



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Efecto antídoto de la metalotioneína en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN FARMACIA

PRESENTA:

M.F. LAURA NALLELY ANAYA RAMOS

CO- DIRECTORES DE TESIS:

Dr. ANTONIO MONROY NOYOLA

Dra. MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUÍZ

CUERNAVACA, MORELOS

Octubre 2021

Cuernavaca, Morelos a 13 de octubre de 2021
Folio: FF/D/SAc/ CIP /DF/089/2021

M. F. LAURA NALLELY ANAYA RAMOS
ALUMNA DOCTORADO EN FARMACIA

P R E S E N T E

Por este medio le informo que sesión ordinaria del Consejo Interno de Posgrado (CIP) celebrada el día 13 de octubre de 2021 se analizó su solicitud para asignación de Comisión Revisora y Jurado revisor para la tesis titulada **“Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”**, después de analizar su solicitud el CIP ratifica el jurado de tesis como se había asignado previamente, quedando de la siguiente manera:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------|
| 1. Dr. Samuel Enoch Estrada Soto | Presidente |
| 2. Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia | Secretaria |
| 3. Dra. Sonia Galván Arzate | Vocal 1 |
| 4. Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez | Vocal 2 |
| 5. Dr. Sergio Montes López | Vocal 3 |
| 6. Dr. Germán Bernal Fernández | Suplente 1 |
| 7. Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda | Suplente 2 |

Se le solicita que envíe de manera electrónica una copia de la versión final de su tesis para complementar su expediente, así como los votos aprobatorios que se firmaron en el periodo anterior. Se recomienda solicitar nuevamente la firma de los votos aprobatorios al Jurado para contar con la fecha reciente.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe del Posgrado en Farmacia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2021-10-15 08:28:46 | Firmante

kMnxi64WClowMqakjgpQ8zzmMqSiq0HBX1IV95/B7+Woqklw/8o/tjyk0k2zzSEWrG0KAcwptuM1NpbWx1Y6ujFyya+gjBkFOae0qFocdet2DV7wvM+M9bmwHSCchw4JORi9q7mM9H+sTdnFAa8jCqKbls5XqxtuEyqa8crbdrEEjbGJY9jJMBicJoPgThe7P73B0PdnVyw2gNdCCO6n1AZYC5Xv02gFQSkOnODI7y5to2txWh2nHC3gClh4gR708/rxkl2ba4n7QKVuVIS+STstkUqaF7/FnGcbJwNHSA7Zqe9iB5zbYnBHR0dawkeevMGnr9ZLIE7HeLIW0A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



F6wAo4Okg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Hc8GQ4tGLJ06t2NWrt9ifqT1SmiWWNKE>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

19 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2021-10-18 17:04:52 | Firmante

b1JR5hco7b7sVscEc2Yo5Yw+STnCAA2Rzh/EsQdhu8d8jxnYpDkk5AIGSikdUqi7xS2OgStedz8Nct9tHv8H8mm269xuHjmsgDUXyk3kxCBmx/uTAAB8B/Pqccu/wkC00kkCz/W2olYHHq+uiR+EftzvtxsSuyeDX549tjnlCqrlvRppiQJfrQX8Z0F3Cte2FVzEIMTgFgEJdxJwumRsYrMS1rFExzyejF48JZF4OoB1tjp+ICEB8i9cC8rNwSLh/kDIco6i5id1mPIMggsik7e+Ybb2qVGepFoqzWUUCmPaBgS4DHet9LTHDj+8r5H9FF9AaBzlazDUzigVTuOQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



C4BXA1cMe

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/abYR9QGb4UdFZk51z9tudlAfct5n9qqZ>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia

19 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DIANA LIZBETH GOMEZ GALICIA | Fecha:2021-10-18 16:09:19 | Firmante

EnP4I8NC2mdW0vr1Qql0O7NsSQS+cDqSetl/pUk5OyzBTbxC7boEgzF1dM90U/bNgXzA8ZjgXGb2JpYnDWEbNMAdAfkZ8iRGca0ERjstzEX8xb1VikbRsKzLpRuJu5PldZW/Kd+wbv6jk/GOYcbx3FKV+M8OI/BCmNT0SINEMSOcwgJKKfsrrK2zHclpkgF3SnyvJOiddM4nfaMn4pbxRxMfT8u2qQFbcD0mBQaJedjN49NjRQp/UNrithxMSFc+mcIDBI7e13P9hOIf+gZ4zZLj2Kz/34AKh6YWRPDUZxRVWCo2FLUbeP52z2UIT8iuqSRc1sqzF2DDvxffHx4aA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



fQJRPopt4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/U3YFKgCC9s8C00Nmrix66w2QtPQEtgNm>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Sonia Galván Arzate

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dra. Sonia Galván Arzate

19 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SONIA GALVÁN ARZATE | Fecha:2021-10-20 10:57:50 | Firmante

dtcKMz53jA4fTpTZegYXOQq6AFrGY9GFSTxwnkrEs3fyYkExCH7IWF17KQ+gzW7wmXdQ53Sk0fx8vhUjY56jsx4YgkVITfvigix2OINRAOIBRW6H6qaSoAUwpCQuIKQ4UtpB0flvC3ZJ9PsAWd6rJRtol+RWeY/ITqtFCRBo/Evt2ewj2Oj6RNHZOYgbex9MPHEGasdHLA2uPqv7lv0WmrF+h5Sh43pODU1DQGYwjgbiVdmnGy5KH2gyBquAuqvbQ5LZOHRtZWFSV5dVg89A+WjdfO6TC11X42FOgeyG8BNVohS2fxmJzIzP7nAy8C2UeKcWcV0JmTKUwRCIzQQTA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[zVMGyfhLW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ARxk1MtbyFnLx3UPImipdlWsCZESlaxU>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

18 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2021-10-18 14:23:22 | Firmante

SlpfcwoXTZwwifkTm7my+Fj0X4WSglnUsZ0R/hXgKyriBsyC4D/oDgJglgNjRXkByYgkP06lvPPZt01mdwOEpDQGE85VMYxe+gHJZI4VJPXoQd+fv83Bk2tr31X0vX/Dw0jOLuXTI4fymPRI2Dgc1L8K0B2Af23q0APNCWLVstZ+Ino9nnlmbWDYs8YF5Q0fDGXzBRCU/ngP5FkakiAg4TLydVIFFPwDxrQWVvk0JvsArJNdHQBDObnUPATscSuc1P1OSKOg6OEY Tb+RTKfvPBWU3gmo90Sho6bc9wns/7lhNjggCXAwwllfmJh/kR2wjtXnDQcgVSMarQvu/VmA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[cR0LtGfNn](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/eBiaAkjsPKjr6e9CRo0klgWrVrvI98H>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Montes López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dr. Sergio Montes López

19 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO MONTES LÓPEZ | Fecha:2021-10-18 21:49:26 | Firmante

EKR3YENYtB1/cYbB7nldZXShNixj89dh8N3Zf+roF4RxfdlZnW06rnejakZ83KgABJSa2s8qhpsm3LDDhPKBgy2WCL2QgeFm462FS5z9jzuotOur7SkIxI+XpY0h6uFt1zgEOQoWPgn4NUNdHXjlrhM9zbiZt/N70mYwhKWtSmHAIPFH0jVHVw5Zv4rjXCefdP28KapeY6LJWNbXISbvWZl3tNrg2uMJz7YeYME+6v5Od2/LKileY0HIIXKsMo0zXXTviehw4AxPvdAKXo4+wfijs3J/O4Yj4+QubX2dUz12aJgJwWfBaxRjN7Wxtr0p/qZ9rZ+1CZnQhqIzov+zwg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jcxWrRnkQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y1Tjgwsuyt1B9SblTudMDXwfl5FrIGT6>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneina en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dr. Germán Bernal Fernández

19 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2021-10-18 21:10:33 | Firmante

mHsjc3NYGjIHVWeVWj3XMjgcbmuVomVpeQkv7J+6ZpRFYcDjJgYilVN0ldnTclSGnabCp9Uu0PEec/5RgWemj2TvRVPTzo0Nq84DRb3IUPGFb4JSfgBjWpcAWwP9EaGfFKUC
TAjfNDjNSEzWaNabr110bYN51h8tT86MueKGPOYPQ43GAf7llqMKsF8n6KPIkWYqlljt6OGJwrtTjjOfw4zgGxUNUX0D1ET25uLHyP/qjwHf1XtcfuVLk04APw7oaYjO9BwBa4d4
Xw1XSawxpAPOSZCLWSPkYI73+ahBPJX6HP01RCYYcUzta0CVivLVoHrb8yznnwuq5VmAHg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KkybumWO4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gDgF7ZhpJVhs6C0LPVuRdXyjcpCFNDJI>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Nallely Anaya Ramos

Título de la tesis: “Efecto antídoto de la metalotioneína en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (Sólo en caso de rechazo):

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

18 de octubre del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA | Fecha:2021-10-18 17:34:51 | Firmante

R1BWYF4Yw0ZUJ8LjyErMXfRe/nfOX1zYTnq0YB97Xo5jv38Q2/mqS5KZahiTUUIq7+gmnFtCZMI6gawYXFYnPj1R/E9ZozYI1KegHZbXnQLOHFpaDg+2pxGMGOnYs92Crvw7bt7/ks7NkmFrgV3Jf6umuOqe1HpOR+3+ZHLY/6ekMLikxaEtuKShM1MM/B2Jb7uTH2csQ/NIBHuqEngaxyve7tZYqxPBfszs3hoC5iyaz8Lq6z0ZnDKyv5EJGjH/iZfkZKIUBHfx4E0mHqWS6TFI6LzAHDpbCol/qmxE6RfKpTrixmqlSKxf22srFhfacc3Zs0pNfIOWBi5qAbA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



68ha4QJSz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/alYeJYN6SZMwccCT5cLSdQ3dnKpMkmb0>



Agradecimientos

La presente tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Neuroprotección de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Antonio Monroy Noyola, en colaboración con el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz. Agradezco a ambos la dirección y el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco al Programa de Posgrado en Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por facilitar el espacio y la oportunidad de realizar un posgrado de excelencia.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado número 350322 otorgada para la realización de estudios de posgrado.

A la Sociedad Mexicana de Neurociencias por su apoyo para la asistencia a congresos internacionales.

Al fondo FOMIX por la beca otorgada para la realización de una estancia de investigación.

Índice general

Índice de tablas	I
Índice de figuras	II
Abreviaturas.....	III
Resumen	V
Abstract.....	VI
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	4
2.1 Generalidades.....	4
2.2 Propiedades físico-químicas	4
2.3 Obtención y exposición.....	6
2.4 Usos.....	6
2.5 Toxicidad del Tl.....	9
2.6 Absorción distribución y excreción de Tl.....	9
2.7 Mecanismo de acción del Tl	12
2.8 Estrés oxidativo y enzimas antioxidantes en la intoxicación por Tl.....	13
2.9 Cuadro clínico en la intoxicación con Tl	15
2.9.1 Dérmicos	19
2.9.2 Gastrointestinales	19
2.9.3 Renales	19
2.9.4 Cardiovasculares	20
2.9.5 Sistema nervioso	20
2.10 Histopatología de la intoxicación por talio	21
2.11 Diagnóstico	21
2.12 Tratamientos	22
2.12.1 Azul de Prusia	23
2.13 Metalotioneínas.....	24
2.13.1 Isoformas de las MTs.....	24
2.13.2 Distribución de las MTs en el organismo	25
2.13.3 Estructura de MT-I /MT-II y su unión a metales.....	25
2.13.4 Inductores de las MT-I y MT-II.....	27
2.13.5 Inducción de MT-I y MT-II por metales.....	28
2.13.6 Funciones de las MTs	28
2.13.7 Actividad quelante de MT-I y MT-II	29
3 Justificación	30
4 Hipótesis	32
5 Objetivo general	33
5.1 Objetivos particulares	34
6 Métodos	36
6.1 Reactivos.....	36
6.2 Preparación de sulfato de talio.....	36
6.3 Preparación de Metalotioneína	36
6.4 Preparación de Azul de Prusia	37
6.5 Preparación de Tween-80 al 1%	37

6.6 Modificador de matriz.....	37
6.7 Hemolizado	37
6.8 Soluciones estándar.....	38
6.9 Limpieza del material para la determinación de Tl	38
6.10 Animales	38
6.11 Grupos experimentales.....	39
6.12 Intoxicación aguda	40
6.13 Obtención de tejidos	41
6.14 Tratamiento de las muestras biológicas y determinación de las concentraciones de Tl por absorción atómica.	41
6.15 Tratamiento de las muestras biológicas y determinación de las concentraciones de MT por absorción atómica.	42
6.16 Determinación de marcadores bioquímicos de daño renal y hepático.....	43
6.17 Determinación de glutatión reducido (GSH)	43
6.19 Estadística	44
7 Resultados	45
7.1 Mortalidad.....	45
7.2 Determinación de las concentraciones de Tl en órganos	47
7.3 Niveles de talio en las regiones cerebrales	52
7.4 Niveles de metalotioneína en órganos	56
7.5 Niveles de metalotioneína en regiones cerebrales	58
7.6 Marcadores bioquímicos de daño renal y hepático.....	60
7.7 Determinación de glutatión reducido (GSH) en riñón e hígado.	61
7.8 Estudio histopatológico.....	62
7.9 Estudio inmunohistoquímico de Nrf2.....	64
8 Discusión	67
9 Conclusiones.....	72
10 Referencias	73

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del Talio	5
Tabla 2. Casos de intoxicación por TI en los últimos años	8
Tabla 3. Síntomas de la intoxicación por TI detectados en paciente durante su admisión.	17
Tabla 4. Signos de la intoxicación por TI detectados en pacientes durante su hospitalización.	18
Tabla 5. Agentes inductores de MT	27
Tabla 6. Grupos experimentales	39
Tabla 7. Curva de calibración de TI	41
Tabla 8. Curva de calibración de Ag	42
Tabla 9. Niveles de TI en órganos	51
Tabla 10. Niveles de TI en regiones cerebrales	55
Tabla 11. Efecto de MT y AP en los marcadores hepáticos y renales.	60
Tabla 12. Evaluación morfológica semicuantitativa del análisis inmunohistoquímico de Nrf2.	66

Índice de figuras

Figura 1. Distribución y excreción del talio	11
Figura 2. Mecanismo de acción del TI	13
Figura 3. Estructura de la MT-II que muestra sus dos cluster metal tiolato	26
Figura 4. Esquema de la metodología	40
Figura 5. Estimación de la probabilidad de sobrevida (EPS)	46
Figura 6. Concentración de TI en órganos	50
Figura 7. Concentración de TI en cerebro	54
Figura 8. Concentración de MT en cerebro	57
Figura 9. Concentración de MT en cerebro	59
Figura 10. Niveles reducidos de glutatión (GSH)	61
Figura 11. Análisis histopatológico de tejidos	63
Figura 12. Estudio inmunohistoquímico de Nrf2 en tejidos	65

Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
Al	Aluminio
ALT	Alanino aminotransferasa
AP	Azul de Prusia
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Dimercaprol
Br	Boro
CAT	Catalasa
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
DL ₅₀	Dosis letal 50
DP	D-penicilamina
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
Ga	Galio
GFAAS	Espectrometría de emisión atómica de horno de grafito
GSH	Glutación Reducido
Gpx	Glutación peroxidasa
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GSSG	Glutación disulfuro
GST	glutación S-transferasa
GCL	L-glutamato L-cisteína γ -ligasa
HD	Hemodiálisis
Hg	Mercurio
HO-	Radical hidroxilo

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HP	Hemoperfusión
HVC	Hemofiltración venovenosa continua
i.p.	intraperitoneal
In	Indio
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica
MRE	Elementos de respuesta a metal
MT	Metalotioneína
MTs	Metalotioneínas
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
OMS	Organización Mundial de la Salud
(O ₂ ⁻)	Radical superóxido
Pb	Plomo
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PT	Proteínas totales
RE	Elementos de respuesta
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
STAT	Transductores de señal y activadores de transcripción
Tl	Talio
v.o.	Vía oral
Zn	Zinc

Resumen

El talio (Tl) es un metal altamente tóxico, es considerado uno de los principales contaminantes en la lista de la EPA (Agencia de Protección Ambiental). La exposición humana a Tl ocurre a través del agua potable, alimentos contaminados y aerosoles. En 1973 la OMS y la EPA (1985) prohibieron el uso de sales de Tl como ingrediente activo en raticidas (Zelio) debido a numerosos reportes de intoxicación. En la actualidad el azul de Prusia (AP) es el antídoto de elección según la Food and Drug Administration (FDA) con una eficacia del 70% contra la intoxicación por Tl. El uso de este metal en la industria ha incrementado, y con él los reportes de una emergente contaminación ambiental, a pesar de las directrices de la OMS, en los últimos 13 años (2008-2021) se han presentado casos de envenenamiento accidental e intencional por Tl. Dicha problemática insta a la necesidad de realizar estudios para determinar el impacto de los mecanismos endógenos y exógenos que previenen la toxicidad del talio. Por ello el presente estudio se enfocó en determinar el efecto citoprotector de la metalotioneína (MT), una proteína con alta capacidad antioxidante y quelante. Para la realización de este estudio se utilizaron ratas Wistar macho intoxicadas con acetato de talio (I) por vía i.p. a una dosis sub-letal de DL25 (16 mg/kg). Veinticuatro horas más tarde, los animales fueron administrados con MT dosis única (100 o 600 µg) vía i.p. mientras que el AP solo en combinación con MT se administró (50 mg/kg) vía oral, dos veces al día con un intervalo de 8 h durante 4 días. Las concentraciones de Tl disminuyeron en la mayoría de los órganos ($p < 0,05$) por efecto de AP solo o en combinación con MT, mientras que la MT sola disminuyó las concentraciones de Tl en testículos, bazo, pulmón e hígado. Así mismo, el Tl cerebral también disminuyó ($p < 0,05$) por efecto de AP y MT solos o en combinación en la mayoría de las regiones analizadas ($p < 0,05$). La mayor disminución de Tl se observó con la combinación de antídotos. Los marcadores plasmáticos de daño renal aumentaron después de la administración de Tl, mientras que AP y MT, solos o en combinación, impidieron el aumento de dichos marcadores. Solo la MT aumentó los niveles de glutatión reducido (GSH) en el riñón. Finalmente, se observó un aumento de Nrf2 en hígado y riñón, después del tratamiento con MT sola o en combinación con AP. Los resultados mostraron que la administración de MT sola o en combinación con AP generó un efecto citoprotector después de la exposición a Tl.

Abstract

Thallium (Tl) is a highly toxic metal it is considered one of the main pollutants on the environmental protection agency (EPA) list. Human exposure to Tl occurs through drinking water, contaminated food, and aerosols. In 1973 the WHO and EPA banned the sales use of Tl as an active ingredient in rodenticides (Zelion) because of many poisoning reports. Despite the WHO guidelines, in the last 13 years (2008-2021) there have been cases of accidental and intentional poisoning by Tl. Prussian blue (PB) is the antidote choice according to the Food and Drug Administration (FDA), with an efficacy of 70% against Tl poisoning. The use of this metal in industry has increased, as well as the reports of emerging environmental contamination, it represents a significant threat to human health. This problem shows the need to study the impact of endogenous and exogenous mechanisms that prevent thallium toxicity. Therefore, the present study focused on determining the cytoprotective effect of metallothionein (MT), a protein with high antioxidant and chelating capacity. The MT was tested, at two doses (100 and 600 µg/rat), Prussian blue (PB) (50 mg/kg) was administered alone or in combination with MT. Tl (16mg/kg) was injected i.p. to Wistar rats. Antidotes were administered twice daily, starting 24 h after Tl injection, for 4 days. Tl concentrations diminished in most organs ($p < 0.05$) by effect of PB, alone or in combination with MT, whereas MT alone decreased Tl concentrations in testis, spleen, lung and liver. Likewise, brain thallium also diminished ($p < 0.05$) by effect of PB and MT alone or in combination in most of the regions analyzed ($p < 0.05$). The greatest diminution of Tl was achieved when the antidotes were combined. Plasma markers of renal damage increased after Tl administration, while PB and MT, either alone or in combination, prevented the raise of those markers. Only MT increased the levels of reduced glutathione (GSH) in the kidney. Finally, increased Nrf2 was observed in liver and kidney, after treatment with MT alone or in combination with PB. Results showed that MT alone or in combination with PB is cytoprotective after thallium exposure.

1 Introducción

El talio (Tl) es un metal que se distribuye ampliamente en el medio ambiente, se encuentra en concentraciones traza en la corteza terrestre y es uno de los principales contaminantes, junto con el cadmio y el mercurio en el listado de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) (2009). El Tl fue descubierto por Williams Crookes en 1861 por espectroscopia, al analizar residuos del proceso de obtención del ácido sulfúrico (H_2SO_4) y debe su nombre a la palabra griega *thallos* (tallo verde) debido al color en las líneas del espectro. En la tabla periódica se expresa con el símbolo Tl, su número atómico es 81 y pertenece a la familia del grupo III A, junto con los metales; boro (B), aluminio (Al), galio (Ga) e indio (In) (Prick, 1979).

Debido a la elevada toxicidad y características físicas (incoloro, inodoro e insípido) el Tl se ha utilizado principalmente para la elaboración de rodenticidas, generado diversos casos de envenenamientos accidentales, suicidas y homicidas (Luckit et al. 1990; Al Hammouri et al. 2011). La dosis letal 50 (DL_{50}) de Tl para humanos es de 8 a 12 mg/Kg (Moeschlin 1980; Thompson 1981) y de 30 a 32 mg/Kg en el caso de los roedores (Ríos 1989). El envenenamiento con Tl ocurre comúnmente después de la ingestión oral, inhalación de polvo contaminado o después de la absorción cutánea, en casos severos puede llevar a la muerte en un periodo de 10 a 12 días (Emsley 1978; Riyaz et al., 2012). El riesgo de exposición a este metal en animales y humanos sigue siendo un problema debido al uso del raticida “zelio” en países en vías de desarrollo y a la creciente utilización del Tl en la industria (Cheam 2001).

La similitud del radio iónico entre el Tl y el potasio (K) ($Tl^+ = 1.44 \text{ \AA}$ y $K^+ = 1.33 \text{ \AA}$) permite al Tl ser indistinguible por las membranas celulares y sustituir al K^+ celular en la bomba Na-K-ATPasa (Mullins y Moore 1960; Gehring y Hammond 1966), alterando vías metabólicas esenciales como glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa (Oehme 1967; Prick 1979). El Tl se distribuye ampliamente en todos los

órganos, el cerebro presenta la concentración más baja, sin embargo, este es el órgano blanco en la intoxicación con TI, observando una distribución heterogénea con concentraciones altas en hipotálamo y bajas en corteza. (Rauws 1974; Aoyama 1989; Ríos et al., 1989) Clínicamente la triada clásica en la intoxicación aguda por TI está compuesta por gastroenteritis, polineuropatía y alopecia (Reed et al., 1963; Prick 1979). Las secuelas clínicas más frecuentes son insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, alteraciones del sistema nervioso central (SNC) y ceguera. En la intoxicación por TI el tratamiento farmacológico y no farmacológico está dirigido a la disminución y excreción de dicho metal del organismo (Reed et al., 1963; Mulkey and Oehme 1993).

En modelos murinos se ha demostrado que los cuadros terapéuticos con base en agentes quelantes son controvertidos, ya que pueden generar redistribución del metal hacia el cerebro, agravando la sintomatología y provocando secuelas neurológicas irreversibles (Rios y Monroy-Noyola 1992; Blanusa et al., 2005). En la actualidad el azul de Prusia (AP) es el antídoto de elección según la Food and Drug Administration (FDA 2003) contra la intoxicación por TI, sin embargo, su eficacia es de un 70%, por ello es necesario continuar con el estudio de nuevos antídotos que no generen redistribución al cerebro. Debido al efecto quelante y antioxidante que se ha demostrado en las metalotioneínas (MTs) decidimos estudiarlas como un posible antídoto frente a la intoxicación aguda por TI.

Las MTs son proteínas intracelulares de bajo peso molecular (6-7 KDa) no enzimáticas, 25-30% de sus aminoácidos son cisteínas que forman puentes disulfuro y tienen alta afinidad por los metales (Kagi y Vallee 1960). En los mamíferos se conocen cuatro isoformas: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV, su distribución es ubicua y heterogénea, excepto la isoforma MT-IV que únicamente se ha identificado en células epiteliales escamosas (Coyle et al., 2002). Las MT-I y MT-II son inducibles y en condiciones fisiológicas las coordinan con Zinc y/o Cobre, sin embargo, si existe una elevada concentración de otros metales de transición en el medio, estos pueden reemplazar al Zinc y Cobre (Kagi y Kojima 1987; Vašák 2005).

Se ha demostrado que las MTs tienen diversas funciones, las de mayor interés para este proyecto son: el control de los iones metálicos (Park et al., 2001; Kara et al., 2005; Klaassen et al., 2009) y el atrapamiento de las especies reactivas de oxígeno (Irato et al. 2001 Ruttkay et al., 2013).

2 Antecedentes

2.1 Generalidades

El talio (Tl) fue descubierto y nombrado por Williams Crookes en 1861, es un metal blando y maleable de color blanco-azulado, su nombre proviene del antiguo griego (*Thallos*: tallos jóvenes) ya que presenta una línea espectral de color verde brillante. Por las características fisicoquímicas el Tl, se ubica en el grupo IIIA de la tabla periódica con el símbolo Tl y el número atómico 81.

El Tl se encuentra distribuido ampliamente en el medio ambiente y está presente en una gran variedad de formaciones rocosas (granito, pirita, carbón y rocas volcánicas), se estima que la concentración natural de este metal en agua dulce y agua de mar es de 0.03 ppb, en la corteza terrestre la concentración traza de este metal oscila entre 0.3 y 0.5 $\mu\text{g/g}$ (Ewers 1988; Mulkey y Oehme 1993; Peter y Viraraghavan 2004). En el mundo hay pocas áreas que poseen altas concentraciones naturales de Tl, entre ellas se encuentran la provincia sur occidental de Guizhou en China, la mina Allchar en Kavadarci Macedonia, Lengnabach en Suiza y Rotokawa en Nueva Zelanda.

2.2 Propiedades físico-químicas

El Tl puro es un metal blanco o gris azulado, suave, maleable e insoluble en agua, tiende a formar compuestos estables con ligandos que se comporten como bases blandas como el azufre. El Tl puede existir en dos estados: monovalente thallo, talio (I), $\text{Tl} + 1$ y trivalente thalli, talio (III), $\text{Tl} + 3$ (Douglas *et al.*, 1990; Mulkey y Oehme, 1993). El Tl monovalente es un ácido de Lewis (receptor de un par de electrones) interactúa mejor con restos inorgánicos y orgánicos de azufre, carbono, fósforo y arsénico como el par donador de electrones (base de Lewis) formando sulfato

(Tl_2SO_4), carbonato (Tl_2CO_3) y acetato (CH_3COOTl) estos compuestos son particularmente tóxicos y estables en solución acuosa, por otro lado el sulfuro (Tl_2S) y yoduro (TlI) son poco solubles y por ello menos tóxicos (Moeschlin, 1980; Galvanarzate y santamaria 1998; EPA 2009). Las características físicas y químicas del Tl se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del Talio. Modificada de Nriagu, 1998; Peter y Viraraghavan, 2004.

PROPIEDADES	VALOR
Número atómico	81
Configuración electrónica	$[Xe] 4f^{14}5d^{10}6s^26p^1$
Spin	
Afinidad electrónica	20
Masa atómica	204.383
Densidad (Kg/m^3)	11850
Radio atómico (pm)	170
Punto de fusión (C°)	304
Punto de ebullición (C°)	1473
Conductividad térmica a 300 K (W/mK)	46.1
Escala Pauling	1.62 (Tl^{1+}); 2.04 (Tl^{3+})
Radio covalente del solo enlace (Å)	1.55
ΔH atomización 298 k (KJ/mol)	182.2
ΔH <i>vap</i> a 298 k (kJ/mol)	180.9
Radio de Van Der waals (Å)	2.00

2.3 Obtención y exposición

El TI es un subproducto de la producción de cemento, también se puede obtener de la fundición de blendas y piritas para la refinación de oro, plomo, cobre, hierro, cadmio y zinc. El polvo generado en la combustión de piritas puede ser procesado para recuperar cantidades comerciales del metal o puede liberarse al medio ambiente. (Twidwell y Beam, 2002; Peter y Viraraghavan, 2004). Solo en Estados Unidos los procesos industriales liberan al año cerca de 1000 toneladas de TI al medio ambiente (Kazantzis, 2000). Los casos de intoxicación por exposición industrial de TI se deben al contacto con la piel en procesos de producción y tratamiento de vidrio, a la inhalación de polvos derivados del tostado de piritas, en procesos de minería y principalmente al consumo de alimentos cultivados en la proximidad de plantas cementeras o industrias mineras (Schoer 1984; Bachanek et al 2000; Peter y Viraraghavan, 2004)

El TI liberado durante la combustión de pirita para la fabricación de cemento se disemina en el aire, se deposita en suelos cercanos y es absorbido por las plantas a través de las raíces. Xiao y colaboradores (2004) determinaron niveles significativamente elevados de TI en especies como col, zanahoria, chile, arroz y maíz. El estudio epidemiológico realizado por Brockhaus (1981) a una población cercana a la planta cementera de Lengerich Alemania demostró que los altos niveles de TI en cabello y orina estaban asociados al consumo de frutas y verduras cultivadas para consumo propio.

2.4 Usos

Desde 1883 las sales de TI se utilizaron con fines cosméticos y medicinales para el tratamiento de sífilis, sudores nocturnos, gonorrea, tuberculosis y tiña, muchos de los tratamientos resultaron efectivos, sin embargo, fueron abandonados al observar que los compuestos de TI generaban toxicidad aún a dosis terapéuticas. (Marmo et

al., 1987; Delvalls et al., 1999). En 1920 surgieron los rodenticidas e insecticidas con sales de Tl como ingrediente activo, el rodenticida más conocido se comercializó bajo el nombre “Zelio” y se mantuvo en el mercado por más de 45 años (Prick, 1979; Nriagu, 1998). En los últimos años se ha observado un creciente uso del Tl en la industria para la fabricación de semiconductores, termómetros de baja temperatura, lentes ópticos, aleaciones, dispositivos electrónicos y fibra óptica (Kazantzis, 2000; Nriagu, 2003) así como en la fabricación de fuegos artificiales, pigmentos y colorantes, se estima que la producción global de Tl para estos usos es de 15 toneladas por año (Kazantzis, 2000; Hoffman, 2003). Los iones de talio muestran excelentes propiedades de resonancia magnética nuclear (RMN), en la medicina el Tl 201 se utiliza como sonda para emular la función biológica del ion K y evaluar la función del miocardio (B.H. Bulkey et al., 1975; Nriagu, 1998)

En 1972 Estados Unidos prohibió el uso de Tl en rodenticidas debido al elevado riesgo de intoxicaciones accidentales en niños y mascotas, si bien muchos países tomaron una postura similar respecto al uso de sales de Tl, aún existen reportes de intoxicaciones (Tabla 2) accidentales, intencionales (suicidas u homicidas), de exposición laboral, contaminación o adulteración de drogas de abuso y productos herbales (Hirata et al.; 1998; Ghaderi et al., 2015; Ghaderi et al., 2017; Senthilkumaran et al., 2017).

Tabla 2. Casos de intoxicación por TI en los últimos años

PAIS	AÑO	CASOS	Neuropatía periférica	REFERENCIA
México	1990	50	✓	Rangel <i>et al.</i> 9 años
Polonia	2001	1	-----	Bachanek <i>et al.</i>
Israel	2000	1	✓	Atsmon <i>et al.</i>
U.S.A	2000	1	✓	Pau.
U.S.A	2002	7	✓	Rusyniak <i>et al.</i>
India	2003	1	✓	Misra <i>et al.</i>
India	2004	26	-----	Saha <i>et al.</i>
U.S.A	2004	1	✓	Sharma <i>et al.</i>
U.S.A	2005	1	✓	Miller <i>et al.</i>
Taiwan	2005	2	✓	Kuo <i>et al.</i>
China	2006	2	✓	Tsai <i>et al.</i>
India	2006	1	✓	Jha <i>et al.</i>
China	2007	2	✓	LuCI <i>et al.</i>
Italia	2007	1	✓	Ammendola <i>et al.</i>
Argentina	2007	118	✓	Martinez <i>et al.</i> 20 años
Iraq	2008	10	✓	CDC
Rusia	2008	50	-----	Luzanova <i>et al.</i> 12 años
Polonia	2008	1	-----	Nocén <i>et al.</i>
Republica Checa	2009	2	✓	Pelclova <i>et al.</i>
China	2010	1	✓	Chen <i>et al.</i>
España	2010	1	✓	
Iraq	2011	10	✓	Al Hammouri <i>et al.</i>
U.S.A.	2012	1	-----	Riyaz <i>et al.</i>
China	2012	14	✓	Sun <i>et al.</i>
España	2013	3	✓	López segura N. <i>et al.</i>
China	2014	9	✓	Zhang <i>et al.</i>
Eslovaquia	2015	1	✓	Sojáková <i>et al.</i>
México	2015	1	-----	Viquez G. IMSS
Japon	2016	1	✓	Kuroda <i>et al.</i>
India	2017	1	✓	Senthilkumaran <i>et al.</i>
Japon	2017	1	✓	Yumoto <i>et al.</i>

2.5 Toxicidad del Tl

El Tl se considera un metal acumulativo altamente tóxico, numerosos estudios indican que los compuestos de Tl se absorben fácilmente en humanos y animales. Este metal presenta una dosis letal 50 (DL₅₀) menor que el Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Zinc (Zn) y Cobre (Cu) por ello es un contaminante prioritario para la EPA. (Cheam, 2001). En humanos la DL₅₀ de Tl es de 8 a 12 mg/Kg de peso y de 30 a 32 mg/Kg de peso en el caso de los roedores (Ríos et al., 1989; Moeschlin, 1980; Thompson, 1981).

La exposición humana a Tl puede tomar diferentes rutas: oral a través de la ingestión de alimentos contaminados, dérmica o respiratoria por inhalación de polvo y humo contaminado (Cvjetko et al., 2010). Sin tratamiento la muerte generalmente ocurre en un periodo de 10-12 días, con excepciones documentadas donde la muerte ha ocurrido en un periodo de 8-10 horas (IPCS, 1996; Al Hammouri et al., 2011). La gravedad de la intoxicación dependerá de la cantidad de metal absorbido, vía de intoxicación, tiempo de exposición, edad, reacción inmune y de la tolerancia de cada individuo (Misra et al., 2003).

2.6 Absorción distribución y excreción de Tl

Las sales de Tl son absorbidas por todas las rutas, sin embargo, la vía oral a través de la ingestión de productos contaminados es la más común en los reportes de intoxicación. La biodisponibilidad de sales de talio como el acetato, sulfato carbonato y yodato excede el 90% (Hoffman, 2003). La vida $\frac{1}{2}$ del Tl en humanos es muy variable con rangos de 1–3 días después de dosis bajas y de 1–1.7 días bajo tratamiento clínico intensivo tras la ingestión de una dosis potencialmente letal. Estudios farmacocinéticos en rata prueban que la vida_{1/2} de este metal en sangre total varía de 1.5 - 4 días (Rauws, 1974; Repetto et al., 1998). El Tl se distribuye rápidamente en el cuerpo desde la sangre hacia los tejidos con un volumen de

distribución de 3.6 L/Kg a través de un modelo tricompartmental (Rauws, 1974; De Groot et al., 1985).

En humanos y animales el TI es capaz de atravesar la barrera placentaria y la hematoencefálica (Hoffman, 2000; Gibson y Becker, 1970), su distribución en el organismo es heterogénea, presentando las concentraciones más altas en riñón y las más bajas en cerebro, sin embargo, este último es el órgano blanco en la intoxicación con TI ya que genera neurodegeneración, desmielinización y peroxidación lipídica (Aoyama, 1989; Galvan arzate et al., 2000; Leung y Ooi, 2000). Al igual que el resto del organismo, el cerebro presenta una distribución heterogénea, de acuerdo a Ríos y colaboradores (1989) 24 h después de la administración de (32 mg/kg) de TI las concentraciones más elevadas se encuentran en hipotálamo y las más bajas en corteza. De acuerdo a Galván y Ríos (1994) estas diferencias están relacionadas con el establecimiento de la BBB, que permite a ratas adultas mostrar una distribución de TI dependiente de la región, mientras las ratas recién nacidas presentan un contenido homogéneo en el cerebro.

En 1980 Van Kesteren describe la toxicocinética del TI en un modelo de tres compartimentos (Figura 1). La primera fase representa la distribución intravascular con una duración aproximada de 4 h, la segunda fase corresponde a la distribución del TI en el SNC con una duración de hasta 48 h, generalmente la distribución finaliza en 24 h y da comienzo a la fase de eliminación que puede verse modificada si existe intervención médica farmacológica o no farmacológica. Debido a que el TI es un elemento, no se metaboliza, no se sabe si *in vivo* este metal sea capaz de transformarse de un estado de valencia a otro (Hologginitas *et al.*, 1980; EPA, 2009).

El TI se excreta por sudor, saliva, lágrimas y leche materna, sin embargo, la principal ruta de eliminación es a través del riñón y tubo digestivo. Durante las primeras horas la excreción urinaria de TI es alta y entre las 24-48 h la excreción fecal juega un papel importante. Se estima que en humanos la excreción renal representa

aproximadamente el 70 %, en contraste, ratas y conejos presentan una mayor excreción de TI vía fecal. La deposición de TI en cabello y uñas también es considerada como una ruta de eliminación (Thompson, 1981; Galvan Arzate y Santa Maria, 1998; Kazantzis, 2007; IPCS, 1996).

Si bien el riñón juega un papel importante en la eliminación de TI también lo hace en la reabsorción, en conejo aproximadamente el 50% de la dosis filtrada es reabsorbida en la nefrona a nivel de túbulo contorneado distal y proximal. Aunado a la reabsorción renal se ha sugerido un mecanismo de reciclaje enteral, donde el intestino grueso parece ser el área principal para la reabsorción enteral y el reciclado de iones de Tl^{+1} , contribuyendo a la retención corporal prolongada de este elemento (Lund, 1956; Rauws 1974).

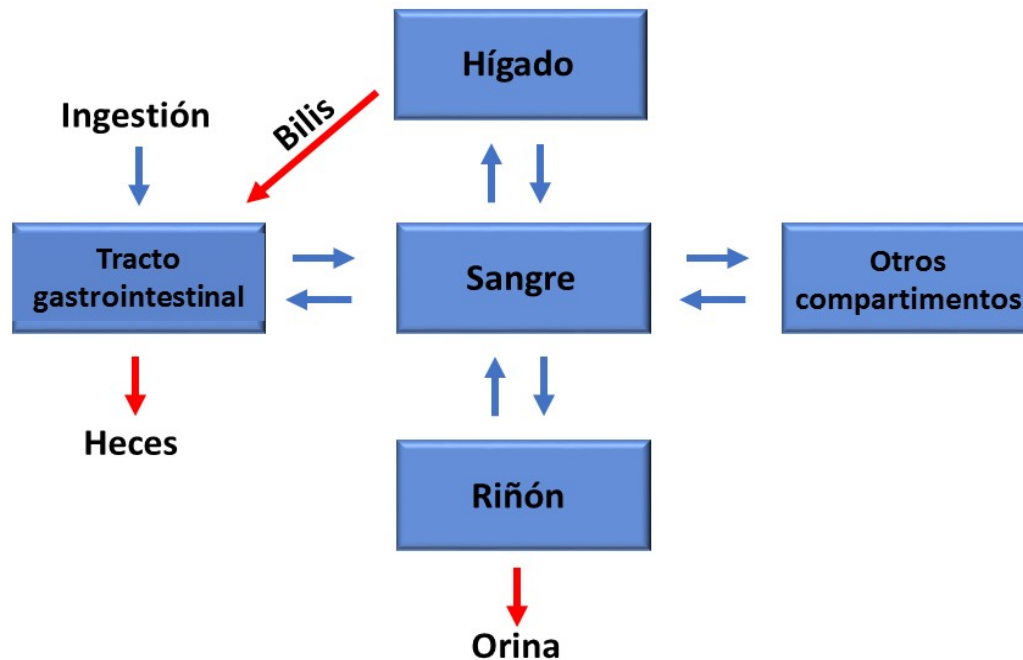


Figura 1. Distribución y excreción del talio. Modificada de Van Kesteren et al., 1980.

2.7 Mecanismo de acción del TI

El mecanismo de toxicidad se basa en la sustitución e interferencia de TI en procesos vitales dependientes de potasio (K), gracias a la similitud de radio iónico entre estos 2 metales ($Tl^+ = 1.44 \text{ \AA}$ y $K^+ = 1.33 \text{ \AA}$), dicha característica permite al TI ser indistinguible por las membranas celulares e imitar la acción biológica de los iones K^+ (Figura 2). Se ha demostrado que el TI reemplaza al K^+ en la ATPasa Na^+/K^+ con una afinidad 10 veces mayor, de esta manera es transportado a través de las membranas celulares (Britten y Blank, 1968; Hoffman, 2003). Una vez dentro de la célula el TI genera efectos adversos en procesos bioquímicos centrales y alteración en rutas metabólicas formadoras de sustratos de elevado contenido energético.

En la glucólisis el TI es capaz de sustituir al K^+ en la enzima piruvato cinasa con una afinidad 50 veces mayor, inhibiendo la formación de adenosín trifosfato (ATP) a partir de fosfoenolpiruvato y adenosín difosfato (ADP) (Cavanagh, 1991; Kaye 1971). El efecto generado en la glucólisis continúa en el ciclo de Krebs, con la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa por la unión de TI en sustitución del K^+ (Hassan et al 1977), otro efecto observado es la disminución de flavín adenín dinucleótido (FAD), sustrato en la fosforilación oxidativa (Appenroth 1999).

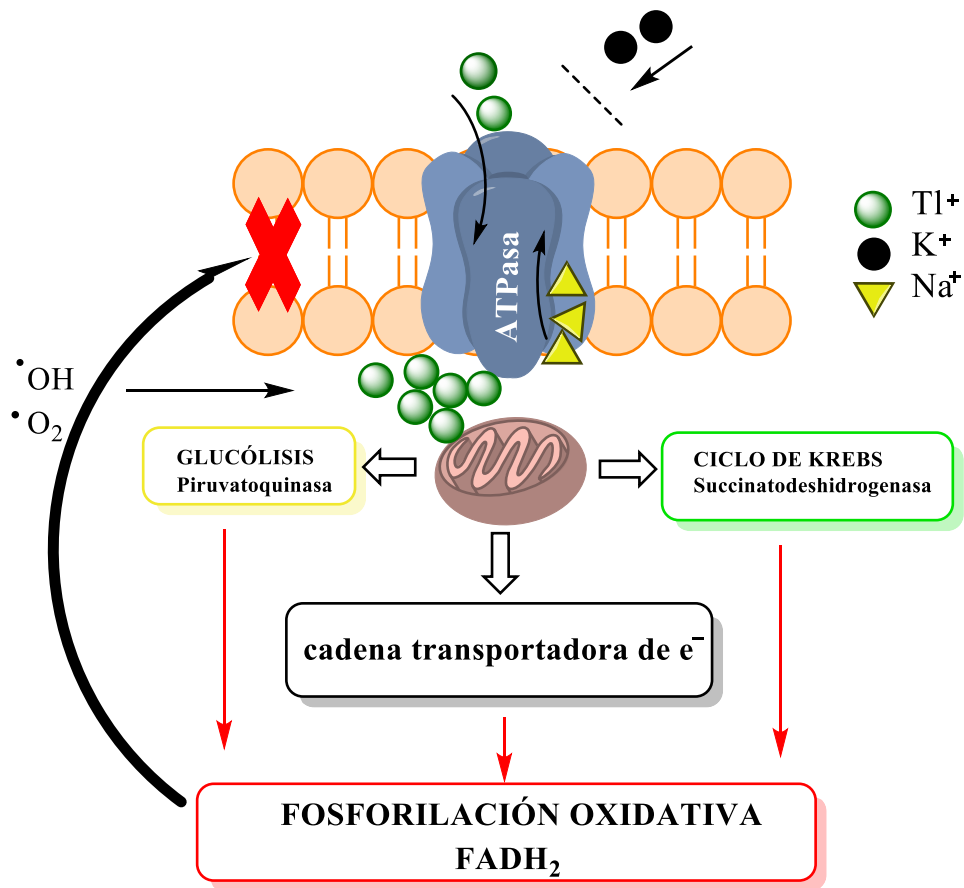


Figura 2. Mecanismo de acción del Tl

2.8 Estrés oxidativo y enzimas antioxidantes en la intoxicación por Tl

El estrés oxidativo es una condición en la que ocurre un incremento excesivo en la producción de radicales libres o especies reactivas y una disminución de los sistemas antioxidantes endógenos. Normalmente las especies reactivas son eliminadas por sistemas antioxidantes intracelulares, sin embargo, como resultado de un proceso de envejecimiento normal o por algunas alteraciones patológicas, estos mecanismos se encuentran dañados. En el organismo, la pérdida del balance oxido-reducción conduce a un daño celular severo, en la intoxicación por Tl el

resultado neto de la inhibición de enzimas en etapas cruciales como la Glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, es la deficiencia en la producción y utilización de energía (Hoffman 2003). Dosis únicas de acetato de TI (8 ó 16 mg/kg i.p.) en rata, generan un desequilibrio bioquímico entre la producción excesiva de radicales libres, especies reactivas de oxígeno ERO y la capacidad antioxidante del organismo, provocando daño oxidativo a biomoléculas y manteniendo a la célula en un proceso constante de estrés oxidativo. En la talitoxicosis el aumento de ERO; radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($HO\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se genera por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; estas especies altamente reactivas oxidarán lípidos, generando el mayor daño a la célula, ya que promueven la peroxidación lipídica, que afecta ácidos grasos poliinsaturados, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Galván et al., 2000, 2005).

Galván y colaboradores (1998) observaron un incremento de la peroxidación lipídica en dos regiones cerebrales (estriado y cerebelo) en ratas tratadas con 0.8 mg/kg de TI, mientras que una dosis mayor de 1.6 mg/kg de TI generó aumento en la peroxidación de lípidos en todas las regiones cerebrales estudiadas. Por otro lado, estudios tanto in vivo como in vitro mostraron que la exposición a TI disminuye la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) y la concentración de glutatión reducido (GSH), in vivo la administración de TI en hámster generó peroxidación de lípidos, particularmente en riñón, con una marcada disminución de los niveles de GSH, así como un agotamiento de GPx (Aoyama et al., 1988; Hanzel et al., 2005). Por el contrario, otro estudio in vivo demostró que 24 h después de la intoxicación por TI las concentraciones de GSH y GPx no disminuyeron en la corteza renal, médula o regiones cerebrales, sin embargo, 7 días después de la intoxicación si fue posible observar la disminución de GSH en estriado, sugiriendo que la expresión de marcadores de daño oxidativo se establece con el tiempo. (Appenroth y Winnefeld 1999; Galván et al., 2005; Osorio et al., 2015, 2017).

Una vez, demostrada la asociación entre la intoxicación por TI, el establecimiento del estrés oxidativo y la sobre producción de ERO, es necesario explicar la función

e importancia de las enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa frente a la tiliotoxicosis. Algunos de los sistemas enzimáticos son: La superóxido dismutasa (SOD) y la GPx. La SOD es una enzima capaz de catalizar la dismutación de dos radicales superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. La enzima GPx cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) utilizando peróxido de hidrógeno, un importante agente oxidante. El GSH es un tripéptido (glutamato, cisteína y glicina) sintetizado de novo en el citosol, donde el primer paso en la síntesis de GSH es catalizado por la enzima L-glutamato L-cisteína γ -ligasa (GCL), para formar γ -glutamil-cisteína. El GSH tiene una importante función antioxidante, ya que además de ser sustrato para la GPx, posee la capacidad de atrapar radicales HO \cdot por sí solo, debido al grupo tiol de su cisteína, lo que le confiere alta nucleofilicidad convirtiéndolo en el tiol no proteico intracelular más importante (Valko et al., 2007; Monostori et al., 2009).

La GCL es la enzima limitante de la velocidad de síntesis del GSH, su expresión responde al estrés oxidativo, en parte, porque está regulada positivamente por el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2). La acumulación nuclear de Nrf2 es un paso de señalización esencial para su función como factor de transcripción, como respuesta al estrés oxidante, el factor de transcripción Nrf2 se trasloca al núcleo donde requiere dimerizarse con pequeñas proteínas homólogas, como los factores de transcripción MAF, para lograr unirse al sitio promotor específico de los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en el gen promotor (Königsberg, 2007), y así ejercer su efecto inductor sobre la expresión de enzimas antioxidantes como GCL, glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucosil transferasa y SOD, GSH, GPx y catalasa (CAT) (Nguyen et al., 2004; Lee y Johnson, 2004; Vairetti, et al., 2021).

2.9 Cuadro clínico en la intoxicación con TI

La intoxicación por TI puede clasificarse como aguda, subcrónica ó crónica, según la vía, la dosis y el tiempo de exposición al metal, los síntomas son diversos e

inespecíficos ya que involucran la participación de múltiples órganos incluidos, corazón, riñones, sistema nervioso central y gastrointestinal (Tabla 3 y 4). En humanos la triada clásica en la intoxicación con TI consta de: gastroenteritis, polineuropatía y alopecia (Kazantzis et al., 1986; Cvjetko et al.,2010)

En la intoxicación aguda los síntomas gastrointestinales aparecen en las primeras horas, los pacientes presentan dolor abdominal severo, vomito, nausea y diarrea; por el contrario estos síntomas son leves o inexistentes en la intoxicación crónica. Las secuelas clínicas más frecuentes que se presentan en los pacientes, son la insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, alteraciones mentales, neuropatía y ceguera (Prick, 1979; Nogué et al., 1982; Mulkey y Oehme, 1993).

Tabla 3. Síntomas de la intoxicación por TI detectados en paciente durante su admisión.

Signos	Número de paciente										n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Gastroenterológico											
Dolor abdominal	•	‡	•	•	•	•	•	•	•		8
Nauseas/vómito	•	•	•	•		•	•	•	•		8
Constipación	•	‡	•	•	•	•	•	•	•		8
Diarrea			•	•							2
Neurológicos											
Dolor en las extremidades inferiores	•	‡	‡	•	‡	•	•	•	•	•	7
Dolor ascendente	•	‡	‡	•	‡	•	•	•	•	•	7
Debilidad	•	•	•	•	•	•	•	•	•		9
Perdida de balance	•	‡	•	•	•				•		5
Temblor	•	‡		•	•				•		4
Movimientos involuntarios		‡	•	•	•				•		4
Disfagia	•	•	•	•	•	•	•	•	•		9
Dificultad para el habla	•	‡	•	•	‡		•		•		5
Dolor de cabeza	•	‡		•	‡	•	•	•	•	•	7
Pérdida de conciencia	•	•	•	•	•						6
Convulsiones		•	•	•	•				•		5
Insomnio	•	‡	•	•	•	•	•	•	•	•	9
Características psicóticas	•		‡	•	•		•		•		5
Problemas visuales											
Visión doble	•	‡	‡	•	‡						2
Agudeza visual anormal		‡	‡	•	‡						1
Otras											
Erupción cutánea				•	•			•	•		4
Dolor de pecho pleurítico		‡	‡	•	‡	•	•			•	4
Opresión de pecho	•	‡	•	•	‡	•	•	•	•		7

Tabla 4. Signos de la intoxicación por TI detectados en pacientes durante su hospitalización. (Modificada de Al Hammouri 2011)

Signos	Número de paciente										n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Alopecia en											
piel, cabello y uñas	•		•	•	•		•	•	•		7
Perdida del tercio lateral de las cejas	•			•			•		•		4
Acné								•			1
Decoloración del cabello					•		•	•	•		4
Piel seca			•								1
Descamación de palmas y plantas	•		•	•	•	•	•		•		7
Líneas de Mess				•							1
Lesiones accematosas				•	•			•	•		4
Gastroenterológico											
Glositis								•			1
Estomatitis			•								1
Sensibilidad abdominal	•	‡		•	•	•	•		•	•	7
Protección abdominal						•	•				2
Sonidos intestinales hiperactivos							•				1
Neurológicos											
Ptosis		‡	‡	•	•	•			•		4
Examen neurológico anormal	•	•	•	•	•	•	•		•		8
Potencia anormal	•	•	•	•	•	•	•		•		8
Poder muscular	3/5	1/5	‡	‡	‡	3/5	4/5	5/5		5/5	
Propiocepción deteriorada		‡	‡	•	•	•			•		4
Sensación de pinchazo deteriorado		‡	‡	•	•	•			•		4
Sensibilidad táctil activada		‡	‡	•	•	•			•		4
Reflejos anormales	•	•	•	•	•	•			•		7
Reflejos tendinosos profundos	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↔	↔	↓	↔	

2.9.1 Dérmicos

El TI produce cambios en la dermis y sus derivados (cabello, uñas, sudor y glándulas sebáceas), sin embargo, la alopecia es el signo más característico. La depilación comienza aproximadamente 10 días después de la ingestión, la pérdida completa del cabello se observa en 1 mes y su recuperación se observa después de 2-3 meses (Prick, 1979; Mulkey y Oehme, 1993). Otros síntomas dérmicos incluyen eritema palmar, acné y piel escamosa, estos se presentan de 2-3 semanas posteriores a la intoxicación (Mulkey y Oehme, 1993; cvjetko 2010). El crecimiento de las uñas de las manos también se ve afectado, la presencia de rayas blancas transversales en las uñas (lineas de Mee) es característica pero no específica de la intoxicación con TI (Prick, 1979; Mulkey y Oehme, 1993; Galvan-Arzate y santamaria, 1998; cvjetko, 2010).

2.9.2 Gastrointestinales

La ingestión oral de sales de TI genera inflamación en estructuras de primer contacto, causando glositis, faringoesofaguitis, gastritis y colitis. Las primeras horas de la intoxicación cursan con dolor abdominal y hemorragia gastrointestinal, 3-4 días después de la intoxicación se presentan náuseas y vómitos precedidos de depresión de la motilidad intestinal y estreñimiento (Prick, 1979; Mulkey y Oehme, 1993).

2.9.3 Renales

El daño renal se observa 2 semanas después de la intoxicación, presentando albuminuria, hematuria y pérdida de hierro, así como presencia de leucocitos y cilindros en el sedimento urinario. La excreción renal de sales de talio es lenta y puede ser detectada cuatro semanas después de la intoxicación (Reed et al., 1963; Prick, 1979). Diversos estudios han demostrado que el estrés oxidativo es un

mecanismo importante de daño, que conduce a la disfunción renal en niños y adultos expuestos a TI (Osorio-Rico, et al., 2017; Duan W, et al., 2020). La administración de dosis altas de TI (30 mg / kg durante 4 días) aumentó la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en suero (Leung y Ooi 2000).

In vivo la administración de TI en hámster generó peroxidación de lípidos, particularmente en riñón, con una marcada disminución de los niveles de GSH, así como un agotamiento de GPx, sin embargo, un estudio realizado 24 h después de la intoxicación por TI mostro un comportamiento diferente, ya que no se observaron disminuciones de GSH ni GPx en corteza renal, demostrando la importancia del tiempo en el establecimiento del daño renal por estrés oxidativo (Aoyama et al., 1988; Appenroth y Winnefeld 1999; Galván et al., 2005; Osorio et al., 2017).

2.9.4 Cardiovasculares

Taquicardia sinusal, pulso irregular, hipertensión y dolor parecido a la angina de pecho se han reportado 2 semanas después de la intoxicación, los trastornos circulatorios pueden generar disnea severa, cianosis y muerte (Reed et al., 1963; Prick, 1979).

2.9.5 Sistema nervioso

De 2 a 5 días después de la intoxicación aguda y posterior a los síntomas gástricos ocurren las manifestaciones neurológicas caracterizadas por una neuropatía periférica dolorosa, parestesia de las extremidades inferiores, ataxia y temblores. Es frecuente el dolor de cabeza crónico, ansiedad, insomnio, irritabilidad, alucinaciones, delirio, convulsiones y coma (Davis *et al.*, 1981; Galvan-Arzate y santamaria, 1998; Kuo et al., 2005) En la intoxicación crónica, la ataxia y la parestesia pueden ser los síntomas sobresalientes, con el tiempo la parestesia

puede progresar a una neuropatía periférica evidente con debilidad y atrofia de la musculatura asociada (Dumitru y Kalantri.,1990; Mulkey y Oehme, 1993; Hoffman 2003). La neuropatía de la intoxicación con TI puede ser erróneamente diagnosticada como síndrome de Guillain-Barré (SGB) debido a la similitud de los síntomas característicos de esta enfermedad (Jha et al., 2006)

2.10 Histopatología de la intoxicación por talio

Experimentos con animales, han demostrado alteraciones morfológicas celulares en el sistema nervioso, riñón, intestino e hígado originados por intoxicaciones con sales de talio, se demostró por microscopía óptica y electrónica que los organelos citoplasmáticos más afectados son las mitocondrias.

En células ganglionares el TI provoca alteraciones morfológicas principales que se caracterizan por vacuolas, mitocondrias dilatadas y desmielinización de los axones (degeneración de las células de Schwann, estos cambios morfológicos desencadenan una evidente axonopatía degenerativa en los nervios más largos del organismo (Reed et al., 1963; Cavanagh et al., 1974; Prick, 1979).

2.11 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en una presentación clínica característica; gastroenteritis, polineuropatía y alopecia, sin embargo, el diagnóstico definitivo solo puede establecerse al demostrar concentraciones elevadas de TI en el cabello, las uñas, las heces, la saliva, la sangre o la orina (Mulkey y Oehme, 1993). La prueba estándar se realiza por espectroscopia de absorción atómica en una colección de orina de 24 horas (Wakid NW y Cortas NK, 1984) Los valores normales de orina están por debajo de 5 µg/L.

La selección de métodos analíticos debe realizarse cuidadosamente de acuerdo al tipo de muestra en la que se debe estimar el TI. Para determinar la presencia de TI en muestras de agua, la titulación amperométrica o ICP-MS puede ser útil. Plasma de acoplamiento inductivo: la espectrometría de emisión atómica (ICP-AES) es útil para analizar materiales biológicos y partículas de aire. El ICP-MS puede usarse también para el análisis de rocas. Los métodos rutinarios en uso son GFAAS (espectrometría de emisión atómica de horno de grafito), DPASV, ICP-MS y fotometría. (Saha, 2005). El diagnóstico de talio toxicosis se debe establecer de manera rápida y acertada pues la elección y comienzo oportuno del tratamiento son importantes para prevenir la muerte y daño neurológico irreversible en el paciente.

2.12 Tratamientos

El objetivo principal del tratamiento médico y farmacológico contra la intoxicación por TI está orientado a reducir los niveles del metal, aumentando su excreción a través de riñones y tracto gastrointestinal, disminuyendo así signos y síntomas de la intoxicación. Tras una intoxicación aguda con sales de TI, Chamberlain y colaboradores (1958) sugieren realizar un lavado gástrico, seguido de la administración de carbón activado 0.5 mg/kg por vía oral dos veces al día durante 5 días. La diálisis peritoneal no se emplea con frecuencia, ya que presenta niveles bajos de excreción y no se consigue eliminar de manera efectiva el metal (Moeschlin, 1980). La diuresis forzada en combinación con la hemodiálisis (HD) logran solo la eliminación del 43% del metal ingerido en un lapso de 3-7 días (Barcknow y Jenss, 1976). Estudios de casos clínicos han demostrado que el tratamiento temprano con carbón activado en combinación con tratamientos extracorpóreos, como hemodiálisis, hemoperfusión (HP) y hemofiltración venovenosa continua (HVC), puede reducir rápidamente los tóxicos circulantes y mejorar la eficacia terapéutica. (Hoffman, 1999; Misra, 2003; Zhang, 2014).

Como parte del tratamiento farmacológico el Azul de Prusia administrado por vía oral genera la absorción del 60-70% de TI durante el ciclo entero hepático (Kamerbeek et

al., 1971) y es considerado el antídoto de elección por la FDA (2003). Se ha estudiado el uso de agentes quelantes exógenos como; el dimercaprol (BAL), ditizona, ditiocarb y D-penicilamina entre otros como posibles antídotos contra la intoxicación por Tl (Paulson *et al.*, 1972; Lehman y Favari 1985), sin embargo, su efecto terapéutico no ha sido eficaz y en algunos casos se ha generado redistribución del metal hacia el cerebro, agravando la sintomatología neurológica (Bendl, 1969; Galvan-Arzate y Santamaria, 1998; Hoffamn 2003; Rusyniak *et al.*, 2003; Montes *et al.*, 2007). Se ha propuesto a las metaloproteínas como posibles agentes quelantes. Estudios *in vivo* demostraron la capacidad quelante de las metalotioneínas I y II frente los metales Cd y Tl, sin embargo, estos estudios no evaluaron el efecto quelante multiorgánico ni el posible efecto redistributivo de los metales al cerebro (Méndez *et al.*, 2003, Kilic y Kutlu, 2010).

2.12.1 Azul de Prusia

El azul de Prusia (AP), también llamado azul de París y azul de Berlín es una sustancia azul oscura utilizada comúnmente como pigmento, fue descubierto en 1704 por el químico Heinrich Diesbach en la ciudad de Berlín. El AP químicamente se denomina hexacianoferrato II férrico con la fórmula empírica $\text{Fe}_4\text{III} [\text{FeII} (\text{CN})_6]_3$ (Monona, 1994) y en forma de sal se denomina hexacianoferrato II férrico de potasio $\text{KFe}_3\text{III} [\text{FeII} (\text{CN})_6]_3$.

El hexacianoferrato II férrico potásico consiste en una red cristalina con la capacidad de intercambiar iones metálicos univalentes como cesio y talio, (Kourim *et al.*, 1964; Nigrovic, 1965). Kravzov y colaboradores (1993) demostraron *in vitro* que la eficacia del AP se ve alterada por el tamaño de partícula, a menor tamaño mayor es el área de superficie, aumentando así la absorción de Tl. La administración oral de 250 mg/kg/día de AP aumenta la excreción de Tl por las heces, mediante el intercambio del potasio en la superficie de los cristales de hexacianoferrato II férrico potásico durante el ciclo entero-enteral del Tl^+ en el intestino y disminuye la vida media del metal de 3.5 días a 1.8 días (Heydlauf, 1969; Kamerbeek *et al.*, 1971; Stevens *et al.*, 1974). Estudios *in*

vitro, *in vivo* y reportes de casos en humanos han demostrado la eficacia y seguridad del uso de AP, por ello la FDA (2003) lo ha aprobado como el antídoto de elección contra la talioxicosis (Lehmann y Favare, 1985; Rios y Noyola, 1992; Sojakova et al, 2015).

2.13 Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas intracelulares no enzimáticas, su peso molecular es de 6-7 KDa y constan de 61 a 68 aminoácidos de los cuales el 30% son cisteínas, en su estructura no presentan aminoácidos aromáticos ni histidinas (Kagi J y Vallee B, 1960). Las MTs fueron descubiertas por Margoshes y Vallee (1957), quienes las describieron como proteínas fijadoras de cadmio (Cd) en la corteza renal de los equinos. Las cisteínas presentes en las MTs forman puentes disulfuro y tienen alta afinidad por los metales que se encuentran coordinados en dos estructuras en forma de cluster metal-tiolato (Kagi & Valle, 1960).

2.13.1 Isoformas de las MTs

Se conocen 15 familias de MTs, la familia 1 corresponde a los mamíferos y en ella se encuentran cuatro isoformas: MT-I, MT-II, MT-III Y MT-IV (Palacios *et al.*, 2011). Los genes que codifican cada una de las isoformas se encuentran en el cromosoma 16 en humanos (Penkowa, 2006). A pesar de las diferencias entre especies, todas las MTs comparten algunas características importantes, químicamente presentan dos componentes, un componente polipeptídico y otro metálico, así como un elevado grado de similitud en la secuencia de aminoácidos, donde las cisteínas se agrupan en secuencias de tipo cys-x-cys, cys-cys y cys-x-y-cys donde “x” e “y” son aminoácidos distintos a la cisteína (kagi y Schaffer, 1988).

2.13.2 Distribución de las MTs en el organismo

Las MTs son proteínas principalmente citoplasmáticas, sin embargo, también se han detectado en fracciones mitocondriales, núcleo y lisosomas (Porter, 1974; Riordan y Richards, 1980; Cherian, 1994). MT-I y MT-II se expresan de manera coordinada y ubicua, su distribución es heterogénea y predominante en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y en menor medida en cerebro (Zelazowski y piotrowski, 1977; Onosaka et al., 1984; yagle and palmiter, 1985; Hidalgo et al., 2001). En el cerebro la MT-I y MT-II están presentes en los astrocitos, dichas isoformas se han detectado en menor medida en neuronas, células ependimales, epiteliales del plexo coroideo y células meníngeas de la piamadre (Hidalgo *et al.*, 2001). La MT-III presenta una distribución más restringida expresándose fundamentalmente en SNC, también se han detectado cantidades significativamente menores en tractos reproductores (masculinos y femeninos), lengua y estómago (Palmiter et al., 1992; Moffat y Séguin, 1999). Por otro lado, la MT-IV se expresa únicamente en epitelio escamoso estratificado (Quaife et al., 1994; Coyle *et al.*, 2002).

2.13.3 Estructura de MT-I /MT-II y su unión a metales

En los mamíferos las isoformas MT-I y MT-II constan de 61 a 62 aminoácidos, la secuencia de los mismos y la unión a metales condicionan la formación de la estructura terciaria (Figura 3. A) La utilización de técnicas espectroscópicas y espectrometrías permitió conocer la estructura espacial y ha sido crucial para comprender el comportamiento de las MTs frente a diferentes tipos de iones metálicos (Vasak et al., 1994; Robbins et al., 1991; palacios et al., 2011).

Fisiológicamente las MT-I y MT-II se encuentran unidas a 7 átomos de Zn o Cu. La unión de metales divalentes o monovalentes se da a través de las cisteínas y está coordinada en dos clusters metal-tiolato, el cluster más cercano al carbono terminal se encuentra ubicado en el dominio α y el más cercano al amino terminal se

encuentra en el dominio β , dichos clusters son capaces de coordinar respectivamente 4 y 3 iones metálicos divalentes o 6 iones metálicos monovalentes (Figura 3 B). Los dominios α y β se unen entre si por un *loop* flexible. (Winge y Miklössy, 1982; Kagi, 1993; Chan *et al.*, 2002; Vasak, 2005).

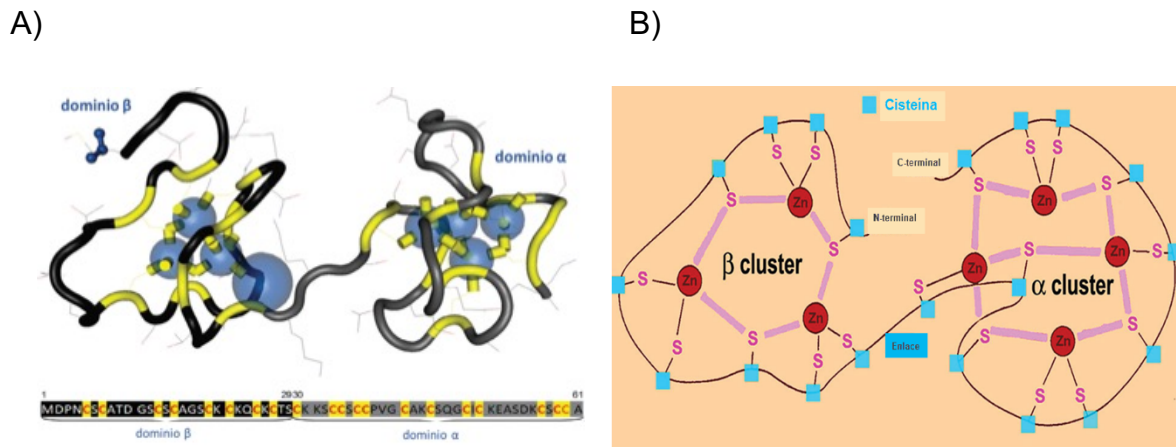


Figura 3. A) Caracterización estructural y secuencia de aminoácidos del dominio α y β de la MT-2 de rata, utilizando la base de datos (Modificada de Babula *et al.*, 2012). B) Unión de cisteínas a iones metálicos Zn, en los dominios α y β (Nielsen *et al.*, 2006).

En condiciones fisiológicas las MTs suelen coordinar Zinc y/o Cobre, sin embargo, el contenido metálico puede variar en función al tejido, la situación fisiológica y las condiciones ambientales, si existe una elevada concentración de otros metales pesados en el medio (Cd,Hg) estos podrán remplazar a los fisiológicos. La unión de metales por afinidad a las MTs es la siguiente: Zn (II) < Pb (II), <Cd (II), <Cu (I), < Ag (I), < Hg (II), < Bi (II) (Kagi & Kojima, 1987), dicha unión a metales puede ser reversible bajo ciertas circunstancias, como un descenso de pH o una variación en el estado redox (Nielson *et al.*, 1985).

2.13.4 Inductores de las MT-I y MT-II

La inducción de MTs resulta de la interacción de estímulos específicos con elementos de respuesta (RE) en el gen promotor, se conocen cuatro RE; 1) elementos de respuesta a metal (MRE), 2) elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), 3) elementos activados por transductores de señal y activadores de transcripción (STAT), 4) elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Searle et al., 1984; Oh et al., 1978; Andrews, 2000; Sabolic et al., 2010). Los principales inductores de MT-I y MT-II se clasifican en: metales, antibióticos, agentes citotóxicos, agentes estresantes, hormonas y factores de crecimiento entre otros (Tabla 5), generando una inducción heterogénea ya que no todos tejidos responden igual ante un mismo estímulo, (Kagi, 1993; Davis y Cousins 2000; Ruttkay et al., 2013).

Tabla 5 Agentes inductores de las MT-I, II *in vitro* y/o *in vivo* (Modificada de Kagi, 1993).

Clasificación de Inductores	Ejemplos
Metales	Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi
Antibióticos	Estreptozotocina Cicloheximida
Agentes inflamatorios y citoquinas	LPS Dexametasona Turpentina IL-1 IL.6 TNF α
Agentes citotóxicos	Hidrocarburos Etanol Isopropanol Cloroformo Tetracloruro de carbono EDTA
Agentes estresantes	Deprivación Inflamación Inmovilización Iradiación
Hormonas y factores de Crecimiento	Glucocorticoides Progesterona Estrógenos Catecolaminas Glucagón Insulina Angiotensina II IGF-1

2.13.5 Inducción de MT-I y MT-II por metales

Las MTs se han propuesto como bioindicadores de exposición y contaminación por iones metálicos ya que los metales de transición son potentes inductores de MT-I y MT-II, dicha inducción se da gracias a la unión del factor de transcripción MTF-1 a los MRE en el gen promotor. Estudios *in vitro* con células hepáticas han demostrado la inducción de MT-I y MT-II frente a la exposición a metales, de igual manera la administración *in vivo* de Zn, Cu, Cd, Co, Bi, Ag, Hg i.p. indujo la expresión de MTs, principalmente en hígado, páncreas y riñón. La presencia de Zn y Cu en la dieta también puede modular la expresión de MTs (Durnam y palmiter, 1981; Bittel et al., 1998; Ribas, 2010; Sabolic et al., 2010).

2.13.6 Funciones de las MTs

Han transcurrido más de 60 años desde el descubrimiento de las MTs por Margoshes y Vallee (1957), numerosos estudios han permitido conocer las propiedades estructurales, localización e inductores de dichas proteínas, sin embargo, su función es aun materia de discusión. Se han propuesto numerosas funciones en las que las MTs podrían participar, Sabolic y colaboradores (2010) recopilan y enumeran ocho : (1) homeostasis, almacenamiento y transporte de metales esenciales, como Zn y Cu, (2) Donación de Zn y Cu a metaloproteinas, factores de transcripción y enzimas, (3) Provisión de ZN y Cu durante la diferenciación celular y desarrollo de órganos durante periodos prenatales y perinatales, (4) contribución a la genotoxicidad y carcinogenicidad, (5) reparación y regeneración celular después de la extirpación de un órgano o lesión química, (6) Protección contra la toxicidad de metales al actuar como quelante, previniendo daño en la estructura y función celular, (7) eliminación de radicales libres generados en el metabolismo normal o en el estrés oxidativo inducido por metales tóxicos, sustancia no metálicas, inflamación o daño físico, (8) protección en neurodegeneración y otras enfermedades.

Las funciones de las MTs de mamíferos propuestas anteriormente han sido discutidas en diversos artículos de revisión, sin embargo, la actividad quelante, antioxidante, y neuroprotectora son las de mayor relevancia en este estudio. (Cherian 1994; Moffatt y Denizeau 1997; Suhy et al. 1999; Davis y Cousins 2000; Miles et al. 2000; Nordberg y Nordberg 2000; Cherian y Kang 2006; Rana 2008; Petering et al. 2009).

2.13.7 Actividad quelante de MT-I y MT-II

Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad quelante de MT-I y MT-II frente a un gran número de metales, siendo Cd, Pb, Cu, Hg y Ag quienes mostraron una elevada afinidad por la MT al desplazar al Zn presente en el complejo Zn-MT, sin embargo, la elevada afinidad de un metal por las MTs *in vitro* no necesariamente se correlaciona con la afinidad de unión *in vivo* o con la capacidad de inducir la síntesis proteica (Waalkes M et al, 1984). En un organismo vivo expuesto a elevadas concentraciones de metales la capacidad de las MTs de unir dichos metales y evitar así la interacción con otros componentes celulares es de suma importancia, lo cual ha motivado el estudio *in vivo* de la función quelante y detoxificadora de las MTs frente a metales de transición fisiológicos (Zn, Cu) y no fisiológicos (Cd, Hg, Pb). La evaluación de la función de las MTs frente a un exceso en las concentraciones de Cu, demostró en un modelo murino de la enfermedad de Wilson que la viabilidad de estos animales está ligada a la presencia de las MTs (Kelly y Palmiter, 1996). Diversos estudios han señalado a las MTs como las proteínas de mayor protección frente a la intoxicación aguda por Cd, demostrando que ratones wild-type generaron una tolerancia a la DL₅₀ 7 veces mayor que los ratones MT-null. (Park et al., 2001; Klaassen et al., 2009). Una evidencia más de la acción quelante de las MTs *in vivo* surgió de la mano de Kilic y kutlu, quienes en el 2010 demostraron que la administración exógena de MT generó una disminución de las concentraciones de TI en hígado de rata dependiente de la dosis.

3 Justificación

El Tl es un metal altamente tóxico, es considerado como uno de los principales contaminantes en la lista de la EPA. Estudios en mamíferos han demostrado que su DL_{50} es menor que Hg, Cd, Pb, Zn y Cu (Cheam, 2001). En 1973 la OMS y la EPA (1985) prohibieron el uso de sales de Tl como ingrediente activo en raticidas (Zelio) debido a numerosos reportes de intoxicación. A pesar de las directrices de la OMS, en los últimos 10 años (2008-2018) se han presentado casos de envenenamiento por sales de Tl. Los reportes recientes de casos de envenenamiento accidental e intencional, su creciente uso en la industria, la contaminación de talio en los suelos y su fácil asimilación por cultivos plantea la preocupación sobre el riesgo de exposición humana a causa de su elevada toxicidad (ATSDR 1992; Xiao et al., 2004).

Si bien el AP es el antídoto de elección por la FDA contra la taliotoxicosis, su efectividad en casos graves es ineficaz ya que no evita efectos neurológicos ni periféricos (lesiones renales y hepáticas). Con el fin de obtener una nueva terapia contra la intoxicación por Tl o aumentar la eficacia de AP se ha estudiado el uso de agentes quelantes como; el dietilditiocarbamato de sodio (Kamerbeek et al., 1971), dimercaprol (anti-Lewisita británica), D-penicilamina y el aminoácido tiol L-cisteína, los resultados de estos estudios son controvertidos ya que se ha demostrado la redistribución de Tl de los depósitos inactivos al cerebro (Ríos y Monroy-Noyola 1992, Montes et al., 2007).

Es de vital importancia proteger al cerebro pues es el órgano blanco en la intoxicación con Tl, por ello es necesario seguir en la búsqueda de agentes quelantes que potencien el efecto del AP y eviten la redistribución. Sabolic y colaboradores (2010) resaltan el importante papel de las MTs en la protección contra la toxicidad de metales pesados. Estudios in vivo centrados en la toxicidad de Tl y Cd revelaron que las MTs administradas exógenamente pueden actuar como quelante y antioxidante contra la peroxidación de lípidos generada por estos metales (Méndez et al, 2003, Kara et al, 2005, Kilic y Kutlu, 2010). La necesidad de

una nueva terapia contra la intoxicación con TI y los antecedentes previos de las MTs nos ha llevado a investigar los posibles efectos protectores de la administración de MT sola y en combinación con AP en un modelo de talitoxicosis aguda.

4 Hipótesis

La administración de metalotioneina sola o en combinación con azul de Prusia, tendrá un efecto citoprotector, mediado por la disminución en las concentraciones de talio en órganos y regiones cerebrales, sin causar redistribución a cerebro, además, generará un efecto antioxidante frente a la intoxicación aguda por talio en rata.

5 Objetivo general

Evaluar el efecto antídoto de la metalotioneína sola y en combinación con azul de Prusia en el modelo de intoxicación aguda por acetato talio en rata.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración de metalotioneina (100 µg y 600 µg) sola y en combinación con azul de Prusia en la intoxicación aguda por talio mediante un estudio de mortalidad y sobrevida.
- Cuantificar los niveles de talio en órganos en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata tras la administración de metalotioneina (100 µg y 600 µg) sola y en combinación con azul de Prusia.
- Cuantificar los niveles de talio en regiones cerebrales en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata tras la administración de metalotioneina (100 µg y 600 µg) sola y en combinación con azul de Prusia.
- Cuantificar los niveles de metalotioneina en órganos en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata tras la administración de metalotioneina (600 µg) sola y en combinación con azul de Prusia.
- Cuantificar los niveles de metalotioneina en regiones cerebrales en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata tras la administración de metalotioneina (600 µg) sola y en combinación con azul de Prusia.
- Determinar el efecto de la administración exógena de metalotioneina (600 µg única dosis), sola y en combinación con azul de Prusia en la función renal y hepática en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata.
- Determinar el efecto de la administración exógena de metalotioneina (600 µg única dosis), sola y en combinación con azul de Prusia en los niveles de glutatión reducido en hígado y riñón en el modelo de taliotoxicosis aguda en rata.

- Determinar en órganos la integridad celular y la inmunoreactividad de Nrf2 tras la administración de metalotioneina (600 µg única dosis), sola y en combinación con azul de Prusia en la talitoxicosis aguda en rata, mediante estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

6 Métodos

6.1 Reactivos

El acetato de talio (I), Tween-80 se adquirieron de Sigma-Aldrich (México). El estándar de absorción atómica para talio GFAA Mix se adquirió de PerkinElmer. El compuesto hexacianoferrato II férrico potásico (azul de Prusia), el estándar de absorción atómica para Plata y la mezcla de metalotioneínas (MTI-II) de hígado de conejo con una pureza del 98%, se compraron de Fluka y Creative BioMart-COP03 respectivamente. Otros reactivos fueron obtenidos por diferentes compañías nacionales

6.2 Preparación de sulfato de talio

Se prepararon 2 soluciones de acetato de Tl, para la dosis de 32 y 16 mg/kg se pesaron (515.6 g y 257.8 g) de acetato de Tl respectivamente y se disolvieron en 25 ml de agua desionizada en un matraz de aforo, teniendo una concentración de 16mg/ml y 8 mg/ml. La solución se transfirió a un frasco previamente etiquetado para su posterior uso.

6.3 Preparación de Metalotioneína

El liofilizado de MT fue resuspendido en 4 ml de s.s.i. Se realizaron las diluciones correspondientes para administrar 100 y 600 μg en 240 μl . Las alícuotas se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.4 Preparación de Azul de Prusia

El AP se preparó pesando 2.5 g del reactivo azul de Prusia que se disolvieron en 200 ml de tween 80 al 1%. Se utilizó un agitador magnético durante 10 minutos para garantizar la disolución. La solución con una concentración de 12.5mg/ml se transfirió a un frasco previamente etiquetado para su posterior uso.

6.5 Preparación de Tween-80 al 1%

Se depositaron 2 ml de tween-80 en un vaso de precipitado y se disolvieron en 200 ml de agua desionizada, para asegurar la correcta disolución se empleó un agitador magnético. La solución se transfirió a un frasco previamente etiquetado para su posterior uso.

6.6 Modificador de matriz

Se preparó una solución con 0.025 % de fosfato monobásico de amonio, 0.05 % de triton X-100, 1% de ácido nítrico y 2% ácido sulfúrico de 500 ml de agua desionizada.

6.7 Hemolizado

Para obtener el hemolizado se siguió el procedimiento descrito por Onosaca y Cherian (1982). Por cada 10 ml de sangre se agregaron 20 ml de KCl al 1.15%, la solución se agitó y centrifugó a 3,000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 20 ml de KCl continuando con el procedimiento antes mencionado por triplicado. Finalmente, el precipitado eritrocitario se resuspendió en 30 ml de Tris-HCl 30 mM (pH 8), se dejó reposar 10 min y se

centrifugo a 10,000 rpm por 10 min, se recogió el sobrenadante y se almaceno a -70 °C para su posterior uso.

6.8 Soluciones estándar

Talio

Se realizó una dilución 1:100 del estándar GFAA Mix marca PerkinElmer, aforando a 10 ml con Ac nítrico al 3%, obteniendo así un stock de TI con una concentración de 1000 ppb que fue utilizado para realizar la curva de calibración.

Plata

Se realizó una dilución 1:100 del estándar de Ag marca Fluka, aforando a 10 ml con Ac nítrico al 3 %, obteniendo un stock de Ag con una concentración de 10 ppm, de dicho stock se realizó una segunda dilución 1:100 para obtener un segundo stock con una concentración de 100 ppb que fue utilizado para realizar la curva de calibración.

6.9 Limpieza del material para la determinación de TI

Para realizar el análisis de las concentraciones de TI en los diferentes tejidos animales, se utilizaron tubos de ensayo de polietileno, que fueron lavados previamente y se mantuvieron 72 h en una solución de ácido nítrico al 1%, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron en la estufa a 65°C durante 15 minutos, evitando cualquier posible contaminación.

6.10 Animales

En este proyecto se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (250-280 g). El alojamiento de los animales se realizó en cajas de acrílico con 6 animales por caja,

bajo condiciones estándar (ciclos de 12:12 h luz–obscuridad, 23±2 °C) y 40% de humedad relativa, con libre acceso de agua y comida (Rodent Diet 5001). Los animales se trataron humanamente de acuerdo a los principios éticos y a las regulaciones especificadas por the Animal Care of Health National Institutes of México.

6.11 Grupos experimentales

De acuerdo a los tratamientos farmacológicos se establecieron 5 grupos experimentales con una n de 4-6 ratas por grupo. Todos los animales excepto los pertenecientes al grupo sham fueron administrados con una DL₅₀ (32 mg/kg) ó DL₂₅ (16 mg/kg) de acetato de TI vía i.p. reportadas previamente (Ríos and Monroy-Noyola, 1992). Se utilizaron 2 esquemas de administración de MT-I,II: MT-100 µg y MT-600 µg ambas fueron dosis única y se administraron 24 h después de la intoxicación con TI. El AP se administró en una dosis de 50 mg/kg vía oral dos veces al día con un intervalo de 8 h. Los 5 grupos experimentales fueron: Grupo Talio (TI+Veh); grupo Azul de Prusia (AP); grupo metalotioneina (MT); grupo Azul de Prusia más metalotioneina (AP+MT); grupo de ratas intactas (Sham), este grupo se utilizó solo para obtener valores basales de MT, en el estudio de marcadores renales y hepáticos, cuantificación de MT, GSH, e histología.

Tabla 6. Grupos experimentales

Grupo	Metalotioneina I 100 ó 600 µg (i.p.)	Azul de Prusia 50 mg/kg 4 días (v.o.)	Acetato de talio 32 ó 16 mg/kg (i.p.)	Vehículos Tween 80 (v.o.) ó SSI (i.p.)
TI+Veh			*	*
AP		*	*	*
MT	*		*	*
AP+MT	*	*	*	
Sham				

6.12 Intoxicación aguda

Para el estudio de mortalidad se utilizó una $n= 10$ animales por grupo y una dosis de 32 mg/Kg de acetato de TI ($C_2H_3O_2TI$) (DL_{50}) (Ríos *et al.*, 1989) por vía i.p, 24 h después de la intoxicación se comenzó con la administración de antídotos (AP y MT) y vehículos durante 4 días, 24 h después de la última administración de antídotos se realizó el registro de mortalidad y sobrevivida de cada grupo. El % de mortalidad se contabilizo de acuerdo al número de ratas muertas durante los 5 días del experimento (Figura 4).

Para las determinaciones de las concentraciones de TI, MT, marcadores renales, marcadores hepáticos y el estudio histopatológico, la intoxicación aguda se realizó administrando 16 mg/Kg de acetato de TI ($C_2H_3O_2TI$) (DL_{25}) (Ríos *et al.*, 1989) por vía i.p., 24 h después de la intoxicación se comenzó con la administración de antídotos AP y vehículos durante 4 días, y MT única dosis, 24 h después de la última administración de antídotos se realizó el sacrificio y obtención órganos y regiones cerebrales.

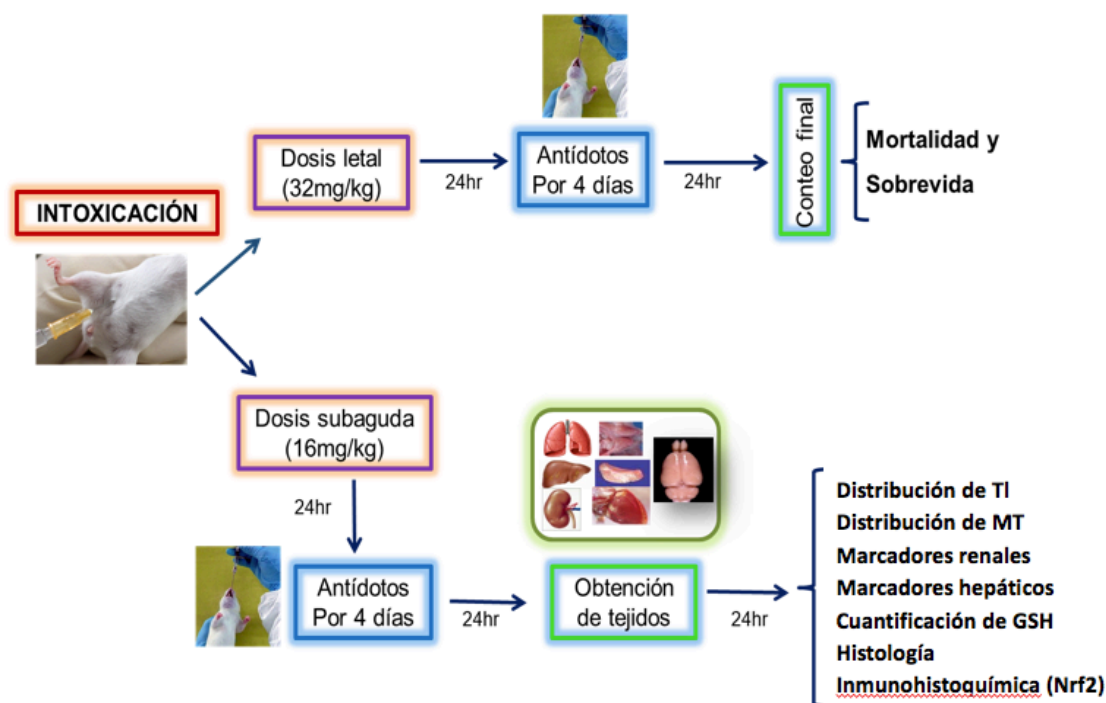


Figura 4. Esquema de la metodología

6.13 Obtención de tejidos

Se obtuvieron 6 órganos (hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón y testículo) y 6 regiones cerebrales (hipotálamo, mesencéfalo, cuerpo estriado, hipocampo, corteza y cerebelo) siguiendo la técnica establecida por Glowinski e Iversen (1996). Los tejidos disectados se pesaron y depositaron en tubos ependorf previamente lavados con ácido nítrico (HNO₃) al 1% durante 72 h, para la eliminación de elementos traza. Los tejidos se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis.

6.14 Tratamiento de las muestras biológicas y determinación de las concentraciones de TI por absorción atómica.

La digestión de los tejidos se realizó en 10 volúmenes (órganos) y 20 volúmenes (regiones cerebrales) de ácido nítrico, las muestras permanecieron en un baño de agua a 60 °C por 30 minutos, se agitaron y se realizaron diluciones con la solución modificador de matriz, que incrementa la termoestabilidad del talio (formación del complejo talio—pirofosfato) y posibilita el paso del metal a la etapa de calcinación (Christian, 1969; Ríos et al., 1989). Las diluciones utilizadas fueron 1:20 en 500 µl (órganos) y 1:3 en 300 µl (regiones cerebrales) y fueron analizadas empleando el espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito Perkin-Elmer Analyst 600 y el automuestreador AS 800. La curva de calibración utilizada se muestran a detalle en la tabla 7.

Tabla 7. Curva de calibración de TI

CONCENTRACIÓN (ppb)	STOCK (µL)	AFORO (mL)
10	50	5
20	100	5
50	250	5
100	500	5
200	1000	5

6.15 Tratamiento de las muestras biológicas y determinación de las concentraciones de MT por absorción atómica.

La determinación de la concentración de MT en tejidos biológicos se realizó utilizando el método de saturación por Ag (Scheuhammer y Cherian, 1986) con pequeñas modificaciones. El tejido se homogenizó en 300 μl de una mezcla (1.5:1 v/v) de buffer de fosfatos 0.05M (pH 7) y NaCl 0.375 M. En tubos de polietileno previamente lavados se hicieron reaccionar 200 μl del homogenado con 400 μl de solución amortiguadora de glicina 0.5 M y 250 μl de solución de plata (20 ppm) mezclando suavemente y dejando reposar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se realizó el lavado agregando 100 μl de hemolizado, hirviendo durante 2 min y centrifugando a 10,000 rpm por 10 min, el proceso de lavado se realizó por triplicado.

Del sobrenadante final se realizaron diluciones con Ac nítrico al 3%, 1:10 o 1:20 (órganos) y 1:2 o 1:10 (regiones cerebrales) en 1000 μl . El análisis se realizó empleando el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 600 con horno de grafito. La curva de calibración utilizada se muestra a detalle en la tabla 8.

Tabla 8. Curva de calibración de Ag

CONCENTRACIÓN (ppb)	STOCK (μL)	AFORO (mL)
1	50	5
2	100	5
5	250	5
10	500	5
20	1000	5

6.16 Determinación de marcadores bioquímicos de daño renal y hepático.

Los animales se sacrificaron cinco días después de la intoxicación con talio. Las muestras sanguíneas utilizadas en este estudio corresponden a los animales utilizados para la determinación de las concentraciones de TI y MT (600 µg única dosis). Para obtener el suero la sangre se recolectó en tubos limpios sin anticoagulante, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos y el suero se almacenó a -20°C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones de creatinina, urea, alanina amino-transferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y proteínas totales (PT) usando el autoanalizador Cobas c 111 (Roche, EE. UU.), Con kits comercialmente disponibles (Roche Diagnostics).

6.17 Determinación de glutatión reducido (GSH)

Los animales se sacrificaron cinco días después de la intoxicación con talio. Los tejidos utilizados para la detreminación de GSH corresponden a los animales utilizados en estudios previos. El contenido tisular de glutatión reducido (GSH) se determinó como describen Hissin y Hilf (1979). Diariamente, se preparó un buffer de fosfatos (PB-EDTA); fosfato de sodio 0,1 M, tampón EDTA 5 mM (pH 8) y se mantuvo en hielo hasta su uso. La solución de o-ftalaldehído (OPA) se preparó en metanol absoluto de grado reactivo, inmediatamente antes de su uso. Las muestras de tejido se homogeneizaron en 3,75 ml de tampón (PB-EDTA) pH 8,0 y 1 ml de HPO₃ (25%), los homogenados se centrifugaron a 3000 x g durante 15 min, se tomaron alícuotas de 500 µL de sobrenadante y se añadieron a 4,5 ml de (PB-EDTA) más 100 µl de (OPA), la mezcla se agitó y se dejó incubando durante 15 min, a temperatura ambiente. La fluorescencia se determinó a 350 nm de excitación y 420 nm de longitudes de onda de emisión, en un espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer LS50B). Los resultados se expresaron como µmol de GSH por g de tejido húmedo (Diaz-Ruiz, et al., 2009).

6.18 Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Los animales se anestesiaron y luego se perfundieron con una solución salina fría seguida de una solución de formaldehído al 10% v/v a 4°C. Los órganos se disecaron y procesaron por separado en un aparato Histokinette 200 (Reichert Jung), se embebieron en parafina y se cortaron con micrótomo en secciones de cinco micrómetros de espesor que fueron montadas en portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron usando un microscopio óptico. Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes se incubaron con anticuerpo monoclonal contra Nrf2 1:100 (Laboratorio Nrf2 abcam). Las secciones se hirvieron en tampón citrato (pH 6 o 9) en un horno microondas durante 2 x 10 min. Las secciones se preincubaron con peróxido de hidrógeno al 0,3% en PBS (solución tamponada con fosfato) durante 30 min y posteriormente se incubaron con antisueros biotinilados secundarios, después se sumergieron en el complejo avidina-biotina-peroxidasa; (Sistema LSAB HRP, DAKO, Carpinteria; CA). La reacción inmune resultó en la oxidación de la 3,3-diaminobencidina por la peroxidasa (Liquid DAB, DAKO Carpinteria CA). Los sitios de reacción se visualizaron como una tinción marrón. La contratinción con hematoxilina se realizó después de la inmunotinción (Montes et al. 2015).

6.19 Estadística

La estimación de la probabilidad de supervivencia se realizó mediante gráficos de Kaplan-Meier y la comparación entre curvas se analizó usando prueba de Mantel-Cox. Las concentraciones de TI en los órganos y regiones cerebrales, los marcadores hepáticos y renales así como las concentraciones de GSH se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se realizó la prueba post hoc Dunnett. Todos los análisis se realizaron en el software SPSS Statistics 20.0 (Chicago, Illinois, EE. UU.). Los datos se expresan como media \pm SE. Los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ se consideraron de significación estadística.

7 Resultados

7.1 Mortalidad

El efecto del tratamiento con MT (100 µg y 600 µg única dosis) sola y en combinación con AP sobre la mortalidad generada por acetato de TI (32 mg/Kg) se muestra en la figura 5. Se observó que la dosis de acetato de talio de 32 mg/Kg indujo un aumento de la mortalidad en los animales del grupo control (Panel A, B). Como se esperaba, el tratamiento con AP protegió parcialmente a las ratas contra los efectos del TI, con un aumento en la supervivencia del 40% ($p < 0.050$, Chi cuadrada) con respecto al grupo control (panel A), mientras que la tasa de mortalidad en los grupos tratados con MT (panel A, B) aumento a más del 80% en comparación con el grupo AP. La combinación de tratamientos AP+MT (MT 100 g) genero un efecto similar al observado en el grupo AP sin embargo el efecto no fue mejor que el generado por el AP solo (panel A) Por lo tanto, la administración de MT (100 µg, y 600 µg única dosis) sola o en combinación con AP no generó mayor supervivencia que el antídoto de elección AP en la intoxicación aguda por acetato de TI (32 mg/kg).

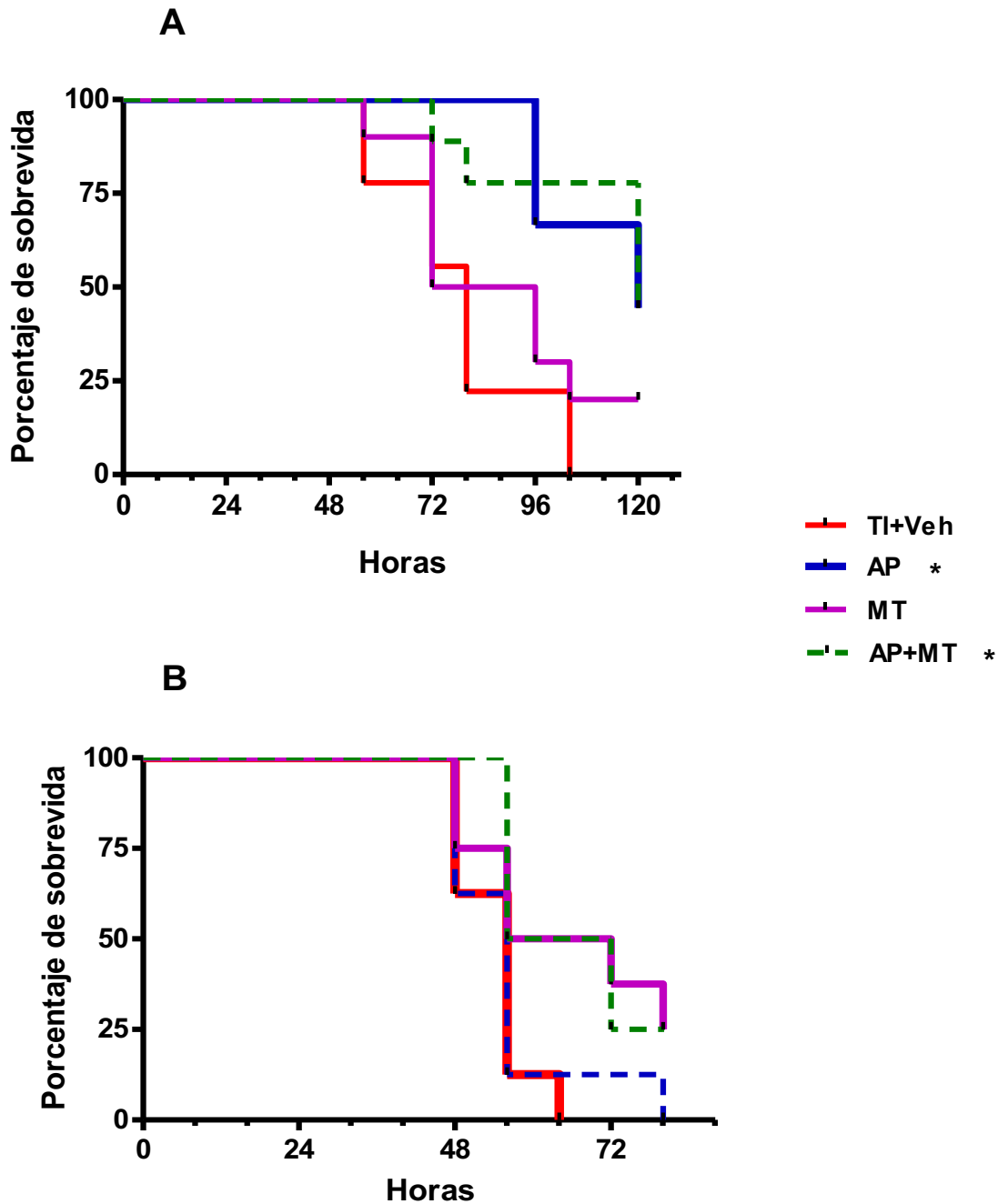


Figura 5. Estimación de la probabilidad de sobrevida (EPS). Todos los animales fueron administrados con acetato de TI (32 mg/kg). Los antídotos administrados fueron: AP v.o. (50mg/kg por 4 días) y MT i.p; **A)** 100 µg única dosis, **B)** 600 µg única dosis. La EPS se realizó durante 5 días posteriores a la intoxicación, n= 8-10 animales por grupo. *TI+Veh*, grupo Talio línea continua roja; *AP*, grupo azul de Prusia línea continua azul; *MT*, grupo Metalotioneina línea continua morada; *AP+MT*, grupo azul de Prusia+Metalotioneina línea discontinua verde. Kaplan-Meier. (* p<0.05 Mantel-Cox).

7.2 Determinación de las concentraciones de TI en órganos

Los niveles de talio en órganos periféricos después del tratamiento con los antidotos AP y MT (100 µg o 600 µg única dosis) solos y en combinación se muestran en la figura 6.

En el panel A, se muestra la media \pm SEM de los niveles de talio en riñón; los valores se expresan como µg de TI por gramo de tejido húmedo. Como se puede observar, la administración de AP, mostró una disminución del 54% en la concentración de TI en comparación con el grupo TI+Veh. Asimismo, en el grupo MT-100 se observó una reducción del 16% en comparación con el grupo TI+Veh. La administración de la combinación de antidotos AP+MT-100 generó la mayor disminución de la concentración de TI en un 80% con respecto al grupo TI+Veh, por otro lado el grupo MT-600 mostró un aumento del 85% frente al grupo TI+Veh.

El panel B muestra los resultados de los niveles de TI en los testículos. El tratamiento con azul de Prusia generó una reducción del 67% en los niveles de TI con respecto al grupo TI+Veh. Asimismo, los grupos MT-100 y MT-600 mostraron disminuciones de TI de 32 y 17%, respectivamente en comparación con el grupo TI+Veh, este efecto en la disminución de las concentraciones de TI también se observó en la combinación de tratamientos en los grupos AP+MT-100 y AP+MT-600, donde el grupo PB+MT-100 mostró la mayor disminución (77%) frente al grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron estadísticamente diferentes del grupo TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

El panel C muestra los resultados del análisis de TI en el bazo. La concentración de TI en el grupo AP fue 70% menor que la determinada en el grupo TI+Veh. Mientras tanto, la administración de MT sola generó una disminución del 32% en el grupo MT-100 con respecto al grupo TI+Veh; la mayor disminución de TI se observó con la combinación de antidotos en los grupos PB+MT-100 y PB+MT-600 con

disminuciones del 71 y 73%, respectivamente en comparación con el grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron diferentes de TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

Los niveles de TI medidos en el corazón se muestran en el panel D. El tratamiento con AP generó una disminución del 63% en los niveles de TI con respecto al grupo TI+Veh. Asimismo, el grupo MT-100 mostró una disminución del 17% en la concentración de TI en comparación con el grupo TI+Veh. Finalmente, la combinación de antídotos en los grupos AP+MT-100 y AP+MT-600, produjo la mayor disminución de los niveles de TI, 74% y 68% respectivamente frente al grupo TI+Veh. En este órgano, solo los antídotos AP y la combinación con MT 100 y 600 fueron diferentes en comparación con el grupo TI+Veh.

El panel E muestra los resultados de la concentración de TI pulmonar. El tratamiento con AP generó una reducción del 63% de TI frente al grupo TI+Veh. Asimismo, en el grupo MT-100 se observó la disminución del 44% en la concentración de TI con respecto al grupo TI+Veh. Nuevamente, la combinación de antídotos mostró un mayor efecto, con disminuciones del 81% para el grupo AP+MT-100 y 66% para el grupo AP+MT-600 en comparación con el grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron diferentes de TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

Las concentraciones hepáticas de TI se muestran en el panel F. Tras la administración del antídoto AP las concentraciones de TI mostraron una reducción del 71% en este grupo en comparación con el grupo TI+Veh. El tratamiento con MT en los grupos MT-100 y MT-600 generó disminuciones de 35% y 29% respectivamente frente al grupo TI+Veh. Nuevamente, la combinación de antídotos tuvo la mayor reducción del contenido de TI, con disminuciones del 78% para el grupo AP+MT-100 y 74% para el grupo AP+MT-600 en comparación con el grupo TI+Veh. En este órgano, solo los antídotos AP y la combinación con MT 100 y 600 fueron diferentes en comparación con el grupo TI+Veh.

De manera general se observó que, el tratamiento con AP generó en promedio una disminución significativa del 70 % de los niveles de TI en todos los órganos estudiados en comparación con el grupo control TI+Veh. La administración de MT (100 o 600 µg) sola o en combinación con AP disminuyó la concentración de talio en órganos de importancia metabólica como pulmón e hígado.

Los valores de la Media \pm SEM de TI (g/tejido) para todos los órganos estudiados se muestran en la tabla 9.

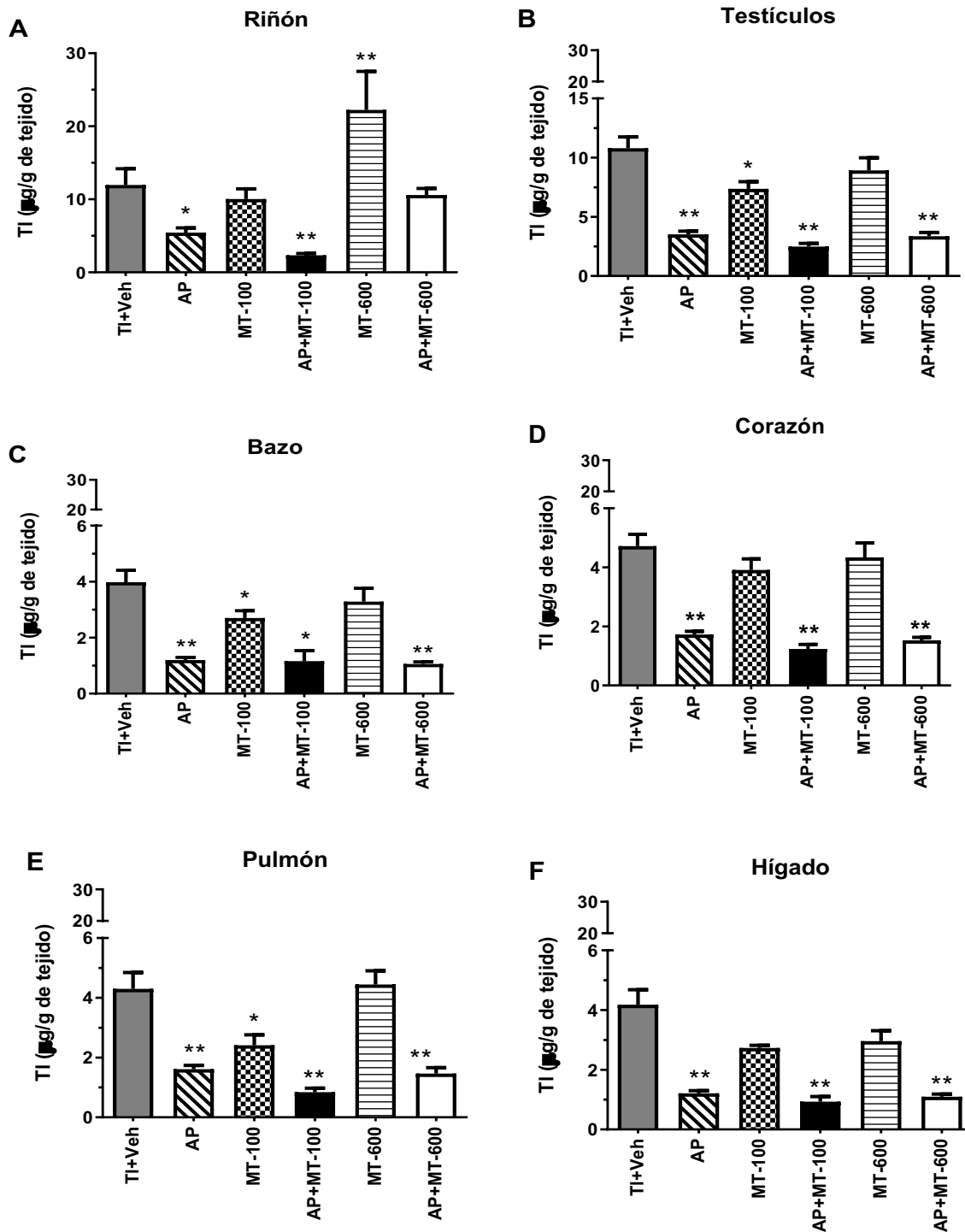


Figura 6. Concentración de Talio en órganos. Todos los animales fueron administrados con acetato de TI (16 mg/kg i.p.) y los tejidos se obtuvieron 5 días después de la intoxicación. Los antídotos administrados fueron: AP v.o. (50mg/kg por 4 días) y MT i.p (100 µg o 600 µg única dosis). Las concentraciones de TI se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras representan el promedio ± SEM de n= 4-6. *Ti+Veh*, grupo Talio; *AP*, grupo azul de Prusia; *MT-100* y *MT-600*, grupo Metalotioneina; *AP+MT-100* y *AP+MT-600*, grupo azul de Prusia+Metalotioneina. panel A (riñón), panel B (testículos), panel C (bazo), panel D (corazón), panel E (pulmón) panel F (hígado). Las marcas denotan un efecto estadístico * p < 0,05, ** p < 0.001 vs TI + Veh. ANOVA de una vía seguida de la prueba Dunnett.

Tabla 9. Niveles de talio en órganos.

Grupo	Riñón ($\mu\text{g/g tejido}$)	Testículos ($\mu\text{g/g tejido}$)	Bazo ($\mu\text{g/g tejido}$)	Corazón ($\mu\text{g/g tejido}$)	Pulmón ($\mu\text{g/g tejido}$)	Hígado ($\mu\text{g/g tejido}$)
<u>TI+Veh</u>	11.97 ± 2.21	10.80 ± 0.95	3.98 ± 0.43	4.72 ± 0.40	4.30 ± 0.55	4.18 ± 0.050
AP	5.44 ± 0.64*	3.52 ± 0.27**	1.20 ± 0.09**	1.73 ± 0.11**	1.61 ± 0.13**	1.21 ± 0.09**
MT-100	10.05 ± 1.40	7.36 ± 0.62*	2.70 ± 0.26*	3.91 ± 0.37	2.41 ± 0.35*	2.73 ± 0.09
AP+MT-100	2.34 ± 0.25**	2.48 ± 0.27**	1.16 ± 0.37*	1.24 ± 0.15**	0.84 ± 0.13**	0.93 ± 0.17**
MT-600	22.25 ± 5.26**	8.93 ± 1.1	3.29 ± 0.48	4.34 ± 0.49	4.44 ± 0.46	2.96 ± 0.35
AP+MT-600	10.60 ± 0.89	3.36 ± 0.31**	1.06 ± 0.07**	1.53 ± 0.11**	1.46 ± 0.20**	1.09 ± 0.09**

TI+Veh, grupo Talio (16 mg/kg); *AP*, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); *MT-100* ó *MT-600* grupo Metalotioneina (100 ó 600 μg); *AP+MT*, grupo Azul de Prusia+Metalotioneina. Media \pm SEM. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ frente a *TI+Veh*.

7.3 Niveles de talio en las regiones cerebrales

Los niveles de talio en regiones cerebrales después del tratamiento con los antídotos AP y MT (100 µg o 600 µg única dosis) solos y en combinación se muestran en la figura 7.

En el panel A, se muestra la media \pm SEM de los niveles de talio en hipocampo; los resultados se expresan como µg de TI por gramo de tejido húmedo. Como se puede observar, la administración de AP, mostró una disminución significativa del 66% con respecto al grupo TI+Veh. El mayor efecto de disminución en la concentración de TI se puede observar en la combinación de antídotos AP+MT-100 con una disminución del 77% en comparación con el grupo TI+Veh. De igual manera la combinación de antídotos AP+MT-600, tuvo una marcada disminución de 66% frente al grupo TI+Veh. Solo la combinación de antídotos con MT 100 y 600 fueron diferentes en comparación con el grupo TI+Veh.

Las concentraciones de TI en estriado se muestran en el panel B, donde se observaron disminuciones de TI del 65% para el grupo AP y 28% para el grupo MT-100 en comparación con el grupo TI+Veh. La combinación de los antídotos AP+MT-100 y AP+MT-600 mostró la mayor disminución de los niveles de TI frente al grupo TI+Veh, con reducciones del 75 y 66%, respectivamente. Todos los grupos fueron diferentes de TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

El panel C muestra las concentraciones de TI en el hipotálamo. El tratamiento con AP generó una disminución del 68% de los valores de TI en comparación con el grupo TI+Veh. Por otro lado, los grupos MT-100 y MT-600 mostraron disminuciones del 26 y 18%, respectivamente, en comparación con el grupo TI+Veh. Nuevamente, la combinación de antídotos mostró la mayor reducción de TI en comparación con la media del grupo TI+Veh, con reducciones de 77% en el grupo AP+MT-100 y 67% en el grupo AP+MT-600. Todos los grupos fueron diferentes del grupo TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

En el panel D se muestran las concentraciones de TI en el mesencéfalo, donde el tratamiento con AP generó una disminución de TI del 64% con respecto al grupo TI+Veh, dicho efecto se observó también en el tratamiento con MT-100, sin embargo, este solo generó una disminución del 31% de TI en comparación con el grupo TI+Veh. Nuevamente, la combinación de antídotos mostró las mayores reducciones, 74% (AP+MT-100) y 68% (AP+MT-600), respectivamente, en comparación con el grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron diferentes del grupo TI+Veh excepto el tratamiento con MT-600.

Los niveles de TI en cerebelo, se muestran en el panel E. El grupo AP mostró una disminución del 66% de TI frente al grupo TI+Veh. Los grupos MT-100 y MT-600 mostraron disminuciones de TI de 22 y 21%, respectivamente, en comparación con el grupo TI+Veh. Por otro lado, la mayor reducción en las concentraciones TI se observó en la combinación de antídotos, con una disminución del 74% para ambos grupos con respecto al grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron diferentes de grupo TI+Veh.

El panel F muestra las concentraciones de TI en corteza. Se observa una disminución de 69% en los niveles de TI en el grupo AP, con respecto al grupo TI+Veh. Los grupos MT-100 y MT-600 mostraron disminuciones del 22 y 21% respectivamente en comparación con el grupo TI+Veh. Finalmente, la combinación de antídotos mostró el comportamiento previamente observado en las otras regiones cerebrales, donde los grupos AP+MT-100 y AP+MT-600 generaron la mayor reducción en los niveles de TI, 75 y 69% respectivamente en comparación con el grupo TI+Veh. Todos los grupos fueron diferentes del grupo TI+Veh.

Los valores de la Media \pm SEM de TI (g/tejido) para todas las regiones cerebrales estudiadas se muestran en la tabla 10.

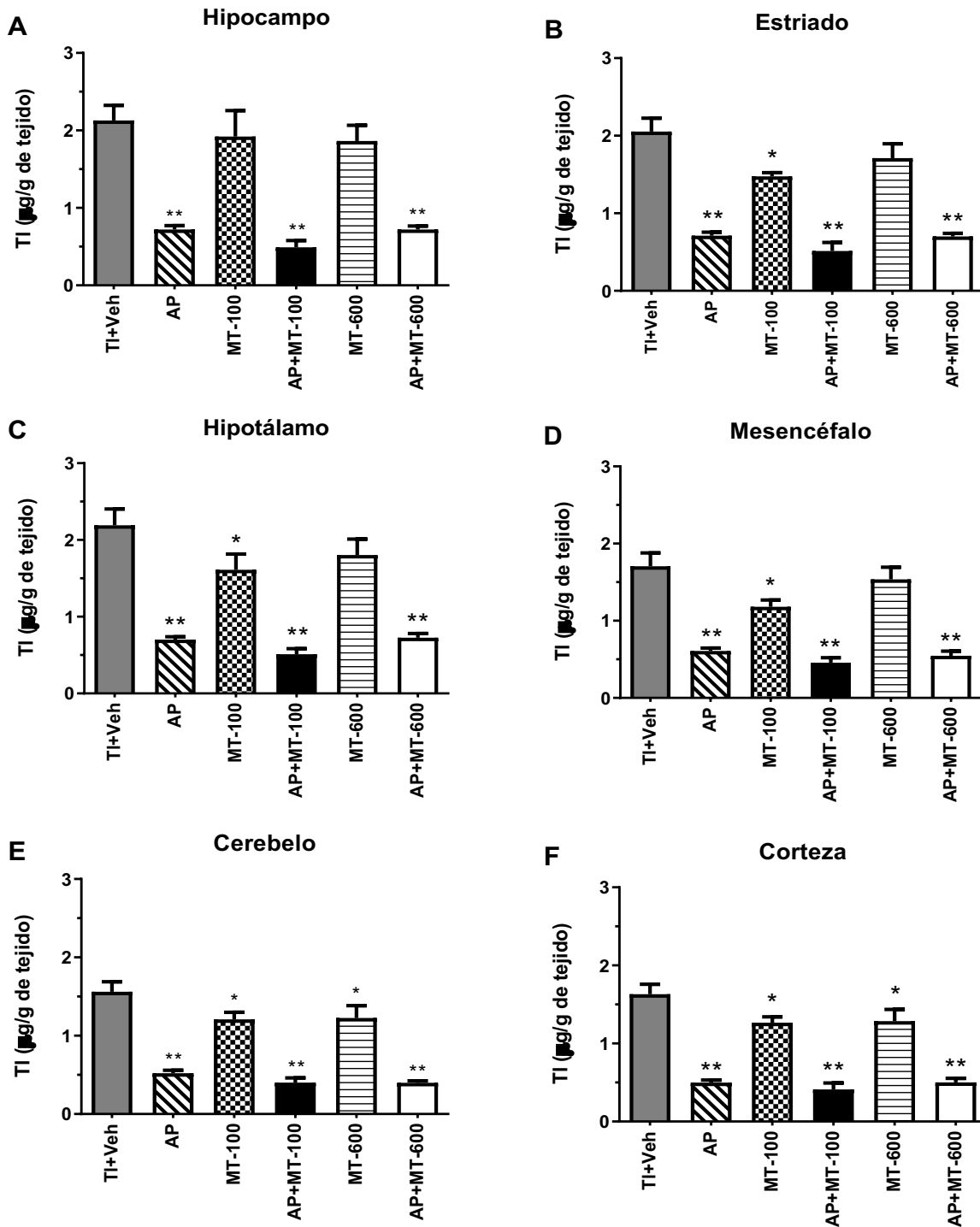


Figura 7. Concentración de Talio en regiones cerebrales. Todos los animales fueron administrados con acetato de TI (16 mg/kg i.p.), los tejidos se obtuvieron 5 días después de la intoxicación. Los antídotos administrados fueron: AP v.o. (50mg/kg por 4 días) y MT i.p (100 µg o 600 µg única dosis). Las concentraciones de TI se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras representan el promedio \pm SEM de n= 4-6. *Ti+Veh*, grupo Talio; *AP*, grupo azul de Prusia; *MT-100* y *MT-600*, grupo Metalotioneina; *AP+MT-100* y *AP+MT-600*, grupo azul de Prusia+Metalotioneina. panel A (hipocampo), panel B (estriado), panel C (hipotálamo), panel D (mesencéfalo), panel E (cerebelo) panel F (corteza). Las marcas denotan un efecto estadístico * p < 0,05, ** p < 0.001vs *Ti+Veh*. ANOVA de una vía seguida de la prueba Dunnett.

Tabla 10. Niveles de talio en regiones cerebrales.

Grupo	Hipocampo ($\mu\text{g/g}$ tejido)	Estriado ($\mu\text{g/g}$ tejido)	Hipotálamo ($\mu\text{g/g}$ tejido)	Mesencéfalo ($\mu\text{g/g}$ tejido)	Cerebelo ($\mu\text{g/g}$ tejido)	Corteza ($\mu\text{g/g}$ tejido)
Tl+Veh	2.13 \pm 0.20	2.05 \pm 0.17	2.19 \pm 0.21	1.71 \pm 0.02	1.56 \pm 0.13	1.63 \pm 0.13
AP	0.72 \pm 0.05**	0.71 \pm 0.04**	0.70 \pm 0.04**	0.61 \pm 0.04**	0.52 \pm 0.04**	0.50 \pm 0.03**
MT-100	1.92 \pm 0.03	1.47 \pm 0.05*	1.61 \pm 0.21*	1.18 \pm 0.09*	1.21 \pm 0.09*	1.27 \pm 0.07*
AP+MT-100	0.49 \pm 0.09**	0.51 \pm 0.11**	0.51 \pm 0.07**	0.46 \pm 0.06**	0.40 \pm 0.06**	0.41 \pm 0.08**
MT-600	1.86 \pm 0.02	1.71 \pm 0.18	1.80 \pm 0.21	1.54 \pm 0.02	1.23 \pm 0.16*	1.29 \pm 0.15*
AP+MT-600	0.72 \pm 0.05**	0.70 \pm 0.04**	0.73 \pm 0.05**	0.55 \pm 0.06**	0.40 \pm 0.03**	0.50 \pm 0.05**

Tl+Veh, grupo Talio (16 mg/kg); AP, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); MT-100 ó MT-600 grupo Metalotioneina (100 ó 600 μg); AP+MT, grupo Azul de Prusia+Metalotioneina. Media \pm SEM. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * p < 0,05 y ** p < 0,001 frente a Tl+Veh.

7.4 Niveles de metalotioneina en órganos

Las concentraciones de MT en órganos después del tratamiento con MT (600 µg única dosis) sola o en combinación con AP en el modelo de talio toxicosis aguda en rata se representan en la figura 8.

La intoxicación con TI y la administración de MT 600 µg única dosis no tuvieron ningún efecto sobre las concentraciones de MT en hígado, sin embargo, en testículo la intoxicación con Talio generó un aumento en las concentraciones de MT del 65%, 94% y 65% en los grupos TI+Veh, AP y MT-600 respectivamente frente al grupo Sham, la combinación de antídotos AP+MT-600 tuvo un mayor efecto, ya que el aumento en las concentraciones de MT fue significativo con respecto a todos los grupos. En riñón el grupo TI+Veh muestra una tendencia a aumentar la concentración de MT con respecto al grupo Sham, sin embargo, este aumento no fue significativo. Por otro lado, la combinación de antídotos AP+MT generó una disminución en la concentración de MT $\geq 65\%$ con respecto a todos los grupos. En bazo todos los tratamientos (AP, MT-600, AP+MT-600) produjeron una disminución $\geq 95\%$ en la concentración de MT en comparación con los grupos Sham y TI+Veh. En pulmón, el grupo TI+Veh presentó un aumento en las concentraciones de MT cuatro veces mayor respecto al grupo sham, mientras que el tratamiento con MT en los grupos MT-600 y AP+MT600 evito el aumento en la concentración de MT generado por la administración TI. En corazón los cuatro grupos (TI+Veh, AP, MT-600 y AP+MT-600) aumentaron significativamente tres veces las concentraciones de MT con respecto al grupo sham, mientras que la administración de MT en los grupos MT-600 y AP+MT-600 generó un aumento cinco veces mayor en la concentración de MT con respecto a los grupos TI+Veh y AP.

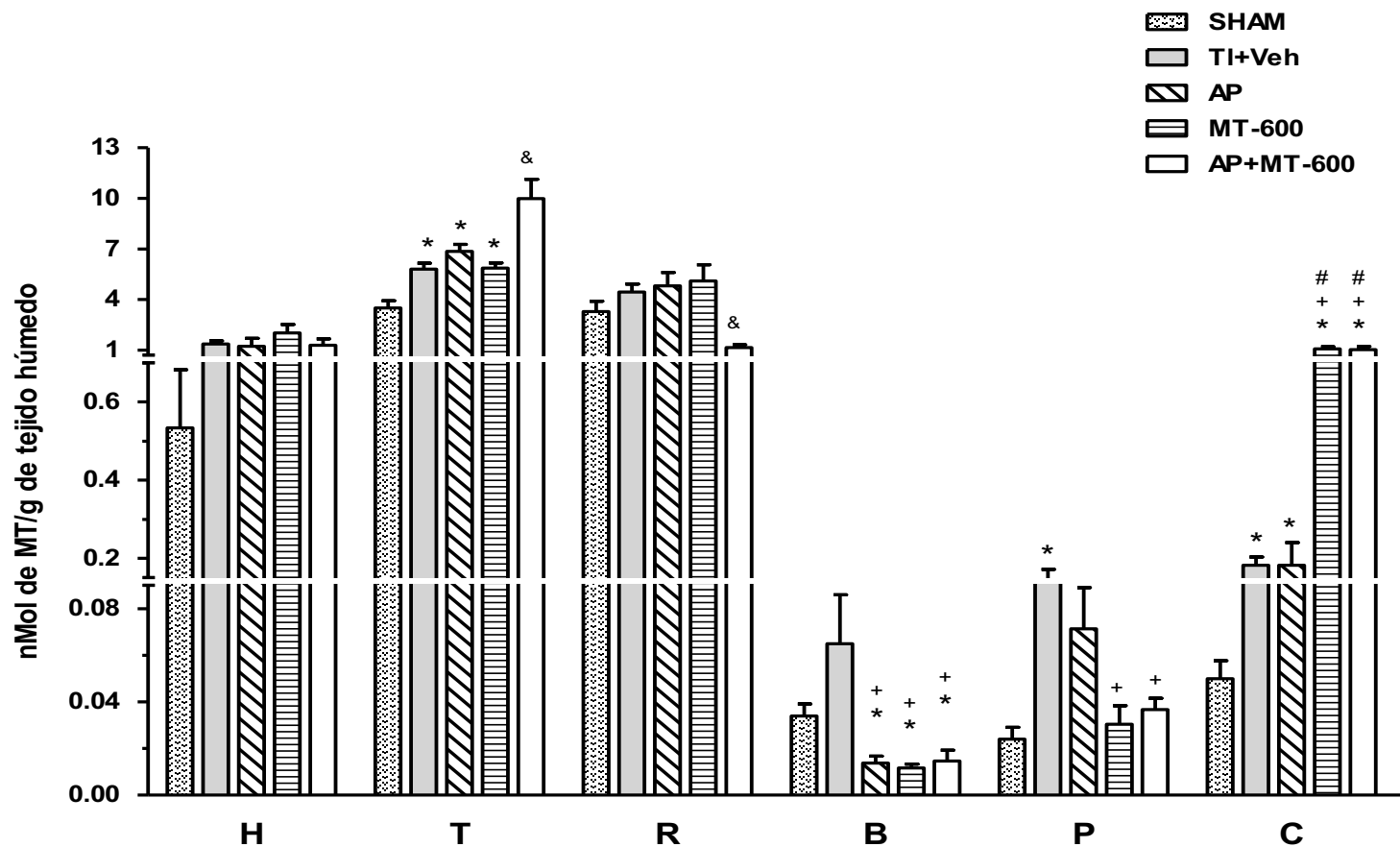


Figura 8. Concentración de MT en órganos. Todos los animales fueron administrados con acetato de TI (16 mg/kg i.p.) y los tejidos se obtuvieron 5 días después de la intoxicación. Los antídotos administrados fueron: AP v.o. (50mg/kg por 4 días) y MT i.p; 600 µg única dosis. Las concentraciones de MT se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras representan el promedio \pm SEM de n= 4-6. *TI+Veh*, grupo Talio y vehículo; *AP*, grupo azul de Prusia; *MT*, grupo Metalotioneina; *AP+MT*, grupo azul de Prusia+metalotioneina. Hígado (H), Testículo (T), Riñón (R), Bazo (B), Pulmón (P), Corazón (C). Las marcas denotan diferencia significativa con respecto a: *Grupo sham, +Grupo TI, #Grupo AP, ++Grupo AP+MT, &Todos los grupos. Se realizó Kruskal-wallis seguida Mann-Whitney ($p < 0.05$).

7.5 Niveles de metalotioneina en regiones cerebrales

Las concentraciones de MT en regiones cerebrales después de la intoxicación con TI y del tratamiento con MT (600 µg única dosis) sola o en combinación con AP se representan en la figura 9.

Bajo el esquema de administración de MT 600 µg única dosis, se observó que en hipocampo todos los grupos experimentales (TI+Veh, AP, MT-600 y AP+MT-600) mostraron un aumento significativo \geq al 47% en las concentraciones de MT con respecto al grupo Sham. El aumento de MT observado en hipocampo contrasta con los resultados obtenidos en otras regiones cerebrales; en hipotálamo los grupos MT-600 y AP+MT-600 generaron la disminución del 38% y 65% respectivamente de MT en comparación al grupo sham y solo el grupo AP+MT-600 mostró una disminución significativa del 52% con respecto al grupo AP. En mesencéfalo el único cambio en las concentraciones de MT se observó en el grupo AP+MT-600 con una disminución significativa \geq el 65% con respecto a todos los grupos. En cerebelo los grupos TI+Veh, AP y MT-600 disminuyeron en 73%, 70% y 52% respectivamente los valores de MT en comparación con el grupo sham, mientras que la combinación de antídotos AP+MT-600 no fue diferente respecto al sham. En la corteza, los tratamientos generaron un comportamiento contrario al ocurrido en hipocampo, ya que en todos los grupos (TI+Veh, AP, MT-600 y AP+MT-600) se observó una disminución significativa \geq al 71% de los niveles de MT con respecto al grupo sham.

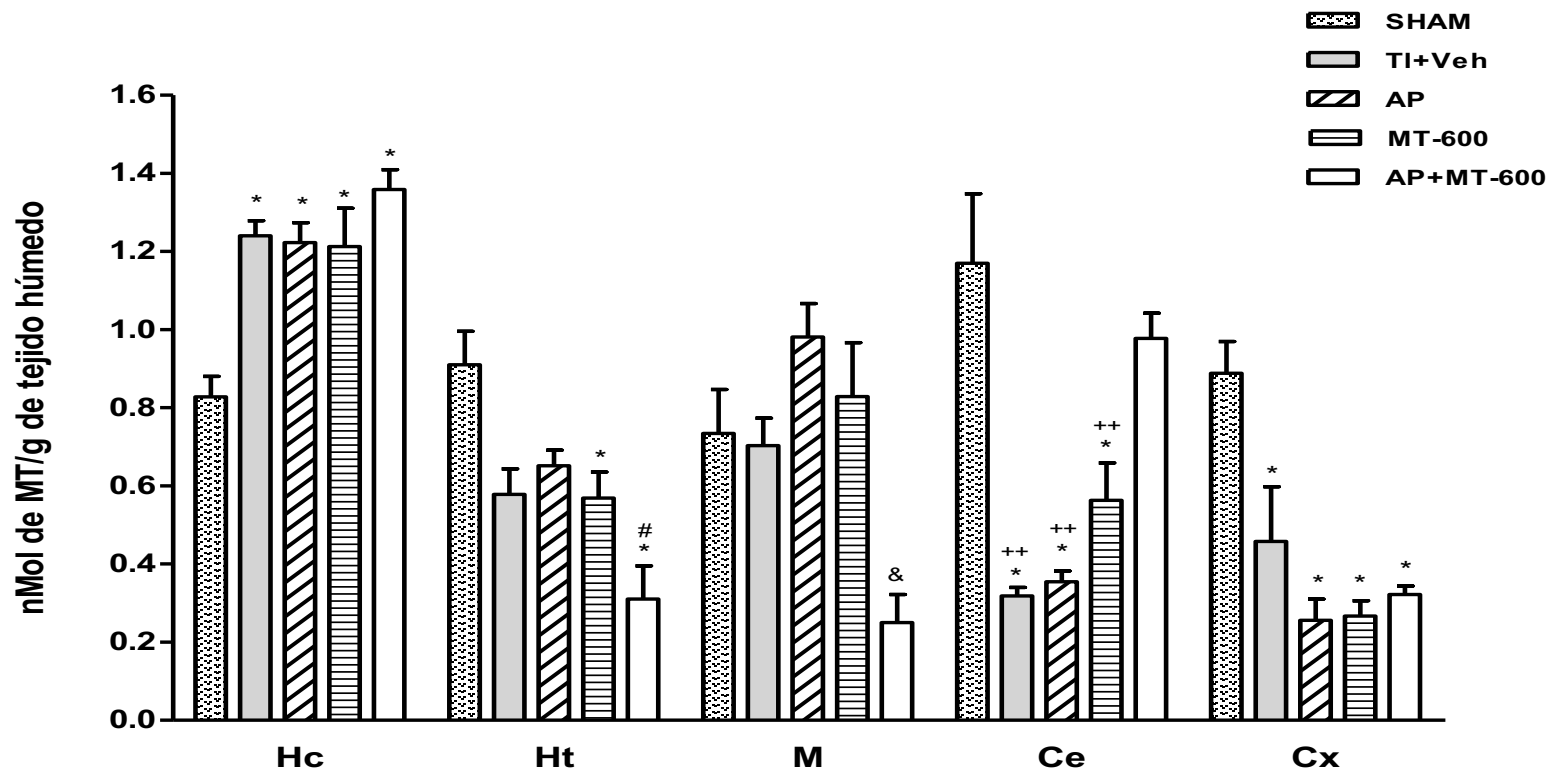


Figura 9. Concentración de MT en cerebro. Todos los animales fueron administrados con acetato de TI (16 mg/kg i.p.) y los tejidos se obtuvieron 5 días después de la intoxicación. Los antidotos administrados fueron: AP v.o. (50mg/kg por 4 días) y MT i.p; 600 µg única dosis. Las concentraciones de MT se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Las barras representan el promedio \pm SEM de $n = 4-6$. *Ti+veh*, grupo Talio y vehículo; *AP*, grupo azul de Prusia; *MT*, grupo Metalotioneina; *AP+MT*, grupo azul de Prusia+Metalotioneina. Hipocampo (Hc), Estriado (S), Hipotálamo (Ht), Mesencéfalo (M), Cerebelo (Ce) y Corteza (Cx). Las marcas denotan diferencia significativa con respecto a: *Grupo sham, +Grupo TI, #Grupo AP, ++Grupo AP+MT, &Todos los grupos. Las regiones Hc y Ce se analizaron por Kruskal-wallis seguida Mann-Whitney, Cx, Ht y M fueron analizadas por ANOVA de una vía seguida de Tukey ($p < 0.05$).

7.6 Marcadores bioquímicos de daño renal y hepático.

El efecto de los tratamientos sobre la toxicidad renal y hepática de TI se muestra en la tabla 11. La intoxicación con TI generó cambios en los niveles de urea y creatinina, el aumento fue significativo en ambos casos ($p < 0.05$) con valores de urea y creatinina tres y dos veces mayores que el grupo sham. Los tratamientos AP y MT (600 μg) solos o en combinación evitaron el aumento en los niveles de urea y creatinina generados por la administración de TI. Por otro lado, la administración de TI y los tratamientos solos o en combinación (AP, MT y AP+MT) no generaron cambio alguno en los marcadores hepáticos; ALT, AST y TP.

Tabla 11. Efecto de MT (600 μg única dosis) y AP en los marcadores hepáticos y renales.

Grupo	Creatinina mg/dL	Urea mg/dL	ALT U/L	AST U/L	TP g/dL
Sham	0.36 \pm 0.01	42 \pm 2.8	83 \pm 8.7	310 \pm 11.1	7.3 \pm 0.07
TI+Veh	0.86 \pm 0.24*	150 \pm 34.9*	59 \pm 3.9	276 \pm 26.2	7.5 \pm 0.19
AP	0.41 \pm 0.02	57 \pm 8.8	72 \pm 2.1	335 \pm 28.2	7.6 \pm 0.20
MT	0.42 \pm 0.03	62 \pm 11.7	58 \pm 5.3	281 \pm 30.2	7.5 \pm 0.20
AP+MT	0.36 \pm 0.01	44 \pm 1.6	61 \pm 7.2	311 \pm 42.6	7.7 \pm 0.21

Los valores representan el promedio \pm SEM de $n = 4-6$ ratas por grupo. *Sham*, grupo de animales sin ningún tratamiento; *TI+Veh*, grupo Talio (16 mg/kg); *AP*, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); *MT*, grupo Metalotioneina (600 μg); *AP+MT*, grupo azul de Prusia + Metalotioneina. *denota diferencia estadística con respecto a todos los grupos ($P < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett)

7.7 Determinación de glutatión reducido (GSH) en riñón e hígado.

Para saber si el efecto citoprotector observado en los biomarcadores de riñón e hígado se debía a un efecto antioxidante ejercido por la MT, se evaluaron los niveles de GSH en los tejidos figura 10. En riñón (panel A) se observó una disminución en los niveles de GSH del 65% en el grupo TI+Veh y 55% en el grupo AP con respecto al grupo de Sham. Si bien la combinación de antídotos AP+MT-600 mostró una tendencia en el aumento de los niveles de GSH con respecto al grupo TI+Veh esta no fue significativa, sin embargo, MT-600 si mostró un aumento significativo del 83% en los niveles de GSH en comparación con el TI+Veh. En hígado (panel B) no se observó diferencia en los niveles de GSH entre ninguno de los grupos evaluados.

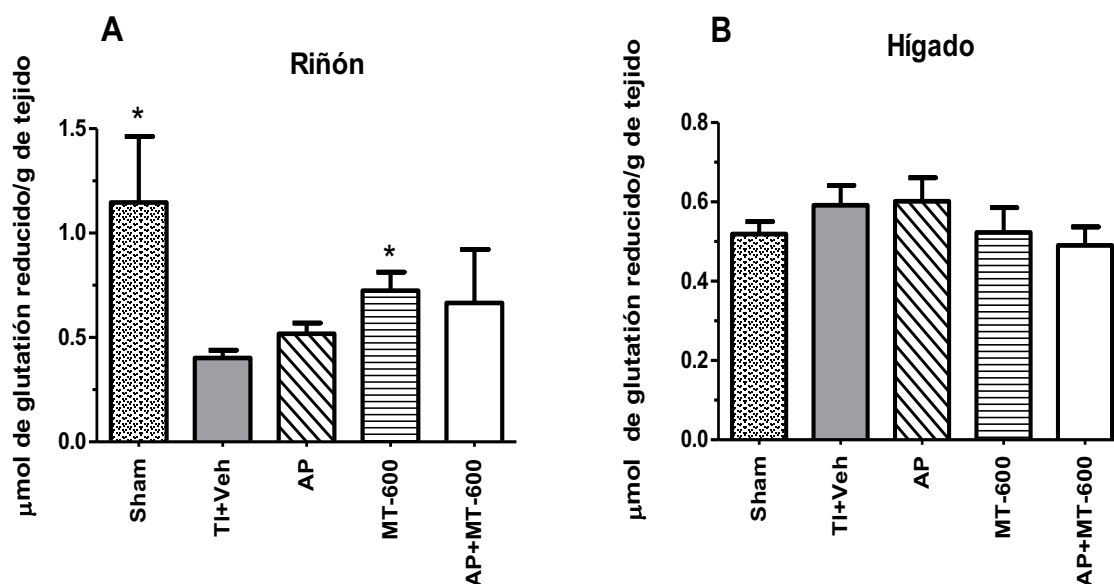


Figura 10. Niveles reducidos de glutatión (GSH). Los valores de glutatión en riñón se expresan en μmol de GSH por gramo de tejido, representan el promedio \pm SEM de $n = 6-7$ ratas por grupo animales por grupo. *Sham*, grupo de animales sin ningún tratamiento; *TI+Veh*, grupo Talio (16 mg/kg); *AP*, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); *MT*, grupo Metalotioneina (600 μg); *AP+MT*, grupo azul de Prusia + Metalotioneina. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. * $p < 0,05$ frente a TI+Veh.

7.8 Estudio histopatológico

La figura 11 muestra la estructura histológica de diferentes tejidos (riñón, testículo, bazo, corazón, pulmón e hígado). El examen histológico utilizando hematoxilina-eosina no reveló cambios morfológicos asociados a los tratamientos TI+Veh, AP, MT-600 ó AP+MT-600 en ninguno de los órganos. En los hallazgos morfológicos del presente estudio se observó, la estructura normal de los glomérulos, el epitelio tubular proximal, los túbulos y la membrana basal del riñón (paneles A-E); resultados similares se observaron en los testículos, tanto en el parénquima como en túbulos seminíferos y células de Leydig, así como en células germinales y células de Sertoli, mostrando un aspecto normal en todos los grupos estudiados (paneles F-J).

En el bazo se observó la pulpa blanca formada por tejido linfático, y la pulpa roja, compuesta por senos vasculares, sin cambios en su morfología (paneles K-N). En los paneles Ñ-R se muestra el músculo cardíaco con fibras agrupadas en límites, tejido conectivo y capilares entre las fibras cardíacas sin lesiones. De igual manera no se observaron lesiones en secciones representativas de pulmón, mostrando conservación de la membrana basal bronquial y células endoteliales vasculares, así como los tubos bronquiales (paneles S-W). Finalmente, los cortes de hígado mostraron una arquitectura hepática sin alteraciones con presencia de una vena central rodeada de cordones hepáticos sinusoides (paneles X-B1).

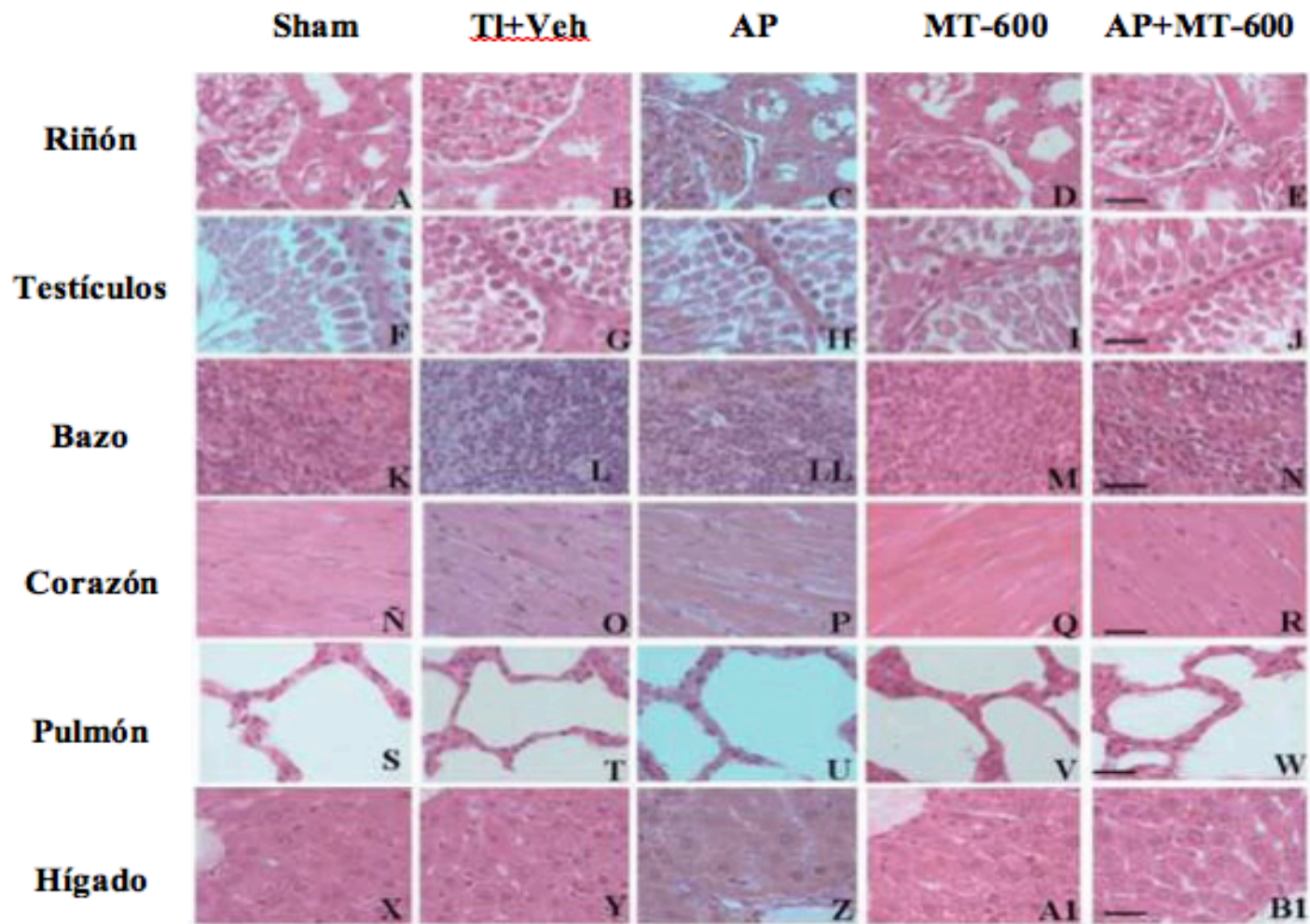


Fig. 11 Análisis histopatológico de cortes de tejido de riñón, testículo, bazo, corazón, pulmón e hígado obtenidos de ratas. *Sham*, grupo de animales sin ningún tratamiento; *Tl+Veh*, grupo Talio (16 mg/kg); *AP*, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); *MT*, grupo Metalotioneina (600 µg); *AP+MT*, grupo azul de Prusia + Metalotioneina. Los órganos muestran un aspecto normal y no se observaron lesiones evidentes en los grupos analizados. Tinción con hematoxilina-eosina, aumento de 1000 X. Barras de escala = 20 µm.

7.9 Estudio inmunohistoquímico de Nrf2

La figura 12 se muestra la inmunohistoquímica realizada en varios órganos; riñón, testículo, bazo, corazón, pulmón e hígado para identificar a Nrf2 como marcador de respuesta al estrés oxidativo frente a los tratamientos administrados TI+Veh, AP, MT-600, AP+MT-600. El examen inmunohistoquímico en ratas sham reveló una inmunoreactividad escasa para Nrf2 en secciones de bazo y corazón (paneles K y Ñ) mientras que se observó una ligera inmunoreactividad en riñón, testículo, pulmón e hígado (paneles A, F, S y X). En los animales tratados con TI+Veh, se observó una evidente, intensidad moderada de inmunoreactividad en todos los órganos (paneles B, G, L, O e Y) principalmente en el pulmón (panel T). El grupo tratado con AP, mostró una leve inmunoreactividad para riñón, bazo, corazón, pulmón e hígado (paneles C, LL, U y Z), mientras que en testículo se observó un aumento moderado en la inmunoreactividad (panel H). Así mismo, se observaron resultados similares para el grupo MT-600 (paneles D, I, M, Q, V y A1). Al comparar la inmunoreactividad observada en ratas sham, se detectó una inmunotinción de Nrf2 aumentada en todos los órganos estudiados de los grupos TI+Veh, AP, MT-600 y AP+MT-600 (Tabla 12).

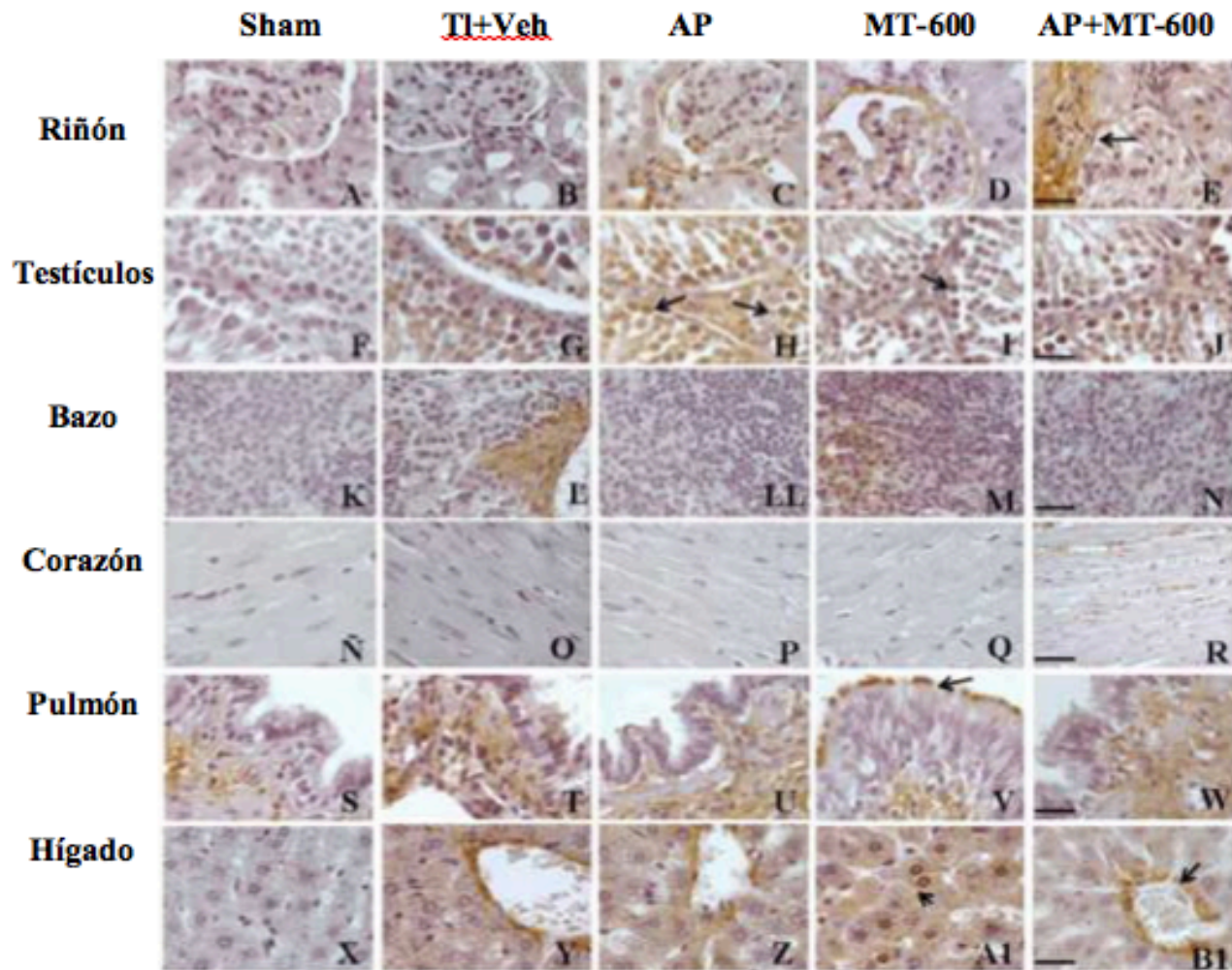


Fig. 12. Estudio inmunohistoquímico de Nrf2 en cortes de tejido de riñón, testículo, bazo, corazón, pulmón e hígado obtenidos de ratas. *Sham*, grupo de animales sin ningún tratamiento; *Tl+Veh*, grupo Talio (16 mg/kg); *AP*, grupo azul de Prusia (50 mg/kg por 4 días); *MT*, grupo Metalotioneina (600 µg); *AP+MT*, grupo Azul de Prusia+Metalotioneina. Se observó un aumento de la inmunoreactividad de Nrf2 en tejido vascular glomerular de riñón, hepatocitos, vena central del hígado, membrana basal bronquial, pulmón y testículo de los grupos experimentales. La flecha muestra la inmunoreactividad de Nrf2. Ampliación 1000 X. Barras de escala = 20 µm.

Tabla 12. Evaluación morfológica semicuantitativa del análisis inmunohistoquímico de Nrf2.

	sham	TI+Veh	AP	MT-600	AP+MT-600
Riñón	+	+	+	++	+++
Testículos	+	++	+++	+++	+++
Bazo	---	+	+	+	++
Corazón	---	+	---	---	+
Pulmón	++	+++	+++	+++	+++
Hígado	+	+	++	++	++

8 Discusión

Los hallazgos del presente estudio demostraron una disminución de las concentraciones de TI en los diversos órganos estudiados, debido al efecto de la MT administrada sola o en combinación con AP. El mecanismo de decorporación de TI por AP es bien conocido; durante su paso por el intestino, las moléculas de AP intercambian K^+ por iones Tl^+ en la superficie de la red de $KFe(Fe(CN)_6)$ (AP). Una vez realizado el intercambio, el AP forma un compuesto estable con el TI, que a su vez se excreta en las heces, acelerando así la decorporación del mismo (Kravzov et al., 1993). La MT, por otro lado, ha sido propuesta como un antídoto quelante para TI en talio toxicosis (Kılıç G y Kutlu M 2010). En este estudio la MT sola no mostro un efecto benéfico en el porcentaje de sobre vida de los animales intoxicados con DL_{50} de TI, sin embargo, a dosis sub-letales DL_{25} de TI (16 mg/kg) la MT tuvo un efecto moderado como tratamiento antídoto contra la intoxicación sistémica aguda por TI, cuando se administra sola (100 o 600 μ g) o en combinación con AP. La MT disminuyó los niveles de TI en tejidos de importancia metabólica, como el pulmón y el hígado, y también en las dos regiones del cerebro que contienen las mayores concentraciones de talio, como el hipotálamo y el cerebelo. El efecto sistémico de MT no produjo una redistribución indeseable de TI al sistema nervioso central (órgano diana de la talio toxicosis), como se ha observado tras la administración de otros agentes quelantes, como D-penicilamina o tioles endógenos como L- cisteína (Ríos y Monroy-Noyola 1992, Montes et al., 2007), ya que la MT no puede atravesar barrera hematoencefálica (Lewis et al., 2012), es posible que el complejo TI-MT no sea capaz de cruzar al cerebro, evitando la redistribución del metal.

En particular, la administración de 600 μ g de MT mostró un aumento de las concentraciones de TI renal producido por una redistribución del metal al riñón; curiosamente, esta acumulación renal de TI no indujo daño renal significativo, ya

que los niveles de creatinina (biomarcador de disfunción renal) fueron similares a los valores del grupo Sham.

La decorporación de TI es más evidente en el riñón e hipocampo, cuando la MT se administra simultáneamente con AP (grupos AP+MT-100 y 600), este efecto farmacológico aditivo de MT en combinación con AP, se ha informado para otros agentes quelantes exógenos estudiados experimentalmente *in vivo* (Montes et al., 2011). En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren un efecto quelante de la MT sobre TI (Kılıç G y Kutlu, 2010; Mendez-Armenta 2003; Kara et al., 2005). Se ha informado que la administración exógena de MT protege contra la intoxicación por metales pesados (Sabolić, et al 2010). En este estudio, la acumulación de TI hepática disminuyó con ambas dosis de MT (100 o 600 µg), como informaron Kılıç y Kutlu (2010) en un modelo similar de talioxicosis aguda en rata. Es importante señalar que la mayoría de los efectos de MT tanto en órganos como regiones cerebrales, no fueron dependientes de la dosis, lo que sugiere que la dosis más baja de MT (100 µg/rata) genera un efecto máximo en la decorporación de TI; de hecho, la dosis más alta empleada de MT (600 µg/rata), fue la que produjo un efecto de redistribución de TI en riñón.

El uso de MT como antídoto en la intoxicación aguda por TI, protegió contra el daño a órganos periféricos, al disminuir las concentraciones de TI en los órganos sin aumentar la concentración del metal en el cerebro. El efecto de la decorporación de TI por MT fue modesto, es posible que otros mecanismos inducidos por MT también estén participando para prevenir el daño en la talioxicosis. Un hallazgo interesante de este estudio fue que la MT aumentó los niveles de GSH, lo que indica una disminución del estrés oxidativo inducido por TI, esto puede explicar la citoprotección inducida por MT que se observa en el riñón. Diversos estudios han demostrado que el estrés oxidativo es un mecanismo importante de daño, que conduce a la disfunción renal en niños y adultos expuestos a TI (Osorio-Rico, et al., 2017; Duan W, et al., 2020). En el grupo AP+MT-600, solo se observó una tendencia a aumentar la cantidad de GSH que, debido a la gran variabilidad, no fue

estadísticamente significativa. Los resultados indican que el AP per se no tiene un efecto antioxidante, como pudo observarse en el grupo que recibió AP solo, coincidiendo con los reportes que le atribuyen al AP sólo un efecto quelante generando una rápida eliminación de TI en tejidos (Montes et al., 2011).

En la misma línea, la MT sola o en combinación, fue capaz de incrementar la detección de Nrf-2 en la mayoría de órganos, mostrando una inducción de mecanismos protectores frente al estrés oxidativo inducido por TI. Los efectos antioxidantes de la MT son bien conocidos y se han sugerido como una ventaja frente a otros agentes quelantes (Ruttkay-Nedecky et al., 2013), debido a que la MT es capaz de prevenir la sobreproducción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y frenar la peroxidación de lípidos (Juarez-Rebollar et al., 2017). Esta acción antioxidante de la MT puede explicar por qué la proteína protege de los efectos renales de la intoxicación aguda por TI, a pesar de la redistribución del metal al riñón. El aumento de las concentraciones de TI renal observado en el grupo de animales tratados con MT-600 también puede ser el reflejo de una mayor excreción del metal por este órgano, sin embargo, esto sigue siendo especulativo hasta futuros experimentos. Un mecanismo citoprotector adicional de la MT es su capacidad para desintoxicar parcialmente TI en tejido de pescado y en plantas como el arroz, según informes recientes de Dragun (2018) y Yao (2020).

Asimismo, el aumento tanto de GSH como de Nrf2 debido al efecto de MT es interesante, ya que se ha reportado una asociación directa entre la síntesis de GSH y Nrf-2. El GSH es un tripeptido, con una importante actividad antioxidante. El primer paso en la síntesis de GSH es catalizado por la enzima L-glutamato L-cisteína γ -ligasa (GCL), para formar γ -glutamil-cisteína. La GCL es la enzima limitante de la velocidad de síntesis del GSH, su expresión responde al estrés oxidativo, en parte, porque está regulada positivamente por Nrf2. Como respuesta al estrés oxidante, el factor de transcripción Nrf2 se transloca al núcleo donde requiere dimerizarse con pequeñas proteínas homólogas, como los factores de transcripción MAF, para lograr unirse al sitio promotor específico de los elementos

de respuesta antioxidante (ARE) en el gen promotor (Königsberg, 2007), y así ejercer su efecto inductor sobre la expresión de enzimas antioxidantes como GCL, glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucosil transferasa y superóxido dismutasa (SOD), GSH peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). El segundo paso en la síntesis de GSH es catalizado por GSH sintetasa (GS), que agrega una molécula de glicina a γ -glutamil-cisteína. Tanto el primer como el segundo paso, requieren energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP); sin embargo, el ATP generalmente no se considera un factor limitante en la producción de GSH, excepto en condiciones patológicas (Vairetti, et al., 2021). Con base en esta información, es probable que el aumento de los niveles de GSH esté relacionado con el aumento de Nrf2, que se observó en las imágenes inmunohistoquímicas de los grupos antídoto.

El presente estudio aporta datos preclínicos relevantes para evaluar la eficacia farmacológica de MT sola o en combinación con AP, como tratamiento antídoto de la talio toxicosis aguda. En la mayoría de los órganos y regiones del cerebro, ambos antídotos mostraron una suma de efectos cuando se administraron en combinación, sin interacción estadísticamente significativa, este resultado indica que MT y AP actúan por mecanismos no relacionados. La MT no puede atravesar barrera hematoencefálica de manera eficiente, por lo tanto, el efecto quelante se ha producido solo en la periferia, sin redistribución al cerebro, representando una ventaja de la MT sobre otros agentes quelantes que agravan la toxicidad del talio cuando se administran solos (Rios y Monroy-Noyola 1992, Lewiss. 2012).

El TI es un metal altamente tóxico y es considerado como uno de los principales contaminantes ambientales en la lista de la EPA. El uso de TI en la industria ha incrementado, y con los reportes de una emergente contaminación ambiental representado una importante amenaza para la salud humana. Duan y colaboradores (2020), investigaron los efectos adversos del TI sobre la salud en niños de 1 a 9 años que habitan en zonas de alta extracción de minerales, los parámetros de laboratorio clínico indicaron alteraciones en las funciones hepáticas, renales y miocárdicas asociadas a elevadas concentración TI, reportando también

que el daño causado por el TI demostró ser potencialmente irreversible. Recientemente, Nuvolone y colaboradores (2021) realizaron un estudio de exposición a talio a través del agua contaminada en Toscana (Italia), los autores observaron que las mujeres embarazadas expuestas al TI presentaron un mayor riesgo de parto prematuro y los neonatos mostraron pesos bajos.

Considerando los estudios recientes que muestran importantes problemas de salud relacionados al aumento en la exposición ambiental a TI; el presente estudio se enfocó en atender y estudiar a la MT sola y en combinación como posible antídoto frente a la intoxicación por TI. Los resultados mostraron que la MT administrada sola o en combinación con AP posee una acción citoprotectora, debido a un doble mecanismo: al disminuir las concentraciones de TI en los órganos por acción del AP y a la acción antioxidante de MT, que es capaz de prevenir el estrés oxidativo inducido por TI.

9 Conclusiones

1. Se corrobora, el uso de azul de Prusia propuesto por la FDA como una alternativa para el tratamiento farmacológico de la intoxicación por talio, ya que aumentó el porcentaje de sobre vida y disminuyó las concentraciones de TI en un 65 % en todos los órganos y regiones cerebrales.
2. La administración de metalotioneína disminuyó las concentraciones de TI en órganos de importancia metabólica (pulmón e hígado) y regiones cerebrales específicas (hipotálamo y cerebelo).
3. El uso de metalotioneína en la talio toxicosis aguda en rata no genera redistribución a cerebro.
4. La administración de metalotioneína previno el incremento de los marcadores de daño renal (urea y creatinina) inducido por la administración de TI.
5. La combinación de los antídotos azul de Prusia más metalotioneína (100 µg) mostró mejor efecto que el azul de Prusia solo, respecto a la disminución de las concentraciones de TI, en la talio toxicosis aguda en rata.
6. La metalotioneína administrada sola o en combinación con azul de Prusia posee una acción citoprotectora, generada por mecanismos antioxidantes, mediados en parte por Nrf2 y GSH.

10 Referencias

- Aguilar C**, Herrera L, Gutiérrez EJ, Reyes-Domínguez IA (2018) Solid-phase distribution and mobility of thallium in mining-metallurgical residues: Environmental hazard implications. *Environ Pollut* 243: 1833-1845
- Al Hammouri**, F., Darwazeh, G., Said, A., Ghosh, R. A. (2011). Acute Thallium Poisoning: Series of Ten Cases. *J. Med. Toxicol.* 7, 306–311.
- Ammendola A**, Ammendola E, Argenzio F, et al. (2007) Clinical and electrodiagnostic follow-up of an adolescent poisoned with thallium. *Neurol Sci.* 28:205–8.
- Andrews GK** (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59:95–104.
- Aoyama H.** (1989) Distribution and excretion of thallium after oral and intraperitoneal administration of thallos malonate and thallos sulfate in hamsters. *Bull Environ Contam Toxicol* 42:456-463.
- Appenroth D**, Winnefeld K. (1999). Is thallium-induced nephrotoxicity in rats connected with riboflavin and/or GSH?-reconsideration of hypotheses on the mechanism of thallium toxicity. *J Appl Toxicol.* 19:61–6.
- ATSDR** (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1992) Toxicological profile for thallium. Public Health Service.
- Babula P**, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Kizek R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 4(8), 739.
- Bachanek T**, Staroslawska E, Wolanska E, Jarmolinska K. (2000). Heavy Metal Poisoning in Glass Worker Characterised By Severe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 7: 51–53.
- Barckow J**, Jenss H. (1976) Thallium intoxication treated by hemodialysis, forced diuresis and antidote. *Med Klin* 71: 1377–1382.
- Bendl BJ.** (1969) Thallium poisoning: report of a case successfully treated with dithizone. *Arch Dermatol* 100:443-446.

Bittel D, Dalton T, Samson SLA et al. (1998). The DNA binding activity of metal response element-binding transcriptional factor-1 is activated in vivo and in vitro by Zn, but not by other transition metals. *J Biol Chem.* 273:7127–7133

Blanusa M, Varnai VM, Piasek M, Kostial K. (2005). Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr Med Chem.* 12(23):2771-94.

Bramanti E, Onor M, Colombaioni L (2009) Neurotoxicity Induced by Low Thallium Doses in Living Hippocampal Neurons: Evidence of Early Onset Mitochondrial Dysfunction and Correlation with Ethanol Production. *ACS Chem Neurosci* 10: 451-459.

Britten JS y Blank M (1968) The thallium activation of the (Na⁺/K⁺) activated ATPase of rabbit kidney. *Biochim. Biophys Acta* 159:160-166

Brockhaus, A., Dolgner, R., Ewers, U., Krämer, U., Soddemann, H., Wiegand, 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.

B.H. Bulkey, J. Rouleau, W.H. Strauss, B. Pitt, (1975) Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis: detection by thallium-201 myocardial perfusion imaging, *New Engl. J. Med.* 293: 1113–1116.

Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N (1994) The Assessment of Reference Values for Elements in Human Biological Tissues and Fluids: A Systematic Review. *Crit Rev Anal Chem*, 24: 363-398.

Cavanagh JB, Fuller NH, Johnson HRM, Rudge P (1974) The effect of thallium salts, with particular reference to the nervous system changes. *Quart. J. Med. New Ser.* XLIII 170, 293–319.

Cavanagh JB (1991) What have we learnt from Graham Frederick Young? Reflections on the mechanism of thallium neurotoxicity. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:3-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Thallium poisoning from eating contaminated cake—Iraq, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 57:1015–8.

- Chamberlain PH**, Stavinoha WB, Davis H (1958) Thallium poisoning. *Pediatrics* 22:1170-1182.
- Chan JC**, Huang Z, Merrifield ME, Salgado MT, Stillman MJ. (2002). Studies of metal-binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coord. Chem. Rev.*, 233–234, 319–339.
- Cheam V** (2001) Thallium contamination of water in Canada. *Water Qual. Res. J. Can.* 36(4):384-94.
- Chen DG**, Ju WH, Sun G. (2010). Hemoperfusion for treatment of one case of thallium poisoning. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 28: 711–712.)
- Cherian, MG**. (1994). The Significance of the Nuclear and Cytoplasmic Localization of Metallothionein in Human Liver and Tumor Cells. *Environ Health Perspect.*, 102(12), 131–135.
- Cherian MG**, Kang YJ. (2006). Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp. Biol. Med.* 231, 138–144.
- Christian GA**. (1969) Medicine, trace metals and atomic absorption spectroscopy. *Anal. Chem* 41:24-40.
- Coyle P.**, Philcox J., Carey L., Rofe A. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 59 (4): 627-47.
- Curković M**, Sipos L, Puntarić D, Dodig-Ćurković K, Pivac N, Kralik K (2013) Detection of thallium and uranium in well water and biological specimens of an eastern Croatian population. *Arh Hig Rada Toksikol* 64: 385-394. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2300.
- Cvjetko P.**, Cvjetko I., Pavlica M. (2010). Thallium toxicity in humans. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 61(1), 111–9.
- Davis LE**, Standerfer LC, Kornfeld M, Abercrombie DM, Butler C. (1981). Acute thallium poisoning: Toxicological and Morphological studies of the nervous system. *Ann. Neurol.* 10:38-44
- Davis S.R**, Cousins R.J. (2000) Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130, 1085–1088.

- De Groot G**, van Heijst ANP, van Kesteren RG, Maes RAA. (1985). An evaluation of the efficacy of charcoal hemoperfusion in the treatment of three cases of acute thallium poisoning. *Arch Toxicol.* 57:61–66.
- Delvals TA**, Saenz V, Arias AM, Blasco J. (1999). Thallium in the marine environment: first ecotoxicological assessments in the Guadalquivir estuary and its potential adverse effect on the Doñana European natural reserve after the Aznalcollar mining spill. *Cienc Mar*; 25(2):16–75.
- Diaz-Ruiz M**, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Rios C. (2009) Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett.* 452: 56-59.
- Douglas KT**, Bunni MA and Baidur SR. (1990). Thallium in biochemistry. *Int J Biochem* 22:429-438.
- Dragun Z**, Krasnići N, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M (2018) Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207: 162-173
- Duan W**, Wang Y, Li Z, Fu G, Mao L, Song, Y, et al (2020) Thallium exposure at low concentration leads to early damage on multiple organs in children: A case study followed-up for four years. *Environ Pollut* 258 : 113319.
- Dumitru D**, Kalantri A. (1990). Electrophysiologic investigation of thallium poisoning. *Muscle Nerve* 13:433–7.
- Emsley J** (1978). The trouble with thallium. *New Sci* 392-4.
- EPA** (U.S. Environmental Protection Agency) (1985) Suspended, cancelled and restricted pesticides. Office of Pesticides and Toxic Substances Compliance, U.S. Environ. Prot. Agency, Washington, DC.
- EPA** (U.S. Environmental Protection Agency) (2009) Toxicological review of thallium and compounds Washington, DC. Cas No. 7440-28-0.

- Ewers, U.** (1988). Environmental exposure to thallium. *Sci. Total Environ.* 71:285–292.
- Fisher RM, Gupta V** (2020). Heavy Metals; In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. 2020 Oct 12.
- Food and Drug Administration.** (2002). Did you know Prussian blue dye. *Consum Rep* 69:45.
- FDA.** (2003). Guidance for Industry Prussian Blue Drug Products — Submitting a New Drug Application Guidance for Industry Prussian Blue Drug Products — Submitting a New Drug Application, (January), 1–6.
- Galvan-Arzate S, Ríos C.** (1994) Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology* 90:63-69.
- Galván-Arzate S., Santamaría, A.** (1998). Thallium toxicity. *Toxicology Letters*, 99(1), 1–13.
- Galván-Arzate S., Martínez A., Medina E., Santamaría A., Ríos C.** (2000). Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: Effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions. *Toxicology Letters*, 116(1–2), 37–43.
- Galvan-Arzate S, Chaverri J, Campos O.N.M., Maldonado P.D., Roman B.V., Rios C., Santamaria A.,** (2005). Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1037–1045.
- Ghaderi, A., Vahdati-Mashhadian, N., Oghabian, Z., Moradi, V., Afshari, R., & Mehrpour, O.** (2015). Thallium exists in opioid poisoned patients. *Daru : Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 39.
- Ghaderi, A., NasehGhafoori, P., Rasouli-Azad, M., Sehat, M., Mehrzad, F., Nekuei, M., ... Mehrpour, O.** (2017). Examining of Thallium in Cigarette Smokers. *Biological Trace Element Research*, 1–7.
- Gehring PJ and Hammond PB.** (1966). The interrelation ship between thallium and potassium in animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 155(1):187-200.

Gibson JE, Becker BA. (1970) Placental transfer, embryotoxicity, and teratogenicity of thallium sulfate in normal and potassium-deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 16:120–132.

Glowinski J, Iversen LI. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3h-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem* 13:655-699

Goullé JP, Le Roux P, Castanet M, Mahieu L, Guyet-Job S, Guerbet M (2015) Metallic Profile of Whole Blood and Plasma in a Series of 99 Healthy Children. *J Anal Toxicol* 39: 707-713.

Hartving P (1984) Chemical principles of chelate therapy in neurotoxicology. *Acta Neurol Scand Suppl* 100:199-202.

Hasana M, Chandra SV, Bajpai VK (1977) Electron microscopic effects of thallium poisoning on the rat hypothalamus and hippocampus: Biochemical changes in the cerebrum. *Brain Res Bull* 2:255-261.

Heydlauf H. (1969) Ferric-cyanoferrate (II): an effective antidote in thallium poisoning. *Eur J Pharmacol* 6:340-344.

Hidalgo J., Aschner M., Zatta P. and Vasak M. (2001) Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 55, 133–145.

Hirata M, Taoda K, Ono-Ogasawara M, et al. (1998) A probable case of chronic occupational thallium poisoning in a glass factory. *Ind Health.* 36: 300-3 19.

Hissin PJ, Hilf RF (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214-226.

Hoffman RS, Stringer JA, Feinberg RS, Goldfrank LR. (1999). Comparative efficacy of thallium adsorption by activated charcoal, Prussian blue and sodium polystyrene sulfonate. *Clin. Toxicol.* 37, 833-837.

Hoffman RS (2000) Thallium poisoning during pregnancy: a case report and comprehensive literature review. *J Toxicol Clin Toxicol* 38:767-775.

Hoffman RS (2003) Thallium toxicity and the role of Prussian blue in therapy. *Toxicol. Rev.* 22, 29-40.

Hollognitas C, Ullicci P, Dricoll J, Gauerholz J, Martin H (1980) Thallium elimination kinetics in acute thallotoxicosis. *Anal Toxicol*; 4:68-73.

Hu X, Zheng T, Cheng Y, Holford T, Lin S, Leaderer B, Qiu J, Bassig BA, Shi K, Zhang Y, Niu J, Zhu Y, Li Y, Guo H, Chen Q, Zhang J, Xu S, Jin Y (2015) Distributions of heavy metals in maternal and cord blood and the association with infant birth weight in China. *J Reprod Med* 60: 21-29

IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1996) Thallium. Environmental health criteria. Vol. 182. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Available from:<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc182.htm>>.

Irato P., G. Santovito, E. Piccinni, and V. Albergoni. (2001). "Oxidative Burst and Metallothionein as a Scavenger in Macrophages." *Immunology and Cell Biology* 79(3): 251–54.

Jha S., Kumar R., Kumar R. (2006). Thallium Poisoning Presenting as Paresthesias , Paresis , Psychosis and Pain in Abdomen. *Journal of the Association of Physicians of India*, 54, 53–55.

Juárez R, Rios C, Nava-Ruiz C, Méndez-Arment M (2017) Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid. Med. Cell Longev.* 5828056.

Kagi J., Vallee B. (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*; 235:3460–3465.

Kagi J. and Kojima Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52, 2561.

Kagi J., Schaffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27, 8509–8515.

Kagi J. (1993) Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In *Metallothionein III*. Suzuki KT, Imura N and Kimura M, Eds, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 29-55.

Kamerbeek HH, Rauws AG, Ham MT, Heijst ANV. (1971). Dangerous redistribution of thallium by treatment with sodium diethyldithiocarbamate. *Acta Med Scand.* 189(3):149-154.

Kara, H., Karatas, F., Canatan, H., Servi, K., (2005). Effects of Exogenous Metallothionein on Acute Cadmium Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, 104, 223–232.

Kazantzis G. (1986). Thallium. *Handbook on the toxicology of Metals*. Elsevier Science Publishers. p. 549-67.

Kazantzis G (2000) Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health* 22:275-80.

Kazantzis G, (2007). Thallium. In (*handbook on the toxicology of metals*). Nordberg G. and others (ed.s). third edition, pp.827-35. Elsevier Science Publishers, USA.

Kelly EJ, Palmiter RD. (1996). A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet* 13:219–222.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89-116.

Kılıç GA, Mehtap Kutlu. (2010). Effects of Exogenous Metallothionein against Thallium-Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *Food and Chemical Toxicology* 48(3): 980–87.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238: 215–220.

Königsberg F, (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica*. 26 (1): 18-25

Kourim V, Rais J, Million B. (1964). Exchange properties of complex cyanides. Ion exchange of cesium on ferrocyanide. *J. Inorg. Nuclear Chem*. 26(1):123-133.

Kravzov J., Rios C., Altagracia M., Monroy-Noyola A., Lopez F. (1993). Relationship between physicochemical properties of Prussian blue and its efficacy as antidote against thallium poisoning. *J. Appl. Toxicol*. 13, 213–216.

Kuroda H., Mukai Y., Nishiyama S., Takeshita T., Tateyama M., Takeda A., Aoki M. (2016). Tardily accelerated neurologic deterioration in two-step thallium intoxication. *Journal of Clinical Neuroscience*, 34, 234–236.

Kuo H C, Huang C C, Tsai Y T, Chu C C, Hsieh S T, Chu N S. (2005). Acute painful neuropathy in thallium poisoning. *Neurology*, 65(2), 302–304.

Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37: 139-43.

Lehmann PA y Favare L. (1984). Parameters for the adsorption of thallium ions by activated charcoal and Prussian blue. *J Toxicol Clin Toxicol.* 22:331–339.

Lehman PA y Favari L (1985) Acute thallium intoxication. Kinetic study of the relative efficacy of several antidotal treatments in rats. *Arch. Toxicol.* 57:56-60

Leung KM, Ooi vec. (2000) Studies on thallium toxicity, its tissue distribution & histopathological effects in rats. *Chemosphere* 41(1-2): 155–159.

Lewis KE, Chung RS, West AK, Chuah MI (2012) Distribution of exogenous metallothionein following intraperitoneal and intramuscular injection of metallothionein-deficient mice. *Histol Histopathol* 27: 1459-1470.

Li N, Zhou Y, Liu J, Tsang DCW, Wang J, She J, et al (2020) Persistent thallium contamination in river sediments, source apportionment and environmental implications. *Ecotoxicol Environ Saf* 202: 110874.

Lin G, Sun Y, Long J, Sui X, Yang J, Wang Q, et al (2020) Involvement of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in protection against thallium-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in primary hippocampal neurons. *Toxicol Lett* 319: 66-73

López Segura N., Aznar Laín G., Nolla Salas J., Mur Sierra A. (2013). Envenenamiento por talio en una adolescente. *Medicina Clínica*, 141(12), 557–558.

Lu CI, Huang CC, Chang YC, et al. (2007) Short-term thallium intoxication. *Arch Dermatol* 143:93–98.

Luckit J, Mir N, Hargreaves M, Costello C and Gazzar B (1990) Thrombocytopenia associated with thallium poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 9:47-48.

Lund A (1956) Distribution of thallium in the organism and its elimination. *Acta Pharmacol Toxicol* 12-251.

Margoshes M., Vallee, B. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc.* 79:4813–4814.

Marmo, E., Matera, M.G., Acampora, R., et al., (1987). Prenatal and postnatal metal exposure: effect on vasomotor reactivity development of pups: experimental research with prussian blue as antidotes against thallium intoxication in antimony

trichloride, thallium sulfate and sodium metavanadate. *Curr. Ther. Res.* 42 (5), 823–838.

Martínez R, Sant R, Feldman G, Martínez N. (2003). Registro de pacientes intoxicados con talio en Tucumán, luego de la prohibición de su uso como rodenticida en Argentina. *Revista de Toxicología En Línea*, 2–10.

Méndez M., Villeda J., Barroso R., Nava C., Jiménez M., Ríos C. (2003) Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexametasona. *Toxicolog. Lett.* 144: 151-157.

Miller M, Patel M, Coon T. (2005). Prussian blue for treatment of thallium overdose in the US. *Hospital Pharmacy*, 40(9), 796–797.

Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V, (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 35–70.

Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicolaou G, Alessio L, Capodaglio E (1990) Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ* 95: 89-105.

Misra, U. K., Kalita, J., Yadav, R. K., & Ranjan, P. (2003). Thallium poisoning: emphasis on early diagnosis and response to haemodialysis. *Postgrad Med J.* 79: 103–105.

Moeschlin S. (1980). Thallium poisoning. *Clin Toxicol* 17(1):133-46.

Moffatt P, Denizeau F. (1997). Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab. Rev.*, 29, 261–307

Moffatt P, Séguin C. (1998) Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA Cell Biol.* 17:501– 510.

Monona R. (1994). *The Artist's Handbook*, second ed. Allworth Press, New York, p 107.

Montes S, Luz Soriano, Camilo Ríos, Antonio Monroy-Noyola. (2007). "Endogenous Thiols Enhance Thallium Toxicity." *Archives of Toxicology* 81(10): 683–87.

Montes, S, Pérez-Barrón, Rubio-Osornio, Ríos Castañeda, Diaz-Ruíz, Altagracia-Martínez, Monroy-Noyola. (2011). Additive Effect of DI-Penicillamine plus Prussian Blue for the Antidotal Treatment of Thallotoxicosis in Rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32(3): 349–55.

Montes S, Juárez-Rebollar D, Nava-Ruíz C, Sánchez-García A, Heras-Romero Y, Rios C, Méndez-Armenta M (2015) Immunohistochemical Study of Nrf2-Antioxidant Response Element as Indicator of Oxidative Stress Induced by Cadmium in Developing Rats.

Mullins L and Moore R. (1960). The movement of thallium ions in muscle. *J. Gen. Physiol.* 43:759-773.

Mulkey JP, Oehme FW. (1993). A review of thallium toxicity. *Vet Hum Toxicol* 35:445-53.

Nguyen T, Yang CS, Pickett CB (2004) The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37: 433-41.

Nielson KB, Atkin CL, Winge DR. (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *Journal of Biological Chemistry.* 260(9), 5342–5350.

Nigrovic V. (1965). Retention of radiocesium by the rats as influenced by prussian blue and other compound. *Phys. Med. Biol.* 10:81.

Noce M., Dutkiewicz G., Ciechanowski K., Borowiak K., Jarmolowicz Z., Serebinska K. (2008). Thallium intoxication caused by ingestion of a 60-year-old poison. *Clinical Toxicology*, 46, 912–913.

Nogué S, Mas A, Parés A, Nadal P, Bertrán A, Millá J, Carrera M, To J, Pazos MR, Corbella J. (1982). Acute thallium poisoning: An evaluation of different forms of treatment. *J Toxicol Clin Toxicol* 19: 1015–1021.

Nordberg M, Nordberg GF. (2000) Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol* 46:451–463.

Nriagu JO (1998) Thallium in the environment. *Wiley Series in Advances in Environment Science and Technology*, vol 29. John Wiley and Sons.

Nriagu JO. (2003). Thallium. *Chem Eng New.* 81(36):153.

Nuvolone D, Petri D, Aprea MC, Bertelloni S, Voller F, Aragona I (2021). Thallium Contamination of Drinking Water: Health Implications in a Residential Cohort Study in Tuscany (Italy). *Int J Environ Res Public Health* 18: 4058.

Oh SH, Deagen JT, Whanger PD et al (1978) Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol.* 234:E282–E285.

Oehme F (1967) Mechanisms of heavy metal toxicities. *Clin. Toxicol.* 5:151

Onosaka S, Cherian, M.G. (1982) "Comparison of Metallothionein Determination by Polarographic and Cadmium-Saturation Methods". *Toxicology and Applied Pharmacology.* 63: 270-74.

Onosaka S, Tanaka K, Cheriant MG. (1984). Effects of Cadmium and Zinc on tissue Levels of Metallothionein. *Environ Health Perspect.*, 54, 67–72.

Osorio-Rico L, Santamaria A, Galván-Arzate S (2017) Thallium Toxicity: General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms. *Adv Neurobiol* 18: 345-353.

Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D. (2001). Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 163, 93–100.

Pau, P. W. I. (2000). Management of thallium poisoning. *Hong Kong Medical Journal*, 6(3), 316–318.

Paulson G, Vergara G, Young J, Bird M. (1972) Thallium intoxication treated with dithizone and hemodialysis. *Arch. Int. Med.* 129:100

Palacios O., Atrian S., Capdevila M. (2011). Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? *J Biol Inorg Chem.*

Palmiter RD, Findley S. D, Whitmore T. E, Durnam D. M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6333–6337.

Penclova D., Urban P., Ridzon P., Senholdová Z., Lukás E., Diblík P., Lacina L. (2009). Two-year follow-up of two patients after severe thallium intoxication. *Hum Exp Toxicol.*, 28, 263–272.

Penkowa M. (2006) Metallothionein I + II expression and roles during neuropathology in the CNS. *Dan Med Bull.*53 (2): 105-21.

- Peter J**, Viraraghavan T. (2004). Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Elsevier Science* 31:493-501.
- Petering DH**, Krezoski S, Tabatabai NM (2009) Metallothionein toxicology: metal ion trafficking and cellular protection. *Met Ions Life Sci* 5:353–397.
- Porter H.** (1974). The particulate half cysteine rich copper protein of newborn liver. Relationship to metallothionein and subcellular localization in non-mitochondrial particles possibly representing heavy lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 56:661-668.
- Prick JGG** (1979) Thallium poisoning. In: Frederikcs JAM (eds) *Handbook of clinical neurology*, vol 36. North-Holland, Amsterdam. pp 239-278.
- Quaife CJ**, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33, 7250–7259.
- Rana SVS** (2008) Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol* 22:262–284.
- Rauws AG.** (1974). Thallium pharmacokinetics and its modification by prussian blue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 284-295.
- Reed D**, Crawley J, Faro S, Pieper S, Kurland L. (1963) Thallotoxicosis, acute manifestations and sequelae. *JAMA*;183:516-22.
- Repetto G**, Del Peso A, Repetto M. (1998) Human thallium toxicity. En: Nriagu J. editor. *Thallium in the Environment. Advances in Environmental Science and Technology.* USA: Wiley. 167-99.
- Ribas B.** (2010) Metalotioneína y algunos elementos minerales como bioindicadores en toxicología y clínica. *Real Academia Nacional de Farmacia.* <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1070>
- Riordan JR.**, Richards V. (1980). Human Fetal Liver Contains Both Zinc- and Copper-rich Forms of Metallothionein. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(11), 5380–5383.
- Ríos C**, Galvan –Arzate S, Tapia R (1989) Brain regions thallium distribution in rats acutely intoxicated with TI₂SO₄. *Arch Toxicol* 63:34-37.

- Ríos C**, Monroy-Noyola A. (1992). D-penicillamine and prussian blue as antidotes against thallium intoxication in rats. *Toxicology* 74 (1):69-76.
- Riyaz**, R., Pandalai, S. L., Schwartz, M., Kazzi, Z. N. (2012). A Fatal Case of Thallium Toxicity: Challenges in Management. *J Med Toxicol*, 9, 75–78.
- Robbins AH**, McRee DE, Williamson M, Collett SA, Xuong NH, Furey WF, Wang BC, Stout CD. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221:1269–1293.
- Ruttkay-Nedecky B**, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6044–6066.
- Rusyniak DE**, Furbee RB, Kirk MS. (2002) Thallium and arsenic poisoning in a small Midwest town. *Ann Emerg Med* 39(3):307-311.
- Rusyniak DE**, Kao LW, Nanagas KA, Kirk MA, Furbee RB, Brizendine EJ, Wilmot PE. (2003), Dimercaptosuccinic acid and Prussian Blue in the treatment of acute thallium poisoning in rats. *Journal of Toxicology. Clin. Toxicology* 41(2):137-42.
- Ruttkay-Nedecky**, Branislav et al. (2013). The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(3): 6044–66.
- Sabolić Ivan**, Davorka Breljak, Mario Škarica, and Carol M. Herak-Kramberger. (2010). Role of Metallothionein in Cadmium Traffic and Toxicity in Kidneys and Other Mammalian Organs. *BioMetals* 23(5): 897–926.
- Saha A**, Sadhu HG, Karnik AB, Patel TS, Sinha SN, Saiyed. (2004). Erosion of nails following thallium poisoning: a case report. *Occupational and Environmental Medicine*, 61, 640–643.
- Salehi S**, Saljooghi AS, Badiie S, Moqadam MM (2017) Chelation of Thallium (III) in Rats Using Combined Deferasirox and Deferiprone Therapy. *Toxicol Res* 33:299-304.
- Saljooghi ASh**, Fatemi SJ (2011) Removal of thallium by deferasirox in rats as biological model. *J Appl Toxicol* 31: 139-143. doi: 10.1002/jat.1573.
- Scheuhammer A.M**, Cherian M.G. (1986) Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 82: 417-25.

- Schoer J.** Thallium. In: Hutzinger O, editor. Handbook of Environmental Chemistry, vol. 3 (c). New York: Springer-Verlag; 1984. p. 143–214.
- Searle PF,** Davison BL, Stuart GW, Wilkie TM, Norstedt G, Palmiter RD. (1984). Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein-I and metallothionein-II genes. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1221–1230.
- Senthilkumaran S,** Namasivayam B, Narendra N, Ritesh G M, Ponniah T. (2017). Acute Alopecia: Evidence to Thallium Poisoning. *Int J Trichology.*, 9, 30–32.
- Sharma AN,** Nelson LS, Hoffman RS. (2004) Cerebrospinal fluid analysis in fatal thallium poisoning: evidence for delayed distribution into the central nervous system. *Am J Forensic Med Pathol.* 25:156–8.
- Sojáková M.,** Žigrai M., Karaman A., Plačková S., Klepancová P., Hrušovský Š. (2015). Thallium intoxication. *Neuroendocrinology Letters*, 36(4), 311–315.
- Stevens W,** Van Peteghem, C Heyndrickx A, Barbier F. (1974). Eleven cases of thallium intoxication treated with Prussian blue. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 10, 1-22.
- Suhy DA,** Simon KD, Linzer DIH et al. (1999) Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J Biol Chem* 274:9183–9192
- Sun T.-W.,** Xu Q.-Y., Zhang X.-J., Wu Q., Liu Z.-S., Kan Q.-C., Wang L. (2012). Management of thallium poisoning in patients with delayed hospital admission. *Clinical Toxicology*, 50(1), 65–69.
- Thompson DF.** (1981). Management of thallium poisoning. *Clin Toxicol* 18:979-990.
- Tsai Y.-T,** Huang C.-C., Kuo H.-C., Wang H.-M., Shen W.-S., Shih T.-S., Chu N.-S. (2006). Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *NeuroToxicology*, 27(2), 291–295.
- Twidwell LG,** Beam CW (2002) Potential technologies for removing thallium from mine and process wastewater: an abbreviated annotation of literature. *Eur. J. Miner Process Environ Prot* 2(1):1-10.
- Vairetti M,** Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C (2021) Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. *Antioxidants (Basel)* 10: 364.

- Van Kesteren RG**, Rauws AG, De Groot G, Van H (1980) Thallium intoxication. An evaluation of therapy. *Intensive Med.* 17:293-7.
- Vasak M**, Kagi JHR. (1994) Metallothionein. In: King, R. B., ed. *Encyclopedia of inorganic chemistry*. New York: John Wiley & Sons Ltd. 2229–2241
- Vasak M**. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 19:13-7.
- Viquez, G**. (2015). Caso Clínico 7: “Escolar femenino de 8 años de edad con elevación térmica de hasta 40 ° C, intermitente de predominio vespertino y nocturno”. *Red Toxicológica Mexicana*.
www.retomex.org.mx/wp-content/uploads/2017/05/caso-clinico-7.pdf. Accessed 22 June 2017.
- Waalkes M**, Harvey MJ, Klaassen CD (1984). relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicology Letters*. 20, 33–39.
- Wakid NW**, Cortas NK. (1984) Chemical and atomic absorption methods for thallium in urine compared. *Clin Chem*. 30: 587-8.
- 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 Saf* 90: 76-81.
- Wang T**, Wen B, Yu XN, Ji ZG, Sun YY, Li Y, Zhu SL, Cao YL, Wang M, Jian XD, Wang T. Early diagnosis, treatment, and outcomes of five patients with acute thallium poisoning. *World J Clin Cases*. 9(19):5082-5091.
- Wanger T**, Scheich H, Ohi FW, Goldschmidt J (2012) The use of thallium diethyldithiocarbamate for mapping CNS potassium metabolism and neuronal activity: Tl⁺ - redistribution, Tl⁺ -kinetics and Tl⁺ -equilibrium distribution. *J Neurochem* 122: 106-14.
- Winge DR**, Miklossy KA. (1982). Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.* 257: 3471-3476.
- Xiao, T.**, Guha, J., Boyle, D., Liu, C. Q., & 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.

Yao Y, Wang M, Zhang P, Wang X, Huang X, Liu W, et al (2020) Different responses in metallothionein gene expression and antioxidative enzyme activity lead to more ROS accumulation in rice exposed to Tl (III) than to Tl(I). *Chemosphere* 259: 127258.


Yumoto T., Tsukahara K., Naito H., Iida A., Nakao A. (2017). A Successfully Treated Case of Criminal Thallium Poisoning. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), 10–11.

Zhang H., Qiao B., Liu B., Zhao X. (2014). Study on the Treatment of Acute Thallium Poisoning. *The American Journal of the Medical Sciences*, 347(5), 377–381.

Zhou Y, Wang J, Wei X, Ren S, Yang X, Beiyuan J, Wei L, Liu J, She J, Zhang W, Liu Y, Xiao T. Escalating health risk of thallium and arsenic from farmland contamination fueled by cement- making activities: A hidden but significant source. *Sci Total Environ*. 782:146603.



The acute systemic toxicity of thallium in rats produces oxidative stress: attenuation by metallothionein and Prussian blue

Laura Anaya-Ramos · Araceli Díaz-Ruíz · Camilo Ríos · Marisela Mendez-Armenta · Sergio Montes · Yoshajandith Aguirre-Vidal · Sara García-Jiménez · Veronica Baron-Flores · Antonio Monroy-Noyola 

Received: 19 May 2021 / Accepted: 1 September 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract Thallium (Tl) is one of the most toxic heavy metals. Human exposure to Tl occurs through contaminated drinking water and from there to food, a threat to health. Recently, environmental contamination by Tl has been reported in several countries, urging the need for studies to determine the impact of endogenous and exogenous mechanisms preventing thallium toxicity. The cytoprotective effect of metallothionein (MT), a protein with high capacity to chelate metals, at two doses (100 and 600 µg/rat), was

tested. Prussian blue (PB) (50 mg/kg) was administered alone or in combination with MT. A dose of Tl (16mg/kg) was injected i.p. to Wistar rats. Antidotes were administered twice daily, starting 24h after Tl injection, for 4 days. Tl concentrations diminished in most organs ($p < 0.05$) by effect of PB, alone or in combination with MT, whereas MT alone decreased Tl concentrations in testis, spleen, lung and liver. Likewise, brain thallium also diminished ($p < 0.05$) by effect of PB and MT alone or in combination in most of the regions analyzed ($p < 0.05$). The greatest diminution of Tl was achieved when the antidotes were combined. Plasma markers of renal damage

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00343-8>.

L. Anaya-Ramos · S. García-Jiménez ·

A. Monroy-Noyola (✉)

Laboratorio de Neuroprotección, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Cuernavaca, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62209, Morelos, Mexico
e-mail: amonroy@uaem.mx

A. Díaz-Ruíz · C. Ríos

Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, Mexico

C. Ríos · V. Baron-Flores

Laboratorio de Neurofarmacología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de Mexico, Mexico

M. Mendez-Armenta

Laboratorio de Neuropatología experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, Mexico

S. Montes

Unidad Académica Multidisciplinaria, Reynosa-Aztlán, Reynosa, Tamaulipas, Mexico

Y. Aguirre-Vidal

Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster Científico y Tecnológico BioMimic®, Instituto de Ecología A.C. (INECOL), Xalapa, Veracruz, México

increased after Tl administration, while PB and MT, either alone or in combination, prevented the raise of those markers. Only MT increased the levels of reduced glutathione (GSH) in the kidney. Finally, increased Nrf2 was observed in liver and kidney, after treatment with MT alone or in combination with PB. Results showed that MT alone or in combination with PB is cytoprotective after thallium exposure.

Keywords Thallium · Reduced glutathione · Metallothionein · Prussian blue · Systemic toxicity · Nrf2 · Oxidative stress

Introduction

Thallium (Tl), one of the most toxic elements for living organisms. Even at low concentrations (Bramanti et al. 2019), severe toxic effects have been reported as a consequence of Tl poisoning. Both in acute or chronic exposure, thallium shows greater toxicity, as compared to other metals such as arsenic, cadmium, lead, and mercury in different organisms (Fisher and Gupta 2020). It is listed as one of the 13 priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) (USEPA 2014). The safe oral reference dose of Tl is as low as 0.056 mg/ d for humans, as reported by the Risk Assessment Information System (RAIS 2003). Low doses of Tl cause central nervous system toxicity symptoms, such as: confusion, disorientation, and hallucinations followed by anxiety, depression, lack of attention, as well as memory and verbal fluency impairment (Osorio-Rico et al. 2017). Likewise, general symptoms of toxicity are observed, as alopecia, while Tl overdose can induce gastrointestinal dysfunction, paralysis, symptoms of internal bleeding, and even death (Osorio-Rico et al. 2017; Duan et al. 2020). Recent studies recognize that Tl contamination is present in the sediments of various countries: Spain, Italy, China, England and Mexico among others, resulting from the contamination of aquifers such as rivers and seas (Li et al. 2020). Regarding contamination in Mexico, it has been reported the presence and geochemical distribution of Tl in different mining-metallurgical exploitations. Results revealed the presence of Tl in most of the mining-metallurgical samples, with labile concentrations reaching up to values of 184.4 mg kg⁻¹, well

above the environmental standards (Aguilar-Carrillo et al. 2018). For this reason, cases of human poisoning are still reported, due to accidental causes in the working environments. The most severe cases of human thallotoxicosis leading to death are those reported in the scientific literature resulting from suicide or homicide acute intoxications (Hoffman 2000; Kuroda et al. 2016 and Senthilkumaran et al. 2017) Also, it has been reported that human chronic thallotoxicosis could occur by environmental exposure, due to the consumption of vegetables and fruits contaminated with Tl coming from adjacent farmlands located in the vicinity of cement plants, municipal incinerators and sulfuric acid factories. Those sources of pollution represent the highest health risk for Tl human intoxication, including contaminated food crops irrigated with wastewater (Kazantzis 2000, Wang et al. 2013) and recently contamination has also been reported in drinking water (Nuvolone et al. 2021). Tl salts are soluble, odorless, tasteless and highly toxic, for this reason, it was widely used in rodenticides and insecticides (Wang et al. 2013). Rat Tl LD50 is about 30–32 mg/Kg, while human LD50 of thallium has been estimated to be 10 mg/kg, lower than As, Hg, Pb and Cu. Since 2012–2017 it has been reported acute Tl poisoning in China, Mexico and Japan with at least 25 patients involved (Sun et al. 2012; Zhang et al. 2014; Viquez-Guerrero 2015; Yumoto et al. 2017). Cases of intoxication manifest gastrointestinal signs and symptoms (diarrhea and vomiting), dermatologic alterations (alopecia, eruptions of the face, Mee's stripes in nails, eczematous lesions, anhidrosis, palmar erythema, stomatitis, and painful glossitis), cardiac (tachycardia and hypotension) and neurological dysfunctions (disorientation, lethargy, ataxia, convulsion, psychosis, insomnia and coma) (Penclova et al. 2009; Zhang et al. 2014). In severe cases of intoxication, individuals died less than a week after thallium ingestion (Riyaz et al. 2012; Viquez-Guerrero 2015; Al Hammouri et al. 2011). Once ingested, Tl is transported into the cells by means of the active mechanism of the Na⁺/K⁺-ATPase and passively through K⁺ channels, due to the similarity of charge and atomic radius to this monovalent cation (Osorio-Rico et al. 2017). It is distributed throughout the organism crossing the blood-brain barrier (BBB) and the placenta barrier (Galván-Arzate and Santamaría 1998; Wanger et al. 2012). Pre-clinical studies with rats have

supported that the half-life of Tl in blood is 72 hours and its highest concentration has been measured in the kidney, testicles and heart (Rios et al. 1989). The mechanism of thallium toxicity is based upon the inhibition of enzymes specific of the glycolysis, Krebs cycle and oxidative phosphorylation. Those inhibitions produce a depletion of the levels of ATP in the cells (Osorio-Rico et al. 2017). Tl has a high affinity for the sulfhydryl groups of amino acids such as cysteine and methionine. The binding affinity of thallium for potassium sites has also been reported, and that binding has been implicated in the alterations of the cellular metabolic pathways dependent on this ion (Fisher and Gupta 2020). Tl + also increases reactive oxygen species (ROS) formation, which in turn play an important role in brain and liver tissue damage and organ dysfunctions by lipid peroxidation (LP) (Galván-Arzate et al. 2000; Maya-López et al. 2018). Likewise, Nrf2-dependent antioxidant response element (Nrf2-ARE) is a basic leucine zipper transcription factor that binds to the antioxidant response element (ARE); this factor is a critical regulator of effective cellular responses and its function confers cellular protection against oxidative stress (Kensler et al. 2007). The nuclear accumulation of Nrf2 is an essential signaling step for its function as a transcription factor (Nguyen et al. 2004, Lee and Johnson 2004). Its participation as a neuroprotective factor has recently been reported by Lin et al. (2020). They demonstrated that Tl induces a significant increase in the levels of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the primary neurons of hippocampus of Wistar rat embryos. When they tested the effect of t-BHQ (an inducer of Nrf2,) a decrease in oxidative damage was observed, showing that activation of Nrf2 pathway plays a protective role in Tl-induced brain damage.

On the other hand, metallothionein (MT) is a family of low-molecular-weight proteins made up of 61–68 amino acids of which 20% are cysteines distributed in two α and β domains and 7 divalent metal ions bound (Nordberg and Nordberg 2000). Three protein isoforms (MT-I, MT-II, and MT-III) have been identified in the central nervous system and peripheral tissues. It's known that MT has a high affinity for divalent essential metals such as Cu and Zn, although it has also shown a high affinity for toxic metals like cadmium and mercury giving rise to metal-thiolate clusters, also

plays role in metal homeostasis/detoxification and radical scavenging (Juárez-Rebollar et al. 2017).

Potassium ferri-cyanoferrate II ($K_3[Fe(CN)_6]$), commonly known as Prussian blue (PB), is the antidote of choice against the human thallotoxicosis (Montes et al. 2011). This chelator agent is administered by oral route, decreasing the absorption of Tl to the enterohepatic circulation by 60–70% and therefore increasing elimination of Tl into feces (Hoffman 2003). Despite its effectiveness as antidote, in severe cases of human thallotoxicosis it's administration is still inefficient, causing neurological and peripheral aftermath, including renal and hepatic lesions. In order to get a new therapy against Tl poisoning and to increase the efficacy of PB, other chelating agents have been administered alone or in combination with PB, such as sodium diethyldithiocarbamate, dimercaprol (British Anti-Lewisite), D-penicillamine and the thiol amino acid L-cysteine, as antidotes. However, when those chelating agents are administered alone, they cause removal of the metal from the deposit tissues, such as bone, muscle and others, redistributing it to the brain, which aggravates the symptomatology of the intoxication (Rios and Monroy-Noyola 1992). In the present study, we evaluate the decorporating effect of MT-I + MT-II administration to rats treated with a sublethal dose of thallium acetate (16 mg/Kg), either alone or in combination with PB.

Materials and methods

Animals

We used male Wistar rats weighing 200–250 g; they were obtained from the vivarium of the National Institute of Neurology and Neurosurgery, México. Rats were housed four per acrylic cage and maintained under standard laboratory conditions (12:12 light–dark cycles, $23 \pm 2^\circ\text{C}$) and 40 % relative humidity, had free access to food and water. All experiments were performed according to the technical specifications of the Official Mexican Norm NOM 0062-ZOO-1999.

The experimental procedures were approved by the Bioethical Committee of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (Registry Number: 135/18), following institutional guidelines as well as

those for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (USA).

Reagents

PB, Tl acetate, Tween-80 and the atomic absorption standard for Tl were purchased from Sigma-Aldrich (Mexico). The MT was purchased from Creative BioMart-COP03. All other reagents were purchased from Merck (Mexico). Finally, the biochemical markers of liver and renal function were evaluated from kits Roche diagnostics.

Antidotal treatments

Animals ($n = 49$) were administered with a single intraperitoneal (i.p.) dose of 16 mg/kg of Tl acetate purchased to Sigma-Aldrich, according to reports by Rios and Monroy (1992). Twenty-four hours later, animals were randomly allocated into each of six groups of treatment, as follows: Tl + Veh: Tl acetate plus vehicle; PB: Tl plus PB (orally, 50 mg/kg twice-daily, for four days) according to the report by Montes et al. (2011); MT-100: Tl plus a single i.p. dose of MT (100 $\mu\text{g}/\text{rat}$) using saline solution as a vehicle; PB + MT-100: Tl plus PB in combination with MT-100; MT-600: Tl plus a single i.p. dose of MT (600 $\mu\text{g}/\text{rat}$), according to the report of Kılıç and Kutlu (2010); PB + MT-600: Tl and PB in combination with MT-600. Likewise, we included a healthy control (HC) group ($n = 5$) to know the normal values, only for the studies of renal and hepatic functions and histology analysis ($n = 3$). Finally, all animals were killed by decapitation (prior anesthesia overdose with ketamine/xylazine) 5 days after Tl intoxication to obtain Tl concentration in body organs and brain regions.

Thallium analysis

The levels of Tl in kidney, testis, spleen, heart, lung, and liver (peripherals organs) and hippocampus, striatum, hypothalamus, midbrain, cerebellum and cortex (brain regions) were analyzed by atomic absorptions spectrophotometry using the analytical conditions reported previously by our research group (Rios et al. 1989). Tissue samples were acid-digested in metal-free concentrated nitric acid and analyzed using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer 3110) equipped with a graphite furnace (Perkin

Elmer HGA-600) and auto sampler (AS-60). All of the material used (polypropylene tubs and tips) in Tl analysis was previously washed and immersed in a 3% nitric acid solution for 24 h and rinsed with deionized water to avoid external Tl contamination. The quantification of metal in biological tissues was performed using a calibration curve constructed with a thallium standard (Perkin Elmer). Results of Tl content in peripheral organs and brain regions are expressed as μg of Tl per gram of wet tissue.

Biochemical markers of liver and renal damage

To determine biochemical markers of renal and hepatic functioning, blood samples were withdrawn and stored in clean tubes. After centrifugation at 1500g, for 10 min, serum was stored at -20°C until analysis. Creatinine, urea, alanine amino-transferase (ALT), aspartate amino-transferase (AST) were measured using NADH kinetic UV test, all this renal and liver biochemical markers including total proteins (TP) were measured using Cobas c 111 autoanalyzer (Roche, USA), with commercially available kits (Roche diagnostics).

Reduced glutathione assay

The tissue content of reduced glutathione (GSH) was determined as described by Hissin and Hilf (1976). Daily, a GSH standard was prepared in 0.1 M sodium phosphate, 5 mM EDTA buffer (pH 8) and was kept on ice until used. Also, a o-Phthalaldehyde (OPA) solution was prepared in reagent-grade absolute methanol, immediately before its use. Tissue samples were homogenized in 3.75 mL EDTA-phosphate buffer (pH 8.0) plus 1 mL of HPO₃ (25%). Supernatants were separated from such homogenates after they were centrifuged at 3000xg for 15 min. Aliquots of five hundred microliters of supernatant were added to 4.5 mL of phosphate buffer plus 100 μL of o-phthalaldehyde. During 15 min, the mixtures were incubated at room temperature and their fluorescent signals were recorded in a luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer LS50B) at 350 nm of excitation and 420 nm of emission wavelengths. Results were expressed as μmol GSH per g of wet tissue (Diaz-Ruiz et al. 2009).

Histopathological and immunohistochemical study

Animals were anesthetized and then perfused with cold saline solution followed by 10% v/v formaldehyde solution at 4 °C. Organs were dissected out and processed separately in a Histokinette 200 apparatus (Reichert Jung), finally were embedded in paraffin. Five-micrometer-thick microtome sections were mounted on slides, hematoxylin-eosin stained and examined using a light microscope.

On the other hand, sections were incubated with monoclonal antibody against Nrf2 1:100 (Nrf2 abcam Laboratory). In brief, sections were boiled in citrate buffer (pH 6 or 9) in a microwave oven for 2 × 10 min. The sections were preincubated with 0.3% hydrogen peroxide in PBS (Phosphate-Buffered Solution) for 30 min and subsequently incubated with secondary biotinylated antisera and then immersed in avidin–biotin–peroxidase complex; (LSAB System HRP, DAKO, Carpinteria; CA). The immune reaction resulted in the oxidation of the 3,3-diaminobenzidine by peroxidase (Liquid DAB, DAKO Carpinteria CA). The reaction sites were visualized as a brown staining. Counterstaining with hematoxylin was performed after immunostaining (Montes et al. 2015).

Statistical analyses

An exploratory analysis of the data was performed to determine normal distribution (Kolmogorov-Smirnov's test) and homogeneity of variances (Levene's test). In order to obtain normal distribution of the data, a logarithmic transformation was applied and then, logarithmic values were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. All analyses were performed using an SPSS 22.0 software (Chicago, Illinois, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

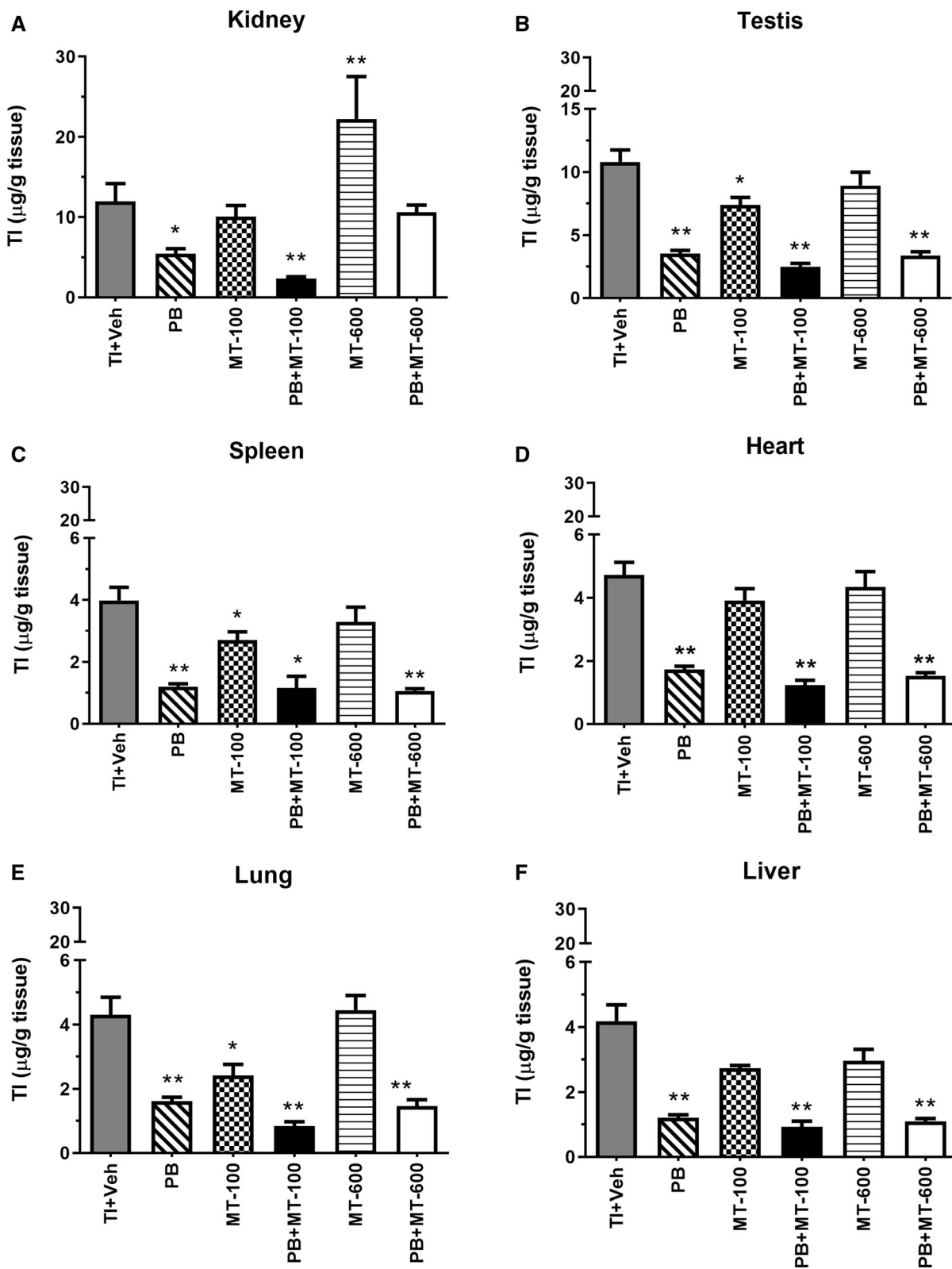
Thallium levels in peripheral organs

Tl levels in peripheral organs after antidotal treatments are shown in additional data are given as Online Resource (Tables .pdf, table S1) and Fig. 1. The mean ± one SEM are shown; values are expressed as

µg of Tl per gram of wet tissue. All values are compared with the Tl + Veh group, taken as 100%. In panel A, kidney tissue Tl changed by effect of treatments as follows: PB (54.3%), PB + MT-100 (23.4%) and MT-600 (176.3%). In panel B, Tl levels in testis changed as follows: PB (32.7%), MT-100 (68.2%), PB + MT-100 (23%) and PB + MT-600 (31.2%). In panel C, spleen tissue Tl changed by effect of treatments, as follows: PB (30.1%), MT-100(67.8%) PB + MT-100 (29.1%) and PB + MT-600 (26.6%). Tl levels measured in the heart are displayed in panel D. Changes were: PB(36.6%), PB + MT-100(26.3%) and PB + MT-600 (32.4%). Panel E shows the results of lung Tl. Changes were: PB (37.4%), MT-100 (56%), PB + MT-100 (19.5%) and PB + MT-600 (34%). Finally, liver Tl concentrations are shown in panel F. changes were: PB (31.9%), PB + MT-100(24.5%) and PB + MT-600 (28.8%). All these changes were statistically significant. One-way ANOVA followed by Dunnett's test. Tl organ levels of the animals treated with MT alone did not show significant changes.

Thallium levels in brain regions

Tl levels in brain regions after antidotal treatment are shown in additional data are given as Online Resource (Tables .pdf, table S2) and Fig. 2. The mean ± one SEM are shown; values are expressed as µg of Tl per gram of wet tissue. All values are compared with the Tl + Veh group, taken as 100%. In panel A, hippocampal tissue Tl changed by effect of treatments as follows: PB, PB+(34.1%) MT-100 (23.2%) and PB + MT-600 (34.1%). In panel B, striatal Tl levels changed as follows: PB (34.5%), MT-100 (71.9%), PB + MT-100 (24.8%) and PB + MT-600 (34%). In panel C hypothalamus Tl changed as follows: PB (32%), MT-100 (64.8%) PB + MT-100 (23.4%) and PB + MT-600 (32.9%). Tl levels measured in the midbrain are displayed in panel D. Changes were: PB (35.7%), MT-100 (69%), PB + MT-100 (26.9%) and PB + MT-600 (32.2%). Panel E shows the results of cerebellum Tl. Changes by treatments were: PB (33.3%), MT-100 (71.8%), PB + MT-100 (25.6%), MT-600 (78.9%) and PB + MT-600 (25.6%). Finally, cortex Tl concentrations are shown in panel F. Changes were: PB (30.7), MT-100 (77.9), PB + MT-100 (25.2%), MT-600 (79.1%) and PB + MT-



◀ **Fig. 1** Effect of Prussian blue (PB) and metallothionein (MT) administered alone or in combination upon thallium (Tl). The values are shown as mean \pm one SEM and are expressed in $\mu\text{g/g}$ of tissue wet of Tl. Only showed the values of Tl plus vehicle (Tl + Veh) levels in kidney (panel A, 11.97 ± 2.21), testis (panel B, 10.80 ± 0.95), spleen (panel C, 3.98 ± 0.43), heart (panel D, 4.72 ± 0.40), lung (panel E, 4.30 ± 0.55) and liver (panel F, 4.18 ± 0.050). Prussian blue (PB): Tl plus PB at 50 mg/kg four days, MT (MT-100 and MT-600): Tl and MT 100 or 600 $\mu\text{g/}$ rat; PB + MT-100 and PB + MT-600: Combined treatments of PB and MT to 100 and 600 $\mu\text{g/}$ rat respectively. One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Tl + Veh

600 (30.7%). All these changes were statistically significant. One-way ANOVA followed Dunnett's test.

Renal and hepatic biochemical markers

The results of antidotal treatments on renal and hepatic thallium toxicity markers are shown in the Table 1. We observed a significant increase in serum creatinine and urea of 2.4 and 3.6-fold, respectively, by effect of Tl intoxication (Tl + Veh), as compared healthy control (HC) group. No alterations in those markers were found in all of the groups receiving treatment either with PB or MT antidotes alone or in combination, as compared to HC averages.

Renal and hepatic GSH levels

To know if the cytoprotectant effect observed in the kidney and liver biomarkers is due to an antioxidant effect exerted by MT, the levels of GSH in the tissues were evaluated. The results are shown in Fig. 3 and the values are expressed as the mean \pm SEM of 6–7 animals per group, in μmol of GSH per gram of tissue. As clearly seen, the kidney GSH in the HC were 1.15 ± 0.32 , while in the Tl + Veh, an average value of 0.40 ± 0.04 was observed, which represents a decrease of -65.23% with respect to HC group. Likewise, in the group PB we observed an average value of 0.52 ± 0.05 and in MT-600 it was 0.73 ± 0.09 . Finally, in the PB + MT-600 the average value was 0.67 ± 0.26 . Only the MT-600 showed an 83% increase in GSH levels compared to the Tl + Veh, this difference was statistically significant. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc

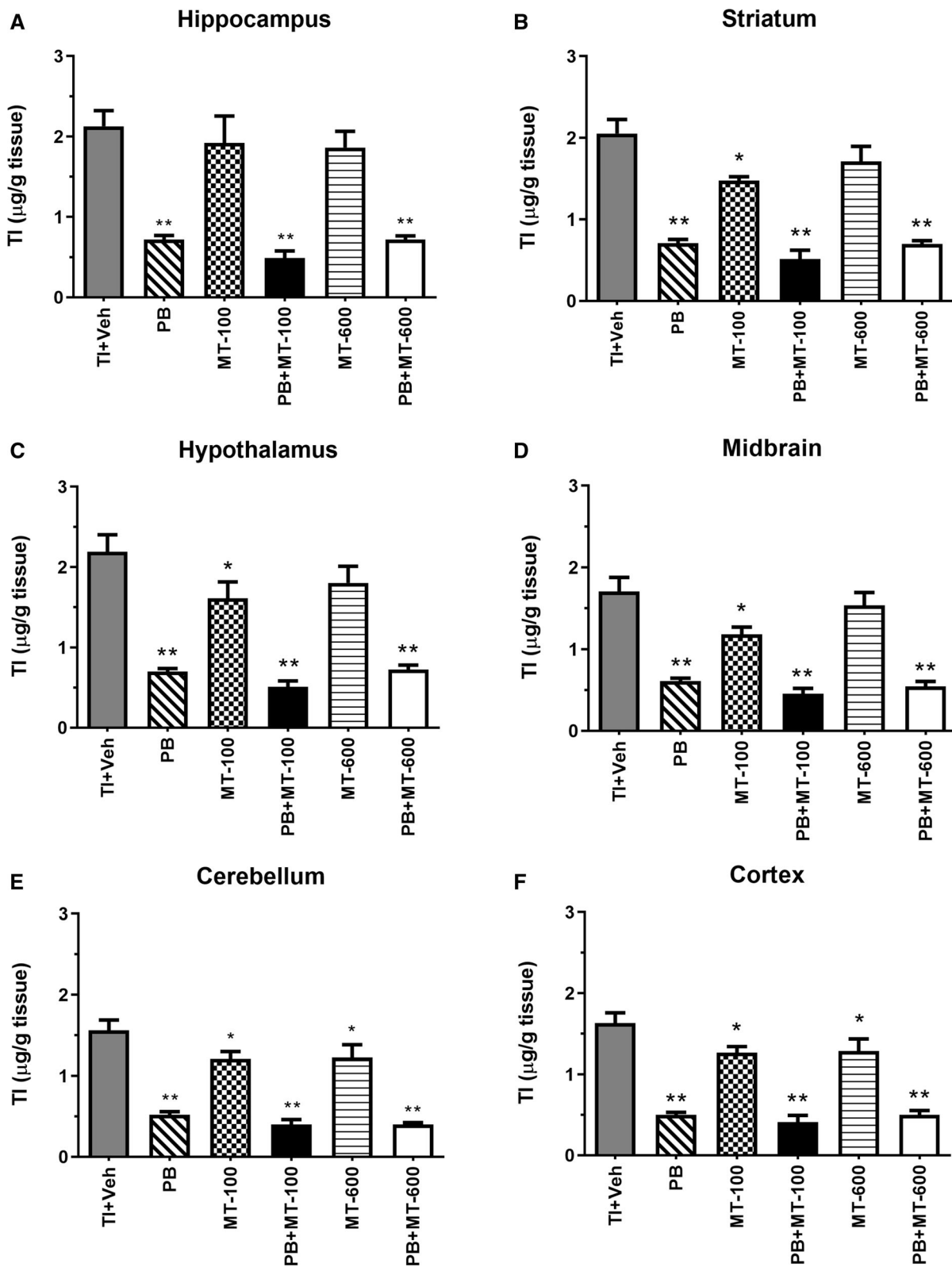
test. * $p < 0.05$. Regarding the liver results, no differences were observed between the evaluated groups (data not shown).

Histopathological examination

Figure 4 shows the histological structure of different tissues of HC, Tl + Veh, PB, MT-600 and MT-600 + PB, using hematoxylin-eosin. Histological examination of kidney, testis, spleen, heart, lung and liver of control group and treated rats, revealed little morphological changes between the organs of those groups. The morphological findings from the current study revealed normal structure of glomeruli, the proximal tubular epithelium, tubules, and basement membrane of kidney (panels A–E); similar results were observed by testis, both the parenchyma with seminiferous tubules and the Leydig cells, as well as the germ cells including the Sertoli cells, showing a normal appearance in all the groups studied (panels F–J). The spleen parenchyma with the white pulp formed by lymphatic tissue, as well as the red pulp, composed of vascular sinuses, was observed without changes in its morphology (panels K–N). In the same figure panels Ñ–R the cardiac muscle of has shown fibers grouped in bounds, connective tissue with capillaries between the cardiac fibers no lesions. No lesions were evident in representative sections of lung from all groups of animals analyzed by the light microscope, conserved bronchial basement membrane and vascular endothelial cells, as well as bronchial tubes are shown (panels S–W). Liver sections showed hepatic architecture without alterations with presence of a central vein surrounded with hepatic cords sinusoids (panels X–B1).

Nrf2 immunohistochemical study

Figure 5 shows the immunohistochemistry to identify the Nrf2 as oxidative stress response marker in several organs from HC and experimental treatments. Immunohistochemical examination revealed scarce immunoreactivity for Nrf2 in spleen and heart sections (panels K and Ñ) whereas slight immunoreactivity was observed in kidney, testis lung and liver in the HC (panels A, F, S and X). In the animals treated with Tl + Veh the moderate intensity of immunoreactivity



◀ **Fig. 2** Effect of Prussian blue (PB) and metallothionein (MT) administered alone or in combination upon thallium (Tl). The values are shown as mean ± one SEM and are expressed in µg/g of tissue wet of Tl. Only showed the values of Tl plus vehicle (Tl + Veh) levels in hippocampus (panel A, 2.13 ± 0.20), striatum (panel B, 2.05 ± 0.17), hypothalamus (panel C, 2.19 ± 0.21), midbrain (panel D, 1.71 ± 0.02), cerebellum (panel E, 1.56 ± 0.13) and cortex (panel F, 1.63 ± 0.13). Prussian blue (PB): Tl plus PB at 50 mg/kg four days, MT (MT-100 and MT-600): Tl and MT 100 or 600 µg/rat; PB + MT-100 and PB + MT-600: Combined treatments of PB and MT to 100 and 600 µg/rat respectively. One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. *p < 0.05, **p < 0.001 vs Tl + Veh

was more evident in all organs (panels B, G, L, O, and Y) mainly in the lung (panel T). In the group treated with PB, a slight immunoreactivity was observed for kidney, spleen, heart, lung and liver (panels C, LL, U and Z), while a moderate increase in the immunoreactivity was observed in testis (panel H). Likewise, similar results were observed for the MT-600 group (panels D, I, M, Q, V and A1). In contrast, compared to the HC an increased Nrf2 immunostaining was detected in the all organs studied of Tl + Veh, PB, MT-600 and PB + MT-600 groups (Table 2).

Discussion

The findings of the present study demonstrated a decrease of Tl concentrations in the various organs studied due to the effect of MT administered alone or in combination with PB. The mechanism of Tl decorporation by PB is well-known; during its passage through the intestine, PB exchange K + by Tl + ions

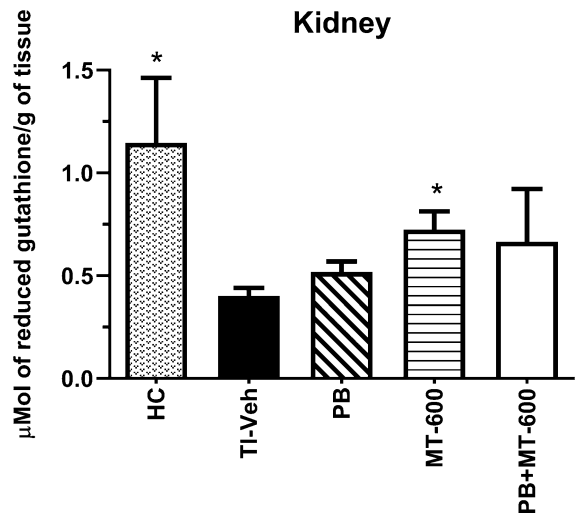


Fig. 3 Results of reduced glutathione (GSH) levels evaluated in the kidney, the values are expressed in mmol of GSH per gram of tissue and correspond to 6–7 animals per group and the values are shown as mean ± SEM. Healthy control (HC), thallium plus vehicle (Tl + Veh), Prussian blue (50 mg/kg) four days (PB), metallothionein 600 µg/rat (MT-600) and PB + MT-600 combined treatments. One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. *p < 0.05 vs Tl + Veh

on the surface of the lattice of K Fe (Fe (CN)6) (PB). Once exchanged, PB forms a stable compound with thallium, that is in turn excreted into the feces, accelerating Tl decorporation (Kravzov et al. 1993). MT, on the other hand, has been proposed as a chelating antidote for Tl in thallotoxicosis (Kılıç G and Kutlu M 2010). In our hands, MT was moderately effective as an antidotal treatment against acute thallium systemic poisoning, when given alone (100 or 600 µg) or in combination with PB. MT decreased the thallium levels in tissues of metabolic importance, such as lung and liver, and also in the two brain regions

Table 1 Renal and hepatic biochemical biomarkers

Group	Creatinine mg/dL	Urea mg/dL	ALT U/L	AST U/L	TP g/dL
HC	0.36 ± 0.01	42 ± 2.8	83 ± 8.7	310 ± 11.1	7.3 ± 0.07
Tl + Veh	0.86 ± 0.24*	150 ± 34.9*	59 ± 3.9	276 ± 26.2	7.5 ± 0.19
PB	0.41 ± 0.02	57 ± 8.8	72 ± 2.1	335 ± 28.2	7.6 ± 0.20
MT-600	0.42 ± 0.03	62 ± 11.7	58 ± 5.3	281 ± 30.2	7.5 ± 0.20
PB + MT-600	0.36 ± 0.01	44 ± 1.6	61 ± 7.2	311 ± 42.6	7.7 ± 0.21

Healthy control (HC), thallium and vehicle (Tl + Veh), Prussian blue at 50 mg/kg (PB), metallothionein 600 µg (MT-600), all groups except HC received Tl (16 mg/kg). Mean ± SEM. One-way ANOVA followed Dunnett's test. p < 0.05 vs HC

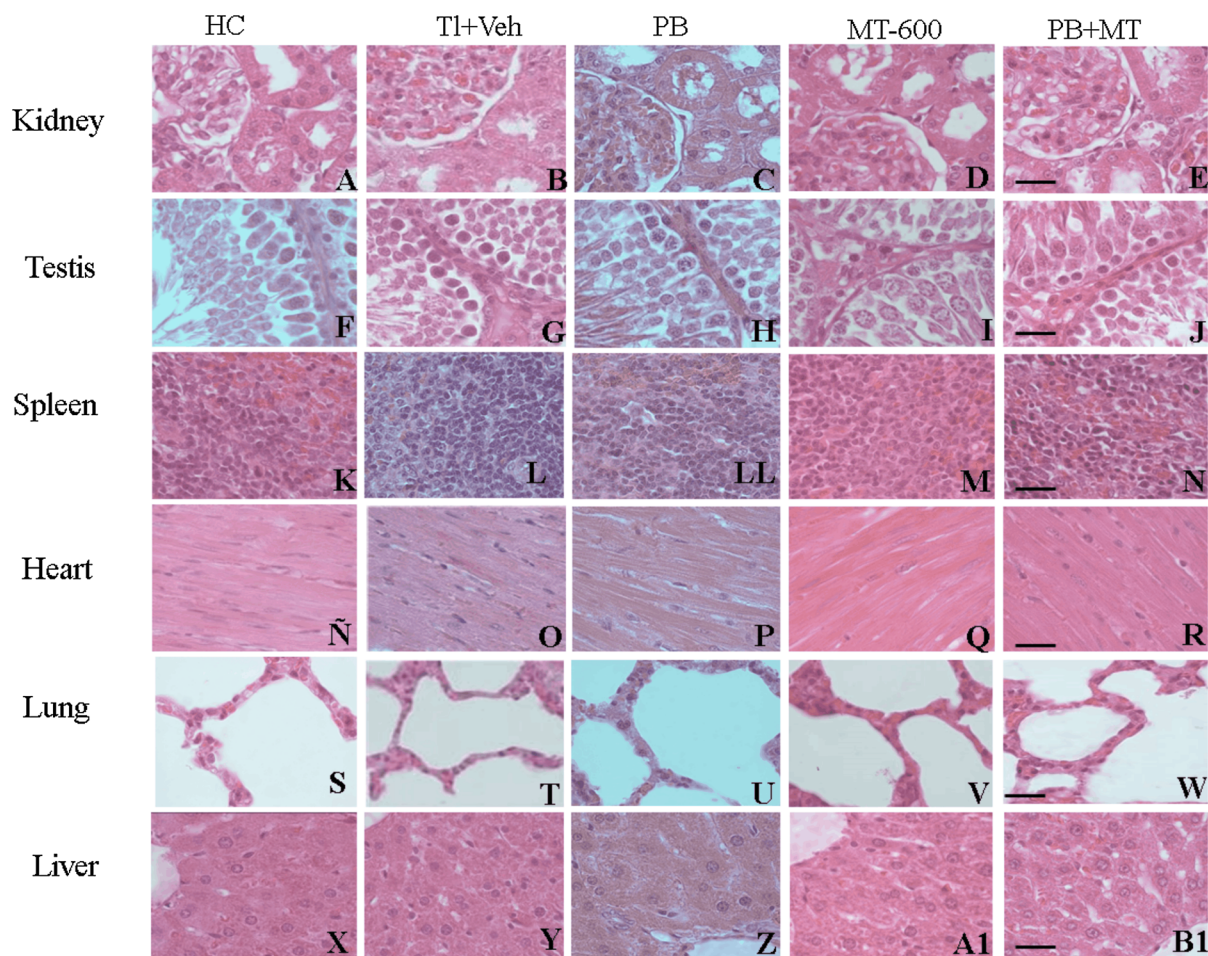


Fig. 4 Histopathological analysis on kidney, testis, spleen, heart, lung and liver tissue sections obtained from rats. Healthy control (HC), thallium plus vehicle (TI + Veh), Prussian blue (50 mg/kg) four days (PB), metallothionein 600 µg/rat (MT-

600) and PB + MT-600 combined treatments. The organs show a normal appearance, and no obvious lesions were observed in the groups analyzed. Hematoxylin-eosin staining, magnification $\times 1000$. Scale bars = 20 mm

containing the highest concentrations of thallium, such as hypothalamus and cerebellum. The systemic effect of MT did not produce an undesirable redistribution of TI to the central nervous system (target organ of thallotoxicosis), as it has been observed after the administration of other chelating agents, such as D-penicillamine or endogenous thiols such as L-cysteine (Rios and Monroy-Noyola 1992, Montes et al. 2007), as MT is unable to cross the blood-brain-barrier (Lewis et al. 2012) then, it is possible that a putative TI-MT complex may not be able to cross to the brain to produce a redistribution of the metal. Particularly, the administration of 600 µg of MT showed a systemic, rather than cerebral, increase of renal TI concentrations produced by a redistribution of the metal to the

kidney. Interestingly, this renal thallium accumulation did not induce significant kidney damage, as the levels of creatinine (a biomarker of kidney dysfunction) were similar to the HC group values. TI decorporation is more evident in the kidney and hippocampus, when MT is administered simultaneously to PB (PB + MT-100 and 600 groups). This additive pharmacological effect of MT in combination with PB has been reported for others exogenous chelating agents studied experimentally in vivo (Montes et al. 2011). Taken together, results of the present study suggest a chelating effect of MT on TI (Kılıç G and Kutlu 2010; Mendez-Armenta 2003; Kara et al. 2005). Exogenous administration of MT has been reported to be protective against heavy metals' intoxication (Sabolic

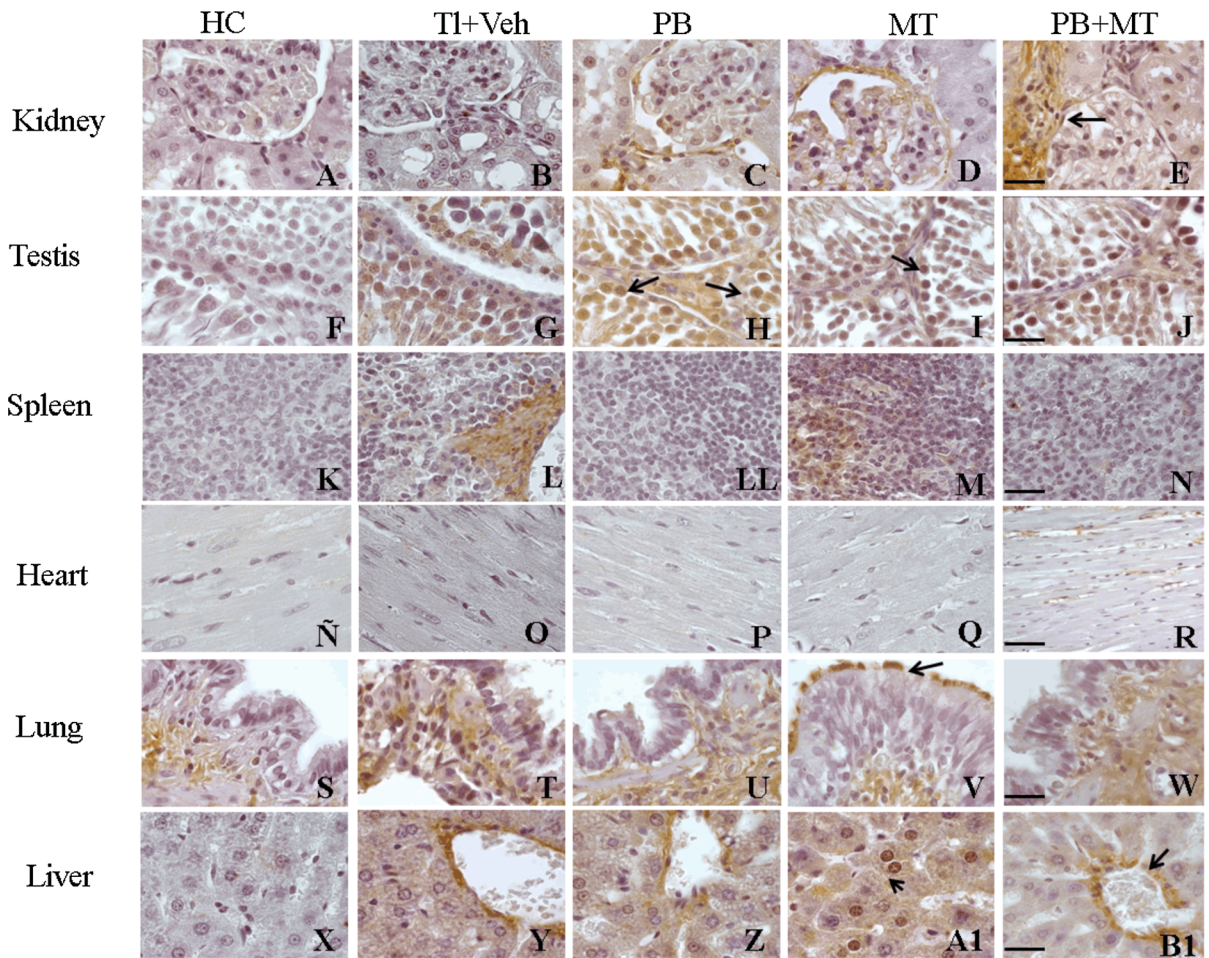


Fig. 5 Immunohistochemical study of Nrf2 on kidney, testis, spleen, heart, lung and liver tissue sections obtained from rats. Healthy control (HC), Tl and vehicle (Tl + Veh), Prussian blue group (PB): Tl plus PB at 50 mg/kg four days, metallothionein (MT-600): Tl and MT 600 µg/rat; PB + MT-600 group: Combined treatments of PB and MT 600 µg/rat. Tissues

increased Nrf2 immunoreactivity in glomerular vascular tissue of kidney, hepatocytes, central vein of liver bronchial basement membrane lung and testis of experimental groups was observed. Arrow shows Nrf2 immunoreactivity. Magnification ×1000. Scale bars = 20 µm

Table 2 The semi-quantitative morphological evaluation of immunohistochemical Nrf2 analysis, according to group

	HC	Tl + Veh	PB	MT-600	PB + MT-600
Kidney	+	+	+	++	+++
Testis	+	++	+++	+++	+++
Spleen	---	+	+	+	++
Heart	---	+	---	---	+
Lung	++	+++	+++	+++	+++
Liver	+	+	++	++	++

Healthy control group (HC), thallium and vehicle (Tl + Veh), Prussian blue (PB), metallothionein 100 and 600 µg (MT-100 and MT-600 respectively): slight; ++ moderate +++ ; intense; --- scarce

et al. 2010). In this study, hepatic Tl accumulation decreased at both doses of MT (100 or 600 μg), as reported by Kılıç, and Kutlu (2010) in a similar rat model of acute thallotoxicosis. It is important to remark that most of the effects of MT were not dose-dependent in body organs and brain regions, suggesting that the lower dose of MT (100 μg /rat) is achieving the maximal effect of the protein on Tl decorporation. In fact, the highest dose of MT employed (600 μg /rat), was the one that produced a redistribution effect on kidney Tl.

The use of MT as an antidote in Tl toxicosis protected against the damage to peripheral organs by decreasing organ concentrations of thallium without increasing the metal concentration of the brain. Because this effect of decorporation of Tl by MT was modest, it is possible that other MT-induced mechanisms are also participating to prevent Tl-induced damage.

An interesting finding of this study was that MT increased GSH levels, indicating a decrease of Tl-induced oxidative stress. This may explain the MT-induced cytoprotection observed in kidney, since various studies have shown that oxidative stress is an important mechanism of damage leading to kidney dysfunction in children and adults exposed to Tl (Osorio-Rico et al. 2017; Duan W et al. 2020). Likewise, in the PB + MT-600 group, there is only a tendency to increase the amount of GSH which, due to the great variability, was not statistically significant. This may indicate that PB does not have an antioxidant effect, as it is observed in the group receiving PB alone. It has been reported that PB is acting only as a Tl chelator allowing a faster removal of the metal from tissues (Montes et al. 2011).

In the same line, Tl was able to increase Nrf-2 staining in most organs, by effect of MT, showing an induction of protective mechanisms against oxidative stress induced by Thallium. The antioxidant actions of MT are well-known and have been suggested as an advantage of the protein compared to other chelating agents (Ruttkey-Nedecky et al. 2013) as it is able to prevent free radicals' overproduction with consequent lipid peroxidation and formation of reactive oxygen species (Juarez-Rebollar et al. 2017). This antioxidant action of MT may explain why the protein protected from the renal effects of acute thallium poisoning, in spite of the redistribution of Tl to the kidney. The increased renal Tl concentrations observed in the

group of animals treated with MT-600 may also be the reflection of a higher excretion of the metal by this organ. This remains speculative until future experiments. An additional cytoprotective mechanism of MT is its ability to partially detoxify Tl in fish and rice plants tissues, according to recent reports from (Dragun et al. 2018; Yao et al. 2020).

Likewise, the increase in both GSH and Nrf2 due to the effect of MT is interesting since a direct association between the synthesis of GSH and Nrf-2 has been reported. The first step in the synthesis of GSH is catalyzed by L-glutamate L-cysteine γ -ligase (GCL), to form γ -glutamyl-cysteine, the expression of GCL (the rate-limiting enzyme for the synthesis of GSH), responds to oxidative stress that is positively regulated by Nrf2 which, in combination with small homologous proteins of the avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (MAF), bind to the antioxidant response elements (ARE) in the promoter of the gene as well as other antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase (GST), UDP-glucosyl transferase and superoxide dismutase (SOD), GSH peroxidase (GPx) and catalase (CAT). The second step in the synthesis of GSH is catalyzed by GSH synthetase (GS), which produces GSH by adding a glycine molecule to γ -glutamyl-cysteine. Both the first and second steps require energy in the form of adenosine triphosphate (ATP); however, ATP is generally not considered a limiting factor in GSH production, except under pathological conditions (Vairetti et al. 2021). Based on this information, it is likely that the increased GSH levels is related to an increase in Nrf2, that was observed in the immunohistochemical images of the antidote groups.

The present study contributes with relevant pre-clinical data to evaluate the pharmacological efficacy of MT alone or in combination with PB for the antidotal treatment of acute thallotoxicosis. For most of the organs and brain regions, both antidotes showed a summation of effects when combined, with no statistically significant interaction. That result indicates that MT and PB are acting by different, unrelated mechanisms. As MT is unable to cross the blood-brain barrier efficiently, thallium is been chelated only in the periphery, without redistribution to the brain. This represents an advantage of the protein over other chelating agents that aggravate thallium toxicity when administered alone (Rios and Monroy-Noyola 1992; Lewiss 2012).

Table 3 Reference thallium values in healthy adult and children population and recent reports of thallium poisoning. Thallium concentrations in blood and organs in experimental rat toxicity models

Specie	Concentration	Exposure source	Effect	References
	Mean \pm SD	Healthy Italians		Minoia et al. (1990)
	Urine $\mu\text{g L}^{-1}$			
	0.42 ± 0.09			
	Blood $\mu\text{g L}^{-1}$			
	0.39 ± 0.05			
	Serum (or plasm) $\mu\text{g L}^{-1}$			
	0.18 ± 0.009			
	Concentration ranges thallium	A systematic review	Reference values in healthy adult population	Caroli et al. (1994)
	Serum $0.05\text{--}0.3 \text{ pg/L}$			
	Whole blood $0.15\text{--}0.6 \text{ pg/L}$			
	Urine $0.02\text{--}8.9 \text{ pg/L}$			
Humans	Mean and interquartile range (25–75%)	Local water resources from three villages (Čelije, Draž, and Potnjani) in eastern Croatia	Hair was not a reliable biological material to track thallium levels mainly due to very low concentrations of this element often well below the detection limit. However, the results showed that the thallium concentration in drinking water can be effectively traced in urine samples	Curković et al (2013)
	Water $\mu\text{g L}^{-1}$			
	$< 0.001 (< 0.001\text{--}0.001)$			
	$0.001(0.001\text{--}0.023)$			
	$0.001(< 0.001\text{--}0.001)$			
	Serum/ $\mu\text{g L}^{-1}$			
	$0.05(< 0.05\text{--}0.10)$			
	$< 0.05(< 0.05\text{--}0.05)$			
	$< 0.05(< 0.05\text{--}0.07)$			
	Urine/ $\mu\text{g L}^{-1}$			
	$0.07(< 0.05\text{--}0.18)$			
	$0.15(0.05\text{--}0.27)$			
	$0.05(0.05\text{--}0.2)$			
	Hair/ $\mu\text{g g}^{-1}$			
	$0.07(0.04\text{--}0.28)$			
	$0.14(0.05\text{--}0.25)$			
	Whole blood	In a series of 99 healthy children	Reference values in healthy children population	Goullé et al. (2015)
	Median $0.02 \mu\text{g/L}$ and $0.01\text{--}0.04$ (range 5th–95th percentile)			

Table 3 continued

Specie	Concentration	Exposure source	Effect	References
Human	Median 0.04 µg/L and 0.02–0.06 (range 5th–95th percentile)	In pregnant Chinese women and their newborns, to assess the association of these metals with birth weight	Tl in the maternal and cord blood was most notably inversely associated with birth weight	Hu et al. (2015)
	The thallium concentration: maternal blood, 0.2 ng/g and cord blood, 0.04 ng/g	In different farmlands around an industrial area featured by cement production activities	Bioaccumulation factor and enrichment factor show that taro and corn preferentially accumulate Tl especially in underground parts. The consumption of these vegetables may result in chronic poisoning and/or even carcinogenic risk	Zhou et al. (2021)
	2.28 ± 1.39 mg/kg in soils	Consumed a thallium-contaminated meal	Hyperalgesia of the limbs and abdominalgia, which may differ from common peripheral neuropathy. Hepatic damage and alopecia	Wang et al. (2021)
Rats	The thallium concentration exceeded the threshold limit value (> 1000 times) in urine (ref: < 5 µg/L; patient 1: 7200 µg/L; patient 2: 5100 µg/L) and blood (> 100 times) (ref: < 2 µg/L; patient 1: 280 µg/L; patient 2: 210 µg/L)	Low level drinking group (20 mM of TlCl ₃)	Deferasirox is a good chelator to remove thallium	Saljooghi and Fatemi (2011)
	In blood serum	High-level drinking group (160 mM of TlCl ₃) per 30 days		
	Low level drinking group 9.856 ± 0.234			
	High-level drinking group 25.17 ± 4.29			
Mice	Concentration of thallium (mg/kg)	Thallium was administered to these rats at two doses: 20 mg Tl ³⁺ /kg (low dose group) and 40 mg Tl ³⁺ /kg (high dose group). Oral administration of the toxic metal ion was performed once a day pre 60 days	Two chelators were tested: deferasirox and deferasirox. The results showed that both chelators were effective only at the highest dose level, whereas deferasirox was more effective than deferasirox in improving urinary thallium excretion	Salehi et al. (2017)
	Low doses			
	Heart 0.110 ± 0.002; kidney 0.741 ± 0.015; liver 1.078 ± 0.021; intestine 0.685 ± 0.026 and spleen 0.716 ± 0.026			
	Concentration of thallium (mg/kg) high doses			
	Heart 0.143 ± 0.003; kidney 1.174 ± 0.021; liver 1.165 ± 0.023; intestine 0.925 ± 0.035; spleen 1.145 ± 0.027			

It is interesting to remark that the reference values in healthy adult population in 1990 and 1994 (Minoia et al. 1990 Caroli et al. 1994) and subsequently the levels in blood, serum, plasma and urine have been reported in a population exposed to Tl, both in water and in the soil, demonstrating their potential threaten to population health (see Table 3). Likewise, in experimental studies in rats exposed to low and high concentrations of Tl during chronic exposures of 30 and 60 days, chelating therapies have been tested (Table 3).

Conclusion

Considering that various reports showed that exposure to Tl, even at very low concentrations, represents a threat to human health and that exposure to Tl is an increasingly global problem, the results of the present study show that MT administered alone or in combination with PB possess a cytoprotective action, due to a double mechanism: by decreasing organ Tl concentrations exerted by PB and by increasing antioxidant actions MT due to its ability to prevent Tl-induced oxidative stress.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. LAR funding acquisition, writing—original draft, methodology. ADR, CR and AMN conceptualization, data curation, formal analysis and writing—review & editing. MMA investigation, methodology, SM, YAV, VBF, methodology, validation, investigation. SGJ supervision, methodology, validation, investigation. and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This project has been partially supported by CONACYT/FORDECYT-PRONACES Project 840801. Taken in part of the PhD thesis of Anaya-Ramos, who received a fellowship CONACYT 350322.

Data availability The authors declare that the databases that support the results will be available when requested from the corresponding author.

Declarations

Conflicts of interest The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

References

- Aguilar-Carrillo J, Herrera L, Gutiérrez EJ, Reyes-Domínguez IA (2018) Solid-phase distribution and mobility of thallium in mining-metallurgical residues: environmental hazard implications. *Environ Pollut* 243:1833–1845
- Al Hammouri F, Darwazeh G, Said A, Ghosh RA (2011) Acute thallium poisoning: series of ten cases. *J Med Toxicol* 7:306–311
- Bramanti E, Onor M, Colombaioni L (2019) Neurotoxicity induced by low thallium doses in living hippocampal neurons: evidence of early onset mitochondrial dysfunction and correlation with ethanol production. *ACS Chem Neurosci* 10:451–459
- Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N (1994) The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review. *Crit Rev Anal Chem* 24:363–398
- Curković M, Sipos L, Puntarić D, Dodig-Ćurković K, Pivac N, Kralik K (2013) Detection of thallium and uranium in well water and biological specimens of an eastern Croatian population. *Arh Hig Rada Toksikol* 64:385–394
- Diaz-Ruiz M, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Rios C (2009) Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 452:56–59
- Dragun Z, Krasnići N, Kolar N, Filipović Marijić V, Ivanković D, Erk M (2018) Cytosolic distributions of highly toxic metals Cd and Tl and several essential elements in the liver of brown trout (*Salmo trutta* L.) analyzed by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere* 207:162–173
- Duan W, Wang Y, Li Z, Fu G, Mao L, Song Y et al (2020) Thallium exposure at low concentration leads to early damage on multiple organs in children: a case study followed-up for four years. *Environ Pollut* 258:113319
- Fisher RM, Gupta V (2020) Heavy metals. StatPearls Publishing, Treasure Island
- Galván-Arzate S, Santamaría A (1998) Thallium toxicity. *Toxicol Lett* 99:1–31
- Goullé JP, Le Roux P, Castanet M, Mahieu L, Guyet-Job S, Guerbet M (2015) Metallic profile of whole blood and plasma in a series of 99 healthy children. *J Anal Toxicol* 39:707–713
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
- Hoffman RS (2000) Thallium poisoning during pregnancy: a case report and comprehensive literature review. *J Toxicol Clin Toxicol* 38:767–775
- Hoffman RS (2003) Thallium toxicity and the role of Prussian blue in therapy. *Toxicol Rev* 22:29–40
- Hu X, Zheng T, Cheng Y, Holford T, Lin S, Leaderer B, Qiu J, Bassig BA, Shi K, Zhang Y, Niu J, Zhu Y, Li Y, Guo H, Chen Q, Zhang J, Xu S, Jin Y (2015) Distributions of heavy metals in maternal and cord blood and the association with infant birth weight in China. *J Reprod Med* 60:21–29

- Juárez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruíz C, Méndez-Arment M (2017) Metallothionein in brain disorders. *Oxid Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2017/5828056>
- Kara H, Karatas F, Canatan H, Servi K (2005) Effects of exogenous metallothionein on acute cadmium toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res* 104:223–232
- Kazantzis G (2000) Thallium in the environment and health effects. *Environ Geochem Health* 22:275–280
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89–116
- Kılıç G, Kutlu M (2010) Effects of exogenous metallothionein against thallium-induced oxidative stress in rat liver. *Food Chem Toxicol* 48:980–987
- Kravzov J, Rios C, Altagracia M, Monroy-Noyola A, López F (1993) Relationship between physicochemical properties of prussian blue and its efficacy as antidote against thallium poisoning. *J Appl Toxicol* 13:213–216
- Kuroda H, Mukai Y, Nishiyama S, Takeshita T, Tateyama M, Takeda A, Aoki M (2016) Tardily accelerated neurologic deterioration in two-step thallium intoxication. *J Clin Neurosci* 34:234–236
- Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37:139–143
- Lewis KE, Chung RS, West AK, Chuah MI (2012) Distribution of exogenous metallothionein following intraperitoneal and intramuscular injection of metallothionein-deficient mice. *Histol Histopathol* 27:1459–1470
- Li N, Zhou Y, Liu J, Tsang DCW, Wang J, She J et al (2020) Persistent thallium contamination in river sediments, source apportionment and environmental implications. *Ecotoxicol Environ Saf* 202:110874
- Lin G, Sun Y, Long J, Sui X, Yang J, Wang Q et al (2020) Involvement of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in protection against thallium-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in primary hippocampal neurons. *Toxicol Lett* 319:66–73
- Maya-López M, Mireles-García MV, Ramírez-Toledo M, Colín-González AL, Galván-Arzate S, Túnez I, Santamaría A (2018) Thallium-induced toxicity in rat brain crude synaptosomal/mitochondrial fractions is sensitive to anti-excitatory and antioxidant agents. *Neurotox Res* 33:634–640
- Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Barroso-Moguel R, Nava-Ruíz C, Jiménez-Capdeville ME, Ríos C (2003) Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol Lett* 144:151–157
- Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicolaou G, Alessio L, Capodaglio E (1990) Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ* 95:89–105
- Montes S, Soriano L, Ríos C, Monroy-Noyola A (2007) Endogenous thiols enhance thallium toxicity. *Arch Toxicol* 81:683–687
- Montes S, Pérez-Barrón G, Rubio-Osornio M, Ríos C, Díaz-Ruíz A, Altagracia-Martínez M, Monroy-Noyola A (2011) Additive effect of dl-penicillamine plus Prussian blue for the antidotal treatment of thallosis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:349–355
- Montes S, Juárez-Rebollar D, Nava-Ruíz C, Sánchez-García A, Heras-Romero Y, Rios C, Méndez-Armenta M (2015) Immunohistochemical study of Nrf2-antioxidant response element as indicator of oxidative stress induced by cadmium in developing rats. *Oxid Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2015/570650>
- Nguyen T, Yang CS, Pickett CB (2004) The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37:433–441
- Nordberg M, Nordberg GF (2000) Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol* 46:451–463
- Nuvolone D, Petri D, Aprea MC, Bertelloni S, Voller F, Aragona I (2021) Thallium contamination of drinking water: health implications in a residential cohort study in Tuscany (Italy). *Int J Environ Res Public Health* 18:4058
- Osorio-Rico L, Santamaría A, Galván-Arzate S (2017) Thallium toxicity: general issues, neurological symptoms, and neurotoxic mechanisms. *Adv Neurobiol* 18:345–353
- Penclova D, Urban P, Ridzon P, Senholdová Z, Lukás E, Diblík P, Lacina L (2009) Two-year follow-up of two patients after severe thallium intoxication. *Hum Exp Toxicol* 28:263–272
- RAIS (2003) Toxicity summary for Aroclor 1254. Toxicity profiles. Risk Assessment Information System (RAIS). Last updated 1997. Accessed 2003
- Rios C, Monroy-Noyola A (1992) D-penicillamine and Prussian blue as antidotes against thallium intoxication in rats. *Toxicology* 74:69–76
- Ríos C, Galván-Arzate S, Tapia R (1989) Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl₂SO₄. *Arch Toxicol* 63:34–37
- Riyaz R, Pandalai SL, Schwartz M, Kazzi ZN (2012) A fatal case of thallium toxicity: challenges in management. *J Med Toxicol* 9:75–78
- Ruttkey-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T et al (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* 14:6044–6066
- Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger C (2010) Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* 23:897–926
- Salehi S, Saljooghi AS, Badiie S, Moqadam MM (2017) Chelation of thallium (III) in rats using combined deferasirox and deferiprone therapy. *Toxicol Res* 33:299–304
- Saljooghi AS, Fatemi SJ (2011) Removal of thallium by deferasirox in rats as biological model. *J Appl Toxicol* 31:139–143
- Senthilkumaran S, Balamurugan N, Jena NN, Menezes RG, Thirumalaikolundusubramanian P (2017) Acute alopecia: evidence to thallium poisoning. *Int J Trichology* 9:30–32
- Sun TW, Xu QY, Zhang XJ, Wu Q, Liu ZS, Kan QC (2012) Management of thallium poisoning in patients with delayed hospital admission. *Clin Toxicol* 50:65–69
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2014) Priority pollutant list. U.S. Environmental Protection Agency, Washington

- Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C (2021) Changes in glutathione content in liver diseases: an update. *Antioxidants* 10:364
- Viquez-Guerrero J (2015) Caso Clínico 7: escolar femenino de 8 años de edad con elevación térmica de hasta 40° C, intermitente de predominio vespertino y nocturno, *Red Toxicológica Mexicana*. Accessed 22 June 2017
- 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 Saf* 90:76–81
- Wang TT, Wen B, Yu XN, Ji ZG, Sun LY, Li Y, Zhu SL, Cao YL, Wang M, Jian XD, Wang T (2021) Early diagnosis, treatment, and outcomes of five patients with acute thallium poisoning. *World J Clin Cases* 9(19):5082–5091
- Wanger T, Scheich H, Ohl FW, Goldschmidt J (2012) The use of thallium diethyldithiocarbamate for mapping CNS potassium metabolism and neuronal activity: Tl⁺ -redistribution, Tl⁺ -kinetics and Tl⁺ -equilibrium distribution. *J Neurochem* 122:106–114
- Yao Y, Wang M, Zhang P, Wang X, Huang X, Liu W et al (2020) Different responses in metallothionein gene expression and antioxidative enzyme activity lead to more ROS accumulation in rice exposed to Tl (III) than to Tl(I). *Chemosphere* 259:127258
- Yumoto T, Tsukahara K, Naito H, Iida A, Nakao A (2017) A successfully treated case of criminal thallium poisoning. *J Clin Diagn Res* 11:10–11
- Zhang H, Qiao B, Liu B, Zhao X (2014) Study on the treatment of acute thallium poisoning. *Am J Med Sci* 347:377–381
- Zhou Y, Wang J, Wei X, Ren S, Yang X, Beiyuan J, Wei L, Liu J, She J, Zhang W, Liu Y, Xiao T (2021) Escalating health risk of thallium and arsenic from farmland contamination fueled by cement-making activities: a hidden but significant source. *Sci Total Environ* 782:146603

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.