



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

CARRERA DE BIOLOGÍA

"ESTIMACIÓN DEL DAÑO AL ADN (RUPTURAS DE CADENA SENCILLA O DOBLE) Y DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN EN LEUCOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO* CON TALIO"

TESIS

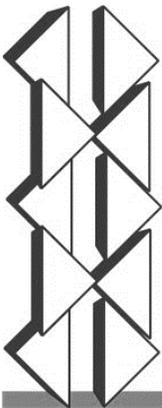
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

SAÚL RAMÍREZ DURAN

DIRECTOR: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO



**FES
ZARAGOZA**

MEXICO, D.F.

AGOSTO 2015.



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.

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Juan José Rodríguez Mercado** dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UIGTA) L5 PA, UMIE-Zaragoza, cuyo responsable es el Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano. Unidad ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza campo II, UNAM.

Durante el desarrollo de esta investigación se recibió el apoyo de la **DGAPA-PAPIIT** proyecto **IN216809** y proyecto **IA201312**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **RAMÍREZ DURAN SAÚL**, con número de cuenta **303240303**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **25 de agosto de 2015** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SECRETARIO M. en C. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

SUPLENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SUPLENTE M. en C. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

El título de la tesis que presenta es: **Estimación del daño al ADN (rupturas de cadena sencilla o doble) y determinación de la cinética de reparación en leucocitos humanos tratados *in vitro* con talio.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABERÁ EL ESPÍRITU”

México, D.F. a 18 de junio de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta máxima casa de estudios, por todas sus enseñanzas y las herramientas que me dio para seguir formando un mejor futuro.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, por sus sugerencias, observaciones y consejos que ayudaron a mejorar la misma:

M. en C. Carlos Bautista Reyes

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Biól. Carlos Martínez Montoya

Dra. Lucila Álvarez Barrera

M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

De manera especial al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por permitir integrarme a su grupo de trabajo, por su paciencia, sus enseñanzas, consejos, apoyo y sobre todo por el tiempo brindado durante la realización de esta tesis.

Al M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por su disposición siempre a ayudar, por las sugerencias, orientación y comentarios realizados siempre con la intención de mejorar profesionalmente.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, por su compañía y por todos los momentos que compartimos juntos, los cuales hicieron más agradables y divertidos los días dentro del laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me mostraron que con dedicación, esfuerzo y sacrificios se logran las metas propuestas, a quienes hicieron posible que llegara a realizar mis estudios, pero sobre todo por darme la vida y a quienes siempre estaré agradecido.

A mis hermanos, con los que he tenido grandes momentos, la diversión, la compañía y los consejos.

A mis cuñados, por todos los días que hemos convivido, las pláticas y las cosas compartidas.

A mi sobrino, que desde que llegó hemos aprendido muchas cosas juntos y espero sigas con esas energías y el entusiasmo por seguir descubriendo más y más.

A mi personita especial, la mujer, amiga y colega, que su aportación en la realización de esta tesis fue muy grande y valiosa. Quien llegó a mi vida, con la que he compartido mis días buenos y todos los malos, pero que siempre estuvo a mi lado, ayudándome, apoyándome, cuidándome y nunca dejó de creer en mí. Mis días junto a ti siempre han sido inolvidables y los que faltan los deseo con ansias..... por todo lo que me das, tu cariño, paciencia, tu apoyo y todo tu amor..... Te Amo MIRIAM.

A mis amigos, con los que compartí muchas experiencias durante la carrera y con los que la diversión estuvo presente, les deseo lo mejor.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Marco teórico.....	5
Talio.....	5
Propiedades y usos.....	5
Función biológica, metabolismo y toxicidad.....	7
Exposición.....	8
Teratogénesis, carcinogénesis y mutagénesis.....	9
Daño y reparación del ADN.....	12
Mecanismos de reparación del ADN.....	14
Marcadores de daño al material genético.....	17
Ensayo cometa.....	18
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Material y métodos.....	24
Aislamiento y tratamiento de leucocitos.....	24
Viabilidad.....	24
Electroforesis unicelular en gel.....	25
Cinética de reparación.....	25
Rupturas de cadena doble de ADN.....	26
Valoración de daño al ADN.....	26
Análisis estadístico.....	27
Resultados.....	28
Viabilidad.....	28
Cinética de reparación.....	28
Cadena doble.....	33
Rupturas de cadena sencilla vs rupturas de cadena doble.....	34
Discusión.....	37
Conclusiones.....	43
Referencias.....	44
Anexos.....	53

RESUMEN

El talio (Tl) es un metal pesado, no esencial, que por sus amplios usos y liberación al ambiente se considera contaminante. Cuenta con dos estados de oxidación, el Tl^+ y Tl^{3+} , ambos tóxicos para los seres vivos. El Tl^+ por similitudes con el ion potasio (K^+), puede mimetizar algunas de sus funciones en los organismos, sin embargo, aún no se tienen del todo descritos los mecanismos por los cuales ejerce efectos a nivel celular y sobre el ADN. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo estimar el daño inducido al ADN por acetato de talio(I) en concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, sobre leucocitos humanos de sangre periférica y determinar la capacidad de reparación de las células mediante una cinética, utilizando para ello la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG).

Se aislaron leucocitos humanos a partir de muestras de sangre periférica. Se hicieron microcultivos en tubos eppendorf, los que contenían medio de cultivo y las concentraciones de acetato de talio(I). Los tratamientos con el compuesto de Tl se dieron por 1 h, al término se evaluó la viabilidad celular y se elaboraron las preparaciones para evaluar el daño y la cinética de reparación al ADN con la técnica de EUG:

- a) Por un lado se realizó la metodología a $\text{pH} > 13$, con la cual se pueden evaluar los rompimientos en el ADN de cadena sencilla, sitios lábiles al álcali, entre otro tipo de lesiones, así como el tiempo requerido para reparar este daño a través de una cinética de reparación. La cinética se realizó tomando como tiempos de recuperación 0, 0.5, 1, 3 y 24 h.
- b) Por otra parte se realizó la metodología a $\text{pH} 9$, con la cual se pueden revelar los rompimientos de cadena doble.

Los resultados obtenidos muestran que este metal disminuye la viabilidad celular en la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ e incrementa significativamente el daño al ADN de cadena sencilla de manera dependiente de la concentración; sin embargo, no se observa capacidad de inducir rupturas de cadena doble.

En relación a la cinética de reparación, las concentraciones presentan tendencia a disminuir la cantidad de material dañado, pero, en ninguna de las concentraciones la recuperación se asemeja a los valores obtenidos en las células sin tratamiento. En conclusión, se observa que el acetato de talio(I) es capaz de inducir daño al ADN e intervenir con la reparación del material genético.

INTRODUCCIÓN

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre en concentraciones bajas, pero debido a la actividad humana se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, principalmente por el uso en las industrias y la fabricación de diversos productos de uso cotidiano, lo que ha ocasionado que varios de estos sean considerados contaminantes ambientales. Algunos de estos elementos son clasificados como peligrosos por su elevada toxicidad, tal es el caso del berilio, cadmio, cromo, mercurio, plomo, telurio, **talio** y vanadio, entre otros (Zierold 2000, Ibrahim *et al* 2006).

Diversos metales forman parte esencial para la vida y otros no son esenciales pero también resultan en alguna manera benéficos en bajas concentraciones, sin embargo cuando estas se incrementan, resultan tóxicos y constituyen un factor de riesgo para la salud (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

Dentro de los no esenciales y clasificados como peligrosos para el ser humano y las distintas formas de vida se encuentra el **talio** (TI). Varios autores lo consideran como el más tóxico para los seres humanos, sobrepasando al mercurio, plomo o cadmio. Estos últimos han sido ampliamente estudiados y se conoce varios aspectos sobre su mecanismo de acción (Palus *et al* 2003, Peter y Viraraghavan 2005, Crespo-López *et al* 2009), sin embargo se ha descrito poco acerca de los efectos que TI ocasiona (Wang *et al* 2013).

Su uso ha sido restringido, pero se sigue utilizando en la elaboración de piezas electrónicas y en medicina nuclear (Tatsi y Turner 2014). No obstante, se tiene información de su presencia en productos, como venenos, insecticidas y rodenticidas, entre otros pesticidas (Nriagu 1998, Peter y Viraraghavan 2005), además de aguas contaminadas o residuales que se emplean para el riego de cultivos (Wang *et al* 2013).

Los compuestos de TI, en su mayoría sales, son muy solubles en agua, lo cual, incrementa su biodisponibilidad así como la posibilidad de absorción y acumulación en los organismos y en las cadenas tróficas (Peter y Viraraghavan 2005). Debido a

su disposición ya sea de manera natural o provocada, los metales como el TI han sido de interés para diversas investigaciones, donde se ha tratado de entender la forma de actuar sobre los organismos, sus efectos, toxicidad, el nivel en el que estos actúan ya sea como citotóxicos, genotóxicos, teratógenos o cancerígenos. También se han estudiado las concentraciones en las que estos llegan a causar dichos efectos. De alguna forma se han conseguido grandes avances, pero aún no son del todo concluyentes.

Una de las metodologías utilizada para el estudio de los efectos que los metales ejercen sobre los organismos y en especial sobre el material genético de las células es la electroforesis unicelular en gel (EUG); con la cual es posible analizar el daño inducido por xenobióticos, tales como los compuestos metálicos; además, ofrece una gran ventaja, ya que puede ser utilizada para realizar la evaluación de una cinética de reparación, con la que se puede determinar si el daño ocasionado es reparado, además de que es rápida, sencilla y muy sensible (Singh *et al* 1988, Tice *et al* 1990, Rojas *et al* 1999).

MARCO TEORICO

Talio

El Tl fue descubierto por Sir William Crookes en 1861; es un metal que se encuentra ampliamente distribuido de manera natural, en concentraciones muy bajas, sin embargo, las actividades humanas han provocado que los niveles en el ambiente se incrementen. Es considerado por diversos autores como uno de los metales más tóxicos para los seres vivos, pero que al mismo tiempo aún no se conoce por completo el mecanismo por el que produce daño.

Propiedades y usos

El Tl tiene peso atómico de 204.383, número atómico de 81, densidad de 11.83 g/cm³, que forma parte junto con el galio e indio de la familia III A de la tabla periódica. Presenta un color de blanco azulado a gris. Sus compuestos se pueden encontrar en los estados de oxidación I y III (Tl⁺ y Tl³⁺, respectivamente); donde la forma I (Tl⁺) presenta mejor estabilidad que la forma III (Tl³⁺) (Léonard y Gerber 1997, EPA 2009, Cvjetko *et al* 2010); En la mayoría de sus formas químicas el Tl es soluble, esta propiedad le confiere quedar biodisponible en los ecosistemas cuando es liberado al ambiente (Reza *et al* 2011).

Se conocen gran cantidad de compuestos derivados del Tl; en el **Cuadro I** se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos más utilizados en las industrias y que son de interés por sus efectos dañinos. En seguida se mencionan algunos de sus usos.

Se tiene registrado que en varios países de América, Asia y Europa el Tl fue ampliamente utilizado desde su descubrimiento. Por ejemplo el sulfato de talio(I) ha sido empleado como rodenticida y en tratamientos de fibras textiles; el cloruro de talio(I) es requerido como catalizador en la cloración (Mercadal y Desoille 1993), otros compuestos son utilizados en insecticidas y en diversos productos como aleaciones, joyería de imitación, pigmentos, colorantes, cristales, aparatos eléctricos y electrónicos, semiconductores, sistemas ópticos, termómetros de baja temperatura y en cables de fibra de vidrio (Léonard y Gerber 1997, Nriagu 1998).

En medicina el isótopo ^{201}Tl se emplea para obtener imágenes del miocardio, otros compuestos a base de Tl, en los que se encuentra el acetato de talio(I), se han utilizado en tratamientos terapéuticos contra la sífilis, gonorrea y tuberculosis (Léonard y Gerber 1997, Nriagu 1998, Martínez-Hernández 2000).

En particular el acetato de talio(I), clasificado con el número CAS 563-68-8 y fórmula química CH_3COOTl (Figura 1), forma cristales blancos inodoros, posee una densidad de 3.68 g/cm^3 , su peso molecular es de 264.4098 g/mol , tiene un punto de fusión de 129°C , es muy soluble en agua, pero insoluble en acetona y es utilizado como compuesto para la medicación, también en la fabricación de compuestos depilatorios (Kazantzis, 1986, Mercadal y Desoille 1993). Su forma de exposición puede ser inhalada o cutánea, provocando intoxicación y produciendo daño en el sistema nervioso, pérdida de la vista, dolores de cabeza, fatiga, debilidad, confusión, convulsiones, coma y en casos severos la muerte (NJDHSS 2000).

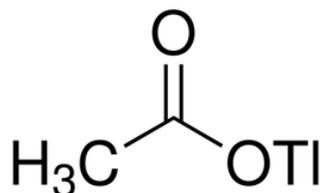


Figura 1. Estructura química del acetato de talio (CH_3COOTl) en estado sólido (tomado de <http://www.sigmaaldrich.com>).

El Tl se encuentra presente de manera natural en el ambiente en concentraciones bajas; pero el incremento ocasionado por las actividades humanas, provocan una contaminación con este metal; la cual pone en peligro el medio ambiente y provoca que la salud humana se ponga en riesgo, ya que el compuesto puede entrar en contacto con vegetales, frutas y animales de granjas (Kazantzis 2000), indispensables para el consumo de las poblaciones cercanas.

En el aire, el Tl se encuentra presente de manera natural en bajas concentraciones, alrededor de 1 ng/m^3 . En agua potable se encuentran concentraciones de $1 \text{ }\mu\text{g/L}$,

en tanto que en suelo oscila de 0.1 a 1.7 mg/kg, exceptuando algunos suelos cercanos a minas que llegan a presentar altos niveles de hasta 1000 mg/kg (OEHHA 1999, Kazantzis 2000, Peter y Viraraghavan 2005, Cvjetko *et al* 2010).

No se tiene conocimiento de su necesidad en algún proceso biológico y mucho menos se le ha relacionado con valor esencial para la vida, por el contrario, se encuentra considerado como uno de los metales pesados extremadamente peligrosos, que pueden competir con cationes metálicos esenciales (IPCS 1996, Nriagu 1998). Es considerado por la agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (EPA 2009) y por otras agencias mundiales (IPCS 1996, USCHPPM 2007), como un metal pesado, contaminante ambiental y ocupacional, del cual se conocen poco de sus efectos tóxicos a nivel celular y genético.

Función biológica, metabolismo y toxicidad

El Tl tiene afinidad por los grupos amino, imino y sulfhídrido de centros activos de las enzimas, además los iones Tl^+ muestran similitudes con el ion potasio (K^+) situación que compromete varios procesos celulares y que han explicado parte de la toxicidad de este metal (Britten y Blank 1968, Barrera y Gómez-Puyou 1975, Léonard y Gerber 1997, Nriagu 1998, Viraraghavan y Srinivasan 2011, López-Antón *et al* 2013).

Algunos autores lo han considerado peligroso y elevadamente tóxico para los mamíferos, incluso su toxicidad se ha comparado con la del mercurio, cadmio y plomo (Peter y Viraraghavan 2005, Pavlíčková *et al* 2006), lo que se le atribuye a la propiedad de ser absorbido por completo y rápidamente, sin importar la vía de administración, además se siguen reportando casos de envenenamiento accidental, ocupacional, deliberado y terapéutico (Nriagu 1998, HRAOEL 2002, Saha 2005). El envenenamiento por Tl se manifiesta por síntomas agudos neurológicos, digestivos y dermatológicos acompañados por alopecia, las primeras señales son dentro de los días 1 y 3 después de la absorción y se presentan por náusea, vómito y en ocasiones por un severo dolor abdominal. Con dosis masivas de un poco más de 2 g, los síntomas progresan rápidamente a shock cardiovascular, coma e incluso la

muerte dentro de las 24 h (Tromme *et al* 1998), también existen síntomas como la polineuritis, desorden visual y reflejos anormales, pero no se ha definido un síntoma que pueda ser considerado como el precursor inicial (Brockhaus *et al* 1981), además de considerar que la severidad de los síntomas depende del tiempo de exposición, la forma de absorción, la edad y la susceptibilidad individual (Repetto *et al* 1998).

Como se mencionó anteriormente, no importa la ruta de contacto, la absorción del TI se lleva a cabo de forma muy rápida (de 80 a 100%), por contacto con la piel, por medio de las mucosas en la boca, pulmón y tracto digestivo, tiene la capacidad de acumularse en riñones, músculos, algunas áreas del cerebro y testículos (Xiao *et al* 2012). Derivado a esto, en la primera hora después de la exposición en personas y animales de experimentación se puede encontrar residuos del metal en la orina. También se conoce que una vez absorbido el TI, una parte es retenida por los eritrocitos de la sangre y el resto es distribuido a los demás tejidos del cuerpo (Kazantzis 1986, Repetto *et al* 1998).

Estudios con hepatocitos de rata expuestos a TI(I) y TI(III) demostraron tener efectos citotóxicos, estos asociados con la formación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica, al potencial colapso de la membrana mitocondrial, la activación de la cascada de caspasas y a una proteólisis celular (Pourahmad *et al* 2010).

Exposición

La fuente principal de emisión de TI al ambiente, son los procesos de extracción de minerales, además de ser residuos de fábricas cementeras y de plantas que utilizan carbón como fuente de energía (Kazantzis 1986, López-Antón *et al* 2013, Karbowska *et al* 2014). La exposición puede provenir del aire, agua y comida; sin embargo, los niveles en aire y agua son muy bajos. En otro sentido pequeñas cantidades son liberados en el aire proveniente de las fábricas; de donde puede precipitarse sobre jardines o campos de cultivo entrando en contacto con los mismos y ser absorbido por medio de las raíces (Dolgner *et al* 1983, Peter y Viraraghavan 2005, Pavlíčková *et al* 2006 Karbowska *et al* 2014).

Los síntomas producidos por esta intoxicación a menudo se confunden con otros padecimientos, por lo tanto no se les da el tratamiento adecuado a las personas envenenadas, presentándose secuelas neurológicas que en algunos casos conducen a la muerte (Tromme *et al* 1998, Martínez-Hernández 2000, López-Antón *et al* 2013).

Teratogénesis, carcinogénesis y mutagénesis

Los efectos teratogénicos inducidos por el TI, demuestran tener influencia sobre el desarrollo fetal en aves y roedores, donde se observó aumento de malformaciones y reducción del peso (Gregotti y Faustman 1998). Para humanos los casos estudiados de envenenamiento no se mostraron tener algún tipo de malformaciones y solo en dosis extremadamente altas los efectos que produjeron fueron abortos, distrofias, caída de cabello, disminución de peso y algunas anomalías en dedos y uñas (Dolgnier *et al* 1983, Léonard y Gerber 1997, Nriagu 1998, HRAOEL 2002).

Los escasos estudios realizados para conocer los efectos carcinógenos no son concluyentes tanto en humanos como en animales. Por el contrario, en experimentos realizados con tricloruro de talio(III) muestran tener propiedades relacionadas con la actividad anti-tumoral (Hart y Adamson 1971, Leonard y Gerber 1997, Nriagu 1998).

Investigaciones realizadas para corroborar la genotoxicidad del TI, no han podido validar sus efectos (Léonard y Gerber 1997, Gregotti *et al* 1992, Nriagu 1998). Sin embargo, para obtener resultados que ayuden a comprender los efectos que el TI y algunos de sus compuestos induzcan, actualmente dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (FES Zaragoza) se realizan estudios *in vivo* e *in vitro* con sales de TI, para conocer más acerca de los efectos que ocasiona, por ejemplo: el cómo se ve afectada la segregación de cromosomas durante la división celular, como produce aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas y daño al ADN, por mencionar algunos.

Además se ha observado que el acetato de talio(I) induce una variación de la respuesta antioxidante por disminución del contenido de ascorbato y afectando a la

actividad de enzimas antioxidantes, esto en la planta *Lemna minor*, expuesta a este compuesto; también se observó que a pesar de la activación de la respuesta antioxidante en un corto tiempo de exposición, en concentraciones altas de acetato de talio(I), incrementan los niveles de peróxido de hidrógeno e induce daño oxidante en lípidos, proteínas y ADN; de lo anterior se desprende que el mecanismo de generación de radicales libres es la forma principal en que actúa el TI para ejercer su toxicidad en plantas (Babić *et al* 2009).

Cuadro I. Propiedades físico químicas del talio y algunos de sus compuestos

Nombre	CAS RN *	Formula Química	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L)
Talio metálico	7440-28-0	Tl	204.38	303.5	1,457	Insoluble
Acetato de talio(I)	563-68-8	CH ₃ COOTl	263.43	131	Sin datos	Muy soluble
Aluminio de talio	52238-56-9	TlAl(SO ₄) ₂ *12H ₂ O	639.66	91	Sin datos	117.8
Bromuro de talio(I)	7789-40-0	TlBr	284.29	480	815	0.5
Carbonato de talio(I)	29809-42-5	Tl ₂ CO ₃	468.78	273	Sin datos	40.3 (15.5°C)
Cloruro de talio(I)	7791-12-0	TlCl	239.84	430	720	2.9
Tricloruro de talio (III)	13453-32-2	TlCl ₃	310.74	25	Se descompone	Muy soluble
Nitrato de talio(I)	10102-45-1	TlNO ₃	266.39	206	430	95.5 (20°C)
Nitrato de talio(III) tri-hidratado	13453-38-8	Tl(NO ₃) ₃ *3H ₂ O	444.44	105-107	Se descompone	Sin datos
Oxido de talio(I)	1314-12-1	Tl ₂ O	424.77	596	Sin datos	Soluble
Oxido de talio(III)	1314-32-5	Tl ₂ O ₃	456.76	717	875	Insoluble
Selenito de talio(I)	12039-52-0	Tl ₂ SeO ₃	535.72	Sin datos	Sin datos	Sin datos
Sulfato de talio(I)	7446-18-6	Tl ₂ SO ₄	504.82	632	Se descompone	48.7

* CAS RN; del inglés Chemical abstracts service registry number (modificado de IPCS 1996, EPA 2009)

Daño y reparación del ADN

El proceso biológico de la reproducción requiere la transmisión fiel de la información genética de padres a hijos; aquí lo esencial es la replicación exacta del ADN genómico para la vida, en donde, las células han desarrollado mecanismos para corregir los errores al que algunas veces se generan durante la replicación del ADN y para reparar los daños que puedan surgir por la acción de algunos agentes ambientales, los cuales podrían causar irregularidades y por consiguiente fallas con consecuencias desastrosas (Cooper y Hausman 2008).

La replicación del ADN es un proceso semiconservativo, ya que cada hebra parental sirve como molde para la síntesis de una nueva hebra hija complementaria. La enzima principal implicada en este proceso es la ADN polimerasa, se encarga de catalizar la unión de los desoxirribonucleotidos 5'-trifosfatos para formar la cadena de ADN de nueva síntesis; sin embargo están involucradas otras proteínas, y son necesarios mecanismos de lectura para asegurar que la exactitud en la replicación se encuentra con la baja frecuencia de errores que se permiten en la reproducción celular (Alberts *et al* 2008, Cooper y Hausman 2008).

Los cambios en la estructura del genoma celular tiene mucha trascendencia; las mutaciones pueden surgir de la incorporación de bases incorrectas durante la replicación del ADN, también se producen diversos cambios espontáneos, o por resultado de la exposición a agentes químicos o radiación. Estos daños en el ADN pueden bloquear la replicación y para mantener la integridad de sus genomas, las células han desarrollado mecanismos de reparación de ADN (Cooper y Hausman 2008).

Los diferentes tipos de daño en el material genético pueden ser producidos por una gran variedad de factores, entre estos se encuentran: la acumulación de estrés ocasionado por la acción continua de genotóxicos endógenos o exógenos (Vaish 2007), la radiación ionizante, radiación no ionizante, pero algunos otros pueden ser productos de errores en la replicación o en la reparación del ADN; los cuales pueden producir rupturas de cadena sencilla, cadena doble, entrecruzamientos entre ADN-

ADN o entre ADN-proteínas y la adición de un químico produce aductos con las bases del ADN, entre otros (Preston y Hoffman 2008).

El daño al ADN es un evento muy común en la vida de una célula, además de ser base fundamental para la evolución, pero se ha comprobado que una inadecuada reparación puede dar lugar a mutaciones, muerte celular, muerte del tejido u órgano involucrado, proliferación descontrolada e incluso cáncer (Valencia-González 2012). La inestabilidad genómica es una característica persistente en células tumorales y que se puede combinar con los efectos de ADN dañado, defectos en la reparación de ADN, además de no detener a la célula durante su ciclo antes de que sea capaz de transmitir el daño del material genético a las células hijas (Lord y Ashworth 2012).

Entre las respuestas que las células incluyen para reparar daños en su material genético se encuentran la activación de puntos de control de daño, lo que detiene la progresión en el ciclo celular con el fin de permitir reparar los daños y evitar su transmisión a las nuevas células; la restauración conserva la integridad del ADN y la apoptosis como mecanismo de eliminación de las células seriamente dañadas (Lord y Ashworth 2012).

Algunos químicos pueden producir daños tanto directamente, reaccionando con el ADN, como un aducto; o indirectamente, como una intercalación entre pares de bases; algunos otros daños producidos por esos compuestos se observan como la alquilación de bases, las cuales pueden a su vez estimular a la pérdida de bases dentro de las cadenas ADN formando así sitios llamados comúnmente sitios AP, los cuales pueden ser apurínicos o apirimídicos; puede también observarse, que una inadecuada reorganización después de una ruptura de ADN formando una ruptura de cadena doble, puede ocasionar una mutación y tal vez un reacomodo de manera estructural en el genoma (Lord y Ashworth 2012). Estos agentes exógenos aunados a los endógenos son causantes de esos tipos de daño sobre el ADN, pero también pueden ocurrir de manera espontánea.

Mecanismos de reparación del ADN

El mantenimiento de la integridad del genoma y del funcionamiento normal de las células, como ya se mencionó, son el papel fundamental de los diferentes mecanismos de reparación del ADN los que proveen una robusta defensa a la célula; así como también, estos procesos son de gran impacto en la disminución de los cambios e incrementos de células transformadas por alteraciones en su expresión génica (Vaish 2007, Díaz y Domínguez 2010). Es aquí donde la célula se enfrenta a un gran problema; es decidir cómo solucionar el daño presente en el ADN, si el daño ocasionado es extenso puede experimentar la muerte celular programada; o de lo contrario, las células pueden activar la gran batería de mecanismos de reparación regresando el ADN a su “estado libre de daño”.

Los mecanismos de reparación se rigen en su mayoría en principios básicos, el reconocimiento del daño ocasionado, retirar el fragmento dañado, la reparación y por último ligar la reparación con el material original; pero para que todos estos pasos se cumplan, las células generan una gran modificación en complejos de proteínas necesarias para localizar, iniciar y concluir con los procesos.

Algunas de las características generales de estos mecanismos son:

Reparación por escisión de bases. Es uno de los principales mecanismos, actúa para remover las bases dañadas de la cadena de ADN, las cuales son remplazadas por síntesis de ADN nuevo (Lord y Ashworth 2012). Este proceso es catalizado por la ADN glicosilasa, formando así un sitio apirimídico o apurínico; estos sitios son reparados por la ADN endonucleasa, que rompe los puntos adyacentes a los sitios AP. La desoxirribosa restante por tanto se elimina, y el espacio resultante es rellenado por la ADN polimerasa y unido por un ADN ligasa (Preston y Hoffman 2008).

Reparación por escisión de nucleótidos. Este mecanismo proporciona a la célula la capacidad de eliminar las lesiones voluminosas de ADN; utiliza cerca de 30 proteínas para quitar un oligonucleótido, que contenga daños del ADN. Está se

considera de vital importancia por tener un vínculo con la transcripción de posibles genes activos, de aquí que la célula enfatice la rápida reparación de estos y así mantener la integridad del mismo proceso de transcripción (Vaish 2007, Preston y Hoffman 2008).

Por ejemplo, cuando la lesión se encuentra en el sitio de un gen activo dentro de la cadena en transcripción, el ADN polimerasa se detiene, lo que inicia un complejo de señales para reclutar al mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, donde un complejo resulta de vital importancia, el factor de transcripción basal, lo que a su vez proporciona especificidad a las incisiones de la cadena de ADN que son necesarias para quitar el nucleótido dañado, después el espacio vacío es llenado por una polimerasa, para posteriormente ser unidos por la ADN ligasa para completar el ciclo (Preston y Hoffman 2008).

Reparación por recombinación. La presencia de cromosomas fragmentados en la célula compromete seriamente la supervivencia, ya que de no ser detectado en cualquier fase del ciclo celular puede inducir muerte celular programada. La célula desarrolló mecanismos de reparación que involucran arreglos específicos los cuales permitan la recuperación del material genético a nivel de reparación de la cadena doble del ADN, estos sistemas son: la recombinación homóloga y la recombinación no-homóloga (Vaish 2007, Preston y Hoffman 2008).

- **Recombinación homóloga.** Es un mecanismo de reparación de rupturas en cadena doble. Consiste en invadir la hebra de la cadena intacta por la cola de su cadena complementaria rota, al sintetizar ADN se forma una unión llamada "Holliday", seguida de una separación y posterior unión, con esto regresar las cadenas completas e intactas (Preston y Hoffman 2008)
- **Recombinación no-homóloga.** El ensamblaje de uniones no-homologas se basa en realizar la reparación en las cadenas de ADN sin tener una hebra molde que sirva para reorganizar el material genético y solo lo organiza

teniendo pequeñas similitudes entre los fragmentos; aunque aún no se conocen todos los procesos que influyen en este tipo de reparación de las células, sin embargo, este mecanismo tiende a provocar errores al modificar la información al momento de la reorganización (Vaish 2007, Preston y Hoffman 2008).

Así como los mecanismos de reparación son activados por diferentes factores para interactuar con el material genético, el daño y los mecanismos para eliminar los errores acumulados (Figura 2); existen también diversos tipos de errores o fallas dentro de los mismos mecanismos de reparación los cuales como consecuencia ocasionan una gran cantidad de problemas dentro de las células, así como patologías para el organismo, ejemplo de esto, es la proliferación desmedida y transformación de las células madre, en células tumorales (Vaish 2007, Valencia-González 2012).

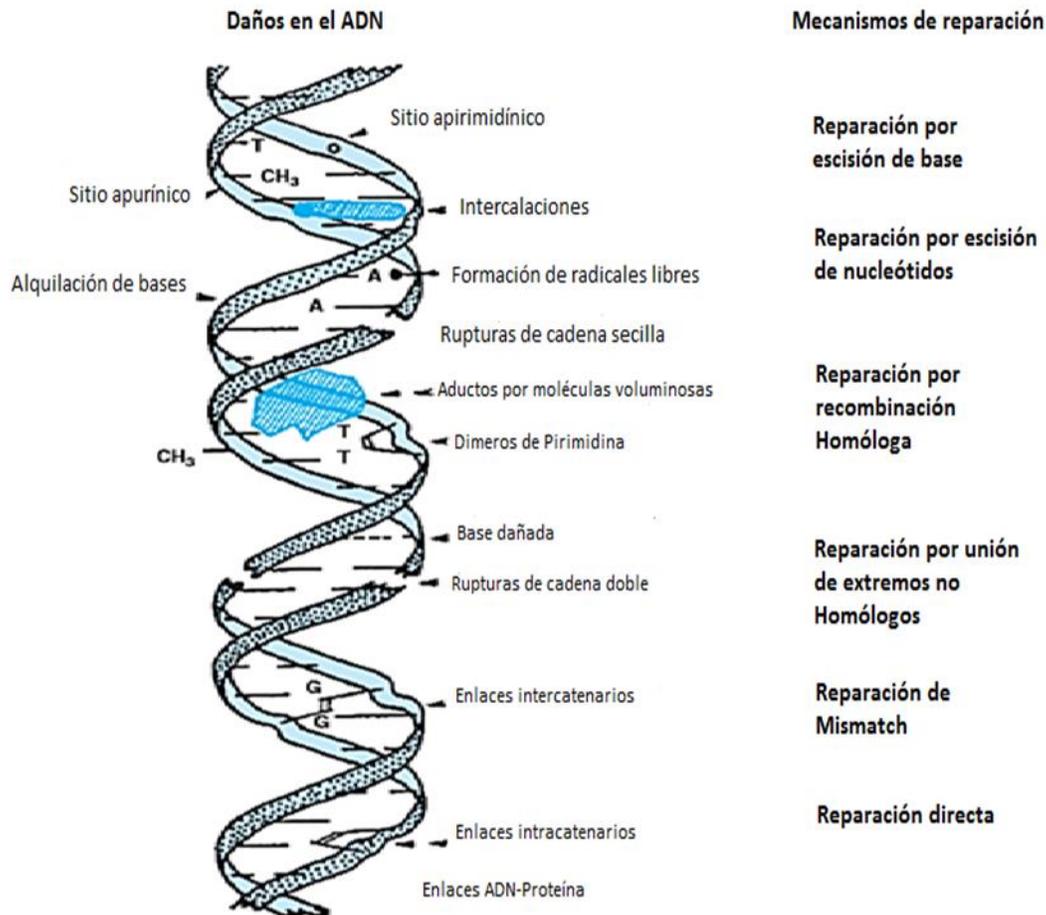


Figura 2. Daño al ADN inducido por agentes físicos y químicos, además de los diferentes mecanismos por los que se pueden reparar (tomado y modificado de Preston y Hoffman 2008).

Marcadores de Daño al material genético

Dentro de los marcadores biológicos más utilizados para evaluar efectos mutagénicos, clastógenos y de daño al ADN se encuentran el análisis de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas (AC) tanto numéricas como estructurales, la hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), el método de micronúcleos (MN), el análisis de aductos en proteínas, mutaciones en el gen hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) y daño en el ADN como aductos, entrecruzamientos, rupturas de cadenas, sitios alcalino lábiles (Albertini *et al* 2000), o bien cambios en la fidelidad de la síntesis de ADN o alteraciones en la

reparación del material genético (Tice *et al* 1990, Rojas *et al* 1999, Cavallo y Ursini 2007, Rodríguez-Mercado *et al* 2011). En donde los modelos de células en cultivo, son también muy recurridos por presentar ciertas ventajas como lo es obtener resultados en corto tiempo de agentes químicos con posible actividad genotóxica (Florín-Ramírez 2005).

Ensayo cometa

La electroforesis unicelular en gel a condiciones alcalinas o “ensayo cometa”, es una metodología con la que se puede evaluar el daño al ADN, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. La técnica fue descubierta por primera vez por Ostling y Johanson en 1984 y se basa en detectar y cuantificar rupturas de cadena sencilla en células independientes, embebidas en agarosa, lisadas y posteriormente sometidas a una electroforesis en condiciones alcalinas; teñidas con yoduro de propidio y observadas usando imágenes fluorescentes y en el caso de daño una migración de ADN (revisado en Olive y Banáth 1993).

Puede realizarse una gran variedad de células que se encuentren en proliferación o también quiescentes (fase G₀). Además de ser utilizado como biomarcador en medicina, biología, patología, en monitoreo ambiental y ocupacional; y especialmente como un indicador de eventos moleculares-celulares en los sistemas biológicos, ya que puede encontrarse la relación entre el riesgo ambiental y los efectos en la salud humana. Estos biomarcadores reflejan la exposición a genotóxicos en particular el daño al ADN y la reparación del mismo (Rojas *et al* 1999, Dusinska y Collins 2008, Collins 2009).

La técnica es relativamente rápida, simple y altamente sensible. Consiste en desnaturalizar al ADN en medio alcalino, donde al someterlo a la electroforesis el material fragmentado se desplaza desde el núcleo hacia el ánodo bajo la corriente del campo eléctrico, adoptando la forma de cometa, con su cabeza y su estela. El desplazamiento que puede ser medido con la escala ocular adaptada al microscopio o bien con el analizador de imágenes (Singh *et al* 1988, Tice *et al* 1990 y 2000). Puede analizarse visualmente, asignando a los cometas una categoría, de 0 a 4,

dependiendo de la longitud de migración del ADN o de la intensidad de la estela en un análisis de la imagen mediante un programa diseñado para tal acción (Figura 3); con un mínimo de 100 células a analizar por muestra, por concentración (Dusinska y Collins 2008).

Es capaz de identificar daño sobre el ADN que pueda ser inducido por agentes químicos incluyendo intercalantes, alquilantes y oxidantes. Se ha reportado que los rompimientos de cadena pueden ser producidos por la interacción directa o indirecta de compuestos químicos con el ADN, los cuales son capaces de producir toxicidad en el genoma. Se conoce además, que los iones metálicos inducen lesiones tales como rompimientos de cadena sencilla y doble, sitios apurínicos o apirimídicos (sitios sensibles al álcali), entrecruzamientos ADN-ADN, ADN-proteínas y modificaciones en las bases, pero también la fragmentación de la cadena de ADN que ocurre en el curso de reparación de las lesiones (Rojas *et al* 1999, Cavallo y Ursini 2007, Dusinska y Collins 2008).

Desde en el punto de vista más objetivo al relajar el ADN y someterlo a electroforesis es posible detectar diferentes tipos de lesiones; por ejemplo, al someter el ADN a electroforesis con pH 7.8 a 10 se facilita la detección de fragmentos de doble cadena; mientras que al someterlos a pH mayor a 12.6 se logran expresar sitios alcalinos lábiles además de las lesiones en cadena sencilla y reparaciones incompletas (Miyamae *et al* 1997).

Gracias a las características que posee la electroforesis unicelular en gel se ha usado para evaluar la capacidad de cualquier célula de reparar el ADN dañado incluyendo rupturas de cadena sencilla y cadena doble, según la versión que sea utilizada. Además, de tomar en cuenta que la reparación en células normales puede ocurrir dentro de los primeros 15 minutos y completar alrededor de los 60 o 120 minutos después de ocurrido el daño (Tice *et al* 1990, Rojas *et al* 1999).

Entre las ventajas que esta técnica posee, se encuentra que pueden coleccionar datos a nivel de células individuales, se requieren números pequeños de muestra, puede ser usada en cualquier tipo celular, los datos se pueden recolectar en tiempos

cortos, se puede evaluar datos de ADN dañado en células que no se encuentran en proliferación, por mencionar algunas (Rojas *et al* 1999).

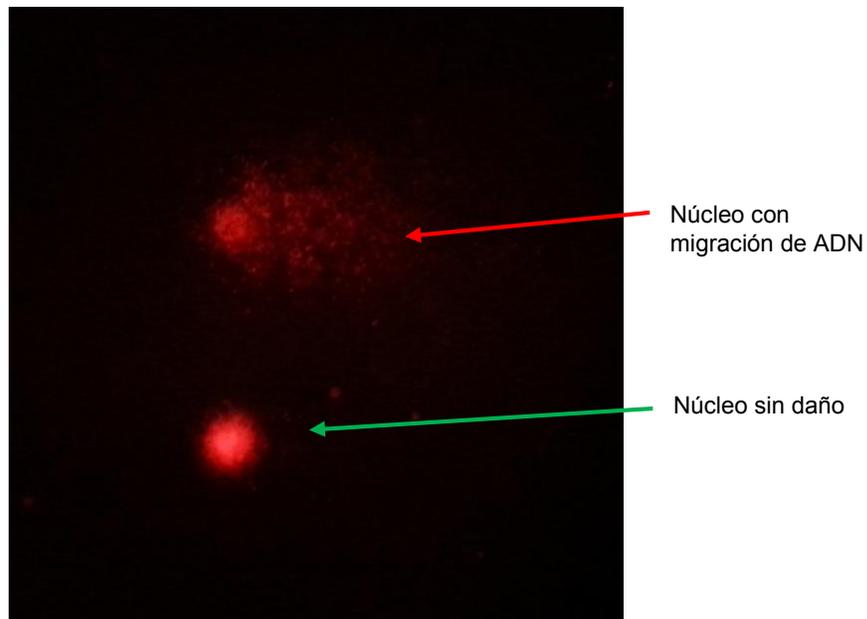


Figura 3. Fotografía de núcleos de linfocitos con daño y linfocitos sin daño. (Tomada al microscopio de fluorescencia con aumento de 40x).

JUSTIFICACIÓN

El aumento en las concentraciones del TI y sus compuestos, así como la toxicidad que estos ejercen sobre el humano y los organismos se encuentra bien documentada. Diversos autores lo describen como un agente capaz de producir diversas alteraciones, ingresando al organismo por los mismos mecanismos mediante los cuales entran cationes esenciales como el sodio y potasio, lo que le facilita al TI la interacción con biomoléculas y de esta manera producir cambios en procesos celulares; sin embargo a pesar de eso, los estudios que evalúan sus efectos a nivel genético aún son escasos y sus resultados son poco concluyentes.

De lo anterior surge la necesidad de estudiar cómo es que el talio(I) ocasiona daño al ADN en un modelo *in vitro*, como lo son los leucocitos humanos, así mismo, conocer la capacidad de las células para reparar este daño.

HIPOTESIS

La toxicidad del TI y sus compuestos es ampliamente reconocida, algunos autores ponen al TI como un agente inductor de daño genético. Por lo que si se exponen *in vitro* leucocitos humanos aislados de sangre periférica a talio(I) se detectaran diferentes tipos de lesiones en el ADN, las cuales se espera sea reparadas por las células.

OBJETIVOS

General

- Estimar el daño al ADN inducido por el acetato de talio(I) en concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, sobre leucocitos humanos de sangre periférica y determinar la capacidad de reparación de las células mediante una cinética de reparación.

Particulares

- Aislar leucocitos humanos de sangre periférica, determinar su densidad por mL y realizar los tratamientos con las diferentes concentraciones de acetato de talio(I).
- Determinar la viabilidad de las células no tratadas y tratadas con acetato de talio(I).
- Valorar la capacidad del acetato de talio(I) de inducir rupturas de cadena sencilla sobre el ADN utilizando electroforesis unicelular en gel a $\text{pH} > 13$.
- Determinar mediante la cinética de reparación la capacidad de las células de recuperarse del daño al ADN inducido por el acetato de talio(I).
- Estimar la capacidad del acetato de talio(I) de inducir rupturas de cadena doble sobre el ADN utilizando electroforesis unicelular en gel a $\text{pH} 9$.
- Realizar una comparación sobre la inducción de rupturas de cadena sencilla vs cadena doble, producidas por el acetato de talio(I) en las diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y tratamientos de leucocitos

Se extrajo sangre periférica por venopunción con una jeringa heparinizada, de dos donadores no fumadores y sin antecedentes recientes de exposición a fármacos; en tubos cónicos se colocaron 4 mL de sangre con 3 mL de amortiguador fosfato salino, vertiendo la mezcla en tubos con 4 mL de solución polisucrosa (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich St Louis, MO) de densidad conocida. Después por centrifugación durante 35 min a 1500 rpm, se recuperó la fracción de células blancas, se hizo un conteo para sembrar 500 mil células en tubos eppendorf en volumen total de 1 mL de medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C y el acetato de talio(I) en concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. El acetato de talio(I) fue obtenido de los laboratorios Riedel-de Haën (CAS no. 563-68-8; Munich, Alemania), con pureza de 97%. Después de 1 h de tratamiento, las células se colectaron por centrifugación a 4000 rpm durante 4 min. El botón celular se utilizó para realizar las siguientes pruebas.

Viabilidad

En todos los casos la viabilidad de los cultivos de leucocitos tratados se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocaron los paquetes celulares en tubos para microcentrifuga y se adicionaron 15 µL de una solución de trabajo 1:1 preparada a partir de la mezcla de 0.025 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich St Louis, MO) y de 0.125 µg/mL de diacetato 5-6 carboxifluoroceína (Sigma-Aldrich St Louis, MO); haciendo dos lavados después de 10 min con 1 mL de medio RPMI 1640, posteriormente se realizaron las preparaciones y se analizaron al microscopio de fluorescencia, diferenciando células que metabolizaron el diacetato 5-6 carboxifluoroceína que emiten una fluorescencia verde (células viables), de células que presentan daños en las membranas y permitieron que el bromuro de etidio se intercale con el ADN, emitiendo una fluorescencia naranja (células no viables).

Electroforesis unicelular en gel

La técnica para evaluar el daño al ADN en células individuales, que se utilizó en este trabajo es la misma descrita por Singh *et al* (1988) y Tice *et al* (1990). Donde láminas para microscopio se cubrieron con agarosa de punto normal de fusión al 1% (Sigma-Aldrich St Louis, MO), posteriormente se colocó una segunda capa, la cual contenía la mezcla del botón celular con la agarosa de punto bajo de fusión al 0.5% (Sigma-Aldrich St Louis, MO) 75 μ L en total, seguida de una tercera capa, con 85 μ L de agarosa de bajo punto. En cada paso se colocó un cubre objetos para obtener una capa homogénea, removiéndolo al solidificar cada capa.

Después las laminillas se sumergieron en una solución de lisis preparada al momento (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10) con dimetil sulfóxido al 10% y tritón X-100 al 1%, por aproximadamente 24 h a 4°C. Después se colocaron en la caja horizontal de electroforesis, donde se dejó desenrollar el ADN en solución amortiguadora (NaOH 300 mM y Na₂-EDTA 1 mM) por 20 min. La electroforesis se llevó por 20 min a 25 V y 300 mA. Todos los pasos anteriores de la técnica fueron llevados a cabo con luz amarilla, de forma indirecta.

Al final las preparaciones se llevaron a una solución neutralizadora de Tris (0.4 M a pH 7.5), realizando dos cambios de 5 min, respectivamente. Posteriormente las preparaciones fueron deshidratadas en dos cambios de 5 min con etanol al 70% y el secado se completó al aire.

Cinética de reparación

Para observar la capacidad de las células de reparar lesiones inductoras del daño al ADN y detectarlas por la EUG en gel, se hizo lo siguiente: tras el término de la exposición las células se lavaron en dos ocasiones con medio RPMI 1640 a 37°C, después de lo cual se tomaron alícuotas en diferentes tiempos donde la primera es tomada como el tiempo 0 (0 h); el resto de las células se dejaron en incubación, colectándolas a las 0.5, 1, 3 y 24 h siguientes y se realizó la técnica de electroforesis a pH >13, de acuerdo con Rodríguez-Mercado *et al* (2011).

Rupturas de cadena doble de ADN

Para evaluar las rupturas de cadena doble, los leucocitos tratados por 1 h con el compuesto de TI en concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fueron colectadas y se realizaron las preparaciones en las laminillas preparadas previamente con agarosa. Después de 1 h en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 nM, Tris 10mM, a pH 10 con DMSO al 10% y Tritón X-100 al 1%), las preparaciones se lavaron con medio RPMI 1640 y se incubaron a 37°C por 1 h en solución nueva de lisis sin detergentes (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10) enriquecida con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARNasa (Sigma-Aldrich St Louis, MO). Al terminar este tiempo las láminas se sumergieron en una nueva solución de lisis a 37°C sin detergentes, pero suplementada con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínasa K (Sigma-Aldrich St Louis, MO) durante 1 h. Transcurrido el tiempo las laminillas se llevaron a las cámaras de electroforesis, tomando el procedimiento según Tice *et al* (2000), con un amortiguador de Tris (100 mM) y acetato de sodio (300 mM) a pH 9, ajustado con ácido acético glacial; dejándolas en equilibrio durante 20 min y la electroforesis fue llevada durante 1 h a 12 V y 100 mA (Rodríguez-Mercado 2006, Rodríguez-Mercado *et al* 2011).

Valoración de daño al ADN

Para la estimación de los rompimientos, se realizó la tinción de los núcleos con 75 μL de bromuro de etidio una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fueron observados al microscopio de fluorescencia (filtro de excitación de luz de 450-490), con una escala ocular para medir los núcleos y la migración del ADN a 400 aumentos. La evaluación se realizó en los experimentos por duplicado analizando 200 células por experimento, cuantificando los núcleos intactos y los núcleos con daño o “cometas”.

Además, para cada parámetro analizado (viabilidad, cinética de reparación y rupturas de cadena doble) se contó con dos donadores, por duplicado y con cultivos testigo: un testigo negativo donde solo se mantuvo a células sin tratar y un testigo positivo donde se trataron a las células durante 15 min con 150 μM de peróxido de hidrógeno.

Análisis Estadísticos

Los datos de viabilidad se encuentran expresados como la media y su desviación estándar, estos se sometieron a una prueba estadística de *Ji* cuadrada. Los datos de la electroforesis unicelular en gel, se muestran con la media y su desviación estándar, se analizaron por un análisis de varianza seguido por una prueba de Tukey (Rojas *et al* 1999, Jaramillo-Cruz 2011).

RESULTADOS

Viabilidad

Los resultados de la viabilidad se muestran en el Cuadro II y en el Cuadro IV; los datos son el promedio de dos donadores varones de 18 y 23 años (donador A y B, respectivamente), sin antecedentes de exposición reciente a drogas o radiación terapéutica. La viabilidad celular fue evaluada a las 0, 0.5, 1, 3 y 24 h después de 1 h de exposición a 1, 10 o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acetato de talio(I). En material y métodos se explicó que se contó con dos testigos uno negativo, al que no se le aplicó ningún tratamiento y otro positivo, que fue tratado con 150 μM de peróxido de hidrógeno por 15 min, es importante mencionar lo anterior debido a que los datos del testigo positivo solo son de referencia y no se muestran en los cuadros.

En el Cuadro II, se puede observar que la viabilidad tiende a disminuir de manera dependiente de la concentración en los distintos tiempos de evaluación con diferencia significativa en la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05, 0.01$) y en 3 h en la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$) del tratamiento con TI, respectivamente.

En el Cuadro IV, se muestran los datos de viabilidad de las evaluaciones de daño al ADN de cadena doble y se puede observar que disminuye el porcentaje de células viables hasta en un 22% en 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del tratamiento con TI ($P < 0.01$).

Durante el estudio de cinética de reparación y el análisis de las rupturas de doble cadena, la viabilidad celular en los tratamientos con peróxido de hidrógeno siempre estuvieron abajo del 72% ($P < 0.01$).

Cinética de reparación

En el Cuadro III, así como en las figuras 3, 4 y 5 se pueden apreciar los efectos que produce el acetato de talio(I) sobre la cinética de reparación en los leucocitos humanos tratados durante 1 h. Los resultados se expresan con el promedio de la longitud del cometa (de los dos donadores) para los distintos tratamientos y los tiempos de recuperación. Como se mencionó anteriormente, en viabilidad celular, se contó con dos testigos, de los cuales solo se presentan en el cuadro los datos

del testigo negativo. En cuanto a los valores del testigo negativo a lo largo de los tiempos de evaluación, de 0 a 24 h, como era de esperarse estos se mantienen constantes.

Los resultados de las evaluaciones muestran que el TI es capaz de incrementar la cantidad de lesiones al ADN (Cuadro III, Figuras 4 y 5) de manera dependiente de la concentración después del tratamiento (tiempo 0 h) y durante los tiempos de recuperación (0.5, 1, 3 y 24 h), donde las diferencias estadísticas se dan prácticamente en todos los tratamientos con la sal de TI y en todos los tiempos de recuperación. Asimismo, el número de células con daño en su material genético se incrementa conforme la concentración (Figura 6), datos que no muestran comportamiento dependiente de la concentración en los tiempos de recuperación de 0.5 a 24 h, es decir, el porcentaje de células dañadas durante la recuperación, no disminuye de manera considerablemente, excepto en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h después de retirado el tratamiento con el acetato de talio(I), comparado con el tiempo 0 h ($P < 0.05$) y además el tratamiento de 100 $\mu\text{g/mL}$, donde se observa disminución de la longitud del cometa pero no en el porcentaje de células con daño.

De manera general, los resultados muestran que la longitud de los cometas de células expuestas al acetato de talio(I), en ninguna de las concentraciones, ni tiempos de recuperación muestran valores que asemejen a su testigo negativo.

Las longitudes de los cometas, evaluadas en los testigos positivos durante la cinética de reparación muestran que para todos los tiempos, su comportamiento se encuentra en promedio entre 70 a 75 μm de longitud y con un porcentaje de células dañadas superior a 50%.

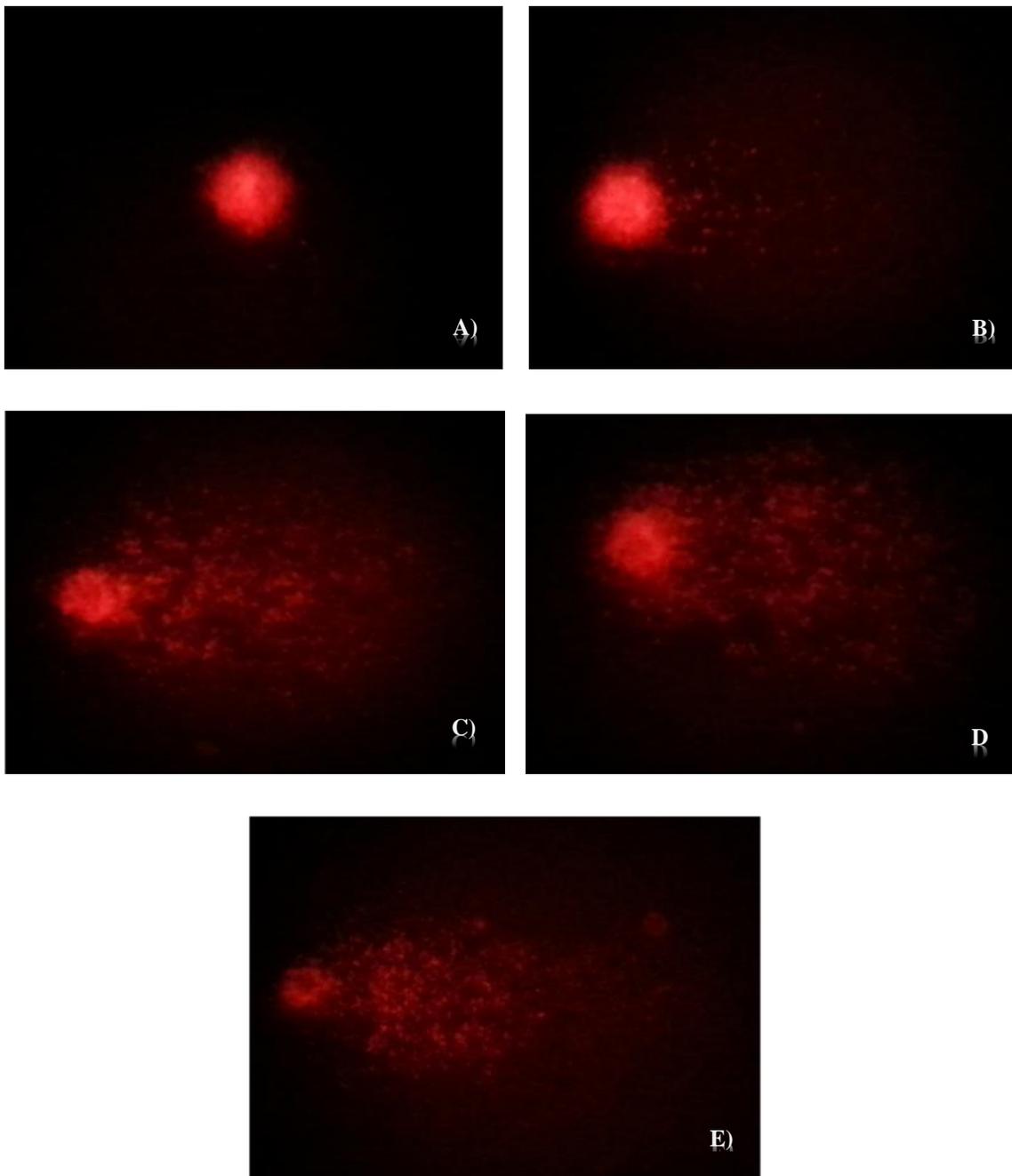


Figura 4. Núcleos de linfocitos humanos sin daño (A) y núcleos con migración del ADN dañado (B - E), tratados por 1 h con acetato de talio(I), durante la evaluación de la cinética de reparación.

Cuadro II. Viabilidad celular de leucocitos humanos tratados 1 h con acetato de talio(I)

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/mL	Porcentaje de viabilidad ± DE (disminución de la viabilidad)			
	Tiempo 0 h	Tiempo 0.5 h	Tiempo 1 h	Tiempo 24 h
0	96.50 ± 1.41	94.87 ± 2.29	96.37 ± 0.17	93.25 ± 0.35
1	91.25 ± 0.35 (5.44)	89.62 ± 2.29 (5.53)	90.75 ± 0.70 (5.83)	88.00 ± 1.41 (5.63)
10	84.75 ± 1.06 (12.17)	82.37 ± 3.35 (13.17)	84.75 ± 0.00 (12.05)	80.00 ± 2.82 ^a (14.2)
100	78.75 ± 6.01 ^b (18.39)	77.87 ± 1.23 ^b (17.91)	80.37 ± 2.29 ^b (16.60)	77.00 ± 2.82 ^b (17.42)

DE, desviación estándar de la media.

Prueba de ji cuadrada: ^a P < 0.05 v ^b P < 0.01, comparado con su testigo.

Cuadro III. Estimación del daño al ADN durante la cinética de reparación de los leucocitos humanos de sangre periférica tratados 1 h con acetato de talio(I)

Tratamiento con CH ₃ COOTl en µg/mL	Longitud del cometa en µm (porcentaje de células dañadas)			
	Tiempo 0 h	Tiempo 0.5 h	Tiempo 1 h	Tiempo 24 h
0	31.99 ± 0.65 (19.5)	33.28 ± 5.71 (18.5)	32.55 ± 6.59 (16.75)	33.99 ± 6.26 (19)
1	35.47 ± 3.77 (46.25)	43.85 ± 6.75 ^b (46.25)	46.83 ± 7.67 ^b (64)	48.92 ± 1.54 ^b (47.5)
10	46.02 ± 4.07 ^b (52.5)	50.84 ± 5.93 ^b (58)	51.78 ± 9.24 ^b (46)	51.66 ± 4.91 ^b (51)
100	70.55 ± 9.61 ^b (57)	59.62 ± 5.57 ^b (46.25)	65.59 ± 13.91 ^b (54.25)	63.33 ± 3.61 ^b (49.75)

DE, desviación estándar de la media.

Prueba de ANOVA-Tukey: ^a P < 0.05 v ^b P < 0.01, comparado con su testigo.

Prueba de ji cuadrada ^d P < 0.05, comparado con el tiempo 0 h

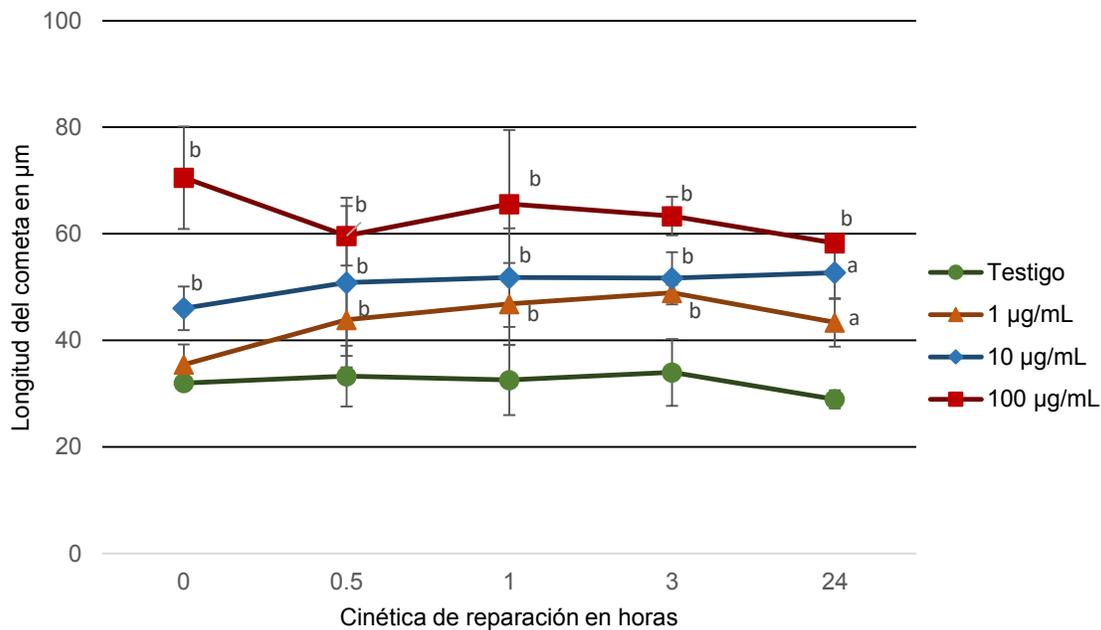


Figura 5. Cinética de reparación de los leucocitos humanos tratados con distintas concentraciones de acetato de talio(I) (Prueba de ANOVA-Tukey: con ^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.01$, comparado con su testigo)

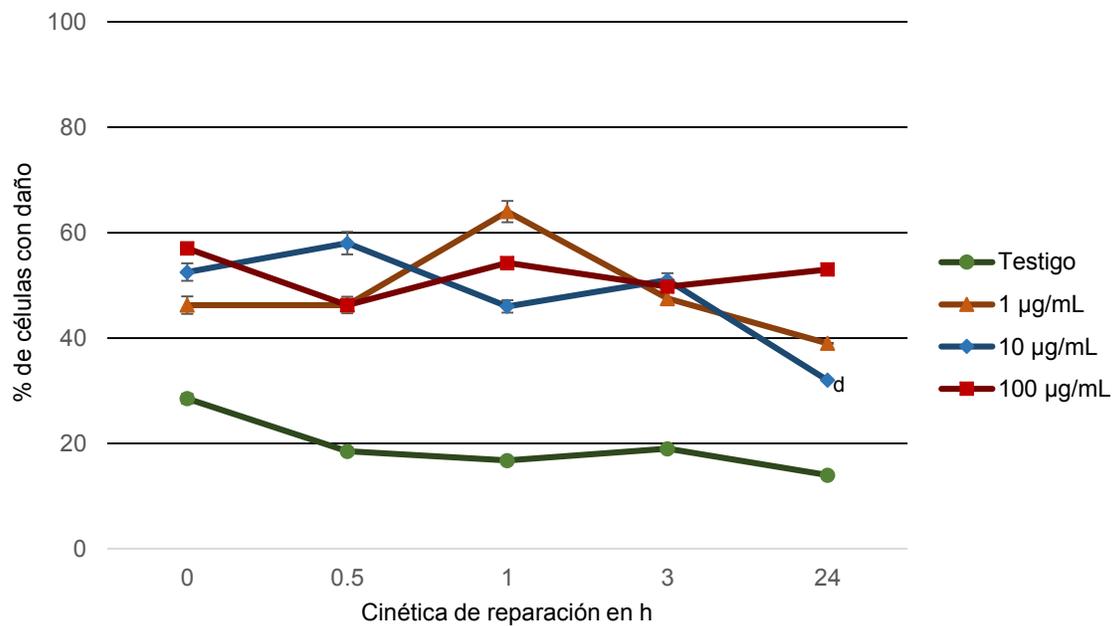


Figura 6. Porcentaje de células dañadas durante la cinética de reparación de los leucocitos humanos tratados a distintas concentraciones de acetato de talio(I) (Prueba de ji cuadrada: ^d $P < 0.05$, comparado con el tiempo 0).

Cadena doble

Las estimaciones de rupturas de cadena doble se muestran en el Cuadro IV y en las figuras 7 y 8. En la figura 8, se pueden apreciar los datos de los dos donadores y el promedio de los mismos. En el cuadro se observa que los datos no presentan cambios significativos en los valores de la longitud del cometa ni en el porcentaje de las células con daño al comparar los grupos tratados con TI y el grupo testigo negativo.

En la figura 8 además se muestran los testigos positivos, dado que son los primeros resultados descritos para este compuesto y por lo tanto se requiere realizar la comparación de los datos obtenidos con ambos testigos, negativo y positivo.



Figura 7. Fotografía de núcleos evaluados con la electroforesis a pH 9

Cuadro IV. Estimación de daño al ADN de cadena doble inducidas en leucocitos humanos tratados 1 h con acetato de talio(I)

Tratamiento con CH_3COOTI en $\mu\text{g/mL}$	Longitud del cometa en $\mu\text{m} \pm \text{DE}$ (porcentaje de células dañadas)	Porcentaje de viabilidad $\pm \text{DE}$
0	25.3 ± 0.11 (12.5)	95.50 ± 0.70
1	25.42 ± 0.41 (13.5)	92.00 ± 0.70
10	25.69 ± 0.33 (7.5)	84.75 ± 1.06
100	25.31 ± 0.11 (7.25)	77.25 ± 0.35^a

DE, desviación estándar de la media

Prueba de Ji cuadrada: ^a $P < 0.01$, comparado con el testigo

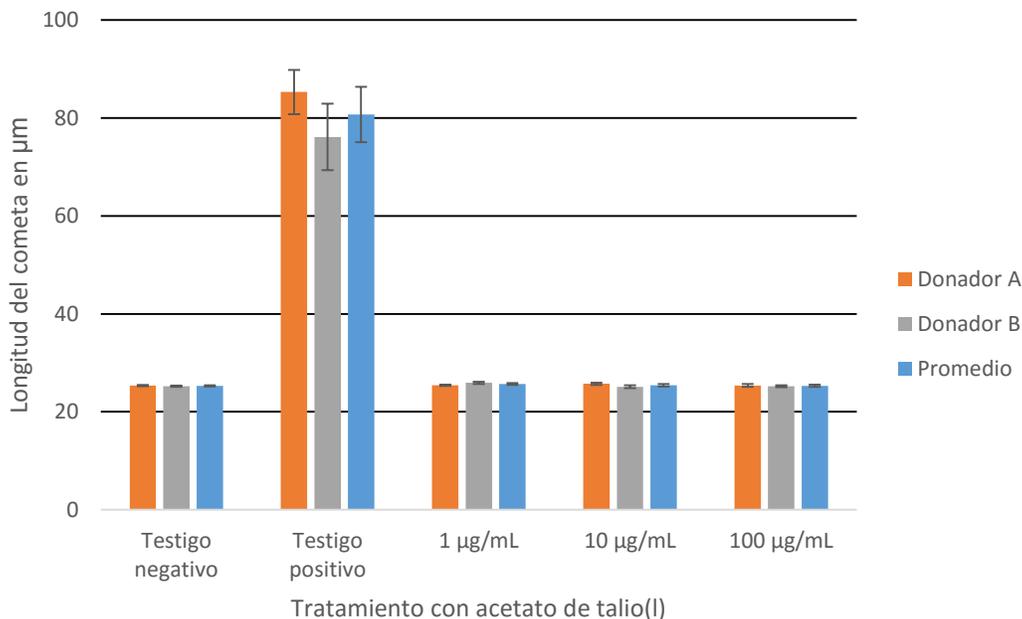


Figura 8. Migración del ADN dañado de cadena doble en leucocitos tratados con acetato de talio(I).

Rupturas de cadena sencilla vs rupturas de cadena doble

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en las dos versiones de la electroforesis unicelular en gel, a pH > 13 y a pH 9, donde los datos se muestran en las figuras 9, 10 y 11. En donde se pueden observar claros cambios entre las dos versiones del ensayo cometa, por un lado un incremento sobre las longitudes de los cometas durante la electroforesis alcalina a pH > 13 al tiempo 0, migración que no se induce en la otra versión. De igual manera, los porcentajes de células con daño únicamente se observan con la versión de pH alto, indicando que el compuesto solo es capaz de inducir rupturas de cadena sencilla.

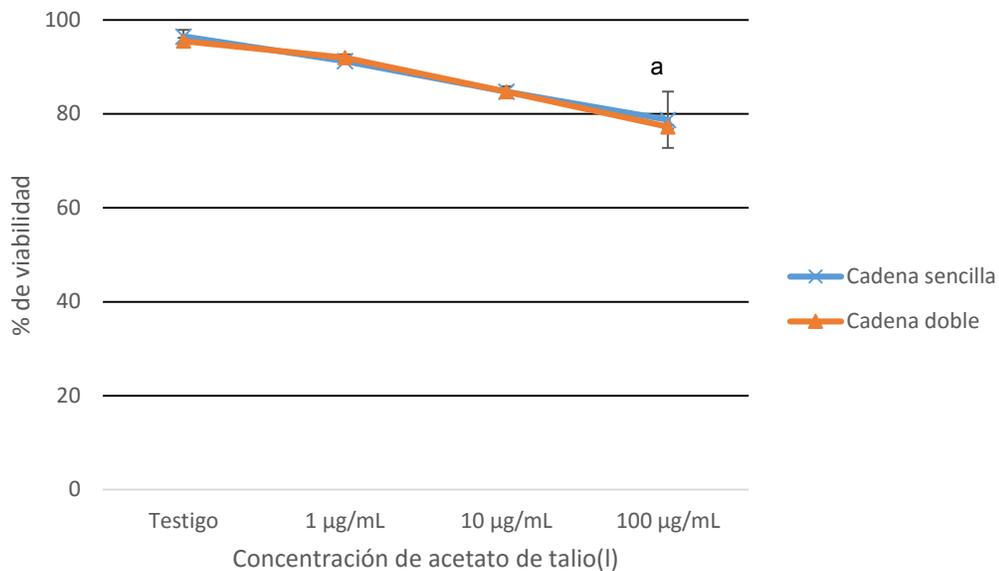


Figura 9. Porcentaje de viabilidad celular en las distintas concentraciones de TI, ensayo cometa pH>13 y pH 9 (Prueba de ji cuadrada: ^a $P < 0.05$, comparado con su testigo)

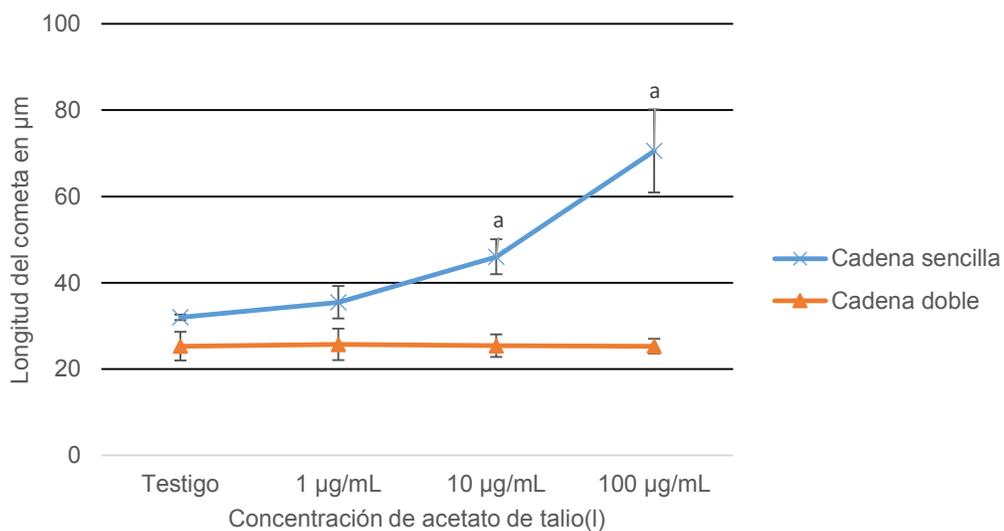


Figura 10. Longitud de la migración del ADN dañado en las distintas concentraciones de TI, ensayo cometa pH > 13 y pH 9 (Prueba de ANOVA-Tukey: ^a $P < 0.05$, comparado con su testigo)

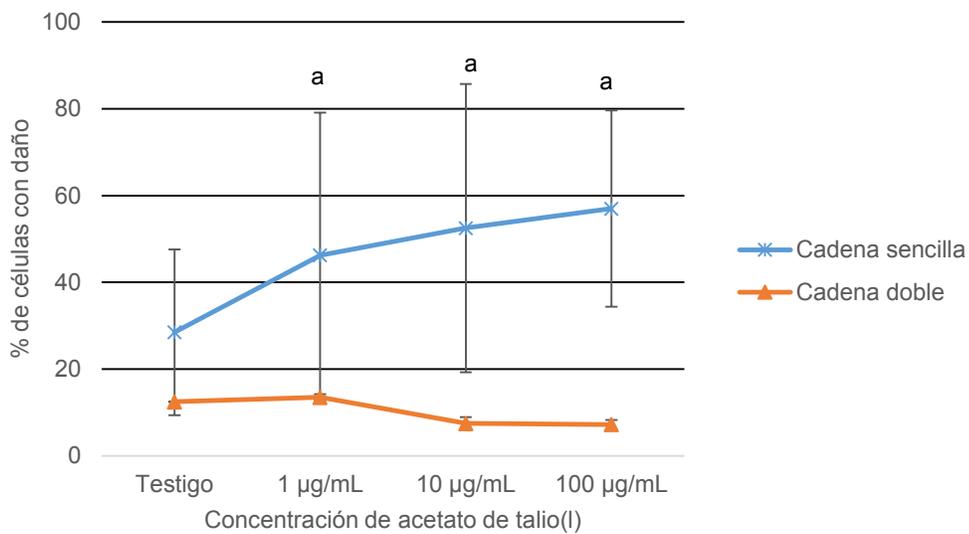


Figura 11. Porcentaje de leucocitos con daño inducido por acetato de talio(I), electroforesis alcalina vs electroforesis neutra (Prueba de Ji cuadrada: ^a $P < 0.05$, comparado con su testigo)

DISCUSIÓN

La toxicidad de los metales en los organismos se debe entre otros factores a que pueden acumularse en los tejidos provocando diversas alteraciones en las células y los componentes celulares. Entre los cambios que se han observado se encuentran alteraciones citogenéticas y sobre los procesos de reparación y replicación del ADN, así como mutaciones, daño primario sobre el ADN, entre otros, que pueden conducir a la inestabilidad del genoma, produciendo cambios en la progresión del ciclo celular y en casos extremos la muerte celular (Cipollini *et al* 2006, Gastaldo *et al* 2008, Preston y Hoffmann 2008).

El TI es uno de los metales pesados, del cual no se conocen todos los mecanismos por los cuales ejerce daño a las células y en específico sobre el ADN, pero es considerado como peligroso debido a su elevada toxicidad en los organismos, la cual es comparable con diversos metales clasificados en la misma categoría. Su concentración en el ambiente es calificada de riesgo para la población y la vida silvestre (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013, Wang *et al* 2013, Fan *et al* 2014), por esto es de gran importancia ampliar los estudios sobre efectos que produce.

Los estudios realizados con TI, utilizando diferentes modelos de prueba muestran que el metal se acumula en distintos tejidos y compartimentos celulares, donde baja la defensa antioxidante e incrementa daño oxidante de lípidos, proteínas y ADN (Babic *et al* 2009). Entre los organismos en los que se ha observado estos efectos se encuentran plantas como *Lemna minor* (Babic *et al* 2009), *Neosartorya fischeri* (Urik *et al* 2010), *Brassica oleracea* (Jia *et al* 2013), *Pimephales promelas* (Lapointe y Couture 2010) y *Ulva lactuca* (Turner y Furniss 2012).

La manera en que el TI entra en los organismos y los sistemas biológicos es por que compite con cationes monovalentes esenciales y de esta forma puede intervenir con varios procesos celulares (Gill *et al* 2005), por lo anterior en este trabajo de tesis se estudió el efecto de una sal de TI, que posee estas propiedades y de la cual se

desea conocer acerca del efecto que ocasiona, sobre el ADN, en células de mamífero y en particular en cultivos celulares.

La técnica más utilizada para conocer la citotoxicidad que inducen los agentes químicos, es la viabilidad celular. El uso de colorantes fluorescentes, los cuales facilitan la determinación entre células vivas y muertas, toma en cuenta la permeabilidad que poseen las membranas celulares para permitir la entrada a colorantes como el 5-6 diacetato de carboxifluoresceína, el cual es metabolizado en el interior de la célula, y cuyo producto emite coloración verde al contacto con luz; o que por lo contrario, cuando la membrana presenta algún tipo de fisura, permite la entrada de colorantes como el bromuro de etidio, el cual es un compuesto que actúa como intercalante con el ADN, emitiendo coloración naranja-rojiza (Jaramillo-Cruz 2011, Rodríguez-Mercado *et al* 2011).

Debido a las ventajas que ofrece esta técnica, durante el estudio de la cinética de reparación y la evaluación de rupturas de cadena doble, se logró observar la capacidad del acetato de talio(I) de inducir efectos de toxicidad celular, donde los resultados muestran que el compuesto es capaz de producir citotoxicidad en concentraciones de 100 µg/mL, efecto que se continua después de retirar el TI durante la cinética de reparación.

En un trabajo previo en el laboratorio empleando leucocitos de sangre completa (Rodríguez-Mercado *et al* 2015) se encontró que el acetato de talio(I) no modificó la viabilidad celular durante 1 h de exposición en concentraciones de 0.5 a 100 µg/mL, sin embargo el análisis citogenético reveló reducción significativa del índice mitótico y del índice de replicación, mismo efecto que se observó en linfocitos humanos tratados con sulfato de talio(I) y tricloruro de talio(III) (Mosqueda-Tapia 2012). Una de las diferencias por las cuales en el presente estudio se observó reducción de la viabilidad en la concentración de 100 µg/mL, con respecto a los estudios anteriores, es el haber empleado leucocitos aislados. Se sabe que los eritrocitos poseen la capacidad de almacenar iones metálicos (Kazantzis 1986, Repetto *et al* 1998), entre los que se puede encontrar el TI, lo que podría disminuir la cantidad que está en contacto con los leucocitos y en consecuencia no inducir toxicidad. Por lo que, al

exponer leucocitos separados de los eritrocitos, la concentración empleada en los cultivos es la que mantiene contacto directo con las células, y de esta manera revelar el efecto citotóxico en concentraciones en las que no se observa cuando se emplea sangre completa.

Otros estudios que apoyan nuestros resultados y ayudan a entender la disminución de la viabilidad en los tratamientos más altos con TI, son los de Chia *et al* (2005). Ellos encontraron en células de glioma C6 de murino, que el acetato de talio(I) en concentraciones de 2.63 a 2634 $\mu\text{g/mL}$ disminuye la viabilidad, produce arrestos en la fase G₂/M del ciclo celular y muerte por apoptosis. Efectos similares se han observado en líneas celulares de humano (Jurkat), en los que el acetato de talio(I) provoca cambios en la permeabilidad de las mitocondrias y muerte celular por apoptosis (Bragadin *et al* 2003).

Los iones Ti^+ y Ti^{3+} están relacionados con el aumento de peroxidación lipídica, oxidación del glutatión, el potencial para colapsar la membrana mitocondrial y activar la cascada de caspasas (Villaverde *et al* 2004, Pourahmad *et al* 2010, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013). Por lo arriba descrito, uno de los mecanismos por el cual el TI afecta la viabilidad y la proliferación, es la capacidad de aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno e interferir con el sistema de defensa de las células.

La técnica de EUG, ha sido utilizada ampliamente en estudios de toxicidad ambiental, carcinogénesis o en el biomonitoreo de agentes peligrosos. Es una metodología sensible para detectar daño y reparación al ADN en células individuales (Singh *et al* 1988, Collins 2014). Gracias a estas ventajas, es que la técnica fue utilizada en este estudio para estimar el daño y la reparación al ADN inducido por el TI.

Los resultados de la cinética de reparación muestran que después de 1 h de tratamiento el acetato de talio(I) incrementa la longitud de los cometas de forma dependiente de la concentración, sin embargo después de retirar el compuesto y dejar que las células reparen el daño, no se observó la recuperación completa. El

daño inicial que se observó ya ha sido reportado en otro estudio (Rodríguez-Mercado *et al* 2015) en el que se emplearon leucocitos de sangre periférica.

Como se mencionó en viabilidad, se conoce que los eritrocitos tienen la capacidad de capturar iones metálicos, entre los que se encuentra el TI; lo anterior permite explicar las diferencias encontradas en otros estudios en los que reportan daño al ADN a partir de concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ de acetato de talio(I) en sangre periférica completa (Rodríguez-Mercado *et al* 2015), en comparación con este estudio, en el cual se utilizaron leucocitos aislados y donde la estadística muestra diferencias desde la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ del mismo compuesto, lo que indica es que el acetato de talio(I) es capaz de inducir daño primario al ADN en concentraciones bajas como 1 $\mu\text{g/mL}$.

En relación a la reparación, algunos autores mencionan que en linfocitos, este proceso comienza en los 15 min después de haber sido inducido el daño por agentes químicos (p.e. peróxido de hidrogeno) y que el tiempo aproximado para que concluya es de 120 min (Singh *et al* 1988, Tice *et al* 1990). Aunque para el caso de la radiación ionizante, la cual se conoce que induce diferentes lesiones de cadena sencilla (sitios sensibles al álcali y oxidación de purinas o pirimidinas) y en menor número rupturas de doble cadena, en granulocitos y linfocitos de sangre humana, se encontró reducción del daño al ADN entre 180 y 240 min después de haber retirado las células de la radiación (Lankinen *et al* 1996, Cipollini *et al* 2006).

Estudios con otros metales tal como el vanadio (V), plomo (Pb) y cadmio (Cd), muestran en células de sangre periférica humana que el tiempo requerido para que se produzca la reparación por la exposición a estos agentes varía de 1.5 a 20 h; por ejemplo, cultivos de células expuestas a óxidos de V (V_2O_3 , V_2O_4 y V_2O_5 , de 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$) requieren entre 90 y 120 min para reparar el daño al ADN y aproximarse a los valores de los testigos (Rodríguez-Mercado *et al* 2003, 2011), en tanto que tratamientos con Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 100 μM) y Cd ($\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 30 μM) revelaron que la reparación se efectúa dentro de las 18 y 20 h después de la exposición, respectivamente (Gastaldo *et al* 2008).

De lo anterior, se observa que el tiempo que requieren las células para reparar el daño al ADN está determinado por el compuesto metálico. En relación al TI y sus compuestos, hasta el momento no se habían evaluado el tiempo que requieren las células para reparar y recuperarse del daño inducido en su material genético. Debido a esto, en este estudio se determinó mediante la cinética de reparación la capacidad reparativa de los leucocitos de sangre periférica expuestos al acetato de talio(I), donde los resultados muestran que las células no logran recuperarse por completo del daño que se indujo, aún después de 24 h de haber retirado el tratamiento con TI. Lo que podría ayudar a explicar este comportamiento es el mecanismo de acción toxica del TI.

Se ha descrito que el TI es capaz de reemplazar al ión K^+ , irrumpiendo en su vía de transporte y alterando su metabolismo (Norris *et al* 1976), además de ocasionar la modificación en la activación de las ATPasas de K^+ y de Na^+/K^+ , las piruvato cinasas, fructosa 1-6-bisfosfatasa y algunas otras proteínas dependientes de iones metálicos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013), interferir con los sitios de activación de otras enzimas, como los grupos amino-sulfhídrido, provocando alteraciones en la estructura y en la actividad de las enzimas (Mulkey y Oehme 1993, Yoshida *et al* 1997, Repetto *et al* 1998, Babula *et al* 2008, Crespo-López *et al* 2009, Cvjetko *et al* 2010, Li *et al* 2012). Con respecto a las alteraciones que sufren las enzimas y aminoácidos, posiblemente se encuentran afectando funciones celulares específicas, tal como la ADN polimerasa (Repetto *et al* 1998).

Por otro lado, la acumulación de iones de TI en las células, podría estar ocasionando daño constante en el material genético y de esta manera al momento de la evaluación de la cinética de reparación de leucocitos humanos tratados con el acetato de talio(I) no se observe recuperación, a causa del constante daño y reparación del mismo.

Se conoce que el daño primario al ADN, así como alteraciones en los procesos de reparación, son eventos importantes que pueden conducir a daño en los cromosomas (Iliakis 1991), en este sentido algunos compuestos metálicos (V_2O_4 ,

$Pb(NO_3)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, inducen daño primario al ADN y AC estructurales (Rodríguez-Mercado *et al* 2003, 2011, Gastaldo *et al* 2008).

El análisis sobre las rupturas de cadena doble del ADN realizados en este trabajo, revelan que el acetato de talio(I) no induce este tipo de efecto en ninguna de las concentraciones empleadas. Estos datos muestran discrepancia con los obtenidos durante la determinación de las aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos tratados con el mismo compuesto; donde se encontró que el TI es capaz de incrementar la frecuencia de AC estructurales (Rodríguez-Mercado *et al* 2015). Con lo anterior se puede suponer que la inducción de las AC estructurales depende del tiempo de exposición a TI, debido principalmente a que para producir AC se requiere de 24 h de exposición o 1.5 ciclos celulares (Lorge 2009). Por lo que 1 h de exposición a TI no es suficiente para evidenciar las rupturas de cadena doble, lo que conduce a pensar que se requieran tiempos de exposición más largos para poder producir este tipo de lesiones consideradas inductoras de AC.

Finalmente uno de los mecanismos por lo que actúan muchos metales pesados para inducir toxicidad celular y genética es produciendo estrés oxidante (Iliakis 1991, Pfeiffer *et al* 2000, Gastaldo *et al* 2008, Obe *et al* 2010, Viswesh *et al* 2010, Rodríguez-Mercado *et al* 2011, Mermershtain y Glover 2013) y el TI no es la excepción, Verstraeten (2006) junto con otros autores (Pino *et al* en prensa) han demostrado, en células de mamífero, que los iones de este metal disminuyen los niveles de glutatión, el cual es uno de los principales componentes del sistema de defensa contra las especies reactivas. Se ha descrito que las especies de oxígeno producen múltiples tipos de lesiones en el ADN tal como oxidación de bases y alteraciones en la cadena azúcar-fosfato. Si el TI induce este tipo de efecto (el cual pueden ser revelado con la EUG) en los leucocitos humanos expuestos, esto explicaría parte del daño observado, sin embargo para poder llegar a conclusiones más sólidas sería conveniente que se realizaran evaluaciones de indicadores de daño oxidante (por ejemplo en bases de ADN).

CONCLUSIONES

- En leucocitos humanos aislados el acetato de talio(I) disminuye la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración, observando diferencia estadística en el tratamiento de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así como es capaz de inducir rupturas de cadena sencilla en el ADN, pero no es capaz de inducir rupturas de cadena doble en los tratamientos empleados.
- La cinética de reparación, muestra que el daño al ADN en los tratamientos con acetato de talio(I) disminuye pero no repara por completo, es decir, no alcanzan los valores del grupo testigo negativo en ningún tratamiento y tiempos de recuperación.
- Por lo anterior, se puede considerar que el acetato de talio(I) induce efectos citotóxicos y genotóxicos en leucocitos humanos tratados durante 1 h a concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. *Biología molecular de la célula*. 5 ed. Editorial Omega. España, 263-324.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463:111-172.
- Babić M, Radić S, Cvjetko P, Roje V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M. 2009. Antioxidative response of Lemma minor plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquatic Botany* 91:166-172.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ Chem Lett* 6:189-213.
- Barrera H, Gómez-Puyou A. 1975 Characteristics of the movement of K^+ across the mitochondrial membrane and the inhibitory action of Tl^+ . *Biol Chem* 250:5370-4.
- Bragadin MA, Toninello A, Bindoli A, Rigobello MP, Canton M. 2003. Thallium induces apoptosis in Jurkat cells. *Ann NY Acad Sci* 1010:283-291.
- Britten JS, Blank M. 1968. Thallium activation of the ($Na^+ - K^+$)-activated ATPase of rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 159:160-6.
- Brockhaus A, Dolgner R, Ewers U, Kraimer U, Soddemann H. 1981. Intake and health effects of thallium among a population living in the vicinity of a cement plant emitting thallium containing dust. *Int Arch Occup Environ Health* 48:375–389.
- Cavallo D, Ursini CL. 2007. Comet assay as a tool to evaluate DNA repair activity and inhibition. *New research on DNA repair*. Breehn RL (ed). Published by Nova Science Publisher, Inc. New York.
- Chia CF, Chen SC, Chen CS, Shih CM, Lee HM, Wu CH. 2005. Thallium acetate induces C6 Glioma cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 1042:523-530.

- Cipollini M, He J, Rossi P, Baronti F, Micheli A, Rossi AM, Barale R. 2006. Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay?. *Mutat Res* 601:150-161.
- Collins AR. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 68:24-32.
- Collins AR. 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* 1840:794-800.
- Cooper GM, Hausman RE. 2008. La célula. 4a Ed. Editorial Marban. España. 818.
- Crespo-López ME, Macedo GL, Pereira SID, Arrifano GPF, PicaÇO-Diniz DL W, do Nascimento JLM, Herculano AM. 2009. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharma Res* 60:212-220.
- Cvjetko P, Cvjetko I y Pavlica M. 2010. Thallium toxicity in humans. *Arch Hig Rada Toksikol* 61:111-119
- Díaz-Chávez J, Domínguez-Gómez G. 2010. Vías de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cancer. *Revista de Especialidades Medico-Quirúrgicas* 15:221-227.
- Dolgner R, Brockhaus A, Ewers U, Wiegand H, Majewski F, Soddemann H. 1983. Repeated surveillance of exposure to thallium in a population living in the vicinity of a cement plant emitting dust containing thallium. *Int Arch Environ Health* 52:79-94.
- Dusinska M, Collins AR. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagen* 23:191-205.
- EPA, Environmental Protection Agency. 2009. Toxicological review of thallium and compounds. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Fan Y, Zhou T, Yuan F, Wu M. 2014. Geological and geochemical constraints on the génesis of the Xiangquan Tl-only deposit, Eastern China. *Ore Geo Rev* 59:97-108.

- Florín-Ramírez D. 2005. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a casiopeína II-gly. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM México.
- Gastaldo J, Viau M, Bouchot M, Joubert A, Charvet AM, Foray N. 2008. Induction and repair rate of DNA damage: A unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals. *J of Theore Biol* 251:68-81.
- Gill ML, Strobel SA, Loria JP. 2005. ^{205}Tl NMR Methods for the characterization of monovalent cation binding to nucleic acids. *J Am Chem Soc* 127:16723-16732.
- Gregotti C, Di Nucci A, Costa LG, Manzo L, Scelsi R, Berté F Faustman EM. 1992. Effects of thallium on primary cultures of testicular cells. *J Toxicol Environ Health* 36:59-69.
- Gregotti C, Faustman EM. 1998. Reproductive and developmental toxicity of thallium. En: Thallium in the Environment. Nriagu JO, Wiley J y Sons, Inc. (Eds). USA. 201-214.
- Hart MM, Adamson RH. 1971. Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group IIIa metals: aluminum, gallium, indium, and thallium. *Proc Nat Acad Sci USA* 68:1623-1626.
- HRAOEL, Health-base Reassessment of Administrative Occupational Exposure Limits. 2002. Thallium and water-soluble thallium compounds. *Committee of the Health Council of the Netherlands*.
- Ibrahim D, Froberg B, Wolf A, Rusyniak D. 2006. Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology. *Clin Lab Med* 26:67-97.
- Iliakis G. 1991. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioensayos* 13:641-648.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. 1996. Thallium and thallium compounds health and safety guide. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- Jaramillo-Cruz E. 2011. Evaluación del daño al ADN en leucocitos humanos tratados in vitro con acetato de talio. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México.

- Jia Y, Xiao T, Zhou G, Ning Z. 2013. Thallium at the interface of soil and green cabbage (*Brassica oleracea L. var. Capitata L.*): Soil-plant transfer and influencing factors. *Sci Total Environ* 450-451:140-147.
- Karbowska B, Zembruski W, Jakubowska M, Wojtkowiak T, Pasieczna A, Lukaszewski Z. 2014. Translocation and mobility of thallium from zinc-lead ores. *J Geochem Explor* 143:127-135.
- Kazantzis G. 1986. Thallium. En: Handbook in the toxicology of metal. 2a ed. Elsevier Science Publisher. New York. Vol.2. 549-567.
- Kazantzis G. 2000. Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health* 22:275–280.
- Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA. 1996. UV- and γ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 352:31-38.
- Lapointe D, Couture P. 2010. Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol Environ Safety* 73:572-578.
- Léonard A, Gerber GB. 1997. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutat Res* 387:47-53.
- Li S, Xiao T, Zheng B. 2012. Medical geology of arsenic, selenium and thallium in China. *Sci Total Environ* 421-422:31-40.
- López-Antón MA, Spears DA, Díaz-Somoano M, Martínez-Tarazona MR. 2013. Thallium in coal: Analysis and environmental implications. *Fuel* 105:13-18.
- Lord CJ, Ashworth A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481:287-294.
- Lorge E. 2009. Genetic Toxicology Testing and its Relevance to Human Risk and Safety Evaluation. En General and Applied Toxicology. John Wiley & Sons, Ltd.
- Martínez-Hernández A. 2000. Cuantificación de la concentración de Talio y de la peroxidación de lípidos en regiones cerebrales de rata después de su administración crónica. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- Mercadal MJA, Desoille H. 1993. Medicina del trabajo. Ed. Masson. España. 2a edición. 1050.

- Mermershtain I, Glover MJN. 2013. Structural mechanisms underlying signaling in the celular response to DNA double strand breaks. *Mutat Res* 750:15-22.
- Miyamae Y, Iwasaki K, Kinae N, Tsuda S, Murakami M, Tanaka M, Sasaki YF. 1997. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electroforesis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res* 393:107-113.
- Mosqueda-Tapia G. 2012. Análisis citogenético en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con sulfato de talio (Tl_2SO_4) y tricloruro de talio ($TlCl_3$). Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México.
- Mulkey JP, Oehme FW, 1993. A review of thallium toxicity. *Vet Human Toxicol* 35:445-453.
- Nava-Hernández MP, Hauad-Marroquín LA, Bassol-Mayagoitia S, García-Arenas G, Mercado-Hernández R, Echávarri-Guzmán MA, Cerda-Flores R. 2009. Lead-, cadmium-, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. *DNA and cell biol* 241-248.
- NJDHSS, New Jersey department of health and senior services. 2000. Hazardous substance fact sheet. "Thallium acetate". Treton, New Jersey.
- Norris P, Kee Man W, Hughes MN, Kelly DP. 1976. Toxicity and accumulation of thallium in bacteria and yeast. *Arch Microbiol* 110:279-286.
- Nriagu JO. 1998. History, production and uses of thallium. En: Thallium in the Environment. Nriagu JO, Wiley J y Sons, Inc. (Eds). USA. 1-14.
- Obe G, Johannes C, Ritter S. 2010. The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more important for the formation of chromosomal aberrations: A hypothesis. *Mutat Res* 701:3-11.
- OEHHA, Office of environmental health hazard assessment California environmental protection agency. 1999. Public health goal for thallium in drinking water. California Public Health Goal.
- Olive PL, Banath JP. 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res, DNA Repair* 294:275-283.

- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure of lead and cadmium. *Mutat Res* 540:19-28.
- Pavlíčková J, Zbírál J, Smatanová M, Habarta P, Houserová P, Kubán V. 2006. Uptake of thallium from naturally-contaminated soils into vegetables. *Food Add and Contamin* 23:484-491.
- Peter ALJ y Viraraghavan T. 2005. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Enviro Inter* 31:493-501.
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potencial to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15:289-302.
- Pino MTL, Verstraeten SV. 2014. TI(I) and TI(III) alter the expression of EGF-dependent signals and cyclins required for pheochromocytoma (PC12) cell-cycle resumption and progression. Wiley online library DOI 10.1002/jat.3096.
- Pourahmad J, Reza M, Daraei B. 2010. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for thallium(I) and thallium(III). *Enviro Toxicol* 25:456-467.
- Preston RJ, Hoffmann GR. 2008. Genetic toxicology. En: Toxicology: the basic science of poisons. Casarette & Doull's. Curtis DK. 7a ed. Editorial McGraw Hill, USA. 381-415.
- Repetto G, del Peso A, Repetto M. 1998. Human thallium toxicity. En: Thallium in the Environment. Nriagu JO, Wiley J y Sons, Inc. (Eds). USA. 167-199.
- Reza M, Pourahmad J, Daraei B. 2011. Thallium(I) and thallium(III) induce apoptosis in isolated rat hepatocytes by alterations in mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol & Environ Chem* 93:145-156.
- Rodríguez-Mercado JJ. 2006. Estudio de los efectos inducidos por tres óxidos de Vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Tesis de Doctorado. UNAM México.
- Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev Int Contam Ambient* 22:173-189.
- Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. 2013. Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug Chem Toxicol*. 36:369-383.

- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol in vitro*. 25:1996-2002.
- Rodríguez-Mercado JJ, Hernández-de la Cruz H, Felipe-Reyes M, Jaramillo-Cruz E, Altamirano-Lozano MA. 2015. Evaluation of cytogenetic and DNA damage caused by thallium(I) acetate in human blood cells. *Environ. Toxicol.* 30:572-580.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. 1999. Review. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromat B.* 722:225-254.
- Saha A. 2005. Thallium toxicity: A growing concern. *Indian J Occup Environ Med.* 9:53-56.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Tatsi K, Turner A. 2014. Distributions and concentrations of thallium in surface waters of a region impacted by historical metal mining (Cornwall, UK). *Sci Total Environ* 473-474:139-146.
- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. En: DNA damage and repair in human tissues. Sutherland EM, Woodhead AD (Eds), Plenum Press, NY. 291-301.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Enviro Molec Mutag* 35:206-221.
- Turner A, Furniss O. 2012. An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalga, *Ulva latuca*. *Mar Pol Bul.* 64:2720-2724.
- Tromme I, Van Neste D, Dobbelaere F, Bouffioux B, Courtin C. 1998. Skin signs in the diagnosis of thallium poisoning. *Brit J Dermat* 138:321–325.

- Urik M, Kramarová Z, Ševc J, Čerňanský S, Kališ M, Medved J, Littera P, Kolenčík M, Gardosova K. 2010. Biosorption and bioaccumulation of thallium(I) and its effect on growth of *Neosartorya fischeri* strain. *Polish J. of Environ Stud* 19:457-460.
- USCHPPM, U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine. 2007. Wildlife toxicity assessment for Thallium. *Read Thru Health* 1-19.
- Vaish M. 2007. Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Mol Cancer* 6:26.
- Valencia-González HA. 2012. Tumorigenicidad *in vitro* de células troncales de líneas celulares de cáncer cervicouterino expuestas a daño en el ADN. Tesis de maestría. UNAM México.
- Verstraeten SV. 2006. Relationship between thallium(I)-mediated plasma membrane fluidification and cell oxidants production in jurkat T cells. *Toxicol* 222:95-102.
- Villaverde SA, Hanzel EC, Verstraeten SV. 2004. In vitro interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defence system. *Free Radic Res* 38:977-984.
- Viraraghavan T, Srinivasan A. 2011. Thallium: Environmental pollution and health effects. *Ency Environ Health* 325-333.
- Viswesh V, Gates K, Sun D. 2010. Characterization of DNA damage induced by a natural product antitumor antibiotic leinamycin in human cancer cells. *Chem Res Toxicol* 23:99-107.
- Wang C, Chen Y, Liu J, Wang J, Li X, Zhang Y, Liu Y. 2013. Health risks of thallium in contaminated arable soils and food crops irrigated with wastewater from a sulfuric acid plant in western Guangdong province, China. *Ecotoxicol Environ Safety* 90:76-81.
- Xiao T, Yang F, Li S, Zheng B, Ning Z. 2012. Thallium pollution in China: A geo-environmental perspective. *Sci Total Environ*. 421-422:51-58.
- Yoshida M, Igeta S, Kawashima R, Akama Y, Yoshida K. 1997. Changes in adenosine triphosphate (ATP) concentration and its activity in murine tissue after thallium administration. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:268-273.

- Zierold K. 2000. Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol in vitro* 14:557-563.

Anexos

Este trabajo fue presentado en:

70 ANIVERSARIO
Universidad Veracruzana
1944-2014

SMG

Universidad Veracruzana
Facultad de Biología

Sociedad Mexicana de Genética
Universidad Veracruzana

CONAGEN DOS MIL
CATORCE

Congreso Nacional de Genética 2014

"In memoriam Frederick Sanger: de la secuenciación de proteínas y DNA a los Metagenomas"

CNG2014 002 EVALUACIÓN DE DAÑO Y REPARACIÓN AL ADN EN LEUCOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO CON TALIO

Ramírez-Duran S, Rodríguez-Mercado JJ*, Hernández-de la Cruz H, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UIGTA), Laboratorio L5 PA, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental (UMIE-Z), Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Campus II, UNAM, A.P. 9-020, CP 15000, Ciudad de México. *juserom@unam.mx

La toxicidad del talio (Tl) y la de sus compuestos, se encuentra bien documentada, sin embargo sus efectos a nivel celular y sobre el ADN aún no se conocen del todo. En el presente trabajo se evaluó el daño en el material genético así, como su capacidad de reparación por la exposición de leucocitos humanos a una sal de talio mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel. Se contó con muestras de sangre periférica de dos donadores, a partir de las cuales se aislaron los leucocitos. Se realizaron microcultivos en tubos eppendorf, los cuales contenían medio de cultivo y las concentraciones de acetato de talio (I): 1, 10 y 100 µg/mL. Los tratamientos con Tl se dieron por 1 h y al termino se evaluó la viabilidad celular. Al mismo tiempo, se elaboraron las preparaciones para evaluar el daño al ADN; a pH > 13 se evaluaron los rompimientos de cadena sencilla sobre el ADN, así como la cinética de reparación; a pH 9 los rompimientos de cadena doble. La cinética de reparación se realizó tomando como tiempos de recuperación 0, 0.5, 1, 3 y 24 h. Los resultados obtenidos muestran que este metal disminuye la viabilidad celular en la concentración de 100 µg/mL e incrementa significativamente el daño al ADN de cadena sencilla de manera dependiente de la concentración; no obstante, no induce rupturas de cadena doble. En relación a la cinética de reparación, las concentraciones presentan tendencia a disminuir la cantidad de material dañado, pero, en ninguna de las concentraciones la recuperación se asemeja a los valores obtenidos en los testigos negativos. En conclusión, en este trabajo se observa que el talio (I) es capaz de inducir daño al ADN e intervenir con los mecanismos de reparación del material genético.

Apoyo UNAM, proyectos PAPIIT IN216809 y IA201312.