, 2004).

En este trabajo se evaluó el estrés celular por el aumento en las ERO y ERN usando DHR 123, el cual en presencia de ONOO⁻, H₂O₂ y peroxidasas mitocondriales es oxidado a la molécula fluorescente Rh 123. Las células tratadas con 0.5–5 µg/mL de TiCl₃ por 3 h mostraron incremento en el porcentaje de células con fluorescencia en todas las concentraciones probadas y estadísticamente significativo a la concentración de 5 µg/mL. Esto indicaría que el TiCl₃ está promoviendo la generación de especies reactivas en la célula, lo cual coincide con estudios previos, realizados *in vitro* en células de rata, que mostraron que 10–250 µM (3.9–97.6 µg/mL) de Ti(NO₃)₃ incrementan la producción de peróxido y radicales como RO₂• y •OH (Hanzel y Verstraeten, 2006; Pourahmad *et al.* 2010; Eskandari *et al.* 2011). El H₂O₂ y el ONOO⁻ son intermediarios en la formación de •OH, un radical altamente reactivo que se sabe, cuando es producido cerca del material genético, puede ocasionar la oxidación de bases o atacar la desoxirribosa del ADN, produciendo rompimientos de cadena sencilla (Evans *et al.*, 2004). La producción de estas especies reactivas a su vez parece estar asociada a dos

mecanismos: daño mitocondrial y el abatimiento de las defensas antioxidantes de la célula.

Se ha reportado, *in vitro* en células de rata y en enzimas purificadas de humano, que la aplicación de 5–250 μM de $\text{TI}(\text{NO}_3)_3$ (equivalentes a 1.9–97.6 $\mu\text{g/mL}$) disminuye el potencial de la membrana mitocondrial y desacopla la cadena de transferencia de electrones (Pourahmad *et al.* 2010; Eskandari *et al.* 2011). Además, inhibe enzimas como GPx, GR y reduce la concentración de GSH y NADPH por oxidación (Pourahmad *et al.* 2010; Eskandari *et al.* 2011; Villaverde *et al.*, 2004). También es posible que haya otras especies reactivas involucradas en este proceso, como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$), que podrían ser detectadas usando otras técnicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la capacidad del TI^{3+} para incrementar las especies reactivas intracelulares e inducir daño a ADN. A la vez, aporta datos en efectos que no habían sido explorados anteriormente, como la inducción del arresto del ciclo celular en la fase G_1/S y la oxidación de bases en el ADN. Es posible conectar estas observaciones de que la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno puede producir el daño al ADN y organelos como la mitocondria, lo que a su vez deriva en el arresto del ciclo celular y la disminución de la viabilidad. Partiendo de esto, a futuro sería importante analizar las repercusiones de la toxicidad del TI^{3+} que han sido poco exploradas, como su intervención en el proceso de monitoreo y reparación del daño al ADN y su relación con el ciclo celular. Esto podría realizarse evaluando el transcurso de la reparación del material genético con técnicas como el ensayo cometa, comparando el daño antes y después de un periodo de tiempo que permita a las células repararse, por la incorporación de nucleótidos nuevos al ADN mediante análogos de bases como BrdU (análogo de la timidina) en células en G_0 durante la reparación por escisión de bases, de nucleótidos o puede través del análisis de proteínas como las diferentes polimerasas de ADN, helicasas, endonucleasas, p53, p21, ATM, ATR, ciclinas y cinasas.

XI. CONCLUSIONES

Los tratamientos con 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 durante diferentes tiempos de exposición en linfocitos humanos *in vitro*:

- Reducen la viabilidad en la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h y a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h de los linfocitos en proliferación. Además, en la concentración de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ se induce el arresto del ciclo celular en la fase de G_1 .
- En las concentraciones de 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ en tiempos de exposición de 1 y 3 h, no produce cambios en la viabilidad en los linfocitos en fase de G_0 ; sin embargo, en la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 3 h de exposición se producen rompimientos de cadena sencilla. Además, en todas las concentraciones y tiempos de exposición se producen lesiones oxidantes en el ADN, evidenciadas por la enzima de restricción Fpg.
- El tratamiento con 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de TlCl_3 durante 3 h tiende a incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en todas las concentraciones y estadísticamente en 5 $\mu\text{g/mL}$.

En general, se observó que el TlCl_3 puede inducir estrés oxidante en linfocitos humanos tratados *in vitro*, que a su vez puede ser responsable del daño al ADN evidenciado por la inducción de bases oxidadas (8-oxoGua, FapydGua y FapydAde) y que a su vez este efecto puede estar desencadenando el arresto del ciclo celular en la fase previa a la replicación del ADN para permitir la reparación de las lesiones.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdal-Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y. y Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 120.
- Achenbach C., Hauswirth O., Heindrichs C., Ziskoven R., Köhler F., Bahr U. y Schulten H. R. (1980). Quantitative measurement of time-dependent thallium distribution in organs of mice by field desorption mass spectrometry. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6(3), 519–528.
- Afshari R., Mégarbane B. y Zavar A. (2012). Thallium poisoning: one additional and unexpected risk of heroin abuse. *Clinical Toxicology*, 50(8), 791–792.
- Aguilar-Carrillo J., Herrera L., Gutiérrez E.J. y Reyes-Domínguez, I. A. (2018). Solid-phase distribution and mobility of thallium in mining-metallurgical residues: environmental hazard implications. *Environmental Pollution*, 243, 1833–1845.
- Álvarez-Barrera L., Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A., Vázquez-Martínez Y. y Altamirano-Lozano M.A. (2019). Effect on the offspring of pregnant females CD-1 mice treated with a single thallium (I) application. *Reproductive Toxicology*, 90, 1–7.
- Ambekar S.S., Hattur S.S., y Bule P.B. (2017). DNA: Damage and repair mechanisms in humans. *Global Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 001–008.
- Aoyama H. (1989). Distribution and excretion of thallium after oral and intraperitoneal administration of thallos malonate and thallos sulfate in hamsters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 456–463.
- Azqueta A., Muruzabal D., Boutet-Robinet E., Milic, M., Dusinska M., Brunborg G., Moller P. y Collins A.R. (2019). Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24–32.
- BD, Becton Dickinson. (2003). Pharmigen, BrdU flow kits. Instruction manual FICT BrdU flow kit and APC BrdU flow kit. Becton Dickinson and Company.
- Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M.R. y Sadeghi M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 643972.
- Bourré L. (2020) DNA Damage Response (DDR). CrownBio. <https://blog.crownbio.com/dna-damage-response#>
- CAS Common Chemistry. (2021). CAS, a division of the American Chemical Society, n.d. [en línea] <https://commonchemistry.cas.org/> 18/03/2022.

- CCME (1999a). Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life:Thallium. Canadian environmental quality guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment. Directrices. Winnipeg, Canada, 3 pp.
- CCME (1999b). Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Thallium. Canadian environmental quality guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment. Directrices. Winnipeg, Canada, 9 pp.
- Chatterjee N. y Walker G.C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263.
- Cheng H., Duan X., Liu S., Lin C. y Shao X. (2013). Thallium, arsenic, and mercury contamination of soil near the world's largest and longest operating tungsten mine. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 301–305.
- Chia C.F., Chen S.C., Chen C.S., Shih C.M., Lee H. M. y Wu C.H. (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042(1), 523–530.
- Ciccia A. y Elledge S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179–204.
- Claussen U., Roll R., Dolgner R., Matthiaschk G., Majewski F., Stoll B. y Röhrbor F. (1981). On the mutagenicity and teratogenicity of thallium [Artículo en alemán:Zur mutagenität und teratogenität von thallium]. *Rhein Ärzteblatt*, 16, 469–475.
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. y Štětina R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143–151.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. y Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
- Cooper M.G. (2000). *The Cell. A Molecular Approach*. 2da Edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Costa D., Fernandes E., Santos J. L., Pinto D.C., Silva A. y Lima J.L. (2007). New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2071–2081.
- Cruz-Hernández Y., Santana-Silva A., Villalobos M., Romero F., Hernández-Álvarez E. y Pi-Puig T. (2019). Assessment of a simple extraction method to determine the bioaccessibility of potentially toxic Tl, As, Pb, Cu, Zn and Cd in soils contaminated by mining-metallurgical waste. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 849–868.
- Darzynkiewicz Z., Juan G. y Bedner E. (1999). Determining cell cycle stages by flow cytometry. *Current Protocols in Cell Biology*, 1(1), 8–4.
- Dexheimer T.S. (2013). DNA repair pathways and mechanisms. En: *DNA repair of cancer stem cells*. Mathews, L. A., Cabarcas, S. M., Hurt, E. (Eds.). Springer, Dordrecht, pp. 19–32.

- Di Candia D., Muccino E., Battistini A., Boracchi M., Gentile G. y Zoja R. (2020). Thallium toxicity due to adulterated infusion with thallium sulfate in eight members belonging to the same family nucleus: Autopsy findings and ICP-MS analysis (inductively coupled plasma mass spectrometry) in a triple homicide. *Legal Medicine*, 42, 101661.
- Djiadeu P., Azzouz D., Khan M.A., Kotra L.P., Swezey N. y Palaniyar N. (2017). Ultraviolet irradiation increases green fluorescence of dihydrorhodamine (DHR) 123: false-positive results for reactive oxygen species generation. *Pharmacology Research and Perspectives*, 5(2), e00303.
- Douglas K.T., Bunni M.A., y Baidur S.R. (1990). Thallium in biochemistry. *International Journal of Biochemistry*, 22(5), 429–438.
- Downs W.L., Scott J.K., Steadman L.T. y Maynard E.A. (1960). Acute and sub-acute toxicity studies of thallium compounds. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 21(5), 399–406.
- Eghtesadi R., Safavi S., Shahmirzayi F., Banafshe H., Omid S. y Ghaderi A. (2019). A narrative review of thallium toxicity; preventive measures. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 11(3), 322–330.
- Eskandari M.R., Pourahmad J. y Daraei B. (2011). Thallium (I) and thallium (III) induce apoptosis in isolated rat hepatocytes by alterations in mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicological y Environmental Chemistry*, 93(1), 145–156.
- Eskandari M.R., Mashayekhi V., Aslani M. y Hosseini M.J. (2015). Toxicity of thallium on isolated rat liver mitochondria: the role of oxidative stress and MPT pore opening. *Environmental Toxicology*, 30(2), 232–241.
- Evans M.D., Dizdaroglu M., y Cooke M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1–61.
- Fergusson J.E. (1990). The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. *Pergamon*, Oxford, UK.
- Forchhammer L., Vaclavik E.B., Kjærsgaard J.F., Høgh P.D., Nielsen C., Jensen A., Loft S., Friis G. y Møller P. (2008). Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*, 23(3), 223–231.
- Fraga C. G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4–5), 235–244.
- Galanis A., Karapetsas A. y Sandaltzopoulos R. (2009). Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1–2), 31–35.
- Galván-Arzate S. y Ríos C. (1994). Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology*, 90(1–2), 63–69.

- Galván-Arzate S. y Santamaría A. (1998). Thallium toxicity. *Toxicology Letters* 99, 1–13.
- Gharsalli T. (2016). Comet assay on toxicogenetics. several studies in recent years on several genotoxicological agents. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, 6(418), 2161–0525.
- Goyer R.A. y Clarkson T.W. (1996). Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5, 691–736.
- Gupta SP. (2018). Roles of metals in human health. *MOJ Bioorganic and Organic Chemistry*, 2(5), 221–224.
- Hanzel C.E., Villaverde M.S. y Verstraeten S.V. (2005). Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium (III) hydroxide. *Toxicology*, 207(3), 501–510.
- Hanzel C.E. y Verstraeten S.V. (2006). Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(3), 485–492.
- Hanzel C.E. y Verstraeten S.V. (2009). TI (I) and TI (III) activate both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(1), 59–70.
- Harris W.R. y Messori L. (2002). A comparative study of aluminum (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin. *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2), 237–262.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P. y Tice R.R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45–51.
- Hartwig A. (2013). Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis?. *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 63–72.
- Hoffman R.S. (2000). Thallium poisoning during pregnancy: a case report and comprehensive literature review. *Journal of Clinical Toxicology*, 38(7), 767–775.
- Hologgitas J., Ullucci P., Driscoll J., Grauerholz J. y Martin H. (1980). Thallium elimination kinetics in acute thallosis. *Journal of Analytical Toxicology* 4(2), 68–73.
- Houtgraaf J.H., Versmissen J. y van der Giessen W.J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 7(3), 165–172.
- Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B. y Beeregowda K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60.
- Jomova K. y Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65–87.

- Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T. y Capanoglu E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349.
- Kazantzis G. (2000). Thallium in the environment and health effects. *Environmental Geochemistry and Health*, 22(4), 275–280.
- Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H. y Beckman J.S. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(2), 149–156.
- Lloyd D.R. y Phillips D.H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1–2), 23–36.
- Léonard A. y Gerber G.B. (1997). Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of thallium compounds. *Mutation Research*, 387(1), 47–53.
- Li S., Huang W., Duan Y., Xing J. y Zhou Y. (2015). Human fatality due to thallium poisoning: autopsy, microscopy, and mass spectrometry assays. *Journal of Forensic Sciences*, 60(1), 247–251.
- Liu H. y Liao G. (2021). Long-term misdiagnosis and neurologic outcomes of thallium poisoning: A case report and literature review. *Brain Behav*, 11(3), e02032.
- Liu J., Luo X., Wang J., Xiao T., Chen D., Sheng G. Yin M., Lippold H., Wang C. y Chen Y. (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*, 224, 445–453.
- Liu J., Wang J., Xiao T., Lippold H., Luo X., Yin M., Ren J. Chen Y. y Linghu W. (2018). Geochemical dispersal of thallium and accompanying metals in sediment profiles from a smelter – impacted area in South China. *Applied Geochemistry*, 88, 239–246.
- Liu J., Wei X., Zhou Y., Tsang D.C., Yin M., Lippold H., Yuan W., Wang J., Feng Y. y Chen D. (2020). Thallium contamination, health risk assessment and source apportionment in common vegetables. *Science of the Total Environment*, 703, 135547.
- Martínez A.M. (2021) El ciclo celular. *Genotipia*. [en línea] <https://genotipia.com/el-ciclo-celular/>
- Møller P. (2022). Measurement of oxidatively damaged DNA in mammalian cells using the comet assay: Reflections on validity, reliability and variability. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 873, 503423.
- Molina L.D.C.P. y Verstraeten S.V. (2008). Thallium (III)-mediated changes in membrane physical properties and lipid oxidation affect cardiolipin–cytochrome c

- interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(10), 2157–2164.
- Moore D., House I. y Dixon A. (1993). Thallium poisoning. Diagnosis may be elusive, but alopecia is the clue. *British Medical Journal*, 306(6891), 1527–1529.
- Mozaffarieh M., Schoetzau A., Sauter M., Grieshaber M., Orgül S., Golubnitschaja O. y Flammer J. (2008). Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular Vision*, 14, 1584.
- Mulkey J.P. y Oehme F.W. (1993). A review of thallium toxicity. *Veterinary and Human Toxicology*, 35 (5), 445–453.
- Murray J.M. y Carr A.M. (2018). Integrating DNA damage repair with the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 52, 120–125.
- Muruzabal D., Collins A. y Azqueta A. (2021). The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111865.
- Nozhat Z., Khalaji M.S., Hedayati M. y Kia S.K. (2022). Different methods for cell viability and proliferation assay: essential tools in pharmaceutical studies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(4), 703–712.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. (2021). PubChem Compound Summar [En línea] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/08/05/2021>
- O'Morgan D. (2007) The Cell Cycle: Principles of control. *New Science Press Ltd. U.K.*, pp. 2–3.
- O'Neil M.J. (2001). The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13va Ed. Merck and Co., Whitehouse Station, New Jersey, E.U.A. 10250 pp.
- Pagnanelli R.A. y Basso D.A. (2010). Myocardial perfusion imaging with 201Tl. *Journal of Nuclear Medicine and Technology*, 38(1), 1–3.
- Peter A.J. y Viraraghavan T. (2005). Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environmental International*, 31(4), 493–501.
- Ponsoda X., Jover R., Nuñez C., Royo M., Castell J.V. y Gomez-Lechon M.J. (1995). Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentration. *Toxicology In Vitro*, 9(6), 959–96.
- Pourahmad J., Eskandari M.R. y Daraei B. (2010). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for thallium (I) and thallium (III). *Environmental Toxicology*, 25(5), 456–467.
- Poudyal B., Shrestha P. y Chowdhury Y.S. (2020). Thallium-201. StatPearls [en línea]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560586/> 09/11/2022.
- Repetto, G. y del Peso, A. (2012). Gallium, Indium, and Thallium. En: *Patty's Toxicology*. 6Ed. John Wiley y Sons, Inc., pp. 257–353.

- Richelmi P., Bono F., Guardia L., Ferrini B. y Manzo L. (1980). Salivary levels of thallium in acute human poisoning. *Archives of Toxicology*, 43(4), 321–325.
- Ríos C., Galván-Arzate S. y Tapia R. (1989). Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl_2SO_4 . *Archives of Toxicology*, 63(1), 34–37.
- Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A. (2013). Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 369–383.
- Rodríguez-Mercado J.J., Hernández-de la Cruz H., Felipe-Reyes M., Jaramillo-Cruz E. y Altamirano-Lozano M.A. (2015). Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium (I) acetate in human blood cells. *Environmental Toxicology*, 30(5), 572–580.
- Rodríguez-Mercado J.J., Mosqueda-Tapia G. y Altamirano-Lozano M.A. (2017). Genotoxicity assessment of human peripheral Lymphocytes induced by thallium(I) and thallium(III). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99(5–6), 987–998.
- Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Espitia J.D. y Altamirano-Lozano M.A. (2019). Induction of cytotoxicity in human cells exposed to thallium(I) and thallium(III). *Current Topics in Toxicology*, 15, 17–27.
- Royall J.A. y Ischiropoulos H. (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultured endothelial cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 302(2), 348–355.
- Rupp W.D. (1996). DNA repair mechanisms. *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, 2, 2277–2294.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K. y Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K. y Paules R.S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environmental Health Perspectives*, 1, 5–24.
- Sibi M.P., Silva L.F. y Carneiro V.M.T. (2009). Thallium(III) Nitrate Trihydrate. En: *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. (Leo A. Paquette, David Crich, Philip L. Fuchs, Gary A. Molander, Ed.). John Wiley and Sons, 59 pp.
- Smith D.H. y Doherty R.A. (1964). Thallitoxicosis: report of three cases in Massachusetts. *Pediatrics*, 34(4), 480–490.
- Stanczyk M., Gromadzinska J. y Wasowicz W. (2005). Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 18(1), 15–26.
- Stohs S.J. y Bagchi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321–336.
- Sunjog K., Kolarević S., Héberger K., Gačić Z., Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B., y Lenhardt M. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of

- genotoxicity by sum of ranking differences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4879–4885.
- Test Catalog - Mayo Clinic Laboratories. (2020). Mayo Clinic Laboratories. <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/>
- UNEP (2011). Recycling Rates of Metals: A Status Report, A Report of the Working Group on the Metals Flows of the International Resource Panel. International Resource Panel, Working Group on the Global Metal Flows (Eds). United Nations Environmental Panel. Reporte. 48 pp.
- US EPA (2014). Priority pollutant list. United States Environmental Protection Agency. Lista. Washington, D.C., EUA. 2 pp.
- US EPA (2018). The National Primary Drinking Water Regulations. United States Environmental Protection Agency. Tabla de estándares. Washington, D.C., EUA. 6 pp.
- US EPA (2009). Toxicological Review of Thallium and Compounds. United States Environmental Protection Agency. Revisión. Washington, D.C., EUA. 163 pp.
- US GS (2021) Thallium. En: Mineral Commodity Summaries. United States Geological Survey Reporte. Reston, Virginia, EUA. 2 pp.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J. y Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1), 37–56.
- Villaverde M. S., Hanzel C. E., y Verstraeten S. V. (2004). *In vitro* interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defence system. *Free Radical Research*, 38(9), 977–984.
- Wang S. y Shi X. 2001. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222, 3–9.
- WHO, World Health Organization. (1996). Thallium World Health Organization: International Programme on Chemical Safety (IPCS) Environmental Health Criteria. Ginebra.
- Xiao T., Guha J., Boyle D., Liu C.Q. y Chen J. (2004). Environmental concerns related to high thallium levels in soils and thallium uptake by plants in southwest Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, 318(1–3), 223–244.
- Xu H., Luo Y., Wang P., Zhu J., Yang Z. y Liu Z. (2019). Removal of thallium in water/wastewater: A review. *Water Research*, 165, 114981.
- Yamamoto A., Honma R. y Sumita M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 39 (2), 331-340.

- Zhang Z., Zhang B., Long J., Zhang X. y Chen G. (1998). Thallium pollution associated with mining of thallium deposits. *Science China Earth Sciences*, 41(1), 75–81.
- Zoroddu M. A., Aaseth J., Crisponi G., Medici S., Peana M. y Nurchi V. M. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 120–129.