

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Efecto del aluminio en la inestabilidad genómica relacionado a cáncer de mama inducido con N-metil-N-nitrosourea (MNU) en ratas Sprague-Dawley



**TESIS**

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

**Alejandro Monserrat García Alegría**

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2017

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

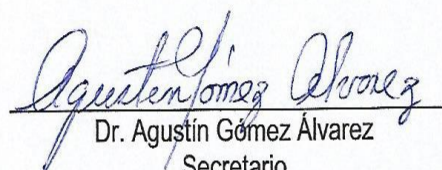
## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Alejandro Monserrat García Alegría**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.




---

Dr. Humberto Francisco Astiazarán García  
Director



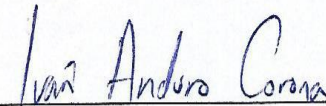
---

Dr. Agustín Gómez Álvarez  
Secretario



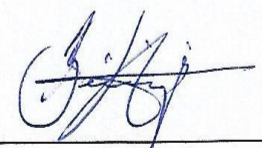
---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Sinodal



---

Dr. Iván Anduro Corona  
Sinodal



---

Dr. Armando Burgos Hernández  
Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

### **Agradecimientos**

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por todos estos años de vida laboral y por la oportunidad de emprender y culminar esta etapa de estudios de doctorado.

A mis sinodales por todo el apoyo recibido durante estos cuatro años de estudios y de trabajo experimental, escritos, ponencias, artículos y todo lo que se ha generado con este trabajo, además de su amistad y compañerismo.

A todas y cada una de las personas que de una u otra manera participaron en la realización de este trabajo de investigación.

A todos Gracias

### **Dedicatoria**

A toda la familia García Alegría y asociados, en especial a mis queridos padres, Manuel García Ramírez (†) y Lydia Alegría Borboa. Enhorabuena y dentro de lo que cabe, sigamos disfrutando los encuentros familiares. Los quiero a todos.

A mi familia, Marina, Alex y Aldo. Los quiero mucho.

A mi...

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xii
Objetivo General	xii
Objetivos Específicos	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
Aluminio y Riesgos a la Salud Humana	5
Aluminio y Cáncer de Mama	8
Etiología del Cáncer de Mama: Agentes Carcinógenos	9
Agentes carcinógenos químicos	9
Carcinógenos completos	9
Carcinógenos incompletos	10
Carcinógenos de acción directa	10
Carcinógenos de acción indirecta	10
Etiología del Cáncer de Mama: Metales	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Diseño Experimental	13
Animales de Experimentación	13
Tratamientos Experimentales	13
Inducción de Cáncer de Mama en Ratas	14
Condiciones de Manejo de Bioterio	17
Dieta	17
Evaluación Dietaria	17
Colecta de las Muestras (Sangre y Tejido Mamario)	19
Muestras Sanguíneas	19
Muestras de Tejido Mamario	19

Optimización de las Condiciones Analíticas Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante Espectroscopia de Absorción Atómica	22
Preparación del Material de Laboratorio	22
Calibración de Balanza Analítica, Material Volumétrico y Micropipetas	22
Calibración del Equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA)	23
Evaluación de Parámetros Analíticos en Condiciones Ideales Mediante Espectroscopia de Absorción Atómica por Flama (EAAF)	23
Linealidad	23
Exactitud	25
Precisión	25
Exactitud y Precisión a Partir de un Material de Referencia Certificado (MRC)	26
Validación del Método Analítico Para Cuantificar Aluminio en Ratas Sprague Dawley Mediante Espectroscopia de Absorción Atómica por Flama y Horno de Grafito	26
Equipo	26
Reactivos, Estándares y Materiales de Referencia Certificado	28
Validación del Método Analítico	28
Linealidad	28
Exactitud y Precisión	30
Repetibilidad	30
Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)	30
Aplicabilidad del Método Analítico Validado	31
Descomposición de las Muestras de Tejidos de Ratas Sprague-Dawley Fortificadas con Aluminio, Controles y del Material de Referencia Certificado (NIST 1566b)	31
Estimación de la Incertidumbre Expandida de un Método Analítico para Cuantificar Aluminio en Tejidos de Ratas Sprague Dawley Mediante EAAF y EAAHG	32

Fuentes de Incertidumbre	33
Estimación de la Incertidumbre Estándar en las Mediciones	33
Incertidumbre de la Concentración de Masa del Elemento Medido en el Instrumento a Través de la Curva de Calibración	35
Incertidumbre del Material Volumétrico	36
Incertidumbre del Factor de Dilución	37
Incertidumbre de la Repetibilidad (rep) de las Mediciones	38
Incertidumbre del Estándar de Aluminio	39
Incertidumbre del Material de Referencia Certificado CRM-S-B	39
Incertidumbre del Material de Referencia Certificado NIST 1566b	40
Incertidumbre Estándar Combinada (IEC)	41
Incertidumbre Estándar Relativa Combinada (IERC)	41
Incertidumbre Expandida (IE)	42
Determinación de la Concentración de Aluminio en Tejido Mamario	42
Efecto del Aluminio en la Inestabilidad Genómica	44
Químicos	44
Evaluación de la Inestabilidad Genómica	44
Evaluación Histopatológica	44
Análisis de Micronúcleos	44
Ensayo de Electroforesis Alcalina en Células Individuales (Ensayo Cometa)	46
Ensayo de Expresión Genética Mediante RT-qPCR	47
Análisis Estadístico	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
Evaluación Dietaria	51
Optimización de las Condiciones Analíticas Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA)	51
Calibración de Balanza Analítica y Material Volumétrico	51

Evaluación de Parámetros Analíticos en Condiciones Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante EAA por Flama	54
Linealidad	54
Exactitud	54
Precisión	54
Límite de Detección y Límite de Cuantificación	54
Exactitud y Precisión a Partir de un Material de Referencia Certificado (MRC)	58
Validación del Método Analítico Para Cuantificar Aluminio en Ratas Sprague Dawley Mediante Espectroscopia de Absorción Atómica por Flama y Horno de Grafito	58
Validación del Método	58
Linealidad	58
Exactitud y Precisión	60
Repetibilidad	62
Límite de Detección y Límite de Cuantificación	62
Aplicabilidad del Método Validado	64
Consideraciones Adicionales	66
Estimación de la Incertidumbre Expandida de un Método Analítico para Cuantificar Aluminio en Tejidos de Ratas Sprague Dawley Mediante EAAFy EAAHG	66
Concentración de Masa del Elemento Medido en el Instrumento a Través de la Curva de Calibración	66
Incertidumbre del Material Volumétrico	66
Incertidumbre para el Factor de Dilución (fd)	69
Incertidumbre para la Repetibilidad de las Mediciones	69
Incertidumbre de la Pureza del Estándar de Aluminio (1000 ± 2 mg/L)	69
Incertidumbre del Material de Referencia Certificado CRM-S-B (700 ± 4 mg/L)	69
Incertidumbre del Material de Referencia Certificado NIST 1566b (197.2 ± 6 mg/L)	69



Incertidumbre Estándar Combinada, Relativa, Porcentaje de Incertidumbre Relativa y Expandida Para la Concentración de Al Cuantificado Mediante EAAF	72
Incertidumbre Estándar Combinada, Relativa y Expandida para la Concentración de Al Cuantificado Mediante EAAHG	73
Determinación de la Concentración de Aluminio en Tejido Mamario	78
Efecto del Aluminio en la Inestabilidad Genómica	80
Evaluación de la Inestabilidad Genómica	80
Evaluación Histopatológica	80
Análisis de Micronúcleos	84
Ensayo de Electroforesis Alcalina en Células Individuales (Ensayo Cometa)	87
Ensayo de Expresión Genética Mediante RT-qPCR	90
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	112

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Condiciones de operación del equipo Perkin Elmer, modelo AAnalyst 400	27
II	Comportamiento biológico (media $\pm$ EE) de ratas Sprague Dawley, mediante la evaluación dietaria a través de un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ )	52
III	Resultados de la calibración de la balanza analítica (por triplicado) con masas patrón y material volumétrico (*desviación estándar)	53
IV	Resultados de la exactitud y de la precisión para un estándar de Al a tres concentraciones y para un material de referencia certificado (CRM-S-B US), cuantificados por EAA por flama, por triplicado	55
V	Porcentajes de recuperación de Al para muestras de tejidos de ratas, agua y alimento, fortificadas con 100 mg/L de Al, digeridas por vía húmeda y cuantificadas mediante EAA por flama, por triplicado	57
VI	Estimación de la exactitud y la precisión de un material de referencia certificado (CRM-S-B) por EAAF y EAAHG	61
VII	Análisis de precisión bajo condiciones de repetibilidad para tres concentraciones diferentes de Al, determinadas por EAAF y EAAHG, respectivamente	63
VIII	Porcentaje de recuperación para muestras de tejido de ratas fortificadas con 100 mg/L de Al para EAAF, y fortificadas con 200 $\mu$ g/L de Al para EAAHG, control sin fortificar y MRC	65
IX	Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa de la concentración de aluminio obtenida a partir de la curva de calibración en respuesta al instrumento, para EAAF y EAAHG, respectivamente	67
X	Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa del volumen del material volumétrico	68

<b>XI</b>	Resumen de la incertidumbre estándar y relativa para el factor de dilución utilizado para realizar la curva de calibración para aluminio, determinado por EAAF y EAAHG, respectivamente	70
<b>XII</b>	Resumen de cada uno de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa para la repetibilidad (rep) en la determinación de aluminio mediante EAAF y EAAHG, (mg/L y µg/L), respectivamente	70
<b>XIII</b>	Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para determinar la incertidumbre estándar y relativa para la pureza de un estándar de aluminio y para dos materiales de referencia certificados de aluminio, determinados mediante EAAF y EAAHG, respectivamente	71
<b>XIV</b>	Resumen de los valores obtenidos para la incertidumbre estándar combinada, la incertidumbre estándar combinada relativa, el porcentaje de incertidumbre estándar relativa y la incertidumbre expandida asociada con la concentración de aluminio determinado por EAAF y EAAHG, respectivamente	77
<b>XV</b>	Concentración de aluminio (medianas) en tejidos de ratas Sprague Dawley cuantificados por EAAHG, evaluados mediante chi cuadrada (X <sup>2</sup> ) y con la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0.05$ )	79
<b>XVI</b>	Genotoxicidad causada por los tratamientos experimentales mediante el conteo de micronúcleos (MN) en eritrocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley hembras, a los 5, 10 y 15 días de exposición	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Administración de tratamientos experimentales por vía intragástrica	15
2	Inducción de cáncer de mama con MNU por vía intraperitonea	16
3	Jaulas de confinamiento de las ratas Sprague Dawley	18
4	Obtención de sangre de ratas por punción intracardiaca	20
5	Cortes quirúrgicos de tejido mamario de ratas Sprague Dawley	21
6	Equipo de espectroscopia de absorción Atómica Perkin Elmer AAnalyst 400	24
7	Horno de microondas MARSxpress 5 CEM	29
8	Diagrama de Ishikawa (causa-efecto) en el que se involucran las fuentes de incertidumbre de este estudio	34
9	Horno de microondas TITAN MPS (A). Residuo ácido de muestra de tejido mamario (B). Residuo ácido de muestra control (agua) (C)	43
10	Tejido mamario de ratas Sprague Dawley	45
11	Equipo para RT-qPCR marca StepOne (Applied Biosystem)	49
12	Curva de calibración para Al mediante EAAF	55
13	Curva de calibración para aluminio cuantificado por EAAF (mg/L)	59
14	Curva de calibración para aluminio cuantificado por EAAHG (µg/L)	59
15	Contribución gráfica de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de aluminio mediante espectroscopia de absorción atómica por flama EAAF y EAAHG	75

<b>16</b>	Cortes histológicos de la glándula mamaria de ratas Sprague Dawley, teñidos con hematoxilina y eosina (A 40X y B 400X)	81
<b>17</b>	Evaluación histopatológica de tejido mamario de ratas Sprague Dawley expuestas a los tratamientos experimentales. Se puede apreciar que el efecto de los tratamientos es de tipo hiperplásico (proliferación celular intraductal). HE 400X	83
<b>18</b>	Genotoxicidad (1 micronúcleo/eritrocito) causada por los Tratamientos experimentales en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición	85
<b>19</b>	Efecto genotóxico provocado por el tratamiento +2000Al/-MNU en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición, evaluado mediante ensayo cometa	88
<b>20</b>	Efecto genotóxico provocado por el tratamiento +2000Al/-MNU en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición, evaluado mediante ensayo cometa, comparado contra el control negativo (-Al/-MNU)	89

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto genotóxico del aluminio, en su forma de  $AlCl_3$ , en la inestabilidad genómica relacionada con el desarrollo de cáncer de mama inducido con N-metil-N-nitrosourea (MNU), en ratas Sprague-Dawley como modelo experimental.

### **Objetivos Específicos**

Optimizar las condiciones analíticas para la validación y estimación de la incertidumbre expandida del método analítico para cuantificar aluminio en tejido de ratas Sprague Dawley, mediante espectroscopia de absorción atómica por flama y horno de grafito (EAAF y EAAHG).

Determinar la concentración de aluminio en glándulas mamarias de ratas, mediante espectroscopia de absorción atómica por flama y horno de grafito.

Identificar alteraciones celulares y tisulares provocadas por aluminio en tejido mamario de ratas Sprague Dawley, mediante técnicas histológicas.

Evaluar la inestabilidad genómica mediante análisis de micronúcleos, ensayo cometa y expresión de genes *BRCA 1* y *SCL11a2*, para explorar su relación con cáncer de mama en el modelo animal.

## RESUMEN

Las formas solubles de aluminio (Al) para uso o consumo humano recientemente han sido consideradas potencialmente tóxicas, debido a que han sido relacionadas con alteraciones en hígado, cerebro, médula ósea, hematológicas y neoplásicas, entre otras. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto genotóxico del aluminio ( $AlCl_3$ ) en la inestabilidad genómica relacionada con el desarrollo de cáncer de mama inducido con N-metil-N-nitrosourea (MNU) en ratas Sprague Dawley. Se evaluó el comportamiento dietario de las ratas y posteriormente se determinó la concentración de aluminio en glándula mamaria mediante espectroscopia de absorción atómica (EAA). La inestabilidad genómica se determinó en cortes histológicos de glándula mamaria teñidos con hematoxilina y eosina. También se realizó ensayo de micronúcleos y ensayo cometa en sangre periférica. Los resultados de la evaluación dietaria indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos experimentales. La concentración de Al en tejido mamario fue mayor en el tratamiento +2000Al/-MNU. Este tratamiento experimental produce proliferación celular intraductal moderada, hiperplasia de ganglios linfáticos y adenoma de glándulas serosas. Los resultados para el ensayo de micronúcleos y el ensayo cometa indican que +2000Al/-MNU causa efecto genotóxico a partir de los 10 días de exposición y que el daño es más evidente a partir de los 15 días de exposición al tratamiento. Se puede concluir que hay inestabilidad genómica y que las condiciones experimentales evaluadas no se relacionan con cáncer de mama.

## INTRODUCCIÓN

El aluminio (Al) es uno de los elementos metálicos más abundante en la naturaleza, ya que representa el 8 % de los metales que conforman la corteza terrestre y la forma más común en que se encuentra es asociado a minerales tipo bauxita (Krewski y col., 2007). Entre las propiedades fisicoquímicas más importantes del aluminio se encuentran: número atómico 13, masa atómica de 26,981 u, densidad de 2.700 Kg/m<sup>3</sup> y, debido a estas razones, no se le considera un metal pesado (Breckle, 1991; Nies, 1999). Aunque no existe consenso sobre estos criterios de clasificación para los metales pesados, recientemente se ha propuesto el término de metales tóxicos, con base en su alta solubilidad y su potencial tóxico a la salud humana y, en este grupo, asociado a toxicidad se encuentra el aluminio (Prozialeck y col., 2008; Tchounwou y col., 2012).

El aluminio en sus formas metálicas tiene una gran diversidad de usos y aplicaciones, debido a que es un metal ligero, tiene alta resistencia física y mecánica, así como alta resistencia a la corrosión u oxidación química, que lo hace ideal para la fabricación de componentes en la industria de la construcción (puertas, ventanas, marcos, chapas), componentes de la industria aeroespacial (aviones), metalmecánica (motores, válvulas), autopartes (rines, chapas, vistas), utensilios de cocina (ollas, coladores, cucharas), así como latas contenedoras de bebidas (jugos, refrescos, cervezas), entre otros usos (Hoyle, 1995; Shinzato e Hypolito, 2005; Silva-Martínez y col., 2005; Verran y Kurzawa, 2008; Yoshimura y col., 2008; Cui y Roven, 2010; Gaustad y col., 2012; Hatayama y col., 2012).

Además de estas aplicaciones industriales, el aluminio tiene otra gran diversidad de usos, pero aquellos que se les considera de mayor relación con el



consumo humano son los de servir como floculante en el proceso de purificación del agua potable, adyuvante en la preparación de vacunas, aditivo de bebidas, dulces, quesos, comidas, antitranspirantes y desodorantes, entre otros (López y col., 2002; Darbre, 2005; Kohara y col., 2007; Yamamoto y col., 2007; Yokel y col., 2008; Gil y col., 2013; Güven y col., 2013).

Estimaciones hechas recientemente en Estados Unidos de Norteamérica, establecen que una persona adulta joven y de clase media consume alimentos y bebidas que contienen aluminio, y señalan que la cantidad ingerida oscila entre 105 y 150 mg de Al/día, en promedio. Esto significa que las personas están expuestas constantemente al uso o consumo frecuente de aluminio en sus diferentes formas o presentaciones de manera rutinaria. Este factor del medio ambiente circundante de las personas ha hecho que este metal sea objeto de múltiples investigaciones debido a su potencial toxicidad en la salud humana (Yamamoto y col., 2007; Department of Health and Human Services, USA, 2008; Yokel y col., 2008).

Por las razones antes expuestas, es importante realizar trabajos de investigación que permitan ahondar en los posibles efectos relacionados con el uso o consumo de materiales que contienen aluminio y los riesgos que esto conlleva en la salud humana, sobre todo en relación a inestabilidad cromosómica, genómica y cáncer.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que en 2008 se presentaron 12.7 millones de nuevos casos de cáncer, con 7.6 millones de defunciones. Entre los principales tipos de cáncer están los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo (excluyendo el cáncer de piel no melanoma), pues representa el 16 % de todas las neoplasias femeninas. La OMS señala que en este mismo año, fallecieron 458,000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad de países desarrollados, la mayoría (69 %) de las defunciones por esa causa, se registran en los países en vías de desarrollo (OMS, 2013).

Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante el 2011 en América Latina se diagnosticaron 400,000 nuevos casos de cáncer de mama y 120,000 mujeres fallecieron por esta enfermedad (OPS, 2011).

El cáncer de mama en México representa la segunda causa de muerte de mujeres entre 30 y 54 años de edad productiva y reproductiva (Knaul y col., 2006). Más recientemente, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2012) señaló que de cada 100 mujeres en México que presentan tumores malignos, 24 tienen cáncer de mama, en tanto que 14 mueren por este tipo de cáncer.

Estudios clínicos en 2004, reportaron niveles incrementados de inestabilidad genómica en regiones alrededor de la glándula mamaria en tejidos histológicamente sanos de mujeres (Ellsworth y col., 2004a), lo cual sugiere que es el resultado de la exposición a productos químicos en esta área del cuerpo

(Ellsworth y col., 2004b). En este sentido, la inestabilidad genómica contribuye de manera importante a alteraciones moleculares que conducen a procesos carcinogénicos y esto puede provocar mayor susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama. Por otro lado, también se ha encontrado asociación entre los quistes mamarios y el uso de antitranspirantes con sales de aluminio, sobre todo si se han utilizado por largos períodos de tiempo (Darbre, 2005b). Incluso se han encontrado niveles incrementados de aluminio en quistes tipo 1 comparado con los niveles de aluminio en suero humano o en leche materna, que aunque no sea de esperarse que los niveles de aluminio no sean similares en los diferentes tejidos, este hallazgo indica que la aplicación tópica del antitranspirante que contiene aluminio está muy relacionado con los quistes tipo 1 que se encuentran en la región axilar, muy cercana al tejido mamario (Manello y col., 2009).

Por otro lado, algunas investigaciones clínicas señalan que no existe argumentación experimental ni biológica, que permita inferir que el cáncer de mama sea provocado por aluminio presente en antitranspirantes y/o desodorantes, debido principalmente a que los resultados que muestran los investigadores que argumentan que si existe relación, no son concluyentes (Harvey, 2003; Gikas y col., 2004; Namer y col., 2008), además, se ha encontrado que el aluminio de los antitranspirantes no provoca inestabilidad genómica en los genes ERBB2, C-MYC y CCND1, relacionados con el cáncer de mama en humanos, de manera similar a como están relacionados los genes BRCA1 y BRCA2 con la carcinogénesis mamaria. Tampoco se ha encontrado diferencia en la concentración de aluminio entre el tejido mamario sano y tumoral (Rodrigues-Peres y col., 2013a,b).

Ante la incertidumbre del papel que pueda jugar el aluminio en la inestabilidad genómica relacionada con la génesis del cáncer de mama, es importante y necesario empezar este tipo de proyectos de investigación, con un

modelo experimental que permita explorar si el aluminio provoca inestabilidad genómica y si esta se encuentra relacionada con cáncer de mama. Por esta razón, se utilizaron ratas Sprague Dawley tratadas con soluciones de aluminio y con N-metil-N-nitrosourea (MNU) para inducción de cáncer de mama.

### **Aluminio y Riesgos a la Salud Humana**

El aluminio es un metal al que no se le ha encontrado participación en el funcionamiento corporal ni en el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, debido a la gran cantidad de usos y aplicaciones como aditivo en bebidas y alimentos, hace que los seres humanos estemos expuestos constantemente a este metal y por consiguiente se pueden presentar riesgos a la salud humana (Yumoto y col., 2009).

Algunos investigadores a nivel mundial, han enfocado sus proyectos de investigación en demostrar la posible participación del aluminio como agente genotóxico promotor de inestabilidad genómica y esta a su vez, se pueda relacionar directamente con la carcinogénesis (Balasubramanyam y col., 2009; Mahieu y col., 2009; Di Virgilio y col., 2010). La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño no solo en el material genético, sino también en todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento del genoma dentro de la célula, originando efectos biológicos adversos. Al agente que provoca genotoxicidad se le llama genotóxico y el daño que provocan se le llama mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis (Nowak y col., 2002; Storchova y Pellman, 2004). Por otro lado, la inestabilidad genómica se refiere a un incremento súbito en la tasa de mutación y el daño afecta a todo el genoma, a tal grado de que existen manifestaciones fenotípicas importantes a nivel de la estructura y número de cromosomas y/o de alteraciones a nivel nuclear en forma

de micronúcleos o, en el arreglo y/o la distribución de la cromatina (Cahill y col., 1999).

Se ha encontrado que el aluminio provoca alteraciones neurodegenerativas asociadas con Alzheimer en animales de experimentación como las ratas (Walton, 2007; Zhang y col., 2013). Estas alteraciones neurológicas pueden presentarse también en humanos (Yumoto y col., 2009; Percy y col., 2011). Los mecanismos moleculares que desencadenan las alteraciones neurodegenerativas no se conocen, pero se ha encontrado que el aluminio provoca estrés oxidativo relacionado con la producción de radicales libres de oxígeno, así como la producción y acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide lo que acelera el daño neurológico (Walton, 2007; Yumoto y col., 2009; Percy y col., 2011; Walton, 2012; Zhang y col., 2013).

También se ha encontrado asociación entre aluminio dietario y alteraciones en la actividad de macromoléculas que contienen fósforo, ya que el aluminio tiene una gran afinidad por este tipo de moléculas (ADN, ATP, ADP, moléculas H y M de los neurofilamentos, proteína *tau* y enzimas como las fosfoesterasas cerebrales). El aluminio desencadena reacciones de fosforilación, desfosforilación e hiperfosforilación, que alteran el funcionamiento de estas moléculas en el cerebro y el daño provocado también está asociado a demencia senil o Alzheimer (Nayak y Chatterjee, 2001).

Por otro lado, en investigaciones recientes también se ha encontrado que el aluminio provoca daño a nivel de médula ósea lo que genera alteraciones en la eritropoyesis que se traducen en anemias microcíticas, hipocrómicas y ferropénicas (Vittori y col., 1999). Uno de los tejidos donde se deposita la mayor cantidad de aluminio es la médula ósea y, algunos investigadores sostienen que la anemia es debida a que el aluminio secuestra o acompleja al hierro

disminuyendo su disponibilidad para el proceso normal de la eritropoyesis (Farina y col., 2002). Así también se ha encontrado que la presencia de aluminio en médula ósea se relaciona con la formación de micronúcleos en eritroblastos, así como la presencia de alteraciones en la cromatina (Vittori y col., 1999; Farina y col., 2002; Lambert y col., 2010).

En otros estudios clínicos, se ha determinado que existe asociación entre aluminio y alteraciones en hígado, ya que en este órgano, la presencia de Al también provoca estrés oxidativo que altera la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA), transaminasas (TGO y TGP), así como enzimas del complejo citocromo P450 de la fracción microsomal hepática (Kumar y col., 2009; Zhu y col., 2013). Estas alteraciones en la actividad de las enzimas hepáticas, hacen que el hígado no pueda realizar sus funciones de desintoxicación de manera normal. Así mismo, se ha encontrado que existe relación entre la presencia de Al y la inestabilidad genómica en hígado, ya que se han observado alteraciones en p53, Rb y ciclina D1, que provoca citotoxicidad hepática (Kumar y col., 2009; Di Virgilio y col., 2010; Zhu y col., 2013).

En los estudios de reproducción de ratas hembra y macho se ha encontrado que el aluminio provoca alteraciones en la producción de hormonas sexuales, como estrógenos y testosterona, las cuales están directamente involucradas con el proceso de diferenciación sexual, así como con la fertilidad y/o con la capacidad reproductiva de estos animales de experimentación (Bellés y col., 2001; Hirata-Koizumi y col., 2011; Wang y col., 2012). De esta forma, se le ha asociado con alteraciones en la reproducción en ratas, observando daño testicular, azoospermia e infertilidad en ratas macho (Wang y col., 2012).

## Aluminio y Cáncer de Mama

El cáncer, en lo general, se considera una enfermedad en sí misma y al mismo tiempo se le considera un conjunto de enfermedades, aunque también se debe considerar que es la etapa final de un proceso microevolutivo en el que interviene la selección natural de células que están en constante división, y que por lo tanto, deben tener mecanismos precisos que permitan la regulación de sus ciclos celulares, en coordinación con los procesos de proliferación y muerte celular (Alberts y col., 2004; Oliva y col., 2008; Read y Donnai, 2009).

Las células que han sido transformadas en carcinogénicas, no han respondido a los mecanismos de control genético del ciclo celular, sino que han evadido al sistema inmunológico, logrando aumentar su tasa de proliferación celular. Estas células han evitado la muerte celular por apoptosis, convirtiéndose en células inmortales *in situ* y, que posteriormente han logrado desarrollar estrategias para invadir tejidos vecinos y distantes, de tal manera y en un grado que, invariablemente podrán provocar la muerte del organismo en donde se desarrollan. Sin embargo, al mismo tiempo niegan el proceso de selección natural, ya que lograron proliferar con mayor velocidad que sus células vecinas, pero se convierten en células finales al no poder mantener con vida al organismo en el que se reproducen y niegan su capacidad de perpetuarse mediante los mecanismos de reproducción celular natural (Sudbery, 2004; Novo, 2006).

La génesis del cáncer está asociada a factores físicos, químicos y biológicos. Independientemente del factor antes señalado, todos ellos impactan y alteran el funcionamiento de grupos de genes relacionados con los mecanismos de control y regulación del ciclo celular y/o de genes que controlan los mecanismos de reparación de daños al ácido desoxirribonucleótido (ADN). Entre estos grupos de genes se encuentran los protooncogenes y los genes supresores

de tumor (Klug y Cummings, 1999; Guízar-Vázquez, 2001; Lodish y col., 2005; Strachan y Read, 2006).

## **Etiología del Cáncer de Mama: Agentes Carcinógenos**

### **Agentes Carcinógenos Químicos**

A pesar de que la radiación ionizante, las infecciones virales y los determinantes genéticos juegan un papel importante en la etiología del cáncer, actualmente se conoce que la mayor incidencia de cáncer es provocada por efecto del ambiente (Marquardt, 1999). La correlación entre el cáncer y los carcinógenos químicos es conocida desde largo tiempo. La primera referencia histórica de la carcinogénesis química la constituyen las observaciones clínicas de Percival Pott en 1775, quien atribuyó correctamente el cáncer de piel escrotal de los deshollinadores, a la exposición crónica al hollín. Hubo que esperar 140 años para obtener la primera prueba experimental de la carcinogénesis química. En 1915, Yamagiwa e Ichikawa comunicaron la aparición de tumores cutáneos en la oreja del ratón mediante aplicaciones reiteradas de alquitrán. Desde entonces, se han identificado una gran variedad de compuestos químicos carcinógenos. Actualmente la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) tiene catalogadas 107 sustancias químicas como carcinógenos humanos (IARC, 2017). Basándose en la actividad química y biológica, los carcinógenos químicos son clasificados en diferentes grupos (Marquardt, 1999; IARC, 2017):

### **Carcinógenos Completos**

Sustancias que inducen el proceso completo de la carcinogénesis cuando son dados en dosis suficientes (inductores y promotores).



### **Carcinógenos Incompletos**

Sustancias que sólo producen una de las etapas de la carcinogénesis química (inductores o promotores).

### **Carcinógenos de Acción Directa**

Sustancias que no requieren conversión metabólica para desarrollar su acción. Los carcinógenos de acción directa son lo suficientemente reactivos inherentemente para unirse de forma covalente a macromoléculas celulares. Algunos de ellos son fármacos quimioterápicos (como ciclofosfamida, cisplatino, bisulfano), otros como metilnitrosourea (MNU), que son agentes alquilantes que transfieren grupos alquilo (metilo, etilo, entre otros) a macromoléculas como las guaninas del ADN.

### **Carcinógenos de Acción Indirecta**

Sustancias que requieren la conversión metabólica a un compuesto final, más activo. Entre éstos se pueden mencionar los siguientes:

Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Carcinógenos químicos indirectos más potentes, se encuentran principalmente en combustibles fósiles. Entre ellos se encuentran compuestos como el benzo[a]pireno, el 3-metilcolantreno y el dimetilbenzantraceno. Estos compuestos tienen un amplio espectro de órganos diana y pueden causar cáncer en el lugar de su aplicación. Los hidrocarburos policíclicos son metabolizados, por oxidasas de acción mixta dependientes del citocromo P450, a epóxidos electrófilos que, a su vez, reaccionan con proteínas y ácidos nucleicos (Marquardt, 1999, IARC, 2017).

Aminas aromáticas y colorantes azoicos: Estas sustancias son otra clase de carcinógenos de acción indirecta. A diferencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, no suelen ser carcinógenos en el punto de aplicación. No obstante,

suelen producir tumores vesicales y hepáticos, respectivamente, cuando los ingieren animales de experimentación. Un agente implicado en los cánceres humanos fue la  $\beta$ -naftilamina, que tras su ingesta se detoxifica por conjugación con el ácido glucurónico. Cuando se excreta por la orina, el conjugado no tóxico se escinde (descompone) por la enzima urinaria glucoronidasa para liberar otra vez el reactivo electrófilo, induciendo así el cáncer de vejiga. Antes de identificar su carcinogenicidad, la  $\beta$ -naftilamina fue responsable de una incidencia 50 veces aumentada de cáncer de vejiga en los trabajadores expuestos a los colorantes de anilina e industrias del caucho (Talaska, 2003). Los colorantes aminoazoicos también son carcinógenos. En un tiempo se utilizó el dimetilaminoazobenceno para dar color a la margarina, para que se pareciera a la mantequilla.

Nitrosaminas/nitrosamidas: Las nitrosaminas han demostrado ser carcinógenos poderosos en animales. La dimetilnitrosamina produce tumores renales y hepáticos en los roedores (Magee, 1956). Son también potentes carcinógenos en los primates, aunque no existen datos fehacientes de inducción de cáncer en seres humanos. No obstante, la enormemente elevada incidencia de cáncer en la provincia china de Hunan (100 veces superior a la de otras zonas) se ha relacionado con el elevado contenido en nitrosaminas en la dieta. También preocupa que las nitrosamidas estén implicadas en la génesis de otros cánceres gastrointestinales, ya que los nitritos añadidos habitualmente para conservar carnes elaboradas y otros alimentos, son metabolizados por la flora endógena formando nitrosaminas y nitrosamidas. La preocupación sobre estos agentes ha dado lugar al rechazo de los alimentos procesados que contengan nitratos (Antón, 2001).

### **Etiología del Cáncer de Mama: Metales**

Es bien sabido que los metales (pesados y traza) están relacionados con cáncer de mama (Geraki y col., 2002; Wen y col., 2002; Al-Ebraheem y col., 2009; Silva

y col., 2012), ya sea porque el mismo cáncer provoca disminución en los niveles corporales de algunos metales traza o porque los mismos metales provocan o están asociados con la génesis del cáncer (Greger y col., 1985; Darbre, 2005c).

Por otro lado, en relación a la toxicidad provocada por metales, recientemente se ha encontrado que muchos de ellos provocan alteraciones genotóxicas y a su vez, esto se puede relacionar con inestabilidad morfológica, cromosómica o genómica, que puede ser el preludio de mutaciones que se asocian directamente con diferentes tipos de cáncer en humanos y animales de experimentación (Diwan y col., 1997). Entre estos metales se encuentra el arsénico el cual está asociado a la inestabilidad genómica y cáncer de pulmón (Hubax y col., 2013). Deficiencias de manganeso en el metabolismo causa desregulación mitótica asociada a inestabilidad genómica en humanos (García-Rodríguez y col., 2012). Por otro lado, el hierro también está asociado con la generación de inestabilidad genómica y cáncer de hígado, pulmón e intestino en ratas de experimentación (Diwan y col., 1997); en el caso de cobre se ha demostrado que se asocia a inestabilidad genómica en ratas y esto está relacionado a cáncer de mama (Bobrowska y col., 2011). El cadmio está relacionado con cáncer de mama en mujeres en todo el mundo (Rahim y col., 2013).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño Experimental**

Es una investigación básica de tipo experimental con variables controladas por diseño. Este proyecto de investigación fue turnado al Comité de Bioética de la Universidad de Sonora y ha sido avalado por dicha instancia. Este procedimiento es importante obtener ya que se trabajó con ratas como animales de experimentación y existe una obligatoriedad por parte de los comités de bioética nacional e internacional sobre el manejo, confinamiento, obtención de muestras y/o sacrificio de dichos animales (NOM-033-ZOO-1995; NOM-062-ZOO-1999).

#### **Animales de Experimentación**

Ratas Sprague Dawley hembras divididas en seis grupos de 8 ratas cada grupo con peso entre 180 y 230 g, que representan a los grupo control y a los grupos con los tratamientos experimentales. La selección del sexo (hembras) es porque se pretendió evaluar la inestabilidad genómica y su relación con cáncer de mama.

#### **Tratamientos Experimentales**

Grupos de ocho ratas fueron asignadas completamente al azar a cada uno de los siguientes tratamientos experimentales:

- 1) Tratamiento A, ratas no expuestas a aluminio y sin inducción de cáncer de mama (control negativo, -Al/-MNU).
- 2) Tratamiento B, ratas expuestas oralmente a aluminio (en su forma de  $\text{AlCl}_3$ ) a 500 mg/L (2.5 mg Al/Kg de peso corporal) e inducidas a cáncer de mama con MNU (+500Al/+MNU).

- 3) Tratamiento C, ratas expuestas oralmente a aluminio (en su forma de  $\text{AlCl}_3$ ) a 1000 mg/L (5 mg de Al/Kg de peso corporal) e inducidas a cáncer de mama con MNU (+1000Al/+MNU).
- 4) Tratamiento D, ratas expuestas oralmente a aluminio (en su forma de  $\text{AlCl}_3$ ) a 2000 mg/L (10 mg de Al/Kg de peso corporal) e inducidas a cáncer de mama con MNU (+2000Al/+MNU).
- 5) Tratamiento E, ratas expuestas oralmente a aluminio (en su forma de  $\text{AlCl}_3$ ) a 2000 mg/L (10 mg de Al/Kg de peso corporal) y sin inducción de cáncer de mama (+2000Al/-MNU).
- 6) Tratamiento F, ratas no expuestas a aluminio y con inducción de cáncer de mama con MNU (control positivo, -Al/+MNU).

NOTA: las ratas sin aluminio y sin inductor de cáncer de mama (MNU) fueron tratadas con solución salina fisiológica al 0.98 % para igualar las condiciones de manejo experimental de las ratas. A las ratas se les administró 1 mL de solución de  $\text{AlCl}_3$ , a las concentraciones antes especificadas, por cinco días a la semana durante 90 días (12 semanas). (Balasubramanyam y col., 2009; Hirata-Koizumi y col., 2011). La solución de aluminio y la solución salina fisiológica fueron administradas por vía intragástrica por medio de sonda o cánula de acero inoxidable (Figura 1).

### **Inducción de Cáncer de Mama en Ratas**

Las ratas fueron tratadas con dosis de 50 mg/Kg de peso corporal con MNU (N-metil-N-nitrosourea, N1517-1G Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aplicado a los 50 y 70 días de edad, para inducir cáncer de mama (Murad y von Haam, 1972; Bobrowska-Korczak y col., 2012). El MNU fue administrado por vía intraperitoneal (Figura 2).



**Figura 1.** Administración de tratamientos experimentales por vía intragástrica.



**Figura 2.** Inducción de cáncer de mama con MNU por vía intraperitoneal.

### **Condiciones de Manejo de Bioterio**

Ciclos de luz/oscuridad de 12 hr cada uno, humedad entre 40 y 70 %, temperatura entre 18 y 22 °C, agua y alimentos *ad libitum* (Casado y col., 1987). En la figura 3 se aprecia las jaulas individuales y el rack en el que están confinadas las ratas, bajo las condiciones de bioterio antes mencionadas.

### **Dieta**

Dieta basal de alimento tipo pellets que contiene 23 % de proteína, 1 % de vitaminas, 4 % de minerales, 4 % de fibra, 6.5 % de grasa, 0.2 % de bitartrato de colina, 0.2 % de metionina, otros componentes menores de la dieta y almidón hasta completar el 100 %. Humedad máxima 12 %. Este alimento es producido por LabDiet de Estados Unidos de Norteamérica y comercializado por PetFood de México (Wang y col., 2013).

### **Evaluación Dietaria**

Durante la experimentación se evaluaron los siguientes parámetros: consumo diario de alimento (CDA), ganancia en peso semanal (GPS), conversión alimenticia (CA) y eficiencia alimenticia (EF). El alimento y las ratas se pesaron dos veces por semana en balanza granataria y con los valores obtenidos se realizó la evaluación dietaria (Wang y col., 2013).





**Figura 3.** Jaulas de confinamiento de las ratas Sprague Dawley.

## **Colecta de las Muestras (Sangre y Tejido Mamario)**

### **Muestras Sanguíneas**

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por corte de cola para la evaluación de genotoxicidad mediante análisis de micronúcleos (MN) y por punción intracardiaca (figura 4) para evaluación de genotoxicidad mediante análisis de electroforesis alcalina en células individuales (ensayo cometa), de ratas anestesiadas en cámara de halotano y eutanizadas por dislocación cervical, de acuerdo a las normas NOM-033-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999, y para evitar el sufrimiento animal.

### **Muestras de Tejido Mamario**

Estas muestras fueron obtenidas mediante cortes quirúrgicos de glándulas mamarias. A estas muestras se les cuantificó la concentración de aluminio y para la evaluación histopatológica (Figura 5) y extracción de RNA total para evaluar expresión genética de los genes BRCA1 y SCL11a2. Las muestras que se utilizaron para evaluación histopatológica se colocaron en recipientes de plástico con formol al 20 %, previo a ser embebidas en bloques de parafina (Figura 7).



**Figura 4.** Obtención de sangre de ratas por punción intracardiaca.



**Figura 5.** Cortes quirúrgicos de tejido mamario de ratas Sprague Dawley.

## **Optimización de las Condiciones Analíticas Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante Espectroscopía de Absorción Atómica**

Previo a la cuantificación de la concentración aluminio, mediante espectroscopía de absorción atómica por flama y horno de grafito, en glándulas mamarias de ratas Sprague Dawley de los seis tratamientos experimentales, se procedió a optimizar las condiciones analíticas. Posteriormente, se llevó a cabo la validación del método analítico e inmediatamente después se realizó la estimación de la incertidumbre expandida. Todo esto se realizó con la finalidad de darle certeza y confiabilidad a los datos obtenidos en el proceso de cuantificación de la concentración de aluminio en tejido mamario y en cumplimiento a lo establecido por la Entidad Mexicana de Acreditación (2009) y por lo dispuesto en la ISO/IEC 17025:2005.

### **Preparación del Material de Laboratorio**

El material fue sometido a un estricto control para evitar la contaminación por metales traza, siguiendo la metodología recomendada por la Norma Mexicana NMX-AA-115-SCFI-2001. Los materiales de trabajo de vidrio (pipetas serológicas y volumétricas, matraces volumétricos Pyrex, entre otros) se lavaron exhaustivamente con detergente líquido comercial para después ser sumergidos en una solución de HNO<sub>3</sub> al 20 % (grado analítico 70 % ACS marca Fermont) durante tres días y posteriormente, enjuagados abundantemente con agua deionizada. Una vez secado, el material se guardó en recipientes de plástico con tapa hermética hasta su uso.

### **Calibración de Balanza Analítica, Material Volumétrico y Micropipetas**

La balanza analítica marca Vibra modelo AF-R220E 220/0.0001 g (Max/d) fue calibrada utilizando un set de masas patrón de laboratorio (0.2, 0.5, 1.0 y 100 g)

marca Rice Like, certificadas por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). Para ello, se realizaron 10 réplicas de cada una de las masas patrón y esto se realizó por triplicado (Ruiz-Morer, 2006). Las micropipetas (0.5 y 1.0 mL, marca High Tech Lab), las pipetas volumétricas (2.0, 5.0 mL Pyrex, clase A) y los matraces volumétricos o de aforación (100 mL Pyrex, tipo A) fueron calibradas por el método gravimétrico, para lo cual se utilizó la balanza analítica calibrada anteriormente. Se realizaron 10 réplicas de cada una de ellas y esto se realizó por triplicado.

### **Calibración del Equipo de Absorción Atómica (EAA)**

Para la cuantificación de Al se utilizó un equipo de Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), Perkin-Elmer Modelo AAnalyst 400 (Figura 6), bajo las condiciones de operación recomendadas por el proveedor (Perkin-Elmer 2012).

### **Evaluación de Parámetros Analíticos en Condiciones Ideales Mediante EAA por Flama (EAAF)**

Los parámetros analíticos de calidad considerados son los siguientes (CENAM-EMA AC, 2008):

**Linealidad.** Se estimó a través de curvas de calibración a partir de un estándar de Al ( $\text{AlCl}_3$ ) de 1000 mg/L (AccuTrace Reference Standard). Las concentraciones de trabajo fueron de 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L de Al. Para ello se prepararon las disoluciones de trabajo, por lo que se tomó 1, 2, 5, 10 y 20 mL del estándar de Al de 1000 mg/L y se colocaron en matraces volumétricos de 100 mL cada uno, se les agregó 2 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado y 10 mL de KCl al 2 %. Posteriormente se aforó a 100 mL con agua deionizada. Todo esto se realizó por triplicado.



**Figura 6.** Equipo de espectroscopia de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 400.

Se determinó la concentración de Al en el equipo de EAA y se obtuvo la curva de calibración (Concentración contra absorbancia) y se estimó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). El criterio de aceptación fue de  $r \geq 0.995$  (CEMAM-EMA AC 2009). El coeficiente de correlación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$r = \frac{[a \sum y + b \sum xy - n(\hat{Y})^2]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2} \quad (1)$$

Donde:

$$\hat{Y} = \frac{\sum y}{n} \quad (2)$$

**Exactitud.** Se estimó mediante el porcentaje de recuperación (% Rec) para lo cual se prepararon soluciones a concentraciones de 20, 50 y 100 mg/L de Al, a partir de una solución madre de 1000 mg/L, con 5 réplicas y cada una por triplicado. Estas tres concentraciones representaron los puntos intermedios de la curva de calibración. Las disoluciones se prepararon de la misma manera en que se explicó en la sección previa. El porcentaje de recuperación se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rec} = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (3)$$

El criterio de aceptación es % Rec =  $100 \pm 15$  (rango: 85-115) (IUPAC 1999)

**Precisión.** Se determinó mediante el porcentaje del coeficiente de variación (% CV), para ello se prepararon soluciones de aluminio de 20, 50 y 100



mg/L, a partir de una solución stock de 1000 mg/L de Al, con 5 réplicas y cada una por triplicado. El % CV se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% CV = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{promedio}} \times 100 \quad (4)$$

El criterio de aceptación es  $\% CV \leq 2 \%$  para métodos instrumentales (Miller y Miller, 2002).

### **Exactitud y Precisión a Partir de un Material de Referencia Certificado (MRC)**

Para evaluar de manera más estricta las condiciones de optimización del método analítico se determinó la exactitud y la precisión a partir de una solución acuosa certificada (CRM-S-B, High-Purity Standards, Charleston, SC, US) que contiene  $700 \pm 4$  mg/L de Al y pureza de 99.96 a 99.99 %, realizando 5 réplicas y cada una por triplicado. La exactitud se determinó mediante el % Rec y la precisión a través del % CV, tal y como se describió anteriormente.

### **Validación del Método Analítico Para Cuantificar Aluminio en Ratas Sprague Dawley Mediante Espectroscopía de Absorción Atómica por Flama y Horno de Grafito**

#### **Equipo**

Se utilizó un equipo de espectroscopía de absorción atómica Perkin Elmer modelo AAnalyst 400, equipado con un horno de grafito Perkin Elmer modelo HG 900 con automuestreador AS 800. Se utilizó lámpara mono-elemento de aluminio, sistema de corrección de fondo y tubos de grafito integrados con plataforma Lvov (Perkin Elmer, 2012). Adicionalmente, se cuantificó Al por espectroscopía de absorción atómica por flama de óxido nitroso-acetileno. Las condiciones de operación se indican en la tabla I. Para la descomposición de las

**Tabla I.** Condiciones de operación del equipo Perkin Elmer, modelo AAnalyst 400.

<b>HORNO DE GRAFITO HG-900</b>	<b>PARÁMETROS</b>
Longitud de onda ( $\lambda$ )	309.3 nm
Gas de Purga	Argón
<b>Rampas:</b>	
<b>Secado</b>	150 °C
<b>Pirólisis</b>	1700 °C
<b>Atomización</b>	2400 °C
<b>Limpieza</b>	2600 °C
<b>Eliminación de interferencias</b>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.2 %
<b>FLAMA</b>	<b>PARÁMETROS</b>
Longitud de onda ( $\lambda$ )	309.3 nm
Lámpara	Cátodo hueco de Al
Oxidante – comburente	Óxido nitroso - acetileno
Ancho de rendija	0.7 mm
<b>Eliminación de interferencias</b>	KCl 0.2 %

Perkin Elmer, 2012.

muestras de tejidos de animales, se utilizó un equipo de horno de microondas MARSxpress 5 (CEM Corporation. Mathews, NC, USA), el cual se puede apreciar en la figura 7.

### **Reactivos, Estándares y Material de Referencia Certificado**

Los reactivos  $Mg(NO_3)_2$ ,  $HNO_3$  concentrado, KCl, fueron obtenidos de J.T. Baker. Se utilizó un estándar de aluminio de  $1000.0 \pm 2.0$  mg/L (AccuStandard, New Haven, CT, US), un material de referencia certificado (CRM-S-B) que contiene  $700 \pm 4.0$  mg/L de Al (High-Purity Standard, Charleston, SC, USA) y un material de referencia certificado de tejido de ostión (NIST 1566b, Gaithersburg, MD, US) que contiene  $197.2 \pm 6.0$  mg/kg de Al. Esto se hizo en sustitución de tejido de ratas ya que, actualmente, no existe un material de referencia certificado de tejido mamario de ratas.

### **Validación del Método Analítico**

Los parámetros analíticos de calidad que se han considerado para la validación del método, recomendados por la Entidad Mexicana de Acreditación, por el Centro Nacional de Metrología, por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y por la ISO/IEC 170125:2005, son los siguientes:

**Linealidad.** Se realizó a través de curvas de calibración y estimación del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la pendiente ( $m$ ). Para ello, se prepararon tres curvas de calibración a partir de un estándar de Al de alta pureza (Accustandard) que contiene 1000.0 mg/L de Al. Las concentraciones de trabajo fueron: 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 y 200.0 mg/L de Al, las cuales se acondicionaron con  $HNO_3$  al 2.0 % y KCl 0.2 % para su cuantificación con una flama de óxido nitroso-acetileno.



**Figura 7.** Horno de microondas MARSxpress 5 CEM.

Adicionalmente se prepararon tres curvas de calibración a concentraciones de 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 y 80.0  $\mu\text{g/L}$  de Al, se acondicionaron con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y con  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0.2 % para su cuantificación por la técnica de horno de grafito.

**Exactitud y Precisión.** Se determinaron a través del porcentaje de recuperación (% Rec), y con el porcentaje de coeficiente de variación (% CV), respectivamente. Para ello, se utilizó un material de referencia certificado (CRM-S-B) que contiene  $700.0 \pm 4$  mg/L de Al, a partir del cual se preparó un estándar de trabajo de 70 mg/L de Al el cual se acondicionó con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y KCl 0.2 % para flama. Para horno de grafito, el estándar de trabajo se preparó a 70  $\mu\text{g/L}$  de Al acondicionado con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0.2 %.

**Repetibilidad.** Se realizó mediante un análisis de varianza, utilizando el estadístico de prueba F con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ) y  $n = 25$ . Es importante señalar que esto fue realizado por el mismo analista, en el mismo equipo de laboratorio, bajo las mismas condiciones experimentales y en tiempos cortos (CENAM-EMA, 2009). Para esto, se prepararon estándares de trabajo por quintuplicado por semana durante un tiempo total de cinco semanas a concentraciones de 20.0, 50.0 y 100.0 mg/L de Al, los cuales se acondicionaron con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y KCl 0.2 % para EAA por flama. Para EAA por horno de grafito, se utilizaron estándares de trabajo a concentraciones por triplicado de 20.0, 40.0 y 60.0  $\mu\text{g/L}$  de Al, que se acondicionaron con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0.2 %. El criterio de aceptación de la repetibilidad es de que  $F_{\text{calculada}} \leq F_{\text{tablas}}$  (Blair y Taylor, 2007).

**Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).** Se obtuvieron a partir de los datos de las curvas de calibración para EAA por flama y para EAA por horno de grafito. El LD se calculó a partir de  $3 s/m$ , dónde  $s$  es la desviación estándar de 10 mediciones del blanco y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración (NTC-ISO/IEC-17025:2005; Blair y Taylor, 2007). El LC fue

calculado como 10 s/m. El blanco para flama fue una solución de HNO<sub>3</sub> al 2 % y con KCl 0.2 %, en tanto que el blanco para horno de grafito fue una solución de HNO<sub>3</sub> al 2 % y Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.2 % (NTC-ISO/IEC-17025:2005; Blair y Taylor, 2007).

El proceso de validación del método analítico se completó mediante la utilización de un material de referencia certificado de tejido de ostión (NIST 1566b) que contiene  $197.2 \pm 6.0$  mg de Al/kg de tejido y que reemplaza al tejido de rata, ya que no existe este tipo de tejido de referencia certificado. En esta etapa se evaluó la exactitud a través del porcentaje de recuperación (% Rec) y la precisión a través del porcentaje del coeficiente de variación (% CV).

### **Aplicabilidad del Método Validado**

El método analítico validado se empleó para cuantificar la concentración de Al en tejidos de ratas sin fortificar y fortificados con 100 mg/L de Al para EAA por flama y con 200 µg/L de Al para EAA por horno de grafito.

### **Descomposición de las Muestras de Tejidos de Ratas Sprague-Dawley Fortificadas con Aluminio, Controles y del Material de Referencia Certificado (NIST 1566b).**

Los tejidos de rata, alimento, agua de beber y el material de referencia certificado (Oyster tissue, NIST 1566b) se digirieron en un equipo de horno de microondas MARSxpress 5 (CEM Corporation, Mathews, NC, USA). La concentración de aluminio se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica por flama, para ello se pesaron por triplicado, en tubos de teflón de 20 x 4 cm,  $0.50 \pm 0.05$  g de mama, hígado, hueso y cerebro, así como alimento, agua de beber y tejido de ostión como controles. A estas muestras se les agregaron 10 mL de estándar de Al de 1000 mg/L (Accustandard) y se digirieron con 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado con un programa de digestión de 200 °C/35 bar/1600 watts/15'. El extracto ácido resultante se aforó a 100 mL con agua deionizada.

En tanto que para EAA por horno de grafito se pesaron  $0.25 \pm 0.02$  g de tejido de rata, así como alimento y agua de beber. A estas muestras se les agregó 1 mL de estándar de Al de 10 mg/L y se digirieron con 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado en horno de microondas MARSxpress 5, bajo las mismas condiciones de digestión antes señaladas. El residuo ácido resultante se aforó a 50 mL con agua deionizada. La concentración de aluminio se cuantificó mediante EAA por flama y horno de grafito. Para flama se utilizó KCl al 0.2 % para eliminar la interferencia de ionización y, para horno de grafito, se utilizó  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0.2 % como modificador químico. En esta etapa se evaluó la exactitud a través del porcentaje de recuperación (% Rec) y la precisión a través del porcentaje del coeficiente de variación (% CV). Adicionalmente, se prepararon tres réplicas de blancos de digestión con agua deionizada digeridas en horno de microondas bajo las mismas condiciones de operación que las muestras y los controles, acondicionadas con  $\text{HNO}_3$  2.0 % y KCl 0.2 % para EAA por flama, en tanto que para EAA por horno de grafito se acondicionaron con  $\text{HNO}_3$  al 2.0 % y  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  al 0.2 % (Perkin Elmer, 2012).

### **Estimación de la Incertidumbre Expandida de un Método Analítico para Cuantificar Aluminio en Tejidos de Ratas Sprague Dawley Mediante EAAF y EAAHG**

La estimación de la incertidumbre expandida se determinó a partir del método analítico previamente validado que se utilizó para cuantificar Al en tejido de ratas Sprague Dawley mediante EAAF y EAAHG. Para ello se determinó la linealidad de ambos métodos mediante un estándar de alta pureza que contiene  $1000 \pm 2$  mg/L de Al. Las curvas de calibración se realizaron utilizando las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L de Al para EAAF en tanto que para EAAHG las concentraciones empleadas fueron: 10, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g/L}$  de Al. La exactitud y la precisión se evaluaron mediante un material de referencia

certificado CRM-S-B con  $700 \pm 4$  mg/L de Al. La precisión bajo condiciones de repetibilidad se determinó mediante un estándar de alta pureza de  $1000 \pm 2$  mg/L de Al, y para ello se emplearon las siguientes concentraciones: 20, 50 y 100 mg/L de Al para EAAF en tanto que para EAAHG las concentraciones fueron de 20, 40 y 60  $\mu\text{g/L}$  de Al. Finalmente, la validación del método se completó con un material de referencia certificado NIST 1566b que contiene  $197.2 \pm 6$  mg/L de Al.

### **Fuentes de Incertidumbre**

Se establecieron las fuentes de incertidumbre mediante el diagrama de Ishikawa (Figura 8) (Meyer, 2003). Entre ellas se encuentra la concentración del Al a partir de la curva de calibración, el material volumétrico empleado, los factores de dilución, la repetibilidad, pureza del estándar de Al y la concentración de Al a partir de los materiales de referencia certificados utilizados. La metodología utilizada en este trabajo para realizar la estimación de la incertidumbre expandida siguió el procedimiento recomendado por la guía de Eurachem-Citac (2012) y lo que establece la ISO/IEC 17025:2005.

### **Estimación de la Incertidumbre Estándar en las Mediciones**

Para la medición de la concentración de masa del elemento químico (Al) se estableció el siguiente modelo matemático:

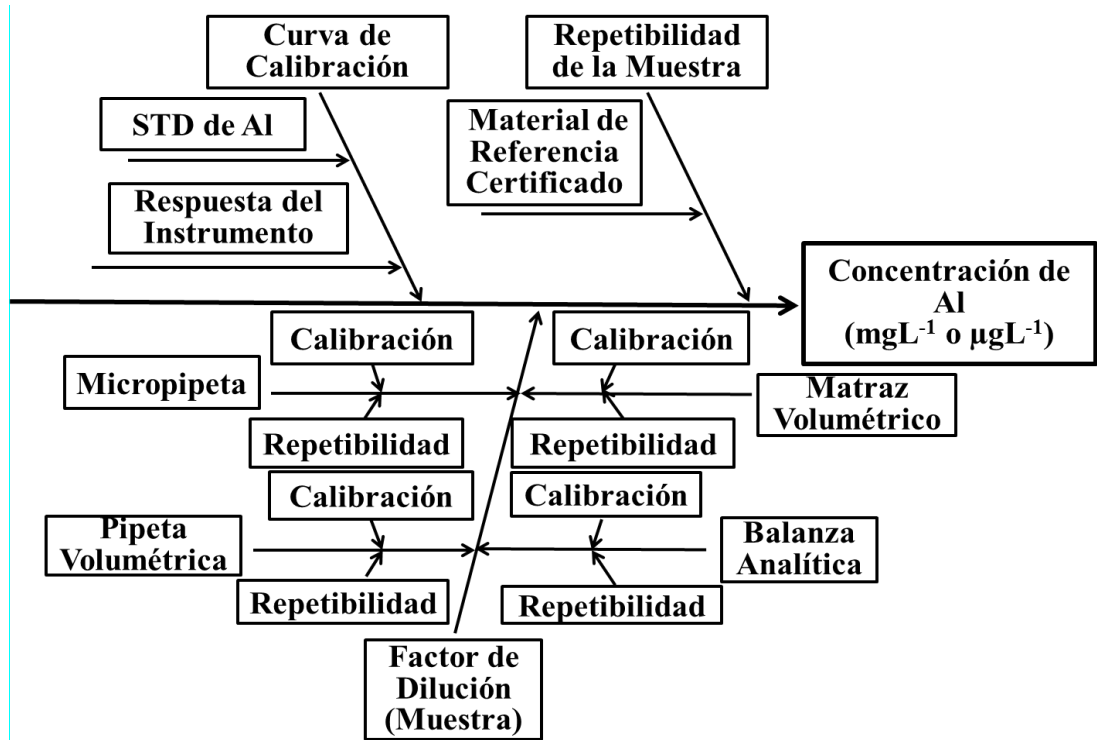
$$\gamma_{x(i)} = \gamma_{(x-B)} * f d_n * f * f_c \quad (5)$$

Donde:

$\gamma_{x(i)}$  = Concentración de masa del mensurando obtenida por un método de medición.

$\gamma_{(x-B)}$  = Concentración de masa obtenida a través de la curva de calibración.





**Figura 8.** Diagrama de Ishikawa (causa-efecto) en el que se involucran las fuentes de incertidumbre de este estudio.

$fd_n$  = Factor de dilución aplicado a la muestra.

$f_c$  = Factor de corrección cuando el método lo indique.

### **Incertidumbre de la Concentración de Masa del Elemento Medido en el Instrumento a Través de la Curva de Calibración**

La incertidumbre estándar de la concentración de masa de Al mediante la respuesta del instrumento se calculó con la siguiente ecuación:

$$u_{\gamma_x} = \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{\rho} + \frac{1}{n} + \frac{(\gamma_{(x)i} - \bar{\gamma}_{MR})^2}{S_{xx}}} \quad (6)$$

Donde:

$u_{\gamma_x}$  = incertidumbre del mensurando (Al) obtenida por el instrumento calibrado.

$s$  = desviación estándar residual del cálculo de regresión.

$b_1$  = pendiente calculada.

$\rho$  = número de réplicas de la muestra en estudio.

$n$  = número de disoluciones ( $i$ ) empleados en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas ( $j$ ) de cada disolución (total de datos) ( $i^*j$ ).

$\gamma_x$  = concentración de Al en estudio (mg/Lo  $\mu\text{gL}^{-1}$ ).

$\bar{\gamma}_{MR}$  = promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la curva de calibración.

$S_{xx}$  = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

Por otro lado, la incertidumbre estándar relativa para la concentración de Al obtenida a partir de la curva de calibración, se determinó con la siguiente ecuación:

$$u_{r\gamma_x} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_x}}{\gamma_x}\right)^2} \quad (7)$$

### **Incertidumbre del Material Volumétrico**

En cuanto a la estimación de la incertidumbre de la medición del volumen de la alícuota ( $V_1$ ) y aforo ( $V_2$ ) en cualquier material volumétrico, se tienen tres principales fuentes de incertidumbre:

1.-) La tolerancia del material volumétrico:

$$u_{tol} = \frac{tol}{\sqrt{6}} \quad (8)$$

2.-) El efecto de la variabilidad o repetibilidad del volumen medido por el analista:

$$u_R = \frac{s_V}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

3.-) El efecto de la variación de la temperatura en relación a la temperatura de calibración:

$$u_{\Delta T} = \frac{[(T-T_{20}) \cdot \alpha \cdot V]}{\sqrt{3}} \quad (10)$$

Donde:

T = Temperatura del agua (°C) al momento de la medición

T<sub>20</sub> = Temperatura de calibración del material volumétrico: 20°C

α = Coeficiente de expansión del volumen de agua °C<sup>-1</sup>

V = Volumen de la pipeta o matraz

Estas tres incertidumbres se combinaron y se calculó su valor mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{u_{V_n}}{V_n} = \sqrt{\left(\frac{u_{tol}}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{\Delta T}}{V_n}\right)^2} \quad (11)$$

### **Incertidumbre del Factor de Dilución**

Siguiendo la Guía de Eurachem-Citac (2012), a continuación se presenta el cálculo de la incertidumbre debida a los factores de dilución. Para obtener la curva de calibración de aluminio determinado por EAAF se realizó una dilución 10:100 a partir de un estándar de aluminio de 1000 mg/L (primera dilución), y a partir de este estándar de concentración intermedia se prepararon las cinco concentraciones empleadas para obtener la curva de calibración. Estas cinco concentraciones implican realizar cinco diluciones (1:100, 2:100, 5:100, 10:100 y 20:100) que generan factores de dilución (FD) de 100, 50, 20, 10 y 5, respectivamente. Para realizar la curva de calibración de aluminio determinado por EAAHG se realizó una dilución 1:100 seguida de otra dilución 1:100 (FD = 10000). Las diluciones restantes las realiza el software del equipo de manera automática, por lo que no es posible estimar las incertidumbres estándar ni relativa.

$$u_{fd_n} = \sqrt{(u_{V_1})^2 + (u_{V_2})^2} \quad (12)$$

El factor de dilución está dado por:

$$fd_n = \frac{V_2}{V_1} \quad (13)$$

Donde:

$fd_n$  = Factor de dilución n

$V_2$  = Volumen de aforo

$V_1$  = Volumen de alícuota

La incertidumbre del factor de dilución para EAAF se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{fd_n} = \sqrt{(u_{fd_{100}})^2 + (u_{fd_{50}})^2 + (u_{fd_{20}})^2 + (u_{fd_{10}})^2 + (u_{fd_5})^2} \quad (14)$$

En tanto que la incertidumbre del factor de dilución para EAAHG se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{fd_n} = \sqrt{(u_{fd_{10000}})^2} \quad (15)$$

### **Incertidumbre de la Repetibilidad (rep) de las Mediciones**

De acuerdo a la Guía de Incertidumbre (Eurachem.Citac, 2012), se debe de incluir la incertidumbre relacionada con la repetibilidad de las mediciones; la cual se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$u_{Y_{rep}} = \sqrt{\left(\frac{S_{Y_{rep1}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{S_{Y_{rep2}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{S_{Y_{rep3}}}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (16)$$

Es importante señalar que la precisión bajo condiciones de repetibilidad para Al se determinó para tres concentraciones diferentes: 20, 50 y 100 mg/L de Al (rep 1, rep 2 y rep 3) cuando se determinó su concentración por EAAF, en tanto que para EAAHG las concentraciones utilizadas fueron de 20, 40 y 60 µg/L (rep 1, rep 2 y rep 3). Para cada determinación el tamaño de muestra fue de 25 (n = 25), en tanto que s representa la desviación estándar.

Por otro lado, la incertidumbre estándar relativa para la repetibilidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$u_{r\gamma_{rep}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{rep1}}}{\gamma_{rep1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\gamma_{rep2}}}{\gamma_{rep2}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\gamma_{rep3}}}{\gamma_{rep3}}\right)^2} \quad (17)$$

### **Incertidumbre del Estándar de Aluminio**

El certificado del estándar de Al indica que su concentración es de  $1000 \pm 2$  mg/L de Al. El valor de  $\pm 2$  representa la incertidumbre expandida, razón por la cual se debe dividir la incertidumbre expandida ( $U$ ) entre el factor de cobertura ( $K = 2$ ) para obtener la incertidumbre estándar, como se indica en la siguiente ecuación:

$$u_{Std\ Al} = U_{expStd\ Al}/k \quad (18)$$

Una vez obtenida la incertidumbre estándar, esta se divide entre  $\sqrt{3}$ , ya que se asume una distribución rectangular, para así obtener la estimación de la incertidumbre final del estándar de Al, tal y como se señala en la siguiente ecuación:

$$u_{\gamma_{Std\ Al}} = \frac{u_{Std\ Al}}{\sqrt{3}} \quad (19)$$

En tanto que la incertidumbre estándar relativa para el estándar de Al se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{r\gamma_{Std\ Al}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{Std\ Al}}}{\gamma_{Std\ Al}}\right)^2} \quad (20)$$

### **Incertidumbre del Material de Referencia Certificado CRM-S-B**

El certificado del material de referencia certificado CRM-S-B indica que la concentración de Al es de  $700 \pm 4$  mg/L. El valor de  $\pm 4$  representa la incertidumbre expandida, razón por la cual se debe dividir la incertidumbre

expandida ( $U$ ) entre el factor de cobertura ( $K = 2$ ) para obtener la incertidumbre estándar, como se indica en la siguiente ecuación:

$$u_{CRM-S-B} = U_{exp}/k \quad (21)$$

Una vez obtenida la incertidumbre estándar, esta se divide entre  $\sqrt{3}$ , ya que se asume una distribución rectangular, para así obtener la estimación de la incertidumbre estándar real del material de referencia certificado CRM-S-B, tal y como se señala en la siguiente ecuación:

$$u_{\gamma CRM-S-B} = \frac{U_{exp}/k}{\sqrt{3}} \quad (22)$$

En tanto que la incertidumbre estándar relativa para el material de referencia certificado CRM-S-B, se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{r\gamma CRM-S-B} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma CRM-S-B}}{\gamma_{CRM-S-B}}\right)^2} \quad (23)$$

### **Incertidumbre del Material de Referencia Certificado NIST 1566b**

El certificado del material de referencia certificado NIST 1566b indica que la concentración de Al es de  $197.2 \pm 6$  mg/L. El valor de  $\pm 6$  representa la incertidumbre expandida, razón por la cual se debe dividir la incertidumbre expandida ( $U$ ) entre el factor de cobertura ( $K = 2$ ) para obtener la incertidumbre estándar, como se indica en la siguiente ecuación:

$$u_{NIST\ 1566b} = U_{exp}/k \quad (24)$$

Una vez obtenida la incertidumbre estándar, esta se divide entre  $\sqrt{3}$ , ya que se asume una distribución rectangular, para así obtener la estimación de la

incertidumbre estándar real del material de referencia certificado NIST 1566b, tal y como se señala en la siguiente ecuación:

$$u_{\gamma_{NIST\ 1566b}} = \frac{U_{exp}/k}{\sqrt{3}} \quad (25)$$

En tanto que la incertidumbre estándar relativa para el material de referencia certificado NIST1566b, se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{r\gamma_{NIST1566b}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\gamma_{NIST1566b}}}{\gamma_{NIST1566b}}\right)^2} \quad (26)$$

### **Incertidumbre Estándar Combinada (IEC)**

Se combinan en forma cuadrática las fuentes de incertidumbre consideradas para este estudio, mediante la siguiente ecuación:

$$u_{c\gamma_{Al}} = \sqrt{(u_{\gamma_{Al}})^2 + (u_{fd_n})^2 + (u_{Std\ Al})^2 + (u_{CRM-S-B})^2 + (u_{NIST1566b})^2 + (u_{\gamma_{rep}})^2} \quad (27)$$

### **Incertidumbre Estándar Relativa Combinada (IERC)**

Una vez obtenida la IEC, esta se divide entre la concentración de Al para obtener la incertidumbre estándar relativa combinada, para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$u_{rc\gamma_{Al}} = \sqrt{\left(\frac{u_{c\gamma_{Al}}}{c\gamma_{Al}}\right)^2} \quad (28)$$

Por otro lado, el porcentaje de la incertidumbre estándar relativa combinada se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\% u_{rc\gamma_{Al}} = \frac{u_{rc\gamma_{Al}}}{u_{\gamma_{Al}}} \times 100 \quad (29)$$



### **Incertidumbre Expandida (IE)**

La incertidumbre estándar combinada obtenida, se multiplica por un factor de cobertura  $\kappa = 2$  para obtener la incertidumbre expandida, cuyo valor es equivalente a un intervalo de confianza del 95 % (Eurachem-Citac, 2012; Valcan, 2013). Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$U_{expAl} = u_{c\gamma Al} * \kappa \quad (30)$$

### **Determinación de la Concentración de Aluminio en Tejido Mamario**

Posteriormente de que el método analítico para cuantificar aluminio mediante espectroscopía de absorción atómica fue optimizado, validado y estimada su incertidumbre expandida, se procedió a cuantificar la concentración de aluminio en tejido mamario de ratas Sprague Dawley expuestas a los tratamientos experimentales. Las muestras obtenidas fueron digeridas en horno de microondas TITAN MPS (Perkin Elmer, 2014) (Figura 9). Para ello se pesaron  $0.40 \pm 0.02$  g de tejido mamario y se colocaron en tubos de digestión de teflón de 15 x 2.5 cm que contienen 7 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Las condiciones de digestión fueron 200 °C, 35 barr, 1600 watts, durante 47 minutos (Bohrer y col., 2008). El residuo ácido resultante se aforó a 100 mL con agua deionizada para posteriormente cuantificar la concentración de aluminio. La determinación de la concentración de aluminio en estándar, material de referencia certificado y tejido mamario de las ratas, se realizó en un equipo de absorción atómica AAnalyst 400 en modalidad horno de grafito o electrotérmica (EAAHG o EAAET), bajo las condiciones de operación recomendadas por el proveedor (Neiva y col., 2002, Perkin Elmer, 2012). Previamente, el método analítico había sido optimizado, validado y estimado la incertidumbre expandida, para darle confiabilidad a la cuantificación aluminio en tejido mamario de ratas por EAAF y EAAHG.



**Figura 9.** Horno de microondas TITAN MPS (A). Residuo ácido de muestra de tejido mamario (B). Residuo ácido de muestra control (agua desionizada) (C).

## **Efecto del Aluminio en la Inestabilidad Genómica**

### **Químicos**

El reactivo N-metil-N-nitrosourea (MNU) N1517-1G lot # SLBF6813V, fue adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El reactivo de Trizol fue adquirido de Life Technologies. El reactivo QuantiTec Rev. Transcription kit es de la marca Qiagen (Cat. No. 205311). Los ensayos de expresión genética Taqman fueron obtenidas de Applied Biosystems (Cat. No. 4331182 y 4308313). El cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) utilizado, fue adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos los demás productos químicos utilizados son grado analítico.

### **Evaluación de la Inestabilidad Genómica**

**Evaluación Histopatológica.** La inestabilidad morfológica se evaluó mediante preparaciones de cortes histológicos de glándulas mamarias de ratas (Figura 10), montados en laminillas fijas, utilizando un micrótopo y el teñido de las preparaciones mediante la tinción con hematoxilina y eosina, que fueron observadas al microscopio óptico marca LEICA modelo DME a 40 y 100X (Esendagli y col., 2009).

**Análisis de Micronúcleos.** Para la evaluación de micronúcleos (MN) se utilizaron tres ratas Sprague Dawley hembras de  $200 \pm 20$  g de peso corporal por grupo (Tratamiento). La colecta de muestras de sangre periférica se realizó de acuerdo a lo establecido en la normatividad vigente (NOM-033-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999), a los 5, 10 y 15 días de los tratamientos experimentales.



**Figura 10.** Tejido mamario de ratas Sprague Dawley.

Para ello se recolectaron 0.5 mL de sangre periférica en tubos Ependorff de 1.5 mL de cada rata y se realizaron tres frotis (extensiones) en portaobjetos limpios. Los frotis fueron teñidos con colorante de Wright (Balasubramanyam y col., 2009) y posteriormente se procedió a contar el número de MN en 2000 eritrocitos (1 MN, 2 MN o más de 2 MN) (Balasubramanyam y col., 2009) en un microscopio compuesto de la marca LEICA modelo DME (Buffalo, NY, 14240 USA).

**Ensayo de Electroforesis Alcalina en Células Individuales (Ensayo Cometa).** Para corroborar la genotoxicidad, mediante análisis de micronúcleos, causada por aluminio en forma de  $AlCl_3$ , se realizó un ensayo cometa exploratorio, que permite observar y cuantificar el daño al DNA (Singh y col., 1991). Para ello, la viabilidad celular se evaluó con el colorante azul de tripan y conteo de células en cámara de Neubauer/hematocitómetro (García-Medina y col., 2011; Pereira y col., 2013). El ensayo cometa se realizó de acuerdo al método de Singh (Singh y col., 1991). Para ello se utilizaron tres ratas hembra Sprague Dawley de los tratamientos A (-Al/-NMU) y E (+2000Al/-NMU), las cuales fueron anestesiadas en cámara de halotano para extracción de 3 a 4 mL de sangre mediante punción intracardiaca y posteriormente eutanizadas por dislocación cervical. Un volumen de 30  $\mu$ L de sangre completa se agregó a 300  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % a 37 °C.

De esta mezcla se tomaron 75  $\mu$ L y fueron colocados sobre un portaobjetos pre-cubierto con una capa de 150  $\mu$ L de agarosa regular al 1% e inmediatamente fue cubierta con un cubreobjetos y mantenidas a 4 °C durante 10 minutos. Se retiró el cubreobjetos y se agregaron 75  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37 °C para formar otra capa y hacer una forma tipo sándwich que fue cubierta con un cubreobjetos y mantenidas a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, las células fueron lisadas en solución de lisis (2.5 mM de NaCl, KOH 1 %, 100 mM de EDTA, 10 mM de Trizma base, Tritón X-100 al 1 % y DMSO

al 10 %) durante 1 hora a 4 °C. Seguidamente, las muestras se colocaron en cámara de electroforesis oscura conteniendo buffer de corrida alcalino frío a pH > 13 (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, ajustando el pH > 13). Se dejaron reposar las muestras durante 20 minutos en frío. Las condiciones de la corrida electroforética fueron 25 mV, 300 mA, durante 20 minutos.

Después de la electroforesis se retiraron las laminillas y fueron lavadas tres veces con buffer de neutralización (0.4 mM de buffer Tris ajustado el pH a 7.5) durante 5 minutos por cada lavado. Finalmente, las laminillas fueron lavadas dos veces con alcohol etílico absoluto anhidro durante 5 minutos cada lavado. Se eliminó el exceso de alcohol y se dejaron secar. Se tiñeron las laminillas con 25 µL de bromuro de etidio (20 µg/mL en agua deionizada) y se cubrieron con cubreobjetos. Todas las etapas del ensayo cometa se llevaron a cabo bajo luz indirecta amarilla o en la oscuridad. Las observaciones de los cometas se hicieron con un microscopio de fluorescencia marca LEICA modelo DM2500 equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital enfriada con luz monocromática, marca LEICA modelo DFC450C de 5 megapíxeles, con adaptador C-mount. Las evaluaciones de los cometas se realizaron en el software CometScore de Tritex. El daño del ADN se reporta como momento de cola Olive (Olive y col., 1990).

**Ensayo de Expresión Genética Mediante RT-qPCR.** Para la extracción de RNA total se utilizó el método basado en la metodología propuesta por Chomczynski y Sacchi (1987). Para ello se pesaron  $0.050 \pm 0.008$  g de tejido mamario de las ratas, que se utilizó para la extracción de ARN total usando Trizol. Para homogenizar las muestras se utilizó el equipo PolyTron. Al RNA total obtenido se le estimó la pureza y la concentración mediante las lecturas de absorbancia a 260/280 nm en el equipo Nanodrop (Desjardins y Conklin, 2010).

La integridad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en condiciones desnaturalizantes y teñidos con bromuro de etidio al 1.5 % (Jacobs, 2007).

Con el RNA obtenido de cada muestra se realizó la reacción de transcripción inversa para obtener el ADNc, y para ello se utilizó el reactivo QuantiTect Reverse Transcription, bajo las condiciones de operación recomendadas por el proveedor (Qiagen, 2016 Cat. No. 205311). Una vez obtenido el ADNc se procedió a evaluar la expresión de los genes *BRCA1* (Fluoróforo FAM) y *SCL11a2* (Fluoróforo FAM) utilizando 30 ng totales de ADNc y ensayos de expresión genética Taqman (Applied Biosystems). Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en el equipo StepOne™ v2.3 (Figura 11). El gen de referencia fue *GAPDH* (Fluoróforo VIC). Las reacciones dúplex (*BRCA1/GAPDH* y *SCL11a2/GAPDH*) se realizaron bajo las condiciones recomendadas por el proveedor (Applied Biosystems, 2016).

### **Análisis Estadístico**

La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para verificar la normalidad de los datos de la evaluación dietaria y las concentraciones de aluminio en tejidos. Los datos de las variables que si cumplieron con los supuestos de normalidad, fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía por el procedimiento de modelos lineales generales (GLM ANOVA), donde el efecto principal fueron los tratamientos experimentales. En el caso de la variable del número de micronúcleos, sólo se utilizaron los conteos obtenidos para células con un micronúcleo, ya que no se presentaron registros para 2 o más MN.



**Figura 11.** Equipo para RT-qPCR marca StepOne (Applied Biosystem).



Los datos de micronúcleos y genotoxicidad fueron analizados mediante un análisis de varianza por modelos lineales (ANOVA-GLM) para un diseño de bloques completos al azar. El modelo incluyó los efectos fijos de los tratamientos y el tiempo de muestreo (Bloques). Cuando existieron diferencias entre las medias, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer (Blair y Taylor, 2007). Las significancias estadísticas fueron consideradas a una probabilidad en el error Tipo I de 0.05 ( $P < 0.05$ ). Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación Dietaria

La evaluación dietaria se realizó para determinar si los tratamientos experimentales o el manejo de los animales de experimentación afecta su comportamiento biológico. Esto se consideró prudente determinar ya que no se tenía la certeza de que las soluciones de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) administrado con sonda por vía intragástrica (Gavage) o la administración de MNU por vía intraperitoneal, podrían afectar este comportamiento biológico en las ratas Sprague Dawley. En la tabla II se puede apreciar que no existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre los tratamientos experimentales y cada uno de los parámetros dietarios evaluados, por lo que se puede considerar que ni los tratamientos experimentales ni el manejo de los animales de experimentación afectaron el comportamiento dietario de las ratas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores quienes trabajaron con dietas que contienen hierro, así como dietas con zinc o cobre en ratas Sprague Dawley (Diwan y col., 1997; Bobrowska y col., 2011; 2012).

### **Optimización de las Condiciones Analíticas Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA)**

#### **Calibración de Balanza Analítica y Material Volumétrico**

En la tabla III se presentan los resultados de la calibración de la balanza analítica (masa patrón de 0.50 g) y el material volumétrico (pipeta de 5 mL y matraz volumétrico de 100 mL), en donde se puede apreciar que la calibración es

**Tabla II.** Comportamiento biológico (media  $\pm$  EE) de ratas Sprague Dawley, mediante la evaluación dietaria a través de un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ).

TRATAMIENTOS*							
Variables	-Al/-MNU	+500 Al/+MNU	+1000 Al/+MNU	+2000 Al/+MNU	+2000 Al/-MNU	-Al/+MNU	Valor de P**
n	8	5	7	8	8	7	
Consumo de alimento (g)	1567.23 $\pm$ 64.16	1603.72 $\pm$ 81.16	1801.93 $\pm$ 68.59	1734.91 $\pm$ 64.16	1710.89 $\pm$ 64.16	1747.09 $\pm$ 68.59	NS
Ganancia total en peso (g)	84.50 $\pm$ 7.61	80.68 $\pm$ 9.63	75.78 $\pm$ 8.14	83.29 $\pm$ 7.61	82.80 $\pm$ 7.61	76.20 $\pm$ 8.14	NS
Conversión alimenticia	20.10 $\pm$ 2.26	22.43 $\pm$ 2.86	24.42 $\pm$ 2.41	22.18 $\pm$ 2.26	22.14 $\pm$ 2.26	23.46 $\pm$ 2.41	NS
Eficiencia alimenticia	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	NS

\* = Al/MNU =  $\pm$  Aluminio/ $\pm$  Metilnitrosourea. \*\* = Valor de P, NS = no significativo, significativo  $P \leq 0.05$ . n = número de datos. EE = Error experimental

**Tabla III.** Resultados de la calibración de la balanza analítica (por triplicado) con masas patrón y material volumétrico (\*desviación estándar).

<b>Réplica</b>	<b>Balanza Analítica (masa 0.50 g)</b>	<b>Pipeta Volumétrica (5.0 mL)</b>	<b>Matraz Volumétrico (100.0 mL)</b>
1	0.499	4.986	99.777
2	0.499	4.999	99.635
3	0.499	4.989	99.648
4	0.499	4.986	99.668
5	0.499	4.988	99.709
6	0.499	5.003	99.673
7	0.499	4.987	99.692
8	0.499	5.012	99.745
9	0.499	4.995	99.814
10	0.499	4.994	99.849
Promedio	0.499	4.994	99.721
*DesvEst	0.000	0.008	0.072

aceptable, ya que la desviación estándar obtenida se encuentra por debajo de 0.10 en las tres mediciones del proceso de calibración (CENAM-EMA, 2008). En la sección de anexos se muestran los valores obtenidos de la calibración del resto del material volumétrico empleado.

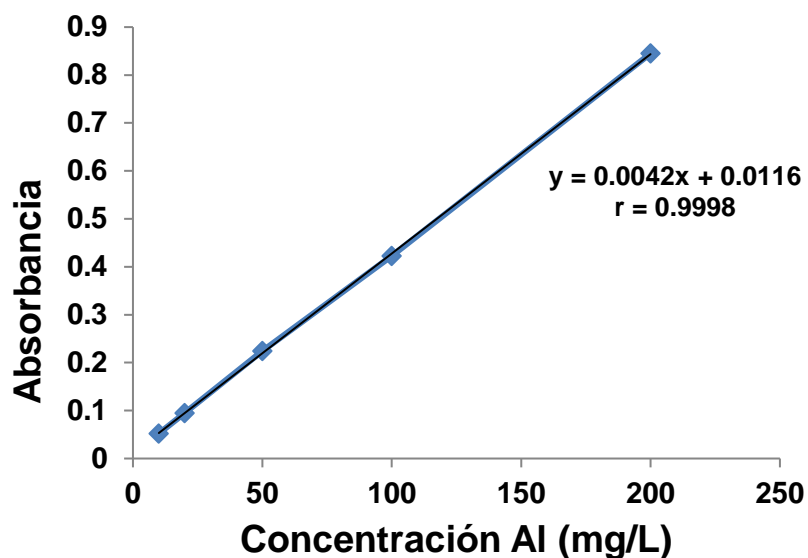
### **Evaluación de Parámetros Analíticos en Condiciones Ideales Para Cuantificar Aluminio Mediante EAA por Flama**

**Linealidad.** Este parámetro se evaluó mediante el coeficiente de correlación o coeficiente de Pearson ( $r$ ). Para ello, se graficó la absorbancia contra la concentración de aluminio (Figura 12). La absorbancia graficada es el promedio de las absorbancias obtenidas de las tres curvas de calibración analizadas. El valor del coeficiente de correlación obtenido fue  $r = 0.9998$ , por lo que se considera aceptable la linealidad, ya que el valor obtenido está por arriba del valor recomendado ( $r \geq 0.995$ ) (CENAM-EMA AC, 2009).

**Exactitud.** Los resultados obtenidos a partir de concentraciones de 20, 50 y 100 mg/L de Al fueron 101, 98 y 97 % (Tabla IV), los cuales se consideran dentro del rango recomendado de  $100 \pm 15$  % por la IUPAC (Thompson y col., 2002) y por el CENAM-EMA AC (2008).

**Precisión.** Los resultados obtenidos del porcentaje de variación (% CV) para las concentraciones de 20, 50 y 100 mg/L de Al fueron de 2.15, 1.05 y 1.16 % (Tabla IV), los cuales están dentro de los criterios de aceptación que debe ser  $\leq 2$  % para métodos instrumentales (CENAM-EMA AC, 2009).

**Límite de Detección y Límite de Cuantificación.** El límite de detección de Al fue de 0.0579 mg/L, y el límite de cuantificación fue de 0.1911 mg/L. Estos resultados son similares a los reportados por la Compañía Perkin Elmer (2012), y a los reportados por Correia y col. (2006), en otro tipo de muestras biológicas, cómo uvas, aceitunas, entre otras.



**Figura 12.** Curva de calibración para Al mediante EAAF.

**Tabla IV.** Resultados de la exactitud y de la precisión para un estándar de Al a tres concentraciones y para un material de referencia certificado (CRM-S-B US), cuantificados por EAA por flama, por triplicado.

Corrida	STD 20 mg/L	STD 50 mg/L	STD 100 mg/L	MRC 700 mg/L
1	20.3	49.0	92.8	707.0
2	19.7	47.9	99.1	704.0
3	20.0	49.7	100.1	702.0
4	20.3	49.3	93.8	701.0
5	20.1	49.5	100.5	708.5
Promedio	20.0	48.9	97.3	704.0
DesvEst	0.4	0.5	1.1	4.3
%REC	101.0	97.7	97.3	100.6
%CV	2.2	1.1	1.2	0.6

STD = Estándar. MRC = Material de Referencia Certificado.

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales, como lo es la absorción atómica, es que pueden detectar y cuantificar cantidades de metales mucho más pequeñas que los métodos de análisis tradicionales, por ejemplo colorimetría.

Esta ventaja analítica permite apreciar la importancia de las concentraciones a nivel de trazas en muchos materiales, por ejemplo en muestras biológicas y ambientales, contribuyendo así al desarrollo de muchas otras técnicas en las cuales los límites de detección altos son el mejor criterio para aplicarlas con éxito (Miller y Miller, 1993).

Por otro lado, los resultados para determinar el porcentaje de recuperación de muestras fortificadas con Al, se muestran en la tabla V. Se puede apreciar que los porcentajes de recuperación obtenidos fueron: mama (100.9), hígado (103.5), hueso (100.6), agua (103.0) y alimento (99.3 %), los cuales se encuentran dentro del rango 85 a 115 % como lo establece la IUPAC (Thompson y col., 2002). Esto indica que el método de descomposición utilizado en las muestras de ratas Sprague Dawley fue adecuado para cuantificar Al; además de que no existen pérdidas por volatilización y/o precipitación. Sin embargo, las muestras de cerebro están fuera del rango permitido (120.5 %), lo cual se puede deber a que las ratas, contienen y/o almacenan cantidades importantes de Al en el cerebro provenientes de otra fuente, por lo que se debe de considerar esto de manera objetiva y analítica.

**Tabla III.** Porcentajes de recuperación de Al para muestras de tejidos de ratas, agua y alimento, fortificadas con 100 mg/L de Al, digeridas por vía húmeda y cuantificadas mediante EAA por flama, por triplicado.

<b>Muestra</b>	<b>Control sin Fortificar con Al (mg/L)</b>	<b>Muestra Fortificada con Al (% Recuperación)</b>
Mama	1.0	101.0
Hígado	1.0	103.5
Hueso	0.8	100.6
Cerebro	2.3	120.5
Agua	1.0	107.0
Alimento	1.1	99.3



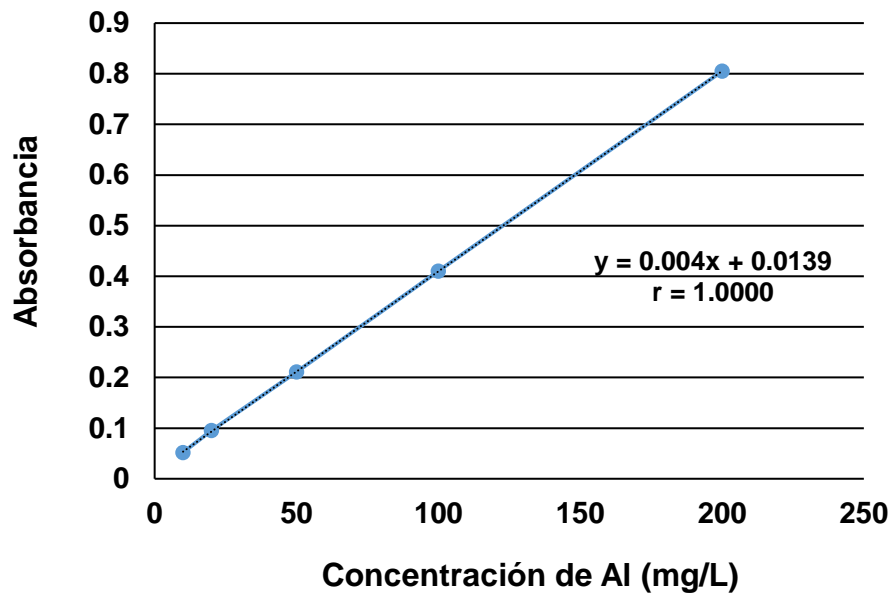
### **Exactitud y Precisión a Partir de un Material de Referencia Certificado (MRC)**

Como se puede apreciar en la tabla IV, el porcentaje de recuperación obtenido fue de 100.62. Este valor se considera aceptable se encuentra muy cercano al 100 % de recuperación. La precisión se determinó mediante el porcentaje del coeficiente de variación (% CV), obteniéndose un valor de 0.61, por lo se considera aceptable debido a que para métodos instrumentales se acepta un valor menor del 2 % (IUPAC, 2012). Con base en los resultados obtenidos de los parámetros analíticos evaluados, es importante señalar que aún falta por evaluar estos mismos parámetros analíticos a través de espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito, con la finalidad de analizar con cantidades de muestra muy pequeñas y/o con concentraciones de Al que no se pueden detectar por flama. Por otra parte, se sugiere realizar la descomposición de las muestras a través de horno de microondas, que tienen una mejor eficiencia en el proceso de descomposición (Bohrer y Col., 2008).

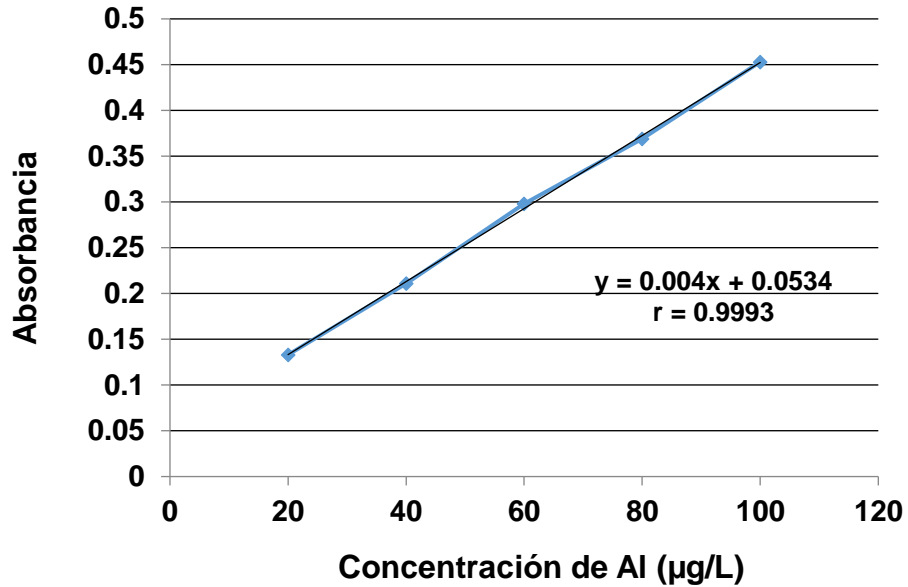
#### **Validación del Método Analítico Para Cuantificar Aluminio en Ratas Sprague Dawley Mediante Espectroscopía de Absorción Atómica por Flama y Horno de Grafito.**

##### **Validación del Método**

**Linealidad.** El proceso de validación del método analítico se realizó primeramente a partir de la linealidad, la cual se llevó a cabo por EAAF y por EAAHG. En la figura 13 se puede apreciar que el coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 1.000 lo cual indica que la asociación entre concentración de Al y la absorbancia es lineal para las concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L, en la variante analítica de EAAF. En la figura 14, la linealidad mediante el coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0.9993, para la variante analítica de EAAHG.



**Figura 13.** Curva de calibración para aluminio cuantificado por EAAF (mg/L).



**Figura 14.** Curva de calibración para aluminio cuantificado por EAAHG (µg/L).

Ambas pendientes ( $m$ ) tienen el mismo valor de 0.004. Estos resultados indican que este parámetro analítico es aceptable, ya que el criterio de aceptación es de  $r \geq 0.995$  (Thompson y col., 2002). Los resultados obtenidos para la linealidad son similares a los obtenidos por otros investigadores en el proceso de validación de un método para la cuantificación de Al como adyuvante en vacunas, cuantificado por EAA por flama (Mishra y col., 2007). El resultado para linealidad también es similar al obtenido por otros investigadores quienes evaluaron cuatro métodos diferentes para la digestión de tejido de ratones albinos Swiss y posterior cuantificación de Al mediante EAA por horno de grafito (Bohrer y col., 2008).

En otro trabajo de investigación se validó un método analítico para determinar Al, Cu y Pb en uvas, mediante EAA por horno de grafito (Correia y col., 2006). Sin embargo, ellos no evaluaron la linealidad mediante el coeficiente de correlación, lo que hicieron fue establecer el rango de linealidad para Al que fue de 1.1 a 50.0  $\mu\text{g/L}$ . A diferencia del presente trabajo en el cual se estableció el rango de linealidad de 10 a 80  $\mu\text{g/L}$  de Al.

**Exactitud y Precisión.** En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos para exactitud y precisión para ambos métodos. Se puede apreciar que la exactitud evaluada mediante el % Rec fue de 100.62 y 97.75 % para EAAF y por EAAHG, respectivamente. Por su parte, la precisión evaluada mediante el % CV fue de 0.610 y 1.301 para EAA por flama y horno de grafito, respectivamente. Los resultados obtenidos se consideran aceptables ya que para la exactitud el criterio de aceptación es de  $100 \pm 5 \%$  para el porcentaje de recuperación cuando se utiliza un material de referencia certificado (CRM-S-B), y para la precisión el criterio de aceptación es  $\% \text{ CV} \leq 2 \%$  para métodos instrumentales (Thompson y col., 2002).

**Tabla IVI.** Estimación de la exactitud y la precisión de un material de referencia certificado (CRM-S-B) por EAAF y EAAHG.

RÉPLICA*	[Al] (70 mg/L) EAAF	[Al] (70 µg/L) EAAHG
1	70.2	69.5
2	71.2	68.9
3	70.4	69.1
4	70.4	68.7
5	70.0	68.8
6	70.4	67.8
7	70.2	67.1
8	70.0	66.9
9	71.2	69.2
10	70.4	68.3
PROMEDIO	70.4	68.4
DS	0.4	0.89
%Rec	100.6	97.8
%CV	0.6	1.3

\*Cada réplica fue realizada por triplicado. DS = Desviación estandar. %Rec = % de Recuperación. %CV = Coeficiente de Variación.

Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores (Mishra y col., 2007) para Al en vacunas (porcentaje de recuperación entre 93.3 y 103.4 %, con un coeficiente de variación de 1.6) y similares a los obtenidos durante la validación del método para cuantificar cobre y otros metales (entre ellos Al) en frutos del olivo (aceituna), mediante EAA por horno de grafito, con porcentajes de recuperación superiores al 95 % y coeficientes de variación del 3.0 % (Soares y col., 2006); sin embargo en el presente trabajo los resultados mostraron una mayor precisión (% CV menor a 1.4 % en comparación al 3.0 %).

**Repetibilidad.** La precisión también se evaluó bajo condiciones de repetibilidad, que es la evaluación de la precisión realizada bajo las mismas condiciones de trabajo (el mismo analista, el mismo equipo, tiempos cortos) (Liang y col., 2013). Los resultados obtenidos para la repetibilidad se muestran en la tabla VII. Como se puede apreciar, el método es repetible para las tres concentraciones de Al determinado por EAA por flama y para las tres concentraciones de Al determinadas mediante EAA por horno de grafito, con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ), para  $n = 25$ . Los resultados de repetibilidad obtenidos son similares a los obtenidos durante la validación del método para determinar la concentración de Al en uvas (Correia y col., 2006).

**Límite de Detección y Límite de Cuantificación.** Los resultados obtenidos de LD y LC para Al determinado por EAAF fueron de 0.06 y 0.19 mg/L y de 0.05 y 0.18  $\mu\text{g/L}$  determinado por EAAHG, respectivamente. Estos resultados obtenidos para LD y LC son más pequeños que los reportados por Mishra y col. (2007) para Al como adyuvante en vacunas, determinado por EAAF, ya que reportan LD de 0.229 mg/L y LC de 1.11 mg/L, así también son más pequeños que los reportados en otras investigaciones que reportan LD de 1.11  $\mu\text{g/L}$  y LC de 3.70  $\mu\text{g/L}$  de Al determinado por EAAHG (Soares y col., 2007).

**Tabla VII.-** Análisis de precisión bajo condiciones de repetibilidad para tres concentraciones diferentes de Al, determinadas por EAAF y EAAHG, respectivamente.

[Al]	F calculada	F tablas	Decisión
EAAF			
20 mg/L*	1.4144	2.8660	Repetible
50 mg/L*	2.3872	2.8660	Repetible
100 mg/L*	2.5780	2.8660	Repetible
EAAHG			
20 µg/L*	1.3070	2.8660	Repetible
40 µg/L*	1.6787	2.8660	Repetible
60 µg/L*	2.1921	2.8660	Repetible

\* n = 25. Cinco réplicas por semana durante cinco semanas.  $\alpha = 5\%$ .

El proceso de validación del método se realizó utilizando un material de referencia certificado de tejido de ostión (NIST 1566b), ya que no fue posible utilizar un material de referencia certificado de tejido de ratas. Este material de referencia certificado contiene una concentración de Al de  $197.2 \pm 6.0$  mg/Kg. Los resultados obtenidos para la exactitud a través del % Rec fueron de 100.60 % para flama y de 100.5 para horno de grafito. El criterio de aceptación para un material de referencia certificado es  $100 \pm 5$  % (CENAM-EMA AC, 2012). Estos resultados representan un valor muy cercano a 100 % y representa un rango más estrecho con respecto a los resultados obtenidos en otro trabajo al utilizar hojas de espinacas (NIST 1570a) como material de referencia certificado que sustituye a las uvas (Correia y col., 2006). El porcentaje de recuperación que obtuvieron fue de 97 % para aluminio. Sin embargo, en otra investigación obtuvieron un porcentaje de recuperación entre 89 y 121 % ( $105 \pm 16$ ) para aluminio al utilizar hígado de pollo como material de referencia certificado, para sustituir a tejido de ratón albino Swiss (Bohrer y col., 2008).

### **Aplicabilidad del Método Validado**

El método validado se utilizó en tejidos de ratas (mama, hígado, hueso y cerebro), agua de beber y alimento para ratas sin fortificar y fortificados con 100 mg/L de estándar de Al, previa digestión en horno de microondas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII. Como se puede apreciar, los porcentajes de recuperación de Al en los diferentes tejidos de rata, alimento, agua y controles se encuentran dentro del rango de  $100 \pm 15$  %, recomendado (Thompson y col., 2002). Es importante mencionar que los blancos de digestión para EAA por flama no se les detectó presencia de Al, ya que los valores se encuentran menores al límite de cuantificación.

**Tabla VII.** Porcentaje de recuperación para muestras de tejido de ratas fortificadas con 100 mg/L de Al para EAAF, y fortificadas con 200 µg/L de Al para EAAHG, control sin fortificar y MRC.

Muestra	Control sin fortificar (mg/L)	Muestra fortificada (% Rec) EAAF	Muestra fortificada (% Rec) EAAHG
Mama	0.3	100.9	109.0
Hígado	0.2	103.5	93.5
Hueso	0.4	100.6	105.0
Cerebro	0.3	109.0	104.0
Alimento para ratas	0.5	99.3	101.2
Agua de beber	0.0	101.0	100.2
Blanco de digestión	0.1	100.4	100.1
MRC (NIST 1566b)*	----	100.6	100.5

\*MRC = Material de Referencia Certificado (Tejido de ostión)



## **Consideraciones Adicionales**

Una vez validado un método analítico y demostrado su aplicabilidad (Kaur y col., 2006), lo que procede es estimar la incertidumbre para darle plena confiabilidad a los resultados obtenidos, por lo que es un requisito que establece la normatividad internacional (NTC-ISO/IEC-17025:2005). Si bien es cierto, existe una gran cantidad de artículos científicos relacionados con diversas metodologías analíticas para cuantificar Al en diferentes tipos de tejidos de animales de experimentación o en humanos, la mayoría de ellos no lo realizan o no consideran el proceso de validación del método empleado. En la literatura científica existen pocos trabajos que se han enfocado a este proceso de validación y son menos aún los trabajos en los cuales después de validar el método analítico, estiman la incertidumbre (Sharma y Mishra, 2006; Theodorsson, 2012).

### **Estimación de la Incertidumbre Expandida de un Método Analítico para Cuantificar Aluminio en Tejidos de Ratas Sprague Dawley Mediante EAAF y EAAHG**

## **Concentración de Masa del Elemento Medido en el Instrumento a Través de la Curva de Calibración**

La incertidumbre estándar y relativa de la concentración de masa de aluminio mediante la respuesta del instrumento se calculó con la ecuación 6. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IX.

### **Incertidumbre del Material Volumétrico**

Los resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre estándar y relativa para el material volumétrico empleado (matraz de 100 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 y 20 mL) considerando la tolerancia del material volumétrico ( $T_0$ ), la temperatura de la medición ( $T$  en °C) y la repetibilidad de la calibración del material volumétrico ( $rep$ ) se resumen en la Tabla X.

**Tabla IX.** Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa de la concentración de aluminio obtenida a partir de la curva de calibración en respuesta al instrumento, para EAAF y EAAHG, respectivamente.

Abreviatura (Ecuación 6 y 7)	EAAF	EAAHG
$S$	$8.281 \times 10^{-6}$	$1.893 \times 10^{-3}$
$b_1$	0.004	0.004
$\rho$	5	5
$n$	15	15
$Y_{xi}$	49.275	61.150
$Y_{MR}$	76	60
$S_{xx}$	24120	4000
$u_{Yx}$	$1.132 \times 10^{-2}$	$2.425 \times 10^{-1}$
$u_{rYx}$	$2.296 \times 10^{-4}$	$3.966 \times 10^{-3}$

**Tabla X.** Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa del volumen del material volumétrico.

Abreviatura (Ecuación 8,9,10,11)	Matraz 100 mL	Pipeta 1 mL	Pipeta 2 mL	Pipeta 5 mL	Pipeta 10 mL	Pipeta 20 mL
<i>Tol</i>	0.08	0.006	0.010	0.01	0.02	0.03
T	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
$\alpha$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-4}$
V (mL)	100	1	2	5	10	20
$S_{rep}$	$1.894 \times 10^{-1}$	$5.263 \times 10^{-3}$	$8.020 \times 10^{-3}$	$1.549 \times 10^{-2}$	$1.398 \times 10^{-3}$	$3.285 \times 10^{-2}$
$\sqrt{n}$	$\sqrt{30}$	$\sqrt{30}$	$\sqrt{30}$	$\sqrt{30}$	$\sqrt{30}$	$\sqrt{30}$
$u_{V100}$	$7.705 \times 10^{-2}$	-----	-----	-----	-----	-----
$u_{rV100}$	$7.710 \times 10^{-4}$	-----	-----	-----	-----	-----
$u_{V1}$	-----	$2.700 \times 10^{-3}$	-----	-----	-----	-----
$u_{rV1}$	-----	$2.700 \times 10^{-3}$	-----	-----	-----	-----
$u_{V2}$	-----	-----	$4.504 \times 10^{-3}$	-----	-----	-----
$u_{rV2}$	-----	-----	$2.257 \times 10^{-3}$	-----	-----	-----
$u_{V5}$	-----	-----	-----	$5.819 \times 10^{-3}$	-----	-----
$u_{rV5}$	-----	-----	-----	$1.164 \times 10^{-3}$	-----	-----
$u_{V10}$	-----	-----	-----	-----	$1.017 \times 10^{-2}$	-----
$u_{rV10}$	-----	-----	-----	-----	$1.017 \times 10^{-3}$	-----
$u_{V20}$	-----	-----	-----	-----	-----	$1.821 \times 10^{-2}$
$u_{rV20}$	-----	-----	-----	-----	-----	$9.106 \times 10^{-4}$

### **Incertidumbre para el Factor de Dilución (fd)**

Los resultados obtenidos para la incertidumbre estándar y relativa para los factores de dilución empleados se muestran en la tabla XI.

### **Incertidumbre para la Repetibilidad de las Mediciones**

Los resultados obtenidos para la repetibilidad de las mediciones se resumen en la tabla XII. Es importante señalar que la repetibilidad se determinó utilizando cinco réplicas por semana durante cinco semanas ( $n = 25$ ) y que las concentraciones que se utilizaron fueron de 20, 50 y 100 mg/L para EAAF y de 40, 60 y 80  $\mu\text{g/L}$  para EAAHG, respectivamente.

### **Incertidumbre de la Pureza del Estándar de Aluminio ( $1000 \pm 2$ mg/L)**

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIII.

### **Incertidumbre del Material de Referencia Certificado CRM-S-B ( $700 \pm 4$ mg/L)**

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla XIII.

### **Incertidumbre del Material de Referencia Certificado NIST 1566b ( $197.2 \pm 6$ mg/L)**

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XIII.

Es importante señalar que los valores obtenidos de incertidumbre estándar y relativa de ambos materiales de referencia certificados para EAAF y EAAHG, son menores a los obtenidos por Patriarca y col. (2004) cuyo valor de incertidumbre relativa para un material de referencia fue de 0.026. Gates y col. (2009) y Krouwer (2003), sugieren que se debe de tomar muy en cuenta las fuentes de incertidumbre que se seleccionan para estimar la incertidumbre de un material de referencia certificado, ya que han demostrado que la masa y la densidad del material de referencia certificado (MRC) influyen mucho en los valores obtenidos de incertidumbre para este tipo de materiales, que repercuten en la evaluación de la concentración del mensurando y por lo tanto en la estimación de la incertidumbre.

**Tabla XI.** Resumen de la incertidumbre estándar y relativa para el factor de dilución utilizado para realizar la curva de calibración para aluminio, determinado por EAAF y EAAHG, respectivamente.

Factor de dilución	Incertidumbre estándar (Ecuación 12,13,14,15)	Incertidumbre relativa (Ecuación 12,13,14,15)
100 (1:100)	$7.710 \times 10^{-2}$	$7.710 \times 10^{-4}$
50 (2:100)	$7.718 \times 10^{-2}$	$1.543 \times 10^{-3}$
20 (5:100)	$7.705 \times 10^{-2}$	$3.959 \times 10^{-3}$
10 (10:100)	$7.772 \times 10^{-2}$	$7.772 \times 10^{-3}$
5 (20:100)	$7.707 \times 10^{-2}$	$1.541 \times 10^{-3}$
10000 (1:100 + 1:100)	$1.090 \times 10^{-1}$	$1.090 \times 10^{-5}$

**Tabla VIII.** Resumen de cada uno de los componentes de incertidumbre y sus valores para estimar la incertidumbre estándar y relativa para la repetibilidad (rep) en la determinación de aluminio mediante EAAF y EAAHG, (mg/L y  $\mu\text{g/L}$ ) respectivamente.

Componente (Ecuación 16,17)	EAAF	EAAHG
$S_{Y_{rep1}}$	0.433	0.486
$S_{Y_{rep2}}$	0.241	0.353
$S_{Y_{rep3}}$	0.760	0.480
$\sqrt{n}$	$\sqrt{25}$	$\sqrt{25}$
$Y_{rep1}$	20.02	40.04
$Y_{rep2}$	49.49	60.36
$Y_{rep3}$	99.62	80.26
$U_{Y_{rep}}$	$1.814 \times 10^{-1}$	$1.537 \times 10^{-1}$
$U_{rY_{rep}}$	$2.321 \times 10^{-2}$	$1.537 \times 10^{-2}$

**Tabla VIII** . Resumen de los componentes de incertidumbre y sus valores para determinar la incertidumbre estándar y relativa para la pureza de un estándar de aluminio y para dos materiales de referencia certificados de aluminio, determinados mediante EAAF y EAAHG, respectivamente.

Componente	EAAF (mg/L)	EAAHG (µg/L)
Pureza de STD de Al (Ecuación 18,19,20)		
$Y_{Al}$	1000	1000000
$k$	2	2
$U_{exp}$	2	2
$U_{Ystd Al}$	$5.773 \times 10^{-1}$	$5.773 \times 10^{-4}$
$U_{rYstd Al}$	$5.773 \times 10^{-4}$	$5.773 \times 10^{-7}$
CRM-S-B (Ecuación 21,22,23)		
$Y_{Al}$	700	700000
$k$	2	2
$U_{exp}$	4	4
$U_{Ystd Al}$	$2.240 \times 10^{-1}$	$2.240 \times 10^{-1}$
$U_{rYstd Al}$	$3.200 \times 10^{-4}$	$3.200 \times 10^{-7}$
NIST 1566b (Ecuación 24,25,26)		
$Y_{Al}$	197.2	197200
$k$	2	2
$U_{exp}$	6	6
$U_{Ystd Al}$	1.732	$1.732 \times 10^{-3}$
$U_{rYstd Al}$	$8.783 \times 10^{-3}$	$8.783 \times 10^{-6}$

**Incertidumbre Estándar Combinada, Relativa, Porcentaje de incertidumbre relativa y Expandida para la Concentración de Al Cuantificado mediante EAAF**

Los valores obtenidos de cada una de las fuentes de incertidumbre estándar se sustituyen en la ecuación 27 para obtener la incertidumbre estándar combinada de la concentración de aluminio:

$$u_{cY_{Al}} = \sqrt{(0.01131)^2 + (0.07742)^2 + (0.5773)^2 + (0.2240)^2 + (1.7321)^2 + (0.1814)^2} = 1.8547 \text{ mg/L}$$

La incertidumbre estándar relativa combinada para la determinación de Al mediante EAAF se obtiene sustituyendo los datos obtenidos en la ecuación 28:

$$u_{rcY_{Al}} = \sqrt{\left(\frac{1.8547 \text{ mg/L}}{49.275 \text{ mg/L}}\right)^2} = 3.7639 \times 10^{-2}$$

Sustituyendo el valor de la incertidumbre estándar combinada y la concentración de Al en la ecuación 29, multiplicado por 100 se obtiene el porcentaje de la incertidumbre estándar relativa combinada:

$$\% u_{rcY_{Al}} = \frac{1.8547}{49.275} \times 100 = 3.76$$

Finalmente, la incertidumbre expandida ( $U$ ) se obtiene sustituyendo el valor obtenido de la incertidumbre estándar combinada y multiplicándolo por el factor de cobertura  $\kappa = 2$ , que permite obtener un intervalo de confianza del 95 %, como se señala en la ecuación 30:

$$U_{C_{Al}} = 1.8547 \text{ mg/L} * 2 = 3.7093 \text{ mg/L}$$

En la tabla XIII se resumen los resultados de los valores obtenidos para cada una de las fuentes de incertidumbre estándar y relativas evaluadas para la determinación de Al mediante EAAF. Por otro lado, como se puede apreciar en la figura 23, la principal fuente de aportación de incertidumbre es la relacionada con el factor de dilución. En buena medida, hasta cierto punto es justificable debido a que en esta etapa del análisis intervienen cinco factores de dilución cuando se determina aluminio mediante EAAF, y esto de alguna manera influye en el resultado. De manera puntual, el factor de dilución contribuye con el 74.2 % de la incertidumbre estándar relativa.

### **Incertidumbre Estándar Combinada, Relativa y Expandida para la Concentración de Al Cuantificado mediante EAAHG**

Los valores obtenidos de cada una de las fuentes de incertidumbre estándar se sustituyen en la ecuación 27 para obtener la incertidumbre estándar combinada de la concentración de Al:

$$u_{cyAl} = \sqrt{(0.2445)^2 + (0.1090)^2 + (1.5366 \times 10^{-2})^2 + (0.2240)^2 + (1.7321)^2} = 1.8585 \mu\text{g/L}$$

La incertidumbre estándar relativa combinada para la determinación de Al mediante EAAHG se obtiene sustituyendo los datos obtenidos en la ecuación 28:

$$u_{rcyAl} = \sqrt{\left(\frac{1.8585 \mu\text{g/L}}{61.15 \mu\text{g/L}}\right)^2} = 3.0392 \times 10^{-2}$$

Sustituyendo el valor de la incertidumbre estándar combinada y la concentración de Al en la ecuación 29 se obtiene el porcentaje de la incertidumbre estándar relativa combinada:

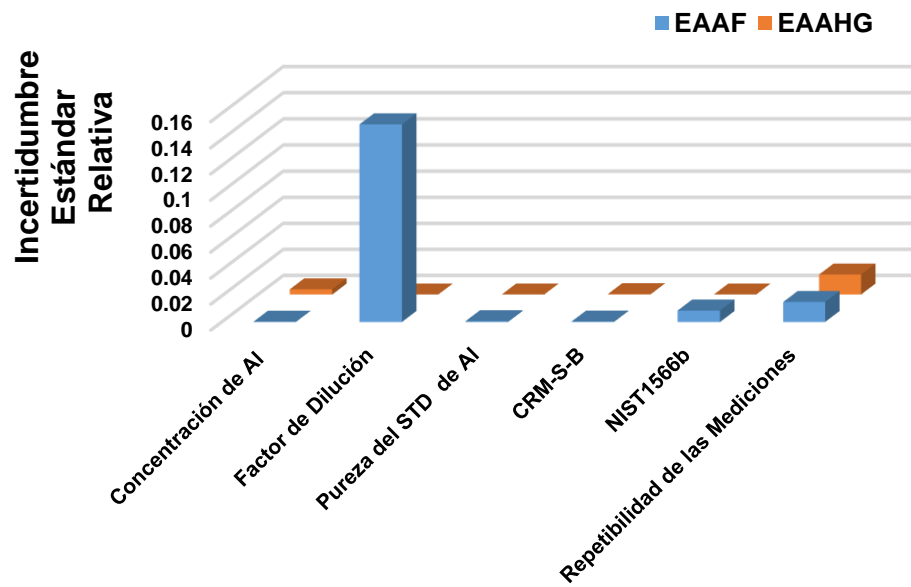


$$\% u_{rcyAl} = \frac{1.8585}{61.15} \times 100 = 3.03$$

Finalmente, la incertidumbre expandida ( $U$ ) se obtiene sustituyendo el valor obtenido de la incertidumbre estándar combinada y multiplicándolo por el factor de cobertura  $\kappa = 2$ , que permite obtener un intervalo de confianza del 95 %, como se señala en la ecuación 30:

$$U_{C_{Al}} = 1.09 \mu\text{g/L} * 2 = 3.717 \mu\text{g/L}$$

En la tabla XIII se resumen los resultados de los valores obtenidos para cada una de las fuentes de incertidumbre estándar y relativas evaluadas para la determinación de Al mediante EAAHG. En la figura 15, se puede apreciar que cuando se determina Al mediante EAAHG, la principal fuente de aportación de incertidumbre es la relacionada con la repetibilidad de las mediciones. De manera puntual, la repetibilidad de las mediciones contribuye con el 50.6 % de la incertidumbre estándar relativa. Forte y Bocca (2007), encontraron una respuesta similar al determinar el porcentaje de incertidumbre relativa con respecto a la reproducibilidad del método analítico para determinar cadmio y plomo para vísceras de pollo cuantificados por SF-ICP-MS. Particularmente su resultado fue que la reproducibilidad contribuye con el 50 % de incertidumbre para cadmio y con el 75 % para plomo. Esto se puede hasta cierto punto entender, ya que la reproducibilidad es la determinación de la precisión del método con respecto a un diferente analista, en diferente equipo de cuantificación de Cd y Pb, y tiempos



**Fuentes de Incertidumbre**

**Figura 15.** Contribución gráfica de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de aluminio mediante EAAF y EAAHG.

diferentes. En tanto que la repetibilidad es el mismo analista y el mismo equipo, en tiempos cortos (Eurachem-Citac, 2013, ISO/IEC 17025:2005).

En la tabla XIV se resumen los valores obtenidos para la incertidumbre estándar relativa combinada y la incertidumbre expandida. Si bien es cierto los valores de estos dos últimos parámetros son similares en magnitud para ambos métodos, también indican que los valores son relativamente bajos por lo que se puede considerar que son valores aceptables. Patriarca y col. (2004), obtuvieron porcentajes de incertidumbre relativa entre 17 y 20 % para la determinación de plomo en sangre. Sin embargo y a pesar de estos resultados, la normatividad internacional relacionada con los mecanismos y las guías para estimar la incertidumbre expandida de una medición analítica, aún no ha establecido los valores deseables o que se pudieran considerar dentro de un rango aceptable o un valor menor o igual a una cantidad establecida. Por lo que se considera trabajar en ello para poder establecer un criterio internacional que pueda indicar que valores de incertidumbre se consideran aceptables para los métodos analíticos y/o las técnicas que se emplean para determinar la incertidumbre de algún mensurando en particular (Eurachem-Citac, 2013; ISO/IEC 17025:2005; Hall, 2007). Además, resulta imperativo revisar la terminología y la forma de estimar la incertidumbre ya que algunos autores consideran que la Guía para la Expresión de la Incertidumbre en las Mediciones (GUM, por sus siglas en inglés) debe ser analizada y actualizada (Hall, 2008; Ellison, 2014; Ehrlich, 2014). Por otro lado, son escasos los trabajos en los que se estima la incertidumbre expandida en la determinación de aluminio a partir de tejidos biológicos mediante EAAF y EAAHG o ICP-EOS (Espectroscopia de emisión con plasma acoplado inductivamente), por lo que resulta complicado discutir y/o comparar resultados. El único artículo que se ha encontrado en el que estiman el porcentaje de incertidumbre del método analítico para cuantificar Al en desodorantes mediante el método complejométrico es el de Kayal y col. (2009).

**Tabla XIV.** Resumen de los valores obtenidos para la incertidumbre estándar combinada, la incertidumbre estándar combinada relativa, el porcentaje de incertidumbre estándar relativa y la incertidumbre expandida asociada con la concentración de aluminio determinado por EAAF y EAAHG, respectivamente.

Parámetro (Ecuación 27,28,29,30)	EAAF	EAAHG
Incertidumbre estándar combinada	1.9 mg/L	1.9 µg/L
Incertidumbre estándar combinada relativa	$3.764 \times 10^{-2}$	$3.309 \times 10^{-2}$
Porcentaje de incertidumbre estándar combinada relativa	3.8	3.0
Incertidumbre expandida ( $k = 2$ )	$49.3 \pm 3.7$ mg/L	$61.2 \pm 3.7$ µg/L

Estos autores obtuvieron un resultado entre 1.2 y 2 % de incertidumbre, en tanto que en el presente trabajo el porcentaje es de 3.76 y 3.03 % para EAAF y EAAHG, respectivamente.

En otras investigaciones, se han realizado trabajos de estimación de la incertidumbre expandida para otros metales y tejidos de diferente origen como el de plomo en sangre humana (Patriarca y col., 2004); As, Hg, Pb, Cd y Cu en tejido de peces (Entwisle y Hearn, 2006; Psoma y col., 2014; Santana y col., 2011; 2015); Cd y Pb en menudencias de pollo (Forte y Bocca, 2007); Fe en cerebro de oveja (Douglas y col., 2016); Cd, Cu, Fe, Pb, Sn y Zn en pasta de tomate (Yenisoy-Karakas, 2012); Zn y Cu en tejido de plantas (Mestek y col., 2001; 2002); As, Cd y Pb en leche de vaca y formulada para infantes (Frazzoli y Bocca, 2018); contaminantes inorgánicos a nivel traza en productos alimenticios (Coelho y col., 2013); elementos esenciales y no esenciales en planta medicinales y sus extractos acuosos (Senila y col., 2014), entre otros.

Todos se apegan a lo que establece la guía de EURACHEM-CITAC y de manera general los resultados obtenidos son similares a los encontrados en la presente investigación.

### **Determinación de la Concentración de Aluminio en Tejido Mamario**

En la tabla XV se reportan los resultados de la concentración de Al en tejido mamario de ratas Sprague Dawley, así como la evaluación a través de las pruebas de Chi-cuadrada y comparación múltiple de Tukey-Kramer. Se puede apreciar que existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre el tratamiento +2000Al/-MNU con respecto a los demás tratamientos experimentales, con un valor de  $38.17 \pm 2.49 \mu\text{g}$  de Al/g de tejido mamario.

**Tabla XV.** Concentración de aluminio en  $\mu\text{g/L}$  (medianas) en tejidos de ratas Sprague Dawley cuantificados por EAAHG, evaluados mediante chi cuadrada ( $\chi^2$ ) y con la prueba de comparación múltiple de Tukey Kramer, con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0.05$ ).

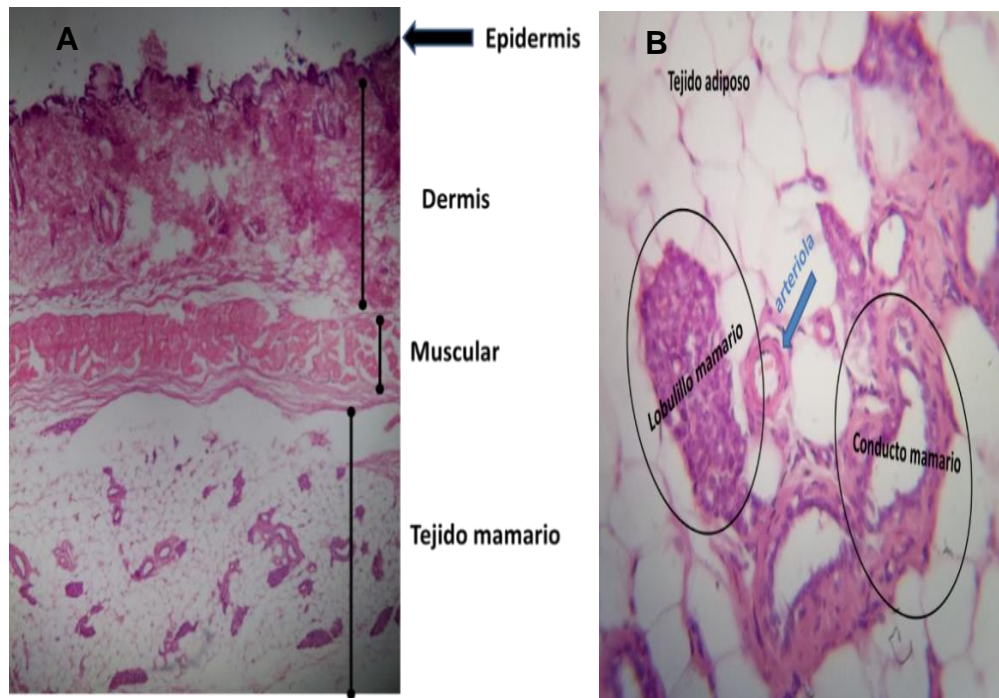
TRATAMIENTOS*							
Variables	-Al/-MNU	+500Al/+MNU	+1000Al/+MNU	+2000Al/+MNU	+2000Al/-MNU	-Al/+MNU	Valor de P**
n	8	5	7	8	8	7	
Mama	11.41 <sup>a</sup>	7.83 <sup>a</sup>	11.72 <sup>a</sup>	12.31 <sup>a</sup>	<b>38.17<sup>b</sup></b>	17.92 <sup>ab</sup>	0.0001
* = Al/MNU = $\pm$ Aluminio/ $\pm$ Metilnitrosourea.							
** = Valor de P, NS = no significativo, significativo $P \leq 0.05$							

Otros estudios reportan que la concentración de aluminio es mayor en glándula mamaria de ratas Sprague Dawley, en relación a otros tejidos, al cuantificar la concentración de varios metales suministrados por la dieta (Oogoshi y col., 1994). Por otro lado, estos resultados indican que no existe un efecto sinérgico en los tratamientos que contienen aluminio y MNU (+500Al/+MNU, +1000Al/+MNU, +2000Al/+MNU), por lo que se puede sospechar que los efectos que produce la administración de MNU no requieren aluminio como microelemento esencial para la tumorigénesis, o que el MNU provoca alteraciones en el mecanismo de transporte de aluminio. Este efecto ha sido observado al determinar que la administración de MNU en ratas, produce alteraciones en el transportador de zinc ZnT-1 y esto genera una falla en el mecanismo de transporte de zinc (Lee y col., 2003; Lee y col., 2004).

### **Efecto del Aluminio en la Inestabilidad Genómica**

#### **Evaluación de la Inestabilidad Genómica**

**Evaluación Histopatológica.** Las preparaciones histológicas de glándula mamaria de rata Sprague Dawley se aprecian en la figura 16. En la figura 18A, se pueden observar los diferentes estratos que lo conforman. En la figura 18B, se aprecia el tejido mamario en el cual hay tejido adiposo, arteriolas, conductos mamarios y lobulillos mamarios. La evaluación histológica de la glándula mamaria, para los fines de la presente investigación, presenta elementos bien definidos los cuales pueden calificarse según el tratamiento estimulador de la proliferación celular de conductos y lobulillos mamarios. Esto es muy importante desde el punto de vista comparativo, ya que al inducir cáncer de mama en ratas Sprague Dawley y/o administrar soluciones de aluminio, se pueden evaluar las alteraciones más frecuentes asociadas con cáncer de mama, ya que el cáncer del tipo carcinoma ductal invasivo que se desarrolla en el conducto mamario, es

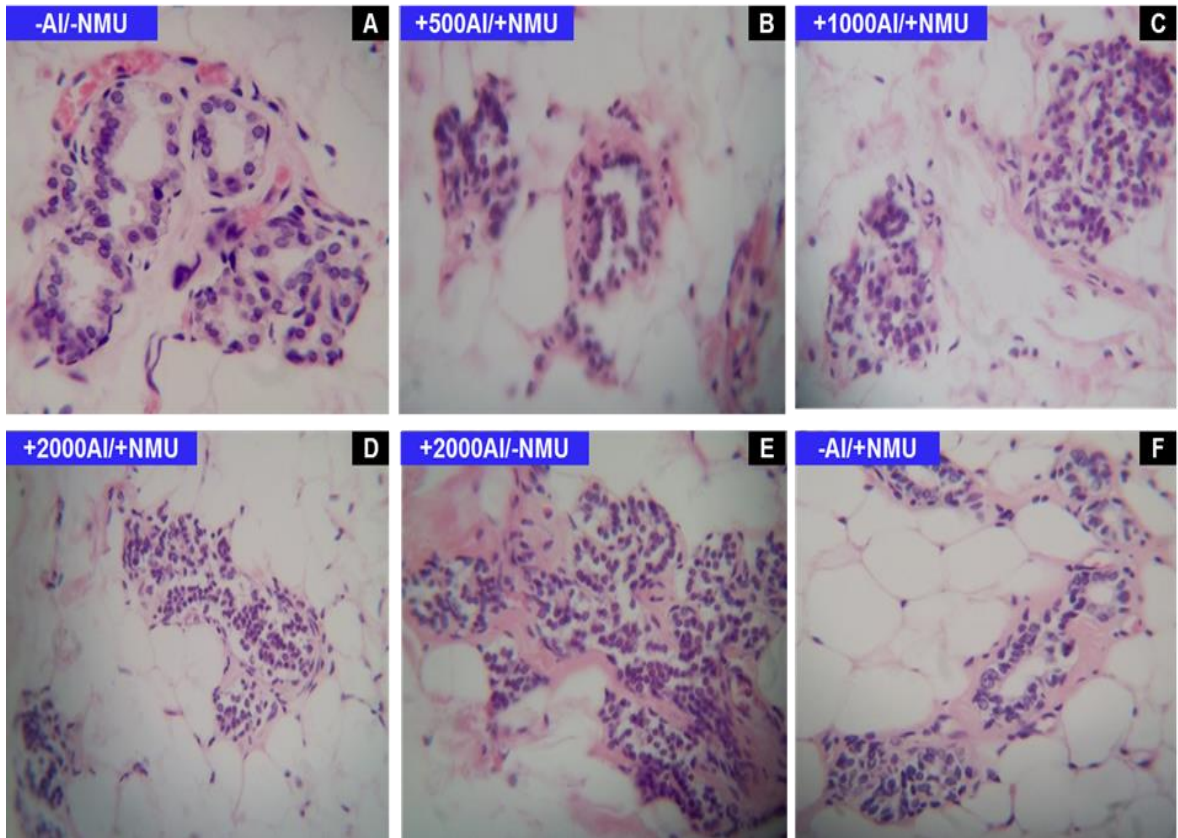


**Figura 16.** Cortes histológicos de la glándula mamaria de ratas Sprague Dawley, teñidos con hematoxilina y eosina (A 40X y B 400X).



el que representa alrededor del 80 % de los casos de cáncer de mama. En tanto que el carcinoma lobular invasivo representa alrededor del 10 % de los casos de éste.

Los resultados histopatológicos obtenidos se muestran en la figura 17. En esta figura se muestra que el efecto de los tratamientos experimentales es de tipo hiperplásico y que no existe evidencia de desarrollo de cáncer (adenocarcinoma) (Thompson y col., 2000; Ensendagli y col., 2009; Perše y col., 2009). A pesar de que se sabe que el MNU es un inductor de cáncer de mama en ratas de laboratorio, en la presente investigación y bajo las condiciones experimentales propuestas, este agente no causó cáncer de mama, solo o con  $AlCl_3$  a las concentraciones evaluadas (Lee y col., 2001; Sharma y col., 2005; Vegh and Enríquez, 2007; Goss y col., 2007; Krishnan y col., 2009; Faustino-Rocha y col., 2013). Sin embargo, en nuestra investigación este compuesto solo provocó mínima proliferación celular intraductal (F), bajo las condiciones experimentales evaluadas. Trabajos previos indican que los adenocarcinomas aparecen después de 140 días de aplicación del MMU (Rajmani y col., 2011). En el tratamiento -Al/-MNU (A) se puede apreciar que no existe proliferación celular intraductal, lo cual es de esperarse ya que este tratamiento representa el control negativo de este estudio. El hallazgo histopatológico más significativo es que el aluminio del tratamiento E, es capaz de provocar proliferación celular intraductal comparado contra los demás tratamientos (B, C, D y F). Estudios histopatológicos previos han demostrado que el aluminio en forma de  $AlCl_3$ , cuando es administrado por vía oral durante 30 días, es capaz de provocar daño hepático en ratas Sprague Dawley (Türkez y col., 2010).



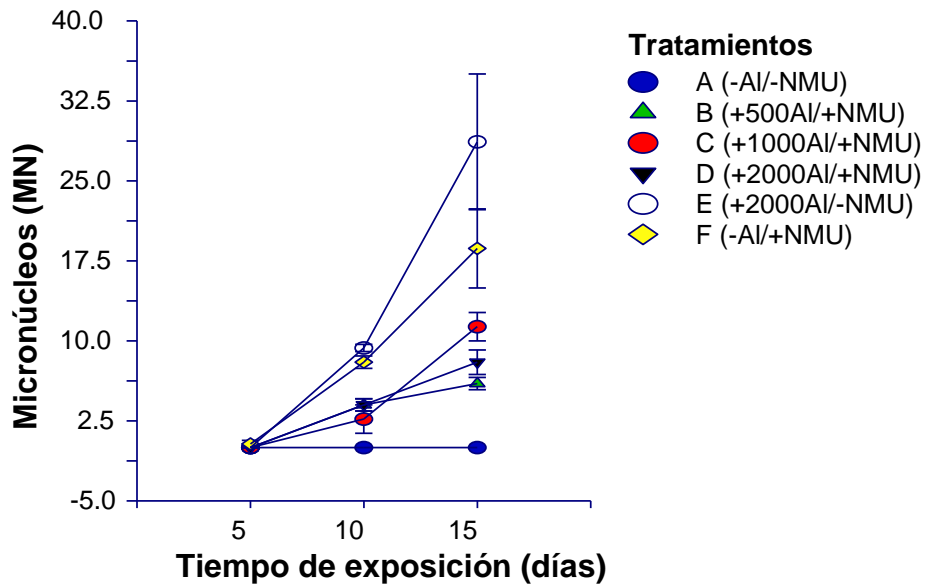
**Figura 17.** Evaluación histopatológica de tejido mamario de ratas Sprague Dawley expuestas a los tratamientos experimentales. Se puede apreciar que el efecto de los tratamientos es de tipo hiperplásico (proliferación celular intraductal). HE 400X.

**Análisis de Micronúcleos.** El análisis de micronúcleos (MN) es un indicador valioso para evaluar genotoxicidad mediante roturas de cromosomas (Türkez y col., 2010; Geyikoglu y col., 2012). Los resultados completos obtenidos para el conteo de micronúcleos (MN) se muestran en la tabla XVI y muestran que en el control negativo (-Al/-MNU) no se detectó la presencia de MN a los 5, 10 y 15 días. En el caso de los conteos con 1 MN/eritrocito, se encontró un efecto del tratamiento y el tiempo de exposición ( $P < 0.05$ ), tal como se aprecia en la figura 18. Los resultados indican que los tratamientos con Al y MNU (500Al/+MNU, 1000Al/+MNU y 2000Al/+MNU) causaron un efecto aparente intermedio. Lo anterior significa que no hubo un efecto sinérgico entre aluminio y MNU, tal y como ya se observó en los resultados obtenidos para concentración de aluminio en glándula mamaria y en la evaluación histológica de mama.

Los tratamientos en donde se observa una mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de MN/eritrocito son los de +2000Al/-MNU y -Al/+MNU y, aunque la media de los MN sea mayor en el tratamiento +2000Al/-MNU comparada contra la media del tratamiento -Al/+MNU, no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ); y esto se debe a que la varianza entre las réplicas para el tratamiento +2000Al/-MNU es grande. Cabe destacar que el tratamiento que solo contiene aluminio, por sí mismo es capaz de producir genotoxicidad en las ratas Sprague Dawley. También es importante señalar que los efectos genotóxicos comienzan a manifestarse de manera significativa ( $P < 0.05$ ) a partir del día 10 y mostrándose valores mayores al día 15 (efecto del tiempo de exposición), lo cual indica un efecto subagudo por bioacumulación de aluminio. En trabajos previos se ha determinado que agentes genotóxicos como la ciclofosfamida provocan una aparición de MN en sangre periférica de ratas, antes de las 24 hr (Mughal y col., 2010). En nuestro trabajo el MNU (-Al/+MNU) provocó aparición de MN, pero lo hizo hasta los 10 días de exposición y en menor cantidad que el tratamiento +2000Al/-MNU.

**Tabla XVI.** Genotoxicidad causada por los tratamientos experimentales mediante el conteo de micronúcleos (MN) en cada 2000 eritrocitos de sangre periférica de ratas Sprague Dawley hembras, a los 5, 10 y 15 días de exposición.

TRATAMIENTOS	5 DIAS			10 DIAS			15 DIAS		
	1 MN	2 MN	>2 MN	1 MN	2 MN	>2 MN	1 MN	2 MN	>2 MN
(A) -AI/-NMU	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(B) 500AI/+NMU	0	0	0	4	0	0	6	0	0
(C) 1000AI/+NMU	0	0	0	2.6	0	0	11.3	0	0
(D) 2000AI/+NMU	0	0	0	4	0	0	8	0	0
(E) 2000AI/-NMU	0	0	0	9.3	0	0	28.6	2.6	0
(F) -AI/+NMU	1	0	0	8	0	0	18.6	0.6	0



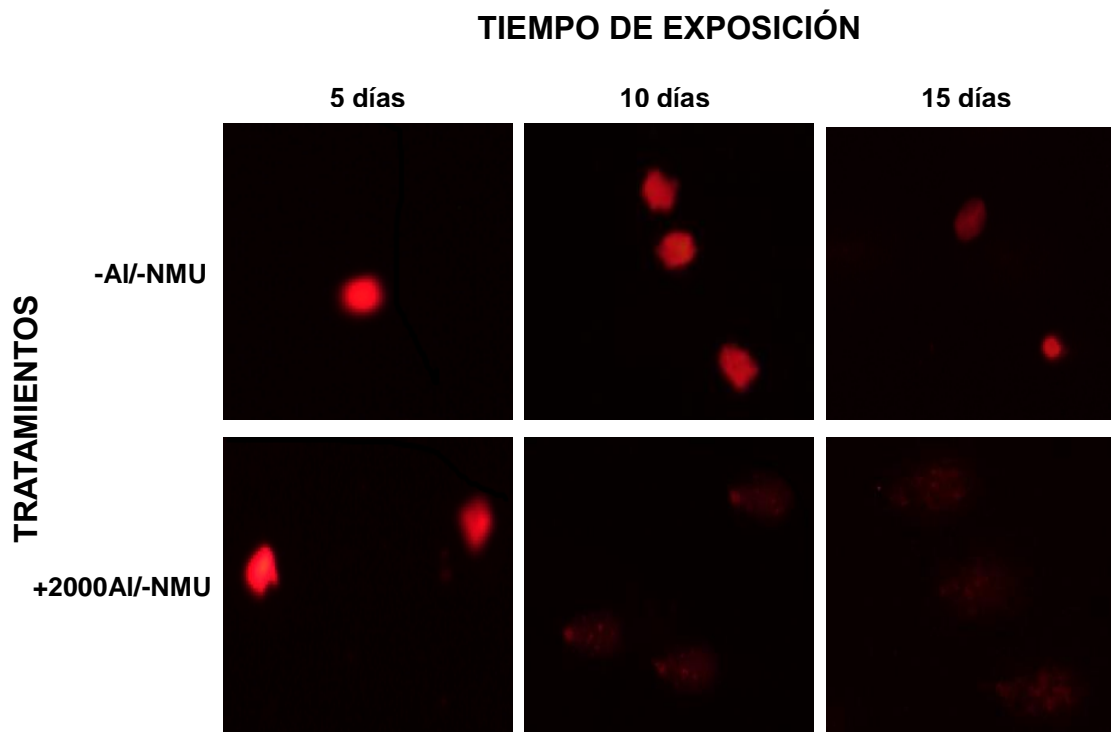
**Figura 18.** Genotoxicidad (1 micronúcleo/eritrocito) causada por los tratamientos experimentales en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición.

Balasubramanyan y col., (2009 a,b), determinaron que nanopartículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  provocan incrementos en la cantidad de micronúcleos hepáticos en ratas hembras Wistar, a las que se les administran las nanopartículas por vía intraperitoneal. También observaron que al aumentar la dosis (500, 1000 y 2000 mg de Al/Kg de peso corporal) aumentó la cantidad de MN, comparadas contra ratas del grupo control y a las que se les administró ciclofosfamida (CFA) como agente genotóxico. Esta genotoxicidad fue corroborada por Klien y Godnić-Cvar (2012).

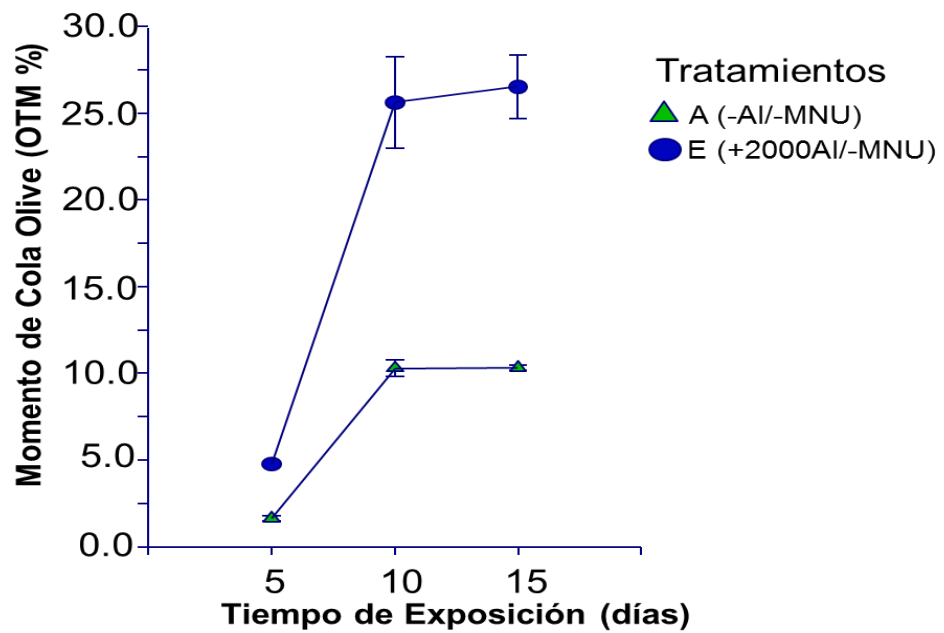
Por otro lado, Türkez y col. (2010, 2011, 2012) evaluaron la genotoxicidad hepática provocada por soluciones de  $\text{AlCl}_3$  en ratas Sprague Dawley. Observaron que dosis subcrónicas de  $\text{AlCl}_3$ , administrada por vía intraperitoneal durante 10 semanas, causó incrementos en la cantidad de micronúcleos y este efecto se pudo revertir utilizando ácido bórico o bórax. Geyikoglu y col. (2012), encontraron que  $\text{AlCl}_3$ , a dosis de 3 mg de Al/Kg de peso corporal, induce genotoxicidad mediante la formación de MN en hepatocitos de ratas Sprague Dawley, cuando el aluminio es administrado por vía intraperitoneal durante 10 semanas. Por su parte, Al-Obaidy y col. (2016) demostraron que soluciones de  $\text{AlCl}_3$  a dosis de 10, 15 y 25 mg de Al/Kg de peso corporal de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) macho, provocó aumentos en la cantidad de micronúcleos en médula ósea, cuando el aluminio se administró por vía intraperitoneal y que la cantidad de micronúcleos es mayor al aumentar la dosis. Aunque hay que aclarar que en algunos trabajos de investigación se ha demostrado que al aumentar la dosis la cantidad de células con MN disminuye, y esta disminución se correlaciona con aumento en la cantidad de células que mueren por apoptosis (Banasik y col., 2005). En el caso del presente trabajo de investigación, las soluciones de  $\text{AlCl}_3$  se administraron por vía intragástrica (Gavage) y el efecto genotóxico es similar al provocado por la administración de soluciones de aluminio por vía intraperitoneal que se reporta en la literatura.

**Ensayo de Electroforesis Alcalina en Células Individuales (Ensayo Cometa).** Los resultados obtenidos de la viabilidad celular evaluada con azul de tripan fue del  $96 \pm 2 \%$ , los cuales son similares a los reportados por otros investigadores (García-Medina y col., 2011; Pereira y col., 2013). Este estudio se realizó a nivel exploratorio para determinar si la genotoxicidad provocada por aluminio (en forma de  $AlCl_3$ ) provoca daño o fragmentación al ADN en leucocitos de sangre de ratas Sprague Dawley. En este sentido solo se utilizaron tres ratas como control negativo (-Al/-MNU) y tres ratas en las que el tratamiento experimental seleccionado fue +2000Al/-MNU.

Este tratamiento experimental ha demostrado que por sí mismo es capaz de provocar proliferación celular intraductal en glándula mamaria, y la mayor cantidad de MN a medida que aumenta el tiempo de exposición. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en las figuras 19 y 20, en donde se observa que en el tratamiento -Al/-MNU (control negativo) no hay daño genotóxico a los 5, 10 y 15 días de exposición. En cambio, en el tratamiento experimental +2000Al/-MNU se puede apreciar que a los cinco días de exposición no hay aparición de cometas y solo se aprecian nucleoides o ADN desenrollado, lo cual es consistente con la nula genotoxicidad que se observa con la formación de micronúcleos a los cinco días de exposición. En cambio a los 10 y 15 días se aprecia claramente la genotoxicidad al encontrar la presencia de cometas. Aunque a los 10 y 15 días de exposición a aluminio no se observan diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ), con respecto al número de cometas y el % OTM, si lo hay para el caso de la formación de nubes, en los que se encontró que por cada 100 cometas detectados, hay 3 y 73 nubes a los 10 y 15 días de exposición a aluminio, respectivamente. Esto significa un mayor efecto genotóxico a los 15 días de exposición el cual es irreversible y mayor aún comparado contra el efecto que ocasiona la exposición a  $H_2O_2$  (Ayala y col., 2004; Stanić y col., 2016).



**Figura 19.** Efecto genotóxico provocado por el tratamiento +2000AI/-MNU en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición, evaluado mediante ensayo cometa.



**Figura 20.** Efecto genotóxico provocado por el tratamiento +2000AI/-MNU en sangre periférica de ratas Sprague Dawley a los 5, 10 y 15 días de exposición, evaluado mediante ensayo cometa, comparado contra el control negativo (-AI/-MNU).



Estudios previos han determinado que el aluminio en forma de lactato de aluminio, administrado por vía intragástrica durante 12 semanas, es capaz de provocar fragmentación del ADN en tejido cerebral de ratas hembra Wistar, cuando el efecto genotóxico es evaluado con electroforesis en gel de agarosa (Kumar y col., 2009). En otros trabajos de investigación se han encontrado correlaciones entre el daño genotóxico que provoca aluminio al aumentar la dosis y el tiempo de exposición, al evaluar el daño provocado por aluminio al ADN de linfocitos humanos mediante ensayo cometa y ensayo de micronúcleos (Lankoff y col., 2006). La ventaja de utilizar el ensayo cometa alcalino, sobre otros métodos in vitro, es que este ensayo es capaz de detectar lesiones o daños al ADN de cadena sencilla o cadena doble, así como roturas en puntos lábiles del ADN de células individuales (Hartmann y col., 2004).

**Ensayo de Expresión Genética Mediante RT-qPCR.** El gen BRCA1 es considerado un marcador genético de cáncer de mama, ya sea porque ha sufrido mutaciones o porque está regulada su expresión por modificación epigenética, y por qué se sobreexpresa cuando hay cáncer de mama (Wu y col., 2010; Li y Greenberg, 2012; Savage y Harkin, 2015). Por otro lado, el producto del gen SCL11a2 ha sido identificado como un gen que codifica para una proteína transportadora de metales divalentes (Jamieson y col., 2005; Mims y Prchal, 2005; Iolascon y col., 2006; Salazar y col., 2008). Recientemente, el producto del gen SCL11a2, la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural (Nramp), se le ha relacionado con el transporte de aluminio en diferentes organismos (Xia y col., 2010; VanDuyn y col., 2013).

Los resultados obtenidos de expresión genética para los genes BRCA1 y SCL11a2 mediante RT-qPCR indican que no existe evidencia experimental que permita establecer que existe expresión de ambos genes, por lo que se puede

inferir que el producto del gen BRCA1 no participa en el mecanismo de reparación de daño al ADN observado en el ensayo cometa. Además, se puede determinar que el producto del gen SCL11a2 no participa en el proceso de transporte de aluminio en ratas Sprague Dawley, bajo las condiciones experimentales propuestas. En este sentido, habrá que utilizar otras aproximaciones de biología molecular para intentar establecer esta relación genética. Resultados similares se han encontrado por otros investigadores en el sentido de que el cadmio, induce fragmentación de ADN y tumorigénesis pero no inducen la expresión de genes como bcl-x ni MT-1 en testículos y próstata de ratas Wistar (Xu y col., 1998). Rodrigues-Peres y col. (2013) han encontrado que no existe inestabilidad de los genes ERBB2, C-MYC, CCND1 cuando se evalúa la correlación entre aluminio e inestabilidad genómica en tejido mamario humano con cáncer y tejido sano.

## CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones analíticas para la validación y estimación de la incertidumbre expandida del método analítico para cuantificar aluminio en tejido de ratas Sprague Dawley, mediante espectroscopía de absorción atómica por flama y horno de grafito.

Se observó que los tratamientos experimentales no afectan el comportamiento dietario de las ratas Sprague Dawley.

El efecto histopatológico de los tratamientos sobre tejido mamario, es de tipo hiperplásico (proliferativo). El aluminio es capaz de inducir proliferación celular intraductal moderada, procesos que podrían ser el inicio de la formación de cáncer mamario en ratas Sprague Dawley.

El aluminio provoca inestabilidad genómica y es el tratamiento experimental +2000Al/-MNU el que produce mayor número de micronúcleos, y mayor número de cometas y nubes en sangre periférica de ratas Sprague Dawley, al aumentar el tiempo de exposición (5, 10 y 15 días).

El producto de BRCA1 no está involucrado en el proceso de reparación de daño al ADN. Así mismo, se infiere que el producto de SCL11a2 no participa en el transporte de Al, bajo las condiciones experimentales propuestas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., Keaton, M.A., Dutta, A. (2013). Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**(3): 1-18. DOI:10.1101/cshperspect.a012914.
- AL-Obaidy, O.R.K., Al-Samarrai, A.S.M., Al-Samarrai, Y.S.Y. (2016). Genotoxicity of aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) on the albino rat *Rattus norvegicus*. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics.* **9**(1):18-24.
- Agrawal, A.K. (2008). Estimation of the uncertainty in chemical measurements, MAPAN-J. Metrol. Soc. India, **23**(4):217-224.
- Al-Ebraheem, A., Farquharson, M.J., Ryan, E. (2009). The evaluations of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. *Applied Radiation and Isotopes.* **67**:470-474.
- Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega. España.
- Ayala M.C, Hernández Y.G, Piñeiro J.C.G, González E.P (2004) Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farm. Bonaerense* **23**(3):277-84.
- Balaram, V., Mathur, R., Satyanarayanan, M., Sawant, S.S., Roy, P., Subramanyam, K.S.V., Kamala, C.T., Anjaiah, K.V., Ramesh, S.L., Dasaram, B. (2012). A rapid method for the determination of gold in rocks, ores and other geological materials by F-AAS and GF-AAS after separation and preconcentration by DIBK extraction for prospecting studies, MAPAN-J. Metrol. Soc. India. **27**(2):87-95.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Misra, S., Hussain, S.M., Grover, P. (2009). Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow. *Mutation Research.* **676**:41-47. DOI:10.1016/j.mrgentox.2009.03.004
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Grover, P. (2009). In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide

nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*. **24**(3):245-251.

Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowski, H., Wojcik, A. (2005) Aluminium-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ. Toxicol.* **20**:402-406.

Basak, S., Mukherjee, S.S., Mandal, S.N., Das, R., Mazumder, A.K., Mondal, J.K., Sammaddar, R., Mondal, S., and Kundu, D. (2010). Interlaboratory proficiency testing: intercomparison in relation to the measurement of alumina, iron (III) oxide and titania present in homogenised china clay, MAPAN-J. Metrol. Soc. India, **25**(4):265-272.

Basak, S., and Kundu, D. (2012). Evaluation of measurement uncertainty in determination of lead in glass materials by a standard complexometric method, MAPAN-J. Metrol. Soc. India, **27**(3):175–182.

Batista, E., Almeida, N., Filipe, E., Alves, J.S. (2009). Comparison of two different approaches in the uncertainty calculation of gravimetric volume calibration XIX IMEKO World Congress Fundamental and Applied Metrology. Lisbon, Portugal.

Bellés, M., Albina, M.L., Sánchez, D.J., Corbella, J., Domingo, J.L. (2001). Effects of oral aluminum on essential trace elements metabolism during pregnancy. *Biological Trace Element Research*. **79**(1): 67-81.

Blair, R.C., Taylor, R.A. (2007). *Biostatistics for Health Science*. 1st ed. Pearson Prentice Hall, New York.

Bobrowska, B., Skrajnowska, D., Tokarz, A. (2011). Effect of Cu supplementation on genomic instability in chemically-induced mammary carcinogenesis in the rat. *J Biomed Sci.* **18**(95):1-5. DOI: 10.1186/1423-0127-18-95.

Bobrowska-Korczak, B., Skrajnowska, D., Tokarz, A. (2012). The effect of dietary zinc - and polyphenols intake on DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *Science*. **19**(43):1-9. DOI: 10.1186/1423-0127-19-43.

Bohrer, D., do Nascimento, P.C., Binotto, R., and Becker, E. J. (2003). Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part II1: Interaction container-chemicals during the heating for sterilization. *Journal of Trace Elem. Med. Biol.* **17**(2):107-115.

- Bohrer, D., Dessuy, M.B., Kaizer, R., do Nascimento, P.C., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Carvalho, L.M., Garcia, S.C. (2008). Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. *Analytical Biochemistry*. **377**:120-127.
- Breckle, C.W. (1991). Growth under heavy metals. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, eds. Plant roots: the hidden half. New York, NY: Marcel Dekker, 351-373.
- Cahill, D.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C. (1999), Genetic instability and darwinian selection in tumours, *Trends Cell Biol*. **9**: M57-M60.
- CENAM-ema. (2008). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica y de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente. pp. 21. México.
- CENAM-ema. (2009). Guía de trazabilidad metrológica de los valores asignados a los calibradores y material de control empleados por el laboratorio clínico. pp. 7-12. México.
- CENAM-ema. (2012). Guía técnica de trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en las mediciones analíticas que emplean la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente. México, D.F.
- CEM Corporation. (2014). MARSxpress 5. Manual operation. Mathews, NC, USA.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. **162**(1):156-159.
- Chou, Y.C., Guzman, R.C., Swanson, S.M., Yang, J., Lu, H.M., Wu, V., Nandi, S. (1999). Induction of mammary carcinomas by *N*-methyl-*N*-nitrosourea in ovariectomized rats treated with epidermal growth factor. *Carcinogenesis*. **20**(4):677-684.
- Christian, G.D. (2009). Química Analítica. Sexta edición. Ed McGraw Hill. pp. 65-113. México.

- Coelho, I., Gueifão, S., Matos, A.S., Roe, M., Castanheira, I. (2013). Experimental approaches for the estimation of uncertainty in analysis of trace inorganic contaminants in foodstuffs by ICPMS. *Food Chem.*, **141**:604-611.
- Correia, L., Soares, M.E., Bastos, M.L. (2006). Validation of an electrothermal atomization atomic absorption spectrometry method for the determination of aluminum, copper, and lead in grapes. *J. Agric. Food Chem.* **54**:9312-9316.
- Cui, J., Roven, H.J. (2010). Recycling of automotive aluminum. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* **20**:2057-2063.
- Darbre, P.D. (2005a). Underarm cosmetics and breast cancer. *J. Appl. Toxicol.* **23**:89-95.
- Darbre, P.D. (2005b). Environmental oestrogens cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **20**:121-143.
- Darbre, P.D. (2005c). Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **99**:1912-1919.
- Darbre, P.D. (2009). Underarm, antiperspirants/deodorants and breast cancer. *Breast Cancer Research.* **11**(suppl3):55. Department of Health and Human Services, USA.
- Department of Health and Human Services. (2008). Division of Toxicology and Environmental Medicine. USA.
- Desjardins, Ph., Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Vis. Exp.* **45** e2565. DOI:10.3791/2565.
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Fernández, M., de Mele. L. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials.* **177**:711-718.
- Diwan, B.A., Kasprzak, K.S., Anderson, L.M. (1997). Promotion of dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary carcinogenesis by iron in female Sprague–Dawley rats. *Carcinogenesis.* **18**(9):1757-1762.
- Douglas, D.N., O'Reilly, J., O'Connor, C., Sharp, B.L. and Goenaga-Infante, H. (2016). Quantitation of the Fe spatial distribution in biological tissue by

- online double isotope dilution analysis with LA-ICP MS: a strategy for estimating measurement uncertainty. *Anal. At. Spectrom.*, **31**:270-279.
- Ehrlich, C. (2014). Terminological aspects of the guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). *Metrologia*. **51**:145-154.
- Ellison, S.L.R. (2014). Implementing measurement uncertainty for analytical chemistry: the Eurachem Guide for measurement uncertainty, *Metrologia*, **51**:199-205.
- Ellsworth, D.L., Ellsworth, R.E., Love, B., Deyarmin, B., Lubert, S.M., Mittal, M.D., Hooke, J.A., Shriver, C.D. (2004a). Outer breast quadrants demonstrate increased levels of genomic instability. *Ann Surg Oncol*. **11**:861-868.
- Ellsworth, D.L., Ellsworth, R.E., Liebman, M.N., Hooke, J.A., Shriver, C.D. (2004b). Genomic instability in histologically normal breast tissues: Implications for carcinogenesis. *Lancet Oncol*. **5**:753-758.
- Entwisle, J. and Hearn, R. (2006). Development of an accurate procedure for the determination of arsenic in fish tissues of marine origin by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*. **61**:438-443.
- Esendagli, G., Canpinar, H., Yilmaz, G., Gunel-Ozcan, A., Oguz-Guc, M., Kansu, E., Guc, D. (2009). Primary tumor cells obtained from MNU-induced mammary carcinomas show immune heterogeneity which can be modulated by low-efficiency transfection of CD40L gene. *Cancer Biology & Therapy*, **8**(2):136-142. DOI: 10.4161/cbt.8.2.7078.
- EURACHEM/CITAC Guide CG 4. (2012). Quantifying uncertainty in analytical measurement. Editor Ellison, S.L.R. and Williams, A. Third edition, United Kingdom. pp. 1-113.
- European Medicines Agency. (2009). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). Recommendation on the evaluation of the benefit-risk balance of veterinary medicinal products. London, UK.
- Farina, M., Lara, F.S., Brandão, R., Jacques, R., Rocha, J.B.T. (2002). Effects of aluminum sulfate on erythropoiesis in rats. *Toxicology Letters*. **132**:131-139.



- Farrance, I., Frenkel, R. (2012). Uncertainty of measurement: a review of the rules for calculating uncertainty components through functional relationships. *Clin. Biochem. Rev.* **33**:49-75.
- Faustino, M.G., Marques, J.R., Monteiro, L.R., Stellato, T.B., Soares, S.M.V., Silva, T.B.S., da Silva, D.B., Pires, M.A.F., Cotrim, M.E.B. (2015). Uncertainty estimation in the determination of metals in superficial water by ICP-OES, 8th Brazilian Congress on Metrology, Bento Gonçalves/RS.
- Faustino-Rocha, A.I., Silva, A., Gabriel, J., Teixeira-Guedes, C.I., Lopes, C., Gil da Costa, R., Gama, A., Ferreira, R., Oliveira, P.A., Ginja, M. (2013). Ultrasonographic, thermographic and histologic evaluation of MNU-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* **67**:771-776.
- Food and Drug Administration. (2014). CFR - Code of Federal Regulations Title 21, Chapter I, Subchapter E, Part 511. Revised as of April 1. Silver Spring, MD, US.
- Forte, G., and Bocca, B. (2007). Quantification of cadmium and lead in offal by SF-ICP-MS: Method development and uncertainty estimate, *Food Chem.*, **105**:1591-1598.
- Frazzoli, C. and Bocca, B. (2008). Validation, uncertainty estimation and application of a sector field ICP MS-based method for As, Cd and Pb in cow's milk and infant formulas, *Microchim. Acta.* **162**:43-50.
- Gates, K., Chang, N., Dilek, I., Jian, H., Pogue, S. and Sreenivasan, U. (2009). The uncertainty of reference standards-A guide to understanding factors impacting uncertainty, uncertainty calculations, and vendor certifications. *J. Anal. Toxicol.* **33**:532-539.
- González, A.G., and Herrador, M.A. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry.* **26**(3):227-238.
- International Organization for Standardization. (1994). ISO 5725-2. Part 2.
- International Organization for Standardization. (2005). ISO/IEC, 17025:2005.
- García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martinez, M., Cortéz-Barberena, E., Gómez-Oliván, L.M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes

of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* **153**:113-118.

- García-Rodríguez, N., Díaz de la Loza, M.C., Andreson, B., Monje-Casas, F., Rothstein, R., Wellinger, R.E. (2012). Impaired manganese metabolism causes mitotic misregulation. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(22):18717-18729.
- Gaustad, G., Olivetti, E., Kirchainb, R. (2012). Improving aluminum recycling: A survey of sorting and impurity removal technologies. *Resources, Conservation and Recycling*. **58**:79-87.
- Geraki, K., Farquharson, M.J., Bradley, D.A. (2002). Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF Study. *Phys. Med. Biol.* **47**: 2327-2339.
- Geyikoglu, F., Türkez, H., Bakir, T.O. and Cicek M. (2012). The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. *Toxicology and Industrial Health*. **29**(9):780-791.
- Gil, L.A.F., da Cunha, C.E.P., Gustavo, M.S.G., Salvarani, M.F.M., Ronnie, A., Lobato, A.F.C., Mendonça, M., Dellagostin, O. A., Conceição, F. R. (2013). Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D. *PLOS ONE* **8**(7):e69692.
- Gómez-Álvarez, A. (2004). Manual de métodos analíticos para rocas y minerales. pp. 21- 25. Editorial Universidad de Sonora.
- Goss, P.E., Strasser-Weipp, K., Qi, S., Hu, H. (2007). Effects of liarozole fumarate (R85246) in combination with tamoxifen on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary carcinoma and uterus in the rat model. *BMC Cancer*. **7**:26. DOI:10.1186/1471-2407-7-26
- Greger, J.L., Bula, E.N., Gum, E.T. (1985). Mineral metabolism of rats fed moderate levels of various aluminum compounds for short periods of time. *J Nutr.* **115**:1708-1716.
- Guillino, P., Pettigrew, H. and Grantham, F.N. (1975). Nitrosomethylurea is a mammary gland carcinogen in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**:401-414.
- Güven, E., Duus, K., Laursen, I., Højrup, P., Houen, G. (2013). Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways

- with major involvement of the alternative pathway. *PLOS ONE*. **8**(9):e74445.
- Hall, B.D. (2008). Evaluating methods of calculating measurement uncertainty, *Metrologia*, **45**:5-8.
- Hartmann, A., Schumacher M., Plappert-Helbig U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*. **19**:51-59.
- Harvey, D. (2002). Química Analítica. Cuarta edición. Ed. McGraw Hill. pp 30-33. México.
- Hatayama, H., Daigob, I., Matsuno, Y., Adachi, Y. (2012). Evolution of aluminum recycling initiated by the introduction of next-generation vehicles and scrap sorting technology. *Resources, Conservation and Recycling*. **66**:8-14.
- Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Ono, A., Hirose, A., Toshio Imai, T., Ogawa, K., Ema, M., Nishikawa, A. (2011). Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reproductive Toxicology*. **31**:219-230.
- Hoyle, G. (1995). Recycling opportunities in the UK for aluminium-bodied motor cars. *Resources, Conservation and Recycling*. **15**:181-191.
- Hubaux, R., Becker-Santos, D.D., Enfield, K.S.S., Lam, R.D.E, Lam, W.L., Martinez, V.D. (2013). Molecular features in arsenic-induced lung tumors. *Molecular Cancer*. **12**(20):1-11.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2017). World Health Organization. Some Chemicals Used as Solvents and in Polymer Manufacture IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. vol. 110.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2012). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. México, DF.
- ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO Guide 99. (2007) International vocabulary of metrology. Basic and general concepts and associated terms (IVM).

- Iolascon, A., d'Apolito, M., Servedio, V., Cimmino, F., Piga, A., Camaschella, C. (2006). Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in *DMT1 (SCL11A2)*. *BLOOD*. **107**(1):349-354.
- IUPAC. (1999). Harmonized Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. *Pure and Appl. Chem.* **71**:337-348.
- IUPAC (2002). Technical Report by Thompson, M., Ellison, S.L.R y Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* **74**(5):835-855.
- Iyengar, V. (2007). Metrology in physics, chemistry, and biology differing perceptions. *Biol. Trace Elem. Res.* **116**:1-4.
- Jacobsprotocol.[http://www.openwetware.org/wiki/Jacobs:Protocol\\_RNA\\_Agarose\\_Gel](http://www.openwetware.org/wiki/Jacobs:Protocol_RNA_Agarose_Gel). Modified 02/28/2017.
- Jamieson, S.E., White, JK., Howson, J.M., Pask, R., Smith, A.N., Brayne, C., Evans, J.G., Xuereb, J., Cairns, N.J., Rubinsztein, D.C., Blackwell, J.M. (2005). Candidate gene association study of solute carrier family 11a members 1 (*SLC11A1*) and 2 (*SLC11A2*) genes in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. **374**:124-128.
- Kayal, N., Singh, N., Ojha, V.N. and Gupta, P.K. (2009). Evaluation and expression of uncertainty in the determination of alumina in deodorants using complexometric method. *J. Test. Eval.* **37**(4):1-8.
- Klien, K. and Godnić-Cvar, J. (2012). Genotoxicity of metals nanoparticules: focus on *in vivo* studies. *Arh Hig Rada Toksikol.* **63**:133-145. DOI: 10.2478/10004-1254-63-2012-2213
- Klug, W.S., Cummings, M.R. (1999). *Conceptos de Genética*. Editorial Prentice Hall. Quinta edición. España.
- Knaul, F.M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., Frenk, J. (2009). Breast cancer in Mexico an urgent priority. *Salud Pública de México*. Suppl. **2**:S335-S344.
- Krishnan, P., Yan, K.J., Windler, D., Tubbs, J., Grand, R., Li, B.D.L., Aldaz, C.M., McLarty, J., Kleiner-Hancock, H.E. (2009). Citrus auraptene suppresses cyclin D1 and significantly delays N-methyl nitrosourea induced mammary

- carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *BMC Cancer*. **9**:259. DOI:10.1186/1471-2407-9-259
- Kohara, I., Tomoda, H., Watanabe, S. (2007). New water-soluble metal working fluids additives from phosphonic acid derivatives for aluminum alloy materials. *J.Oleo Sci*. **56**:(10) 527-532.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau V. (2007). Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. **10**(Suppl1):1-269. DOI:10.1080/10937400701597766
- Krouwer, J.S. (2003). Point Critique of the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement Method of Estimating and Reporting Uncertainty in Diagnostic Assays Clinical. *Chemistry* **49**(11):1818-1821.
- Kumar, V., Bal, A., Dip Gill, K. (2009). Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology*. **264**:137-144.
- Kuo, H.W., Chen, H.F., Wu, C.C., Chen, D.R., Lee, J.H. (2002). Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biological Trace Elements Research*. **89**(1):1-11. DOI: 10.1385/BTER:89:1:1
- Lambert, V., Boukhari, R., Nacher, M., Goullé, J.P., Roudier, E., Elguindi, W., Laquerrière, A., Carles, G. (2010). Plasma and Urinary Aluminum Concentrations in Severely Anemic Geophagous Pregnant Women in the Bas Maroni Region of French Guiana: A Case-Control Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**(5):1100-1105.
- Lankoff, A., Banasik, A., Duma, A., Ochniak, E., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Wojcik, A. (2006). A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Letter*. **161**:27-36.
- Lee, W.M., Lua, S., Medlineb, A., Michael, C., Archer, M.C. (2001). Susceptibility of lean and obese Zucker rats to tumorigenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Letters*. **162**:155-160.
- Lee, R., Woo, W., Wu, B., Kummer, A., Duminy, H., Xu, Z. (2003). Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is

accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein. *Experimental Biology and Medicine*. **228**:689-696.

Lee, S., Simpson, M., Nimmo, M., Xu, Z. (2004). Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague Dawley rats. *Carcinogenesis*. **25**(10):1879-1885. DOI:10.1093/carcin/bgh214

Li, M.L. and Greenberg, R.A. (2012). Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. *Trends Biochem Sci*. **37**(10):418-424. DOI:10.1016/j.tibs.2012.06.007

Liang, D., Steinert, C., Bammesberger, S., Tanguy, L., Ernst, A., Zengerleand, R., and Koltay, P. (2013). Novel gravimetric measurement technique for quantitative volume calibration in the submicroliter range. *Meas. Sci. Technol*. **24**(2):025301.

Lipworth, L. (1995). Epidemiology of breast cáncer. *Eur J cancer prev*. **4**:7-30.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, K.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnel, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. España.

López, F.F., Cabrera, C., Lorenzo, M.L., López, M.C. (2002). Aluminium content of drinking waters, fruit juices and soft drinks:contribution to dietary intake. *The Science of the Total Environment*. **292**:205–213.

Lorefice, S. (2009). Traceability and uncertainty analysis in volume measurements. *Measurement*. **42**(10):1510-1515.

Mahieu, S., Contini, M.C., González, M., Millen, N. (2009). Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney. *Toxicology Letters*. **190**:9-15.

Mestek, O., Kominkova, J., Koplík, R. and Suchanek, M. (2001). Determination of zinc in plant samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, **54**:927-934.

Mestek, O., Kominkova, J., Koplík, R., Borkova, M. and Suchanek, M. (2002). Quantification of copper and zinc species fractions in legume seeds extracts by SEC/ICP-MS: validation and uncertainty estimation, *Talanta*, **57**:1133-1142.

- Meyer, V.R. (2003). Measurement uncertainty of liquid chromatographic analyses visualized by Ishikawa diagrams, *J. Chromatogr. Sci.*, **41**:439-443.
- Miki, Y., Swenson, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Taytigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarium cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. **266**:66-71.
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta edición. Ed. Pearson Prentice Hall. pp. 21-41. España.
- Mims, M.P. and Prchal, J.T. (2005). Divalent metal transporter 1. *Hematology*. **10**(4):339-345. DOI: 10.1080/10245330500093419.
- Mishra, A., Bhalla, S.R., Rawat, S., Vansal, B., Sehgal, R., and Kumar, S. (2007). Standardization and validation of a new atomic absorption spectroscopy technique for determination and quantitation of Aluminium adjuvant in immunobiologicals. *Biologicals*. **35**(4):277-284.
- Mughal, A., Vikram, A., Ramarao, P., Jena, G.B. (2010). Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutation Research*. **700**:86-94. DOI:10.1016/j.mrgentox.2010.05.014.
- Nayak, P., Chatterjee, A.K. (2001). Differential responses of certain brain phosphoesterases to aluminium in dietary protein adequacy and inadequacy. *Food and Chemical Toxicology*. **39**:587-592.
- Neiva, T.J., Benedetti, A.L., Tanaka, S.M., Santos, J.I., D'Amico, E.A. (2002). Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. *Braz J Med Biol Res* **35**(3):345-350.
- Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:730-750.
- Norma Mexicana. (2001). NMX-AA-115-SCFI-2001. Análisis de Agua - Criterios Generales para el Control de la Calidad de Resultados Analíticos.
- Norma Mexicana. (2001). NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

- Norma Oficial Mexicana. (1995). NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
- Norma Oficial Mexicana. (1999). NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Novo, V.F.J. (2007). Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la Biomedicina. Ed. Pearson Prentice Hall. España.
- Nowak, M.A., Komarova, N.L., Sengupta, A., Jallepalli, P.V. Shih, I.M., Vogelstein, B., Lengauer, C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:16226-16231.
- NTC-ISO/IEC-17025:2005.
- Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., Clària, J. (2008). Genética Médica. Días de Santos Ediciones. España.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Cáncer de mama: Prevención y control. OMS: Carga Mundial de Morbilidad, 2008.
- Organización Panamericana de Salud. (2013). Temas de salud: el cáncer en las Américas.
- Olive, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat Res.* **122**(1):86-94.
- Oogoshi, K., Yanagi, S., Moriyama, T., Arachi, H. (1994). Accumulation of aluminum in cancers of the liver, stomach, duodenum and mammary glands of rats. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **8**(1):27-31.
- Patriarca, M., Castelli, M., Corsetti, F. and Menditto, A. (2004). Estimate of uncertainty of measurement from a single-laboratory validation study: application to the determination of lead in blood, *Clin. Chem.*, **50**(8):1396-1405.
- Percy, M.E., Kruck, T.P.A., Pogue, A.I., W.J. (2011). Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* **105**(11):1505–1512.



- Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C. (2013). Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. *Mutation Research*. **750**:19-26.
- Perkin Elmer. (2012). Manual de operación de equipo de espectroscopia de absorción atómica modelo AAnalyst 400.
- Perkin Elmer (2014) Manual operation of equipment microwave furnace model TITAN MPS.
- Perše, M., Cerar, A., Injac, R., Štrukelj, B. (2009). N-methylnitrosourea induced breast cancer in rat, the histopathology of the resulting tumours and its drawbacks as a model. *Pathol. Oncol. Res.* **15**:115-121. DOI 10.1007/s12253-008-9117-x.
- Pikor, L., Thu, K., Vucic, E., Lam, W. (2013). The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **32**:341-352.
- Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Nebert, D.W. (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sci.* **102**(2):207-18.
- Psoma, A.K., Pasiadis, I.N., Rousis, N.I., Barkonikos, K.A. and Thomaidis, N.S. (2014). Development, validation and accreditation of a method for the determination of Pb, Cd, Cu and As in seafood and fish feed samples, *Food Chem.*, **151**:72-78.
- Rahim, F., Jalali, A., Tangestani, R. (2013). Breast cancer frequency and exposure to cadmium: A meta- analysis and systematic. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* **14**(7):4283-4287.
- Rajmani, R.S., Doley, J., Singh, P.K., Kumar, R., Barathidasan, R., Kumar, P., Verma, P.C., Tiwari, A.K. (2011). Induction of mammary gland tumour in rats using N-methyl-N-nitroso urea and their histopathology. *Indian J. Vet. Pathol.* **35**(2):142-146.
- Read, A., Donnai, D. (2007). Nueva Genética Clínica. Editorial Omega. España.
- Rees, S.L., Panesar, S., Steiner, M., Fleming, A.S. (2006). The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on induction of maternal behavior in the virgin female rat. *Hormones and Behavior* **49**:337-345. DOI:10.1016/j.yhbeh.2005.08.012.

- Rodrigues-Peres, R.M., Cadore, S., Febraio, S., Heinrich, J.K., Serra, K.P., Derchain, S.F.M., Vassallo, J., Sarian, L.O. (2013). Tissue Aluminum Concentration Does Not Affect the Genomic Stability of ERBB2, C-MYC, and CCND1 Genes in Breast Cancer. *Biol Trace Elem Res.* **154**:345-351. DOI 10.1007/s12011-013-9751-3.
- Ruiz-Morer, R. (2006). Recomendaciones para la Calibración de Material Volumétrico en el Laboratorio Clínico. *Química Clínica.* **25**(2):104-110.
- Salazar, J., Mena, N., Hunot, S., Prigent, A., Alvarez-Fischer, D., Arredondo, M., Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Zhao, L., Garrick, L.M., Nuñez, M.T., Garrick, M.D., Raisman-Vozaria, R., Hirsch, E.C. (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *PNAS.* **105**(47):18578-18583. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804373105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804373105).
- Santana, L.V., Sarkis, J.E.S., Azevedo, J.S., Ulrich, J.C. and Hortellani, M.A. (2011). Estimate of uncertainty of measurement in the determination of Zn, Cu, Hg and Pb in fish muscle, International Nuclear Atlantic Conference-INAC.
- Santana, L.V., Sarkis, J.E.S., Ulrich, J.C. and Hortellani, M.A. (2015). Estimation of uncertainty of a reference material for proficiency testing for the determination of total mercury in fish in nature, J. Phys. Conf. Ser., **575**:012041.
- Savage, K.I. and Harkin, D.P. (2015). BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS Journal.* **282**:630-646. DOI:10.1111/febs.13150.
- Senila, M., Drolc, A., Pintar, A., Senila, L. and Levei, E. (2014). Validation and measurement uncertainty evaluation of the ICP-OES method for the multi-elemental determination of essential and nonessential elements from medicinal plants and their aqueous extracts, J. Anal. Sci. Technol., **5**(37):1-9.
- Sharma, R., Kline, R.P., Ed, X., Wu, E.X., Katz, J.K. (2005) Rapid *in vivo* Taxotere quantitative chemosensitivity response by 4.23 Tesla sodium MRI and histo-immunostaining features in N-Methyl-N-Nitrosourea induced breast tumors in rats. *Cancer Cell International.* **5**(26):1-20. DOI:10.1186/1475-2867-5-26.

- Shinzato, M.C., Hypolito, R. (2005). Solid waste from aluminum recycling process: characterization and reuse of its economically valuable constituents. *Waste Management*. **25**:37-46.
- Silva-Martínez, S., López-Benítez, W., Álvarez-Gallegos, A.A., Sebastián, P.J. (2005). Recycling of aluminum to produce green energy. *Solar Energy Materials and Solar Cells*. **88**:237-243.
- Silva, M.P., Soave, D.F., Riberiro-Silva, A., Poletti, M.E. (2012). Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Research Notes*. **5**:194-204.
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephensen, R.E., Schneider, E. (1991). A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res*. **252**:289-296.
- Singh, Y.P., Nijhawan, S.K., Singhal, R.P., Axena, A.K.S. and Rao, S.U.M. (2004). Interlaboratory proficiency testing: thermocouple intercomparison-2001/02, *MAPAN-J. Metrol. Soc. India*. **19**(3):177-184.
- Soares, M.E., Pereira, J.A., and Bastos, M.L. (2006). Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations *J. Agric. Food Chem*. **54**:3923.
- Stanić D, Plećaš-Solarović B, Petrović J, Bogavac-Stanojević N, Sopić M, Kotur-Stevuljević J, Ignjatović S, Pešić V (2016) Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in peripheral blood lymphocytes from rats chronically treated with corticosterone: The protective effect of oxytocin treatment. *Chemico Biological Interactions*. 256:134-141.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.006>
- Storchova, Z., Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**:45-54.
- Strachan, T., Read, A.P. (2006). *Genética Humana*. Editorial Mc Graw-Hill. Tercera edición. México.
- Sudbery, P. (2004). *Genética Molecular Humana*. Editorial Pearson Prentice Hall. Segunda edición. España.

- Tchounwou, P.B., Yedjoum, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *EXS*. **101**:133-164.
- Theodorsson, E. (2012). Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*. **4**(3):305-320.
- Thompson, H.J., Singh, M., McGinley, J. (2000). Classification of Premalignant and malignant lesions developing in the rat mammary gland after injection of sexually immature rats with 1-Methyl 1 Nitrosourea. *J Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **5**(2):201-210.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). IUPAC Technical Report. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem*. **74**(5):835-855.
- Türkez, H., Yousef, M.I., Geyikoglu, F. (2010). Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*. **48**:2741-2746. DOI:10.1016/j.fct.2010.06.049.
- Türkez, H, Geyikoglu, F., Colak, S. (2011). The protective effect of boric acid on aluminum induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. *Turkish Journal of Biology*. **35**:293-301. DOI:10.3906/biy-0902-11
- Türkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A. (2012). Borax counteracts genotoxicity of aluminum in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*. **29**(9):775-779. DOI: 10.1177/0748233712442739
- Valcan, A. (2013). Evaluation of the uncertainty of measurement. *Glob. J. Sci. Front. Res. Chem*. **13**(6):1-6.
- Vanduyn, N., Settivari, R., LeVora, J., Zhou, S., Unrine, J., Nass, R. (2013). The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. *J. Neurochem*. **124**(1):147-157. DOI:10.1111/jnc.12072
- Van Loon, J.C. (1985). Selected Methods of Trace Metal Analysis: Biological and Environmental Samples. Chemical Analysis. A series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications. Ed. John Wiley & Sons. First edition. **80**:53-76.
- Vegh, I., Enríquez de Salamanca, R. (2007). Prolactin, TNF alpha and nitric oxide expression in nitroso-N-methylurea-induced-mammary tumours. *Journal of Carcinogenesis*. **6**(18):1-8. DOI:10.1186/1477-3163-6-18

- Vesper, H.W. and Thienpont, L.M. (2009). Traceability in laboratory medicine, *Clin. Chem.* **55**(6):1067-1075.
- Vittori, D., Nesse, A., Pérez, G., Garbossa, G. (1999) Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **76**:113-120.
- Verran, G.O., Kurzawa, U. (2008). An experimental study of aluminum can recycling using fusion in induction furnace. *Resources, Conservation and Recycling.* **52**:731-736.
- Walton, J.R. (2007). A longitudinal study of rats chronically exposed to aluminum at human dietary levels. *Neuroscience Letters.* **412**:29-33.
- Walton, J.R. (2012). Cognitive deterioration and associated pathology induced by chronic low-level aluminum ingestion in a translational rat model provides an explanation of Alzheimer's disease, tests for susceptibility and avenues for treatment. *International Journal of Alzheimer's Disease.* **2012**(ID 914947):1-17.
- Wang, N., She, Y., Zhu, Y., Zhao, H., Shao, B., Sun, H., Hu, C., Li, Y. (2012). Effects of subchronic aluminum exposure on the reproductive function in female rats. *Biol Trace Elem Res.* **145**:382-387 DOI 10.1007/s12011-011-9200-0
- Wang, Y., Cheng, M., Zhang, B., Nie, F., Jiang, H. (2013). Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLOS ONE.* **8**(3):1-8 e58659. DOI:10.1371/journal.pone.0058659
- Wu, J., Lu, L.Y., Yu, X. (2010). The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell.* **1**(2):117-123. DOI 10.1007/s13238-010-0010-5
- Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., Ma, J.F. (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *PNAS.* **107**(43):18381-18385. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004949107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004949107)
- Xu, G., Zhou, G., Jin, T., Zhou, T., Hammarström, S., Bergh, A., Nordberg, G. (1998). Apoptosis and p53 gene expression in male reproductive tissues of cadmium exposed rats. *BioMetals.* **12**:131-139.

- Yamamoto, S., Tomoda, H., Watanabe, S. (2007). Water-Soluble Metal Working Fluids Additives Derived from the Esters of Acid Anhydrides with Higher Alcohols for Aluminum Alloy Materials. *J.Oleo Sci.* **56**:(9) 463-469.
- Yenisoy-Karakas, S. (2012). Estimation of uncertainties of the method to determine the concentrations of Cd, Cu, Fe, Pb, Sn and Zn in tomato paste samples analysed by high resolution ICP-MS, *Food Chem.*, **132**:1555-1561.
- Yoshimura, H.N., Abreu, A.P., Molisani, A.L., de Camargo, A.C., Portela, J.C.S., Narita, N.E. (2008). Evaluation of aluminum dross waste as raw material for refractories. *Ceramics International.* **34**:581–591.
- Yokel, R.A., Hicks, C.L., Florence, R.L. (2008). Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese. *Food Chem Toxicol.* **46**(6): 2261-2266.
- Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A., Ishikawa, A. (2009). Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **103**:1579-1584.
- Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Lv, R., Song, T. (2013). Extremely low-frequency magnetic exposure appears to have no effect on pathogenesis of Alzheimer's disease in aluminum-overloaded rat. *PLOS ONE.* **8**(8):e71087.
- Zhu, Y., Han, Y., Zhao, H., Li, J., Hu, Ch., Li, Y., Zhang, Z. (2013). Suppressive effect of accumulated aluminum trichloride on the hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in rats. *Food and Chemical Toxicology.* **51**:210-214.

## AN EXOS

Anexo 1.1.- Calibración de balanza analítica con masa de 0.2 g.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0.1997	0.1998	0.1998
2	0.1996	0.1997	0.1997
3	0.1995	0.1998	0.1996
4	0.1996	0.1997	0.1996
5	0.1995	0.1997	0.1997
6	0.1996	0.1998	0.1998
7	0.1996	0.1996	0.1995
8	0.1997	0.1997	0.1997
9	0.1960	0.1998	0.1997
10	0.1996	0.1998	0.1996
Promedio	0.9924	0.1997	0.1997
Desv Est	0.0011	6.99206E-05	9.48683E-05

Anexo 1.2.- Calibración de balanza analítica con masa de 0.5 g.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0.4990	0.4990	0.4991
2	0.4987	0.4991	0.4993
3	0.4989	0.4992	0.4992
4	0.4989	0.4990	0.4993
5	0.4989	0.4988	0.4992
6	0.4989	0.4990	0.4993
7	0.4990	0.4991	0.4992
8	0.4989	0.4992	0.4991
9	0.4989	0.4990	0.4991
10	0.4990	0.4990	0.4991
Promedio	0.4989	0.4990	0.4992
Desv Est	8.75595E-05	0.0001	8.75595E-05

Anexo 1.3.- Calibración de balanza analítica con masa de 1.0 g.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0.9978	0.9979	0.9981
2	0.9978	0.9982	0.9982
3	0.9979	0.9982	0.9982
4	0.9978	0.9983	0.9982
5	0.9977	0.9981	0.9982
6	0.9975	0.9980	0.9983
7	0.9977	0.9981	0.9983
8	0.9977	0.9982	0.9984
9	0.9976	0.9981	0.9982
10	0.9978	0.9981	0.9981
Promedio	0.9977	0.9981	0.9982
Desv Est	0.0001	0.0001	9.18937E-05

Anexo 1.4.- Calibración de balanza analítica con masa de 100.0 g.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	99.9724	99.9726	99.9728
2	99.9723	99.9726	99.9731
3	99.9720	99.9725	99.9728
4	99.9721	99.9726	99.9731
5	99.9720	99.9725	99.9732
6	99.9721	99.9724	99.9731
7	99.9723	99.9723	99.9731
8	99.9721	99.9725	99.9733
9	99.9719	99.9725	99.9734
10	99.9720	99.9725	99.9733
Promedio	99.9721	99.9725	99.9731
Desv Est	00.0001	9.42809E-05	00.0018



Anexo 1.5.- Calibración de micropipeta de 0.5 mL.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0.4950	0.4952	0.4954
2	0.4930	0.4953	0.4958
3	0.4940	0.4953	0.4961
4	0.4965	0.4952	0.4959
5	0.4940	0.4953	0.4976
6	0.4935	0.4954	0.4912
7	0.4915	0.4954	0.4891
8	0.4930	0.4954	0.4992
9	0.4954	0.4953	0.4991
10	0.4938	0.4953	0.4990
Promedio	0.4939	0.4953	0.4958
Desv Est	0.0014	7.37865E-05	0.0033

Anexo 1.6.- Calibración de micropipeta de 1.0 mL.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0.9850	0.9916	0.9920
2	0.9841	0.9918	0.9922
3	0.9856	0.9916	0.9919
4	0.9859	0.9917	0.9921
5	0.9896	0.9918	0.9919
6	0.9882	0.9916	0.9914
7	0.9877	0.9917	0.9922
8	0.9908	0.9918	0.9922
9	0.9921	0.9920	0.9923
10	0.9910	0.9918	0.9919
Promedio	0.9880	0.9917	0.9920
Desv Est	0.0028	0.0001	0.0002

Anexo 1.7.- Calibración de pipeta volumétrica de 2.0 mL.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	1.9476	1.9518	1.9614
2	1.9681	1.9601	1.9586
3	1.9489	1.9546	1.9591
4	1.9754	1.9523	1.9612
5	1.9462	1.9524	1.9609
6	1.9368	1.9518	1.9582
7	1.9671	1.9521	1.9595
8	1.9407	1.9533	1.9601
9	1.9490	1.9538	1.9623
10	1.9613	1.9602	1.9613
Promedio	1.9541	1.9542	1.9602
Desv Est	0.0129	0.0032	0.0013

Anexo 1.8.- Calibración de pipeta volumétrica de 5.0 mL.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	4.9857	4.9814	4.9914
2	5.0139	4.9902	4.9923
3	4.9764	4.9921	4.9996
4	4.9775	4.9919	4.9891
5	4.9844	4.9876	4.9914
6	5.0280	4.9881	4.9916
7	4.9771	4.9912	4.9918
8	5.0548	4.9902	4.9896
9	5.0064	4.9879	4.9921
10	5.0032	4.9901	4.9919
Promedio	5.0007	4.9890	4.9921
Desv Est	0.0259	0.0031	0.0028

Anexo 1.9.- Calibración de matraz volumétrico de 100.0 mL.

Medición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	99.7473	99.7612	99.8214
2	99.2629	99.8116	99.8310
3	99.2968	99.8214	99.8256
4	99.3649	99.8120	99.8276
5	99.4772	99.8201	99.8301
6	99.3750	99.8176	99.8266
7	99.4223	99.8215	99.8314
8	99.5879	99.8168	99.8296
9	99.7886	99.8221	99.8301
10	99.8975	99.8214	99.8279
Promedio	99.5220	99.8125	99.8281
Desv Est	00.2219	00.0184	00.0030