



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ EL VANADIO COMO ANTINEOPLÁSICO EN EL
ADENOCARCINOMA PULMONAR. ESTUDIO *IN VITRO* ”.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN. C. GABRIELA GUERRERO PALOMO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CD. MX., MARZO 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado de Ciencias Biomédicas por brindarme la oportunidad de crecer tanto en lo profesional como en lo personal, esperando en un futuro poder retribuir a las nuevas generaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 371305/ Becario 243307) durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Comité Tutor asignado; Dra. Erika Patricia Rendón Huerta y Dra. Ana María Salazar Martínez, por sus valiosas aportaciones para desarrollar, mejorar y concluir este proyecto.

A mi Directora de Tesis la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes, por el apoyo brindado, por creer en mí y por estar al pendiente. Muchas gracias.

DEDICADO A...

Rosa María†:

Quiero confesarte que no había querido hacer mi examen de grado, lo postergue mucho, incluso se presentaban situaciones que no lo permitían, aunque la mayor razón es que no estarás en la forma que lo deseo cada día.

Estaba enojada con la ciencia y la investigación que no evitaron que el cáncer te ganará la batalla, pero comprendí que rendir tributo a la vida era la mejor opción, hoy estoy aquí para luchar desde la labor social, desde la calidad humana, desde mis pequeñas colaboraciones y aportaciones científicas. Quiero continuar haciendo lo que más me gusta, eso que te hacía sentirte orgullosa de mí.

Eres, fuiste y serás uno de los pilares más fuertes e importantes de mi vida, eras una mujer trabajadora, honesta, buena, generosa, sensible, estabas hecha de una sola pieza, sin duda eras ejemplar.

Gracias por enseñarme de principios y valores, de arte y cultura, pero también por todos los momentos de diversión, por dejar que tu hogar fuera una casa de muñecas, gracias por regalarme la ilusión de esperar a Santa Claus y la emoción de salir a buscar al conejo de Pascua. Gracias por ser mi cómplice, mi amiga y mi confidente.

Gracias por que siempre viste por mí, me cuidaste, me enseñaste tanto, hasta cuando te fuiste tuve que aprender a como estar sin ti, estoy segura que esa fue la última lección que me enseñaste, pero también la más difícil y dolorosa. Te extraño demasiado y lo que me reste de vida te voy a necesitar.

Soy afortunada, siempre te expresé y te demostré mi gratitud, mi admiración, mi respeto y sobre todo el gran amor que construimos a lo largo de los años.

Para mí siempre serás una mamá en envoltura de tía.

Te amo con todo mi corazón

Martha: TE AMO es solo el resumen de todo lo que siento por ti; que es tan grande, invaluable, indescriptible, inagotable e inquebrantable. **Mami** siempre has sido ejemplar, eres una increíble guía, me enseñas que todo lo puedo, gracias por dejarme decidir en cualquier aspecto de la vida aunque no coincidiera con tú ideología.

Gracias por cada sacrificio, por esforzarte tanto para sacarnos adelante, por enseñarme de la responsabilidad, la dedicación y el compromiso. Te pido perdón por cada ocasión que te fallé, que te hice enojar, por cada discusión, por todas aquellas veces donde te respondí mal, incluso perdóname si te he ofendido.

Lamento no destacar en muchos ámbitos pero ten por seguro que cada día trabajo para ser la mejor versión de mí, siendo mi propia competencia como me inculcaste.

Infinitamente gracias por sumarte a mi aventura, por el apoyo incondicional, por cada platica referente a este proyecto donde me dedicabas toda la atención posible, aunque no tuvieras idea o no me entendieras de lo que te hablaba.

Gracias por los clásicos e interminables: “ya vete a dormir”, “ya comiste”, “deberías descansar un poco”, entre otras tantas frases conocidas pero que se convierten en únicas cuando las pronuncias.

Gracias por ser mi soporte, por las risas, por secar lágrimas de felicidad o frustración, por los abrazos, por todo tú amor, por ser mi refugio y mi fortaleza.

No encuentro las palabras para agradecerte por celebrar cada uno de mis logros, desde la primer estrellita que obtuve en el jardín de niños hasta el día de hoy que obtendré el grado de doctora. Todo mis éxitos son tuyos.

“TE AMO CON TODO LO QUE SOY Y CON LO QUE NO PUEDO SER”

Fer: Eres una gran persona, posees muchas virtudes, las dos que más amo son tú nobleza y la capacidad de tener buen humor incluso en los peores momentos. Tienes una magia increíble, cuando no estás en casa me falta ruido.

Perdón por cada ocasión en que te lastime con mis palabras o mis acciones, por todas las veces en las que no estamos de acuerdo, es claro que no soy la hermana perfecta, pero nunca tengas duda de que daría todo por ti, hasta la vida misma. **Te amo profundamente.** No creas que soy tan diferente de tí, pero como tú no hay nadie...

Maribel Islas, a mi gran inspiración: Quizá nunca te lo he dicho pero gracias a ti y a tú ejemplo me establecí metas, aunque no recuerdo con exactitud el momento si está en mi memoria verte llena de diseños, planos y proyectos. Gracias por las ocasiones que me dejaste acompañarte a la universidad y cuando me permitiste “ayudarte” con tus tareas. Te admiro profundamente y te quiero mucho.

A mis amigos: Que sin duda son una pieza clave del rompecabezas que es mi vida, que son la familia que construyo día con día, sin importa el momento en el que nuestras vidas llegaron a la convergencia. Se que a veces nos separa el tiempo, las actividades, las ciudades o los continentes, pero siempre están presentes: **Brenda Casarrubias Tabarez, Claudia Terreros Victoria, Dulce Figueroa, Elizabeth Ortega Rocha, Juan Carlos Albarrán, Marbella Osornio Roque, Mariana Segovia Mendoza, Mónica Guevara, Nelly López Valdés, Rafael Balderas Xicohtécatl, Roberto Cárdenas Zúñiga, Salvador Andrade Castillo, Virginia Bernal Cilia** gracias por todo su apoyo, por ser ejemplo, por ser mentores, por las experiencias, por su cariño incondicional, por las risas, las lágrimas, los regaños, las lecciones, su paciencia, su tiempo, por cuidarme y protegerme, incluso de mí. Los respeto y los admiro demasiado. Gracias por no dejar que me rindiera.

Alejandro Ortega García: Gracias por motivarme a alcanzar mis sueños, por admirarme, por ser mi centro de equilibrio, por ser incondicional, por toda la magia, por todo tú amor. Por que a pesar de los años nos seguimos conociendo. “No te necesito, te prefiero”.

Los amo con todo mi corazón.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
UNIDADES DE MEDIDA.....	v
NOMENCLATURA QUÍMICA.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÁNCER.....	2
1.1.1. Definición.....	2
1.2. CÁNCER DE PULMÓN.....	2
1.2.1. Clasificación.....	3
1.2.2. Tratamiento.....	5
1.3. COMPUESTOS PLATINADOS.....	6
1.3.1. Mecanismo de acción de los compuestos anticancerígenos platinados.....	7
1.4. COMPUESTOS MÉTALICOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.....	10
1.5. VANADIO.....	10
1.5.1. Generalidades.....	10
1.5.2. Propiedades anticarcinogénicas de los compuestos de vanadio.....	12
1.6. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.....	19
1.6.1. Apoptosis.....	19
1.6.1.1. Apoptosis Extrínseca.....	19
1.6.1.2. Apoptosis Intrínseca.....	20
1.6.2. Necroptosis.....	21
1.6.3. Anoikis.....	22
1.6.4. Piroptosis.....	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos particulares.....	28

5. MÉTODOS	29
5.1. Cultivo celular.....	29
5.2. Preparación de los compuestos de vanadio y exposición de la línea A-549	29
5.3. Ensayo de viabilidad celular.....	29
5.4. Cuantificación de apoptosis	30
5.5. Extracción total de proteínas.....	30
5.6. Western Blot.....	31
5.7. Ensayo de Griess.....	32
5.8. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	32
5.9. Análisis estadístico.....	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Efecto de $VOSO_4$ y $NaVO_3$ en la viabilidad celular	34
6.2. Determinación de la translocación de la fosfatidilserina en presencia de $VOSO_4$ y $NaVO_3$	36
6.3. Efecto del $VOSO_4$ y $NaVO_3$ en la expresión de proteínas que participan en diversos mecanismos de muerte celular	38
6.4. Efecto del $VOSO_4$ y $NaVO_3$ en la producción de NO y ROS	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	50
9. PERSPECTIVAS	51
10. REFERENCIAS	52
ANEXO I. REACTIVOS	67
ANEXO II. SOLUCIONES	70
ANEXO III. ARTÍCULO REQUISITO	71
ANEXO IV. PRESENTACIONES EN EVENTOS ACADÉMICOS	85
ANEXO V. CAPITULOS DE LIBRO	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de los compuestos platinados.	6
Figura 2. Mecanismo clásico de acción de los quimioterapéuticos platinados.....	9
Figura 3. Proceso de oxidación del vanadio en el citoplasma celular.	11
Figura 4. Vías clásicas de muerte celular	21
Figura 5. Vías de activación de anoikis	24
Figura 6. Vías de activación de piroptosis	26
Figura 7. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 en la viabilidad celular de A-549	35
Figura 8. Externalización de la fosfatidilserina inducida por VOSO_4 y NaVO_3	37
Figura 9. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 por 24 h en la expresión de proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis en las células A-549.....	39
Figura 10. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 por 48 h en la expresión de proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis en las células A-549.....	40
Figura 11. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 en la expresión de proteínas que participan en la vía extrínseca de la apoptosis en las células A-549	42
Figura 12. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 en la expresión de la proteína Caspasa-1	43
Figura 13. Producción de NO en células A-549 estimuladas con VOSO_4 y NaVO_3	44
Figura 14. Generación de ROS en células A-549 estimuladas con VOSO_4 y NaVO_3	45
Figura 15. Actividad de los compuesto de vanadio sobre los mecanismo de muerte celular en células de cáncer de pulmón.	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón.....	4
Tabla 2. Clasificación del cáncer de pulmón por estadios clínicos	5

ABREVIATURAS

AIM2	Proteína ausente en melanoma 2
AKT	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptoticas-1
APC	Alofocianina
ASC	Proteína tipo punto asociada con la apoptosis y con dominio de reclutamiento y activación de caspasas
ATM	Ataxia telangiectasia
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Ataxia telangiectasia y relacionada con Rad3
Bad	Proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2
Bak	Proteína asesina-antagonista de Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína linfoma de células B-2
Bcl-w	Proteína tipo Bcl-2
Bcl-xL	Proteína linfoma de células B extra grandes
Bid	Proteína BH3 tipo Bax
Bik	Proteína asesina de interacción con Bcl-2
Bim	Proteína mediadora de muerte celular de interacción con Bcl-2
Bmf	Proteína factor modificador de Bcl-2
c-Abl	Proteína Abelson de leucemia murina
c-Fos	Subunidad del factor de transcripción de la proteína activadora-1
cdc	Cinasa dependiente de ciclina
ciAP	Proteína de inhibición celular de la apoptosis
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CYLD	Cilindromatosis
DAMPs	Patrones moleculares asociados con peligros
DCF	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpp	dots per point
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético

ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Fragmento estimulador de apoptosis
FasL	Ligando de Fas
GADD45	Proteína 45 inducible por arresto del ciclo celular y daño al DNA
GSH	Glutación
GTP	Trifosfato de guanosina
Hrk	Activador de apoptosis harakiri
HRP	Peroxidasa de rábano
HyL	Cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas
Igepal	Octilfenoxipolietoxietanol
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
Mcl-1	Leucemia de células mieloides-1
MLKL	Pseudocinasa
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
mTOR	Proteína diana de rapamicina en células de mamífero
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAIP	Proteína inhibidora de apoptosis neuronal
NETosis	Muerte celular inducida por la activación de trampas de trampas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLR	Receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos
NLRC4	Proteína 4 que contiene el dominio de reclutamiento y activación de caspasa de la familia NLR
NLRP	Receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos que contienen un dominio a pirina
Noxa	Proteína inducida por forbol-12-miristato-13-acetato
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
OCT	Transportadores de cationes orgánicos
OMS	Organización Mundial de la salud
p21	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A

p53	Proteína supresora de tumores
PAMPs	Patrones asociados a patógenos
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
PBS	Solución amortiguadora fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
pRb	Proteína del retinoblastoma
PS	Fosfatidilserina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
Puma	Proteína moduladora de apoptosis regulada por p53
rcf	Fuerza centrífuga relativa
RHIM	Dominio homotípico con motivos de interacción con RIP
RIPK	Proteína cinasa de interacción con el receptor
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revolución por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Cáncer pulmonar de células pequeñas
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
TBS	Solución amortiguadora tris(hidroximetil)aminometano salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-R1	Receptor-1 del factor de necrosis tumoral
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNF
Trizma® base	Tris(hidroximetil)aminometano
TTBS	Solución amortiguadora tris(hidroximetil)aminometano salino con polisorbato 20
Tween® 20	Polisorbato 20
VO(oda)	Compuestos de oxodovanadio con oxodiacetato

UNIDADES DE MEDIDA

h	horas
min	minutos
s	segundos
nm	nanómetro
kDa	kilodalton
mA	miliamper
mg	miligramos
μg	microgramo
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
nM	nanomolar
mL	mililitro
μL	microlitro

NOMENCLATURA QUÍMICA

Ca^{2+}	calcio
CaCl_2	cloruro de calcio
CO_2	dióxido de carbono
H_2O	agua
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
Na_3VO_4	ortovanadato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NaH_2PO_4	bifosfato de sodio
NaNO_3	nitrato de sodio
NaVO_3	metavanadato de sodio
NH_2	amino
NH_3	amoníaco
NH_4VO_3	metavanadato de amonio
NO	óxido de nítrico
NO_2^-	nitrito
O_2	oxígeno atmosférico
$\text{O}_2^{\bullet-}$	anión superóxido
OH^\bullet	radical hidroxilo
Pt	platino
V	vanadio
$\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$	decavanadato
V_2O_5	pentóxido de vanadio
VO_4^{3-}	anión vanadato
VO^{2+}	cación vanadilo
VOSO_4	vanadil sulfato

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial por lo que representa un problema de salud pública. Es una enfermedad que se diagnostica en estadios avanzados para la cual se emplea frecuentemente cisplatino. Dicho compuesto induce daño al DNA, estrés oxidante, arresto del ciclo celular y apoptosis, por lo que se asocia con efectos tóxicos tanto en células normales como en células de cáncer, por lo tanto, el desarrollo de nuevas moléculas, que eviten estas desventajas es una prioridad. Diferentes compuestos de origen metálico han mostrado actividad antitumoral en estudios *in vitro* e *in vivo*. El vanadio es un metal de transición con diferentes estados de oxidación, algunos compuestos de vanadio con valencias +4 y +5, inducen efectos citotóxicos, modificación de vías de transducción de señales, arresto del ciclo celular y apoptosis en diferentes tipos de cáncer.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de VOSO_4 y NaVO_3 sobre proteínas que participan en diferentes vías de muerte en la línea celular A-549 que deriva de adenocarcinoma pulmonar.

Los ensayos de viabilidad y muerte celular de los compuestos de vanadio, se analizaron por citometría de flujo. La expresión de las diferentes proteínas anti y proapoptóticas fueron evaluadas por Western blot. Mientras que los niveles de ROS y NO se determinaron mediante los ensayos de diclorodihidrofluoresceína y de Griess, respectivamente.

El vanadio inhibió la viabilidad celular de manera dependiente del tiempo, la concentración, la valencia y el compuesto. La expresión de la fosfatidilserina en las células tratadas con 25-50 μM de VOSO_4 durante 24 y 48 h fue mucho menor que en las células tratadas con cisplatino. El efecto sobre la expresión de la fosfatidilserina en la membrana celular alcanzó su valor máximo después de 24 h de tratamiento con la concentración más baja de NaVO_3 , dicho efecto solo se observó en la concentración de 100 μM después de 48 h de exposición, similar a la expresión observada en las células tratadas con cisplatino.

En relación a la expresión de proteínas anti y proapoptóticas; los tratamientos con los compuestos de vanadio durante 24 h disminuyeron la expresión de Bax, Bcl-2, Caspasa-3 y FasL al compararlos con el grupo control. La expresión de Bax después de 48 h de tratamiento disminuyó en presencia de VOSO_4 , mientras que se comportó de manera opuesta con el estímulo de NaVO_3 . En lo que respecta a la expresión de Caspasa-9, se observó un incremento con la concentración de 25 μM de NaVO_3 , sin embargo con las concentraciones de 50 y 100 μM de ambos compuestos no se observó expresión de dicha proteína. En tanto que la expresión de Caspasa-7 solo se observó en el grupo cisplatino. Además la expresión de Caspasa-8 solo se observó posterior a las 48 h con las concentraciones de 25 μM de VOSO_4 y 50-100 μM de NaVO_3 .

La expresión de Caspasa-1 disminuyó a las 48 h de tratamiento lo cual fue independiente del compuesto de vanadio. En el caso de la expresión de NO, esta no se modificó con ninguna de las concentraciones o compuestos que se utilizaron al compararlos con el grupo control. De manera interesante el nivel de ROS incrementó de forma drástica, observando la mayor expresión en la concentración de 100 μ M de VOSO_4 .

En conclusión nuestros resultados sugieren que VOSO_4 y NaVO_3 inducen muerte celular a través de un mecanismo no identificado, ya que no se observaron cambios en la concentración de proteínas apoptóticas evaluadas, sin embargo los niveles de ROS incrementaron de manera significativa en las células estimuladas con VOSO_4 por un mecanismo distinto a los descritos actualmente.

ABSTRACT

Lung cancer is the most common diagnosed malignancy worldwide and it is a public health problem. It is diagnosed in advanced stages and the elective treatment is cisplatin. This compound induces DNA damage, oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis; also, it is associated with notorious toxic effects in both normal and cancer cells; therefore, the development of new molecules, which overcome these disadvantages, would be a priority. Several metal compounds with proven *in vitro* and *in vivo* antitumor activity have been considered. Vanadium is a transition element with different oxidation states; several vanadium compounds with valences +4 and +5 exhibit cytotoxic effects, disruption of cellular signal transduction pathways, cell cycle arrests and apoptosis effect on various cancer types.

In this work, we evaluated the effects of VOSO_4 and NaVO_3 on proteins involved in different cell death pathway in lung adenocarcinoma cell line A-549.

The effects of vanadium compounds on the viability and phosphatidylserine translocation were analyzed by flow cytometry. The expression of various proteins was evaluated by western blot. Whereas the level of reactive oxygen and nitrogen species were determined by dichlorodihydrofluorescein and Griess methods respectively.

Vanadium inhibited cell viability in concentration, time, valence and, compound-dependent manner. Phosphatidylserine expression on cells treated with 25-100 μM VOSO_4 after 24 and 48 h exposure was much lower than the cisplatin-treated cells. The effect of 24 h exposure to NaVO_3 enhanced the cell membrane phosphatidylserine expression that reached its maximal value at low concentration and after 48 h of treatment with 100 μM , the latter was identical to that was induced by cisplatin treatment.

Whereas anti- and pro-apoptotic proteins expression, treatment with vanadium compounds for 24 h decreased the expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and, FasL compared to the untreated cells. Bax expression after 48 h exposure diminished at the presence of VOSO_4 , but NaVO_3 induced an increase in its expression. Respect to Caspase-9 expression increased at low concentration (25 μM) of NaVO_3 , but at 50-100 μM concentrations both vanadium compounds it was undetectable. Caspase-7 was only expressed in cisplatin-treated cells. Interestingly, Caspase-8 expression only was observed when cells were treated for 48 h with 25 μM VOSO_4 and 50-100 μM NaVO_3 .

With respect to Caspase-1, the expression diminished after 48 h treatment with either compound. NO expression remained unaltered in all the treatments with both vanadium compounds. ROS levels were greatly enhanced with both compounds although the highest VOSO_4 concentration induced higher expression.

Our results suggest that VOSO₄ and NaVO₃ induced cell death through an unidentified mechanism, as we did not observe an increase pro-apoptotic and a decrease in anti-apoptotic proteins concentrations, but ROS expression was greatly enhanced particularly in VOSO₄-treated cells triggered by mechanisms different to those described so far.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, dentro de las neoplasias conocidas se sabe que el cáncer de pulmón es el que presenta mayor incidencia y mortalidad [1]. Existen diversos tratamientos para erradicar o controlar esta enfermedad, dentro de los cuales se puede mencionar la resección quirúrgica, la radioterapia, la inmunoterapia y la quimioterapia; esta última tiene efectos citotóxicos, tanto en células tumorales como en las no transformadas, lo que conlleva a generar efectos deletéreos en la calidad de vida de los pacientes [2]. Por lo cual es importante encontrar alternativas terapéuticas que generen efectos secundarios reducidos comparados con los agentes quimioterapéuticos actuales.

En años recientes la búsqueda de principios activos novedosos se ha dirigido a los compuestos de origen metálico [3, 4]. Dentro de estos compuestos destacan los derivados del vanadio que en estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado posibles propiedades terapéuticas contra diversas enfermedades [5].

El vanadio es un metal de transición que se encuentra en forma aniónica y catiónica con seis estados de oxidación. Se ha mostrado que en células cancerígenas los compuestos de vanadio con valencias +4 y +5 promueven la activación de vías de señalización y factores de transcripción desencadenando efectos citotóxicos, antiproliferativos y apoptóticos; sin embargo, los mecanismos por los cuales actúan los compuestos de vanadio no se han dilucidado [5-7].

1.1. CÁNCER

1.1.1. Definición

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la capacidad de transformar y malignizar una célula o un grupo de células normales, este evento se desarrolla y establece mediante una serie organizada de alteraciones conocidas como sellos del cáncer entre las que se incluyen: evasión de señales antiproliferativas, señales de crecimiento independientes, activación de invasión y metástasis, inducción angiogénica, replicación ilimitada, reprogramación metabólica, evasión del sistema inmune y resistencia a la muerte celular [8-10].

1.2. CÁNCER DE PULMÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 se ha estimado que el número de casos nuevos es de aproximadamente de 18.1 millones, de los cuales se reportan 9.6 millones de defunciones. Entre las neoplasias conocidas, el cáncer de pulmón es la más común tanto en incidencia como en mortalidad (1.8 millones de muertes) [1, 11, 12].

El cáncer de pulmón actualmente registra 2.1 millones de nuevos casos al año lo cual representa el 11.6% de las neoplasias diagnosticadas [13]. La mayoría de los pacientes presentan tumores con crecimiento local avanzado al momento de la detección, debido a que la enfermedad en estadios tempranos presenta síntomas inespecíficos, el diagnóstico se realiza en estadio avanzados (III o IV) por lo que la línea de tratamiento a la que se recurre es la quimioterapia y tiene una supervivencia no mayor a cinco años [14-17].

Se consideran como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón: la edad, el sexo, la etnia, la herencia y la susceptibilidad genética, la dieta, la exposición a xenobióticos a través del tabaquismo tanto activo como pasivo, entre otros [18-21].

1.2.1. Clasificación

El carcinoma pulmonar es una enfermedad heterogénea la cual se clasifica en dos categorías con relevancia patológica y clínica [22, 23]:

- a) Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC) que representa cerca del 15% de los casos de cáncer de pulmón, se caracteriza por una rápida proliferación y se asocia con el consumo de tabaco [24].
- b) Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), el cual constituye aproximadamente el 85% de los tipos de cáncer, se subdivide en cáncer de células indiferenciadas (15%), cáncer de células escamosas (30%) ambos muestran una fuerte relación con el tabaquismo y el adenocarcinoma (60%) que es el tipo más común en pacientes no fumadores [23-26].

Otra forma de clasificar al cáncer de pulmón desde el punto de vista clínico es utilizando el sistema TNM propuesto en 1943 por Pierre Denoix en el cual se describe cómo el cáncer evoluciona en los pacientes, proporciona información para realizar el seguimiento de la enfermedad y diseñar el tratamiento. Este sistema se basa en tres componentes (Tabla 1): tamaño del tumor primario (T), invasión de nódulos linfáticos adyacentes (N) y metástasis a distancia (M) [27-29]. Las diferentes combinaciones de TNM permiten agrupar al cáncer en cuatro estadios (Tabla 2); en la etapa I el cáncer se localiza en el pulmón sin afectar los nódulos linfáticos o metástasis. Cuando el tumor se ha diseminado a nódulos linfáticos adyacentes o genera efectos en la pleura visceral se considera etapa II. Mientras que en la etapa III las células neoplásicas se diseminan a nódulos linfáticos del mediastino, del cuello e incluso en aquellos localizados de manera intrapulmonar en ambos pulmones. Finalmente, el proceso de metástasis a distancia se reconoce como la etapa clínica IV [30-32].

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de pulmón

T: Tumor primario		
Descripción		
Tx	No pueden ser evaluados al no ser visualizados en imagen. Las células cancerosas se observan en muestras de esputo u otros líquidos pulmonares	
T0	Sin evidencia del tumor primario	
Tis	Carcinoma in situ. El tumor se encontró solo en las capas superiores de las células que recubren las vías respiratorias, sin invadir los tejidos pulmonares más profundos	
T1	a	≤ 1 cm
	b	> 1 cm a ≤ 2 cm
	c	> 2 cm a ≤ 3 cm
En su diámetro mayor esta rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia de invasión		
T2	a	> 3 cm a ≤ 4 cm
	b	> 4 cm a ≤ 5 cm
Afecta a los bronquios, invade la pleura visceral, atelectasia obstructiva (total o parcial) e invasión local del diafragma		
T3	> 5 cm a ≤ 7 cm	Invasión local de la pared torácica, pericardio parietal y nervio frénico, así como tumor satélite en el mismo lóbulo
T4	> 7 cm	Tumor satélite en diferente nódulo (en el mismo pulmón). Invasión del mediastino, traque, corazón, esófago, vertebra, carina y nervio laríngeo inferior
N: Invasión de nódulos linfáticos adyacentes		
Descripción		
Nx	No se puede evaluar el daño de los ganglios linfáticos	
N0	No existe daño de los ganglios linfáticos	
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hiliares e intrapulmonares ipsilaterales en el mediastino	
N2	Metástasis en ganglios linfáticos en el mediastino ipsilaterales y/o subcarinales	
N3	Metástasis en ganglios linfáticos en el mediastino contralaterales, hiliares contralaterales, escaleno o supraclavicular ipsilaterales o contralaterales	
M: Metástasis a distancia		
Descripción		
M0	Sin metástasis a distancia	
M1	Presencia de metástasis a distancia	
M1	a	Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral, tumor con nódulos pleurales o derrame pleural maligno
	b	Metástasis única extratorácica
	c	Metástasis múltiples extratorácica en uno o varios órganos

Tabla 2. Clasificación del cáncer de pulmón por estadios clínicos

Estadio	T	N	M
Oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a – T1c	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T1a – T1c	N1	M0
	T2a – T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1a – T1c	N2	M0
	T2a – T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0-N1	M0
Estadio IIIB	T1a – T1c	N3	M0
	T2a – T2b	N3	M0
	T3 – T4	N2	M0
Estadio IIIC	T3 – T4	N3	M0
Estadio IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a – M1b
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

1.2.2. Tratamiento

Una vez que se establece la clasificación y estadio clínico del tumor pulmonar se procede a seleccionar el tratamiento más adecuado para el paciente. Dentro de las modalidades terapéuticas que se puede seleccionar están:

Cirugía: Es el procedimiento recomendado cuando el cáncer de pulmón se detecta en los estadios clínicos I y II, en este procedimiento deberá extirparse todo tejido que contenga al tumor y los nódulos linfáticos adyacentes. En la intervención quirúrgica se puede quitar una parte del tejido pulmonar o todo un pulmón [30, 33].

Radioterapia: Es el uso de energía ionizante en dosis de 50-60 Gray, que permite destruir células cancerosas y reducir el tamaño de algunos tumores en estadio III, puede considerarse un tratamiento radical, adyuvante o paliativo [34-36].

Quimioterapia: Este método se considera como la primera línea de tratamiento en estadios III y IV del cáncer de pulmón, los fármacos se administran vía oral o intravenosa en ciclos (de tratamiento–descanso). A pesar de conocer un amplio espectro de agentes antineoplásicos generalmente se utilizan esquemas basados en compuestos derivados del platino, tales como el carboplatino, el oxaliplatino y el *cis*-diaminodicloroplatino II, conocido con el nombre de cisplatino [37-40].

1.3. COMPUESTOS PLATINADOS

Los compuestos platinados constituyen la clase de medicamentos con más uso en el tratamiento contra el cáncer; cerca del 50% de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad que reciben quimioterapia son tratados con cisplatino, carboplatino u oxaliplatino. Estos tres fármacos se caracterizan por poseer un átomo de platino (Pt) al centro, dos grupos amino (NH₂) o amoníaco (NH₃) y dos ligandos aniónicos (en los cuales difieren) formando una estructura química plana y cuadrada (Figura 1) [39, 41], compartiendo un mecanismo de acción generalizado.

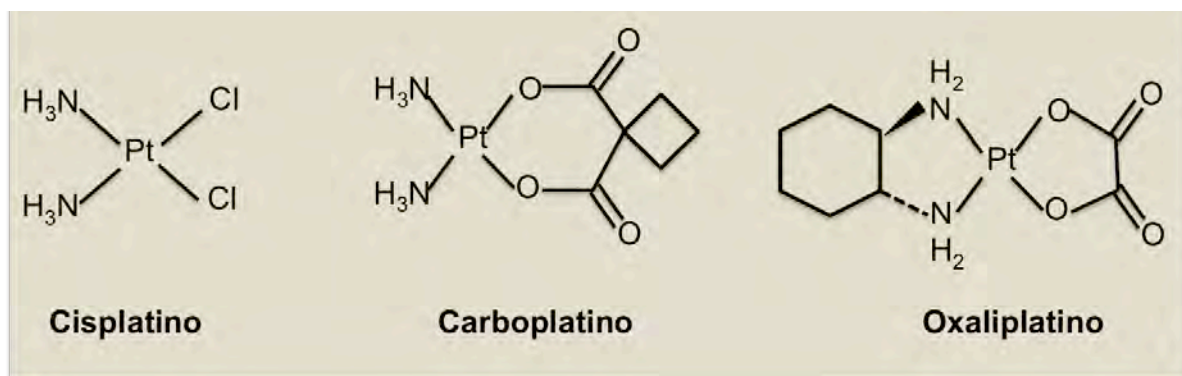


Figura 1. Estructura química de los compuestos platinados.

1.3.1. Mecanismo de acción de los compuestos anticancerígenos platinados

El mecanismo clásico de acción de los agentes platinados implica cuatro pasos clave: atracción celular, activación, unión al DNA y apoptosis, los cuales se describen a continuación [39, 42, 43].

i. Atracción celular: Para acceder a la célula puede realizarlo a través de difusión pasiva o por transporte activo. La captación de cisplatino se vincula con los niveles de expresión de transportadores de cationes orgánicos (OCT) [44-46].

ii. Activación/Hidrólisis: Una vez dentro de la célula el compuesto platinado sustituye sus ligandos aniónicos por moléculas de agua (H_2O) adquiriendo carga positiva, la cual lo vuelve un compuesto electrofílico que se puede unir a las bases de DNA, generando aductos intracatenarios o intercatenarios [39, 47, 48].

iii. Unión al DNA: Las moléculas platinadas se unen al DNA en el sitio más nucleófilico de la guanina que es la posición N7. Las células cuyo DNA se ha dañado por la presencia de los compuestos de platino tienen la capacidad de detener el ciclo celular en la fase G_2/M e intentar reparar el daño mediante la maquinaria de reparación de escisión de nucleótidos [49-51].

iv. Apoptosis: Si la célula es incapaz de reparar el daño, ésta incrementa la expresión de proteínas que se relacionan con la muerte celular [37, 39, 52]. Entre los mecanismos moleculares (Figura 2) implicados en la inducción de apoptosis, se encuentran la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), modulación de las señales de calcio, activación de caspasas, inhibición de proteínas antiapoptóticas y glutatión (GSH), activación de p53 a través de las vías ATM y ATR, cambios en la regulación de las vías de las cinasas (PKC, ERK, MAPK, JNK, AKT, c-Abl), ineficiencia de mecanismos de reparación de daño al DNA y modulación de la expresión de genes [37, 38, 42, 43]. Sin embargo, estos efectos también se llevan a cabo en las células que no se han transformado, por lo que el tratamiento con los compuestos platinados se asocia con la inducción de

cardiotoxicidad, gastrotoxicidad, hemotoxicidad, hepatotoxicidad, mielosupresión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad y reprotoxicidad [37, 40, 53-55].

Si bien los compuestos platinados son los antineoplásicos más efectivos y con más amplio uso para combatir diferentes tipos de cáncer principalmente de origen epitelial, se deben considerar los efectos adversos que genera, por lo que es necesario el desarrollo y empleo de nuevos compuestos que, en combinación con los agentes quimioterapéuticos actuales o por sí solos, constituyan una estrategia más eficiente y menos tóxica para erradicar el cáncer.

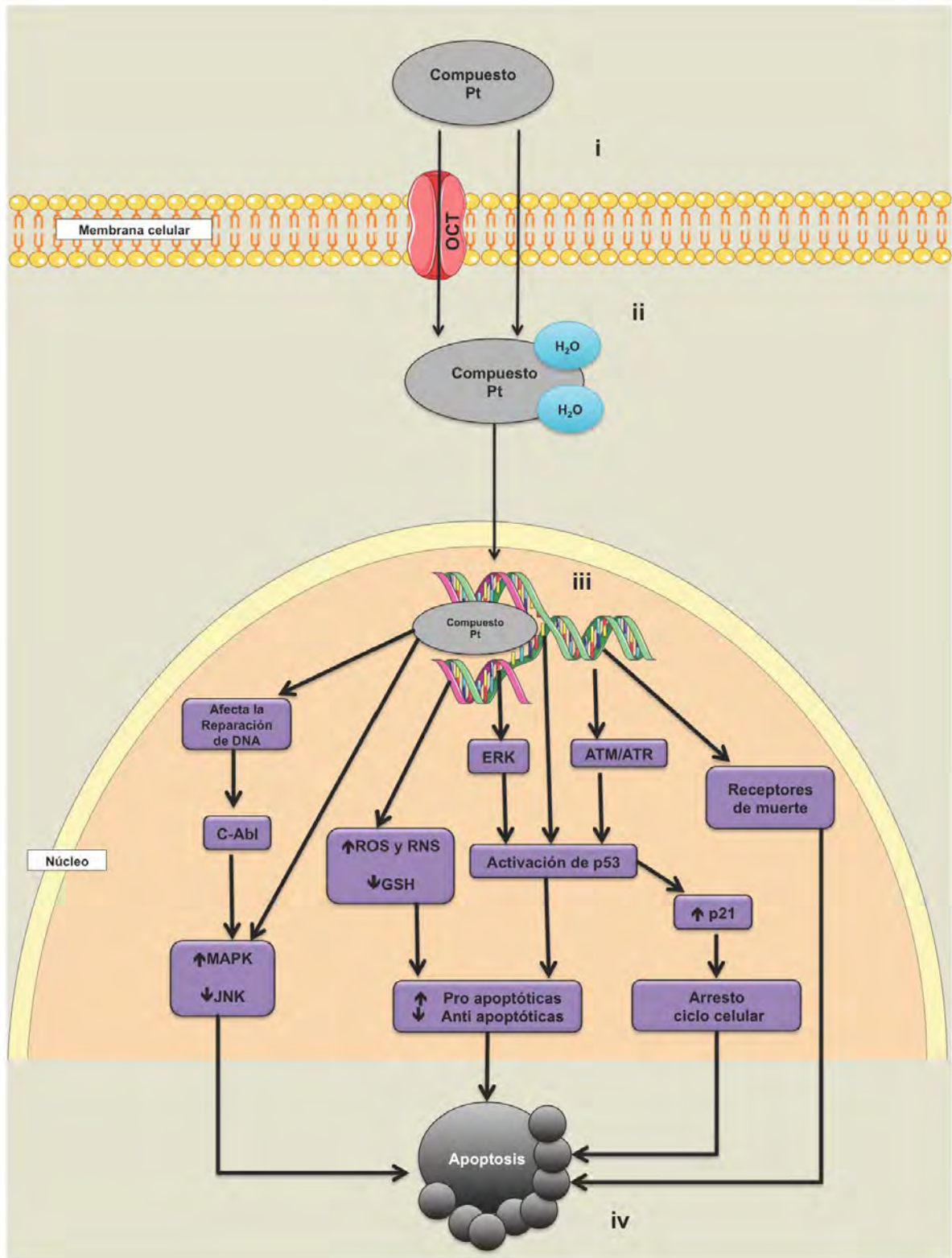


Figura 2. Mecanismo clásico de acción de los quimioterapéuticos platinados. i) atracción celular, ii) activación/hidrólisis, iii) unión al DNA y iv) inducción de apoptosis a través de diferentes mecanismos moleculares.

1.4. COMPUESTOS MÉTALICOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

En la actualidad diversos grupos de investigación se han enfocado en el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos de origen metálico. Estos compuestos tienen distintas características como el estado de oxidación, número y tipo de ligandos, estructura geométrica, carga eléctrica, entre otros [3, 56, 57]. Se ha demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* la actividad antitumoral que ejercen los compuestos derivados de elementos tales como antimonio, arsénico, bismuto, cobalto, cobre, estroncio, galio, hierro, iridio, manganeso, molibdeno, níquel, oro, osmio, plata, platino, rodio, rutenio, titanio, zinc y vanadio. Entre los diferentes mecanismos de acción inducidos por los compuestos metálicos destacan la formación de aductos y la fragmentación de DNA, inhibición de PARP-1, de las tirosinas y de la tiorredoxina reductasa, arresto del ciclo celular, inducción de ROS y apoptosis [3, 4, 56-60]. Algunos de estos mecanismos se han observado en un gran número de estudios donde se emplean diversos compuestos de vanadio [5].

1.5. VANADIO

1.5.1. Generalidades

El vanadio (V), es un elemento de transición que pertenece al grupo VB de la tabla periódica, se encuentra distribuido de forma abundante en la corteza terrestre, se caracteriza por presentar seis estados de oxidación (-1 al +5), pasa de un estado a otro a través de reacciones de óxido-reducción; los tres estados de oxidación con funciones biológicas reconocidas son +3, +4 y +5 [61-63]. El vanadio tiene la capacidad de presentarse como anión o catión; en condiciones fisiológicas el vanadio predomina como anión vanadato (VO₄³⁻) y como catión vanadilo (VO²⁺) [7, 64, 65].

Los compuestos de vanadio con estado de oxidación +5 entran a la célula mediante canales aniónicos, mientras que los compuestos con estado de oxidación +4 tienen la habilidad de atravesar la membrana celular [62, 65]. En el interior de la célula realizan una serie de reacciones con proteínas que forman parte de la maquinaria antioxidante, los compuestos con valencia +4 se oxidan por el oxígeno molecular

(O_2) a vanadio +5 acompañado de la liberación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), una posterior reducción con NADPH produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 3). Otra forma de realizar la oxidación de +4 a +5 de los compuestos de vanadio es mediante la generación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) vía la reacción de Fenton [66-69].

Algunos vanadatos poseen una estructura similar a los aniones fosfato, característica por la cual, los vanadatos podrían mimetizar a los fosfatos al reemplazarlos en los centro activos de estos, permitiendo la activación o inhibición de diversos sistemas enzimáticos que contienen fosfatos [7, 70-72] como adenilato ciclasa, ATPasas, ATP fosfohidrolasas, cinasas, DNA polimerasas, fosfatasa alcalina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, glucógeno sintasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lipoprototeína lipasa, peroxidasas y tirosina fosfatasa [5, 62, 67, 68, 70], entre otras.

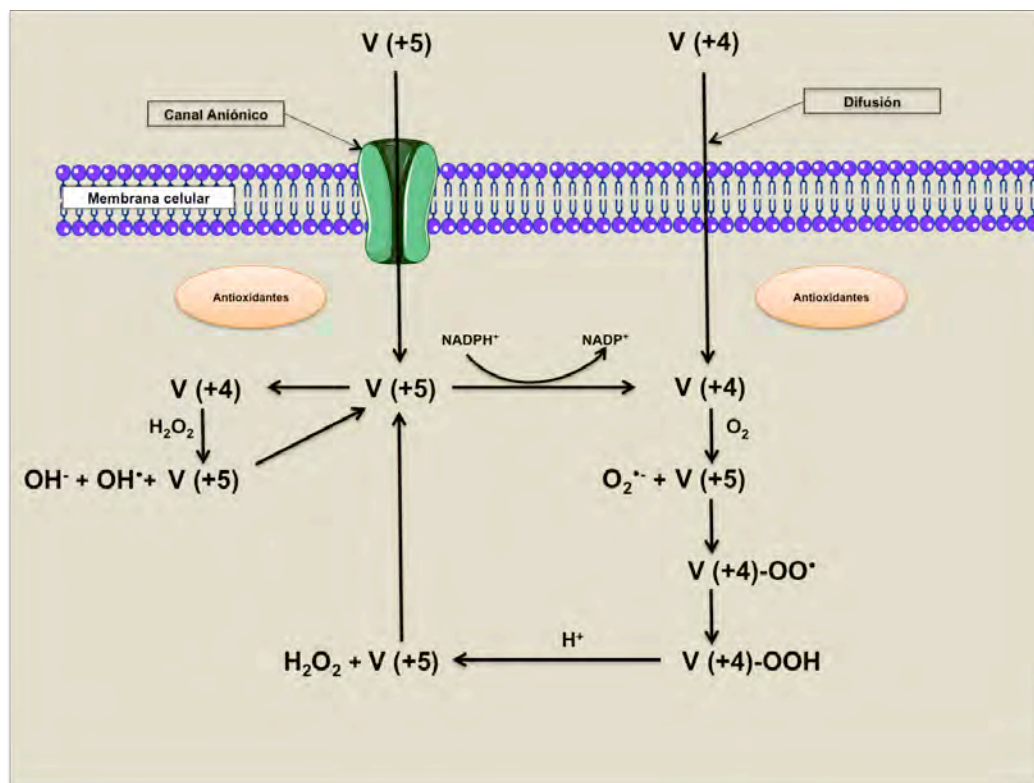


Figura 3. Proceso de oxidación del vanadio en el citoplasma celular.

En los últimos 15 años los compuestos de vanadio han adquirido importancia en cuanto a su potencial farmacológico. Las sales de vanadio, metavanadato de amonio, metavanadato de sodio, ortovanadato de sodio y el vanadil sulfato, así como productos sintéticos que utilizan el vanadio como base, se han probado como agentes antibacterianos, antivirales, antiparasitarios, insulino-miméticos y anticarcinogénicos [5, 73-76].

1.5.2. Propiedades anticarcinogénicas de los compuestos de vanadio

Entre los principales mecanismos de acción relacionados con los efectos antitumorales del vanadio que se observa en estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, son la disrupción del metabolismo celular mediante la generación de ROS y RNS, alteración de organelos celulares como la mitocondria, los lisosomas, el núcleo, proteínas del citoesqueleto (actina y tubulina), modificación en vías de transducción de señales, ciclinas y caspasas que son fundamentales en el arresto del ciclo celular y la apoptosis [5, 69].

Vanadoceno

Se ha descrito que en líneas celulares humanas procedentes de cáncer de hígado (HepG2), testículo (NTera-2), mama (BT-20, MCF-7), neuroblastoma (SH-SY5Y, SK-N-SH), pancreático (AsPC-1), colorrectal (HCT-8), leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4) y de glioblastoma (U373), bajo el estímulo de los compuestos acetilacetona de vanadoceno, dicloruro de vanadoceno, ditiocianato de vanadoceno y dioxicanato de vanadoceno, se induce el arresto del ciclo celular en las fases G₁/S asociado con la disminución de los niveles de fosforilación de pRb, y en algunos casos también arresto en la fase G₂/M, lo que inicia la apoptosis mediante activación de c-Fos sin involucrar a p53 o GADD45 e induce la transcripción controlada de NF-κB [77-85].

Peroxovanadato

Los peroxovanadatos pueden inhibir las proteínas tirosina fosfatasa [86] en cultivos celulares murinos de glioma (C6), neuroblastoma (NB41), hepatocarcinoma (H4-II-E-C3) y leucemia (L1210) [87, 88] y en líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63), adenocarcinoma pulmonar (A-549) y cáncer colorrectal (SW-620). En células de cáncer humano se observó la inhibición de cdc25 y el bloqueo del ciclo celular en la fase G₂/M, la inhibición de la metástasis por el descenso en la expresión de MMP-2, apoptosis dependiente de la generación de ROS y reducción del potencial mitocondrial, así como la obstrucción de la transición epitelio-mesénquima mediada por TGF- β [89-91].

Oxovanadato

El efecto del arresto en el ciclo celular y la apoptosis también se observa en estudios realizados en células de melanoma maligno (A-375, CN-mel) y de adenocarcinoma pulmonar (A-549) al exponerlas a compuestos de oxidovanadio con piridoxal y piridinonato [92, 93]. En células de feocromocitoma (PC-12) [94-96], insulinoma de rata (RINm5F) [97], leucemia mieloide aguda (HL-60) [98] y adenocarcinoma de ovario (OVCAR-3) [96], ante el estímulo con el compuestos potasio bisperoxo (1,10-fenantrolina) oxovanadato (+5), se induce la fosforilación de manera dependiente de la concentración y del tiempo de proteínas de la vía de las MAPK, tal como ERK que participa en la proliferación celular y la exocitosis entre otras funciones. Del mismo modo el estímulo induce la activación de JNK y p38 que contribuyen a la muerte celular, esta última no se encontró relacionada con la activación de Caspasa-3, aunque se observa el incremento de Caspasa-1 que es una proteína indispensable en la inducción de la vía de muerte por piroptosis en líneas celulares de cáncer humano (HepG2, HeLa) y fibroblastos de origen embrionario de ratón; incluso el tratamiento con este oxovanadato provocó la inhibición de PTEN, lo cual permite el inicio de la autofagia por medio de PI3K [99].

Oxovanadio

Respecto del compuesto bis (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovanadio (+4) o Metvan, se ha reportado que éste disminuye el tamaño de tumores sólidos de hígado, nasofaríngeos, ovario, próstata, testículo e íleon. Además tiene la capacidad de inducir muerte celular al activar caspasas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis [100, 101]. En líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-3, NALM-6), leucemia mieloide aguda (HL-60), mieloma múltiple (ARH-77, U266B1, HS-Sultan), de neuroblastoma (SH-SY5Y, SK-N-SH), cáncer de mama (MCF-7), cáncer gástrico (AGS), se observó que diferentes compuestos de oxovanadio generan inhibición de la viabilidad e inhibición del crecimiento celular, producen ROS, la disminución de GSH, adicionalmente bloquea la expresión de vitronectina, fibronectina, MMP-2 y MMP-9, aunado a la pérdida del potencial de membrana lo que conduce hacia la muerte celular conocida como anoikis [102-110].

La actividad antitumoral *in vitro* de bis (maltolato) oxovanadio (+4) en células que derivan de rhabdomyosarcoma y de neuroblastoma (SH-SY5Y, SK-N-SH) se observó como la capacidad de inhibir la proliferación y activar la muerte celular [111, 112], mientras que *in vivo* se observó la inhibición del crecimiento tumoral en ratones DBA/2j a los cuales se les indujo un crecimiento tumoral con células de linfoma (MDAY-D2) [113]. En células de hepatocarcinoma (BEL-7402, HepG2) que se estimularon con compuestos sintéticos de oxovanadio en combinación con polisacáridos [114, 115], al igual que la combinación de estos compuestos con quinolina y piridinona en células de sarcoma histiocítico (U937), se observó la inhibición de la proliferación celular de manera dependiente de la concentración y la promoción de la apoptosis independiente de caspasas [116, 117].

Pentóxido de vanadio

La síntesis de productos a partir de la mezcla de pentóxido de vanadio (V₂O₅), (1,10-fenantrolina) y ácido oxálico, son capaces de inducir el arresto del ciclo celular en las fases S y G₂/M, así como la translocación de la fosfatidilserina hacia la membrana externa de células de hepatocarcinomas de manera dependiente de la concentración

(SMMC-7721 [0.5-4 μ M], HepG2 [5-40 μ M]) [118]. En ratones de la cepa CD-1, a los cuales se les administró uretano para generar adenomas pulmonares y posteriormente se expusieron por inhalación al V_2O_5 , se observó que el número y tamaño de los tumores disminuyó, del mismo modo que los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 y mientras que la expresión de Bax incremento [119].

Polioxovanadato

El vanadio como polioxometalato, que forma agregados inorgánicos aniónicos de oxígeno y metales de transición, muestra prometedoras actividades biológicas con amplio potencial para inhibir de diversos tipos de tumores [120-122]. La evaluación de la actividad anticancerígena del decavanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$), que es el más representativo de los polioxovanadatos, inhibe la proliferación celular y activa la apoptosis en líneas celulares derivadas de cáncer humano tales como: ovario (SK-OV-3), hígado (SMMC-7721), mama (MCF-7), pulmón (A-549) e incluso en leucemia murina (P388), en estudios *in vitro*, mientras que en ensayos *in vivo* inhibe el crecimiento de tumores hepáticos en ratones [123-125].

Oxodovanadio

Los compuestos de oxodovanadio con oxodiacetato conocidos como VO(oda), activan la expresión de la fosfatasa alcalina, afectan al DNA, a la actina, el metabolismo lisosomal y mitocondrial, propician la producción de ROS y promueven la actividad antiproliferativa mediante la fosforilación de la vía de ERK en líneas celulares de osteosarcoma (MG-63, UMR-106) y adenocarcinoma pancreático ductal (PANC-1) [126-130]; la fosforilación de la vía de ERK también se observa ante el estímulo del polímero potasio-dioxidovanadio (+5) en células procedentes de carcinomas humanos de pulmón (A-549), mama (MCF-7) y colorrectal (HCT-116) [131].

Otros compuestos de vanadio

Con la finalidad de incrementar el potencial anticarcinogénico del vanadio se han sintetizado compuestos de vanadio con monosacáridos, antiinflamatorios (naproxeno) [132], antifúngicos (clioquinol) [133], dipicolinato [134], aminoácidos esenciales (metionina y valina) [135], flavonoides tales como crisina [136-138], baicaleína [139], hesperidina [140], naringenina [141], quercetina [142] o silibina [136, 143, 144], que en diversos ensayos *in vitro* inhiben la viabilidad y la proliferación, propician el arresto celular en fase G₁ o G₂/M, la liberación de ROS y RNS, modifican el potencial de membrana mitocondrial, disminuyen la resistencia eléctrica transepitelial y reducen la activación de NF-κB en líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2, HT-29), cáncer de mama (MDA-MB-231, SK-BR-3), osteosarcoma (MG-63, UMR-106) y adenocarcinoma pulmonar (A-549). Inclusive estos compuestos conllevan a las células hacia la apoptosis mediante la activación de la Caspasa-3 y Caspasa-7 y fragmentación de DNA.

Los compuestos de vanadio con luteolina disminuyen las metástasis en células de cáncer de colon (CT-26) y mama (MDA-MB-231) [145, 146] y el compuesto de vanadio-crisina afecta la viabilidad de células de osteosarcoma (MG-63) en un modelo tridimensional de “esferoides” afectando el tamaño y la forma de los mismos, mientras que en modelos *in vivo* con xenoinjertos tumorales en ratones *N:NIH (S) Fox1nu*, el compuesto inhibió el desarrollo y redujo el tamaño de los tumores [147].

La mezcla de compuestos de vanadio con ligandos azo, polipiridil o salicilaldimina generan efectos antiproliferativos en células de adenocarcinoma colorrectal (HT-29) y cáncer cérvico uterino (HeLa), [148], tienen la capacidad de disminuir la viabilidad y reducir la migración de células cancerígenas de mama (MCF-7, MDA-MB-231), leucemia mieloide aguda (HL-60), osteosarcoma (UMR-106), próstata (PC-3) y ovario (A2780). Incluso estos compuestos dañan la membrana celular lo que provoca diferentes tipos de muerte, efectos que son comparables con los inducidos por el cisplatino [149-152].

Metavanadato de amonio

En el modelo de rata Sprague-Dawley tratadas con diferentes inductores de cáncer de mama, colorrectal y hepático como el 7,12-dimetilbenzantraceno [75, 153], el 2-acetilaminofluoreno [154, 155], la dietilnitrosamina [156-158] y la dimetilhidrazina respectivamente [159-161] y que posteriormente se expusieron vía oral en agua de bebida a metavanadato de amonio (NH_4VO_3), se observó que reduce la incidencia tumoral, el número y tamaño de los tumores e induce apoptosis a través de la disminución en la expresión de las proteínas PCNA, Bcl-2 y el incremento de Bax. En estudios *in vitro*, la exposición de células de cáncer de mama MCF-7 a estos compuestos disminuye la viabilidad e induce la muerte celular por apoptosis [75, 162].

Ortovanadato de sodio

Diferentes células derivadas de cáncer humano al ser estimuladas con ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) manifiestan disminución en el porcentaje de células viables, arresto del ciclo celular en las fases G_2/M y S de manera similar a otros compuestos de vanadio (+5), induce la activación de p38, JNK y COX-2 dependiente de la concentración, interfiere con la vía PI3K/AKT/mTOR, disminuye el potencial de la membrana mitocondrial e inhiben la expresión de la proteína Bcl-2 y activa la expresión de Bax, lo cual conduce a las células hacia la inminente apoptosis [163-171].

Metavanadato de sodio

El metavanadato de sodio (NaVO_3) genera ROS en células de adenocarcinoma pulmonar (A-549), lo que induce la fosforilación de p53 dependiente de ATM [172] y ATR [173], aunado al incremento y descenso de la expresión de p21 y cdc25 respectivamente, lo cual inactiva al complejo ciclina B-cdc2 que en consecuencia frena el ciclo celular en la fase G_2/M dependiente de la concentración de NaVO_3 [172-175]. Por otra parte decrece la expresión proteica de ciclina D1 y eleva la expresión de Caspasa-3 en cáncer de esófago (EC109) en relación con el tiempo y concentración del estímulo [176].

Vanadil sulfato

El vanadil sulfato (VOSO₄) inhibe la proliferación e incrementa el porcentaje de células apoptóticas y necróticas [177] en células de rhabdomyosarcoma, adenocarcinoma pulmonar (A-549), cáncer de próstata (DU145), carcinoma de riñón (A-498) [111, 163] y en células de hepatocarcinoma de rata (H35-19) [65]. En células de cáncer cérvico uterino (HeLa) el tratamiento con VOSO₄ suscita la ruptura sencilla o de doble cadena del DNA [178].

Como se mencionó a lo largo de este apartado, los diversos compuestos químicos de vanadio con diferentes estados de oxidación promueven diferentes efectos antineoplásicos dirigidos hacia la inducción o inhibición de diversas proteínas que participan en los mecanismos de muerte celular como la apoptosis, autofagia, necroptosis, anoikis y piroptosis. De manera particular la exposición a los compuestos VOSO₄ y NaVO₃ en cultivos celulares provenientes de neoplasias humanas, indican como características de muerte celular el incremento del porcentaje de células en apoptosis, así como la expresión de Caspasa-3. Sin embargo, no se ha dilucidado cual es el mecanismo mediante el cual lo realizan, es importante mencionar que estos compuesto se han empleado en el tratamiento de otras patologías ya que poseen características como hipoglucemiantes, antiparasitarios, antivirales o antibacterianos.

1.6. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular es un evento importante en un gran número de procesos fisiológicos como el metabolismo, el desarrollo de los linfocitos y la respuesta al daño del DNA, entre otros. El que una célula se mantenga con vida o muera, es un proceso que se asocia a diversas enfermedades incluyendo el cáncer, por lo que el conocer los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de muerte celular resultan relevantes. Las principales formas de muerte caracterizadas son la apoptosis y la necroptosis, no obstante se han descrito otras formas como: anoikis, catástrofe mitótica, entosis, ferroptosis, muerte celular dependiente de lisosomas, muerte celular inmunogénica, NETosis, paraptosis, parthanatos y piroptosis, que son menos frecuentes [179, 180].

A continuación, se describen los cuatro mecanismos moleculares de muerte celular que han sido relacionados con los compuestos de vanadio.

1.6.1. Apoptosis

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso organizado en el cual los eventos bioquímicos conducen a alteraciones celulares características. Los cambios morfológicos iniciales de la apoptosis incluyen la contracción y pérdida de la simetría de la membrana celular, así como la condensación de la cromatina, la formación de los cuerpos apoptóticos y la fragmentación celular. Todas estas alteraciones se regulan por la activación sucesiva de vías específicas. La apoptosis se clasifica en extrínseca (mediada por receptores de muerte) e intrínseca (mediada por mitocondrias) [179-183].

1.6.1.1. Apoptosis Extrínseca

La vía extrínseca (Figura 4A) ocurre por la activación de los receptores de muerte que pertenecen a la familia de los receptores del TNF, de los cuales los más conocidos son Fas y TNF-R1, así como sus respectivos ligandos de Fas (FasL) y TNF- α . Los receptores de muerte reclutan proteínas adaptadoras como TRADD

(dominio de muerte asociado a TNF) o FADD (dominio de muerte asociado a Fas), dependiendo del receptor, y RIPK1 (proteína cinasa de interacción con el receptor 1) y procaspasa-8 para así formar el complejo de señalización inductor de muerte que sirve como base para activar Caspasa-8. Esto desencadena el proceso apoptótico mediante la activación de caspasas efectoras como las Caspasa-3 y -7 [179, 180, 184].

1.6.1.2. Apoptosis Intrínseca

La vía intrínseca (Figura 4B) puede activarse por diferentes estímulos y mecanismos internos como estrés celular, daño al DNA, hipoxia, modificación en la concentración de iones, entre otros. Todos ellos tienen como resultado la liberación del citocromo c y proteínas proapoptóticas de la mitocondria. La liberación del citocromo c se asocia con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la pérdida del potencial de membrana, resultado de la oligomerización de las proteínas Bak-Bax en la membrana mitocondrial [179, 183, 185].

Una vez que el citocromo c se libera al espacio citosólico formará un complejo conocido como “apoptosoma” el cual también está conformado por el factor activador de proteasas apoptóticas-1 (Apaf-1) y procaspasa-9. Este complejo permite la activación de Caspasa-9 que más tarde activará a las caspasas efectoras punto donde convergen ambas vías apoptóticas [186-188].

Esta vía se regula por la familia de proteínas Bcl-2, la cual se divide en tres subfamilias; *a)* Antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bcl-2A1, quienes previenen la activación de proteínas proapoptóticas; *b)* Proapoptóticas multidominio: Bak y Bax y *c)* Proapoptóticas que únicamente poseen el dominio BH3: Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa y Puma. Los cambios en las concentraciones de los miembros de la familia Bcl-2 es lo que determina que una célula continúe viva o inicie apoptosis [189, 190].

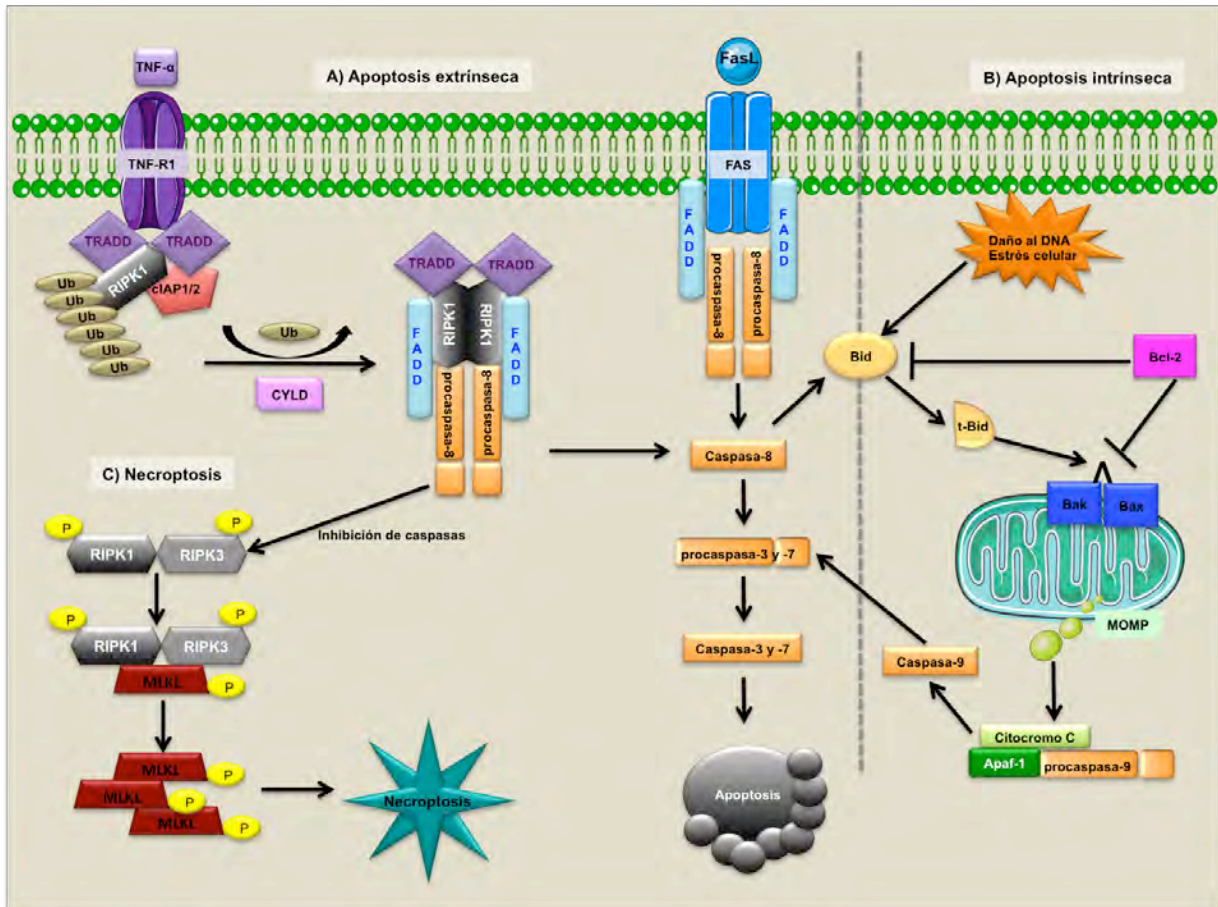


Figura 4. Vías clásicas de muerte celular.

1.6.2. Necroptosis

La necroptosis es una forma de muerte celular que se inicia al perturbar el microambiente intra o extracelular, lo cual es detectado por receptores de muerte o receptores de reconocimiento de patógenos. Este tipo de muerte es mediador de funciones adaptativas en caso de respuestas ineficientes a estrés, además participa en la protección de sistemas del desarrollo y el mantenimiento homeostático de las células T [179, 191].

Se caracteriza por la pérdida acelerada del potencial de membrana celular, lo que conduce a la dilatación del citoplasma y la ruptura de la membrana plasmática, dando paso a la citólisis. Existe una secuencia de eventos sinérgicos que conduce a la activación de necroptosis que incluye la disfunción mitocondrial por la producción

de ROS, el abatimiento de ATP, una falla en el sistema homeostático, la activación de proteasas, específicamente calpaínas y catepsinas y la ruptura de lisosomas y de la membrana celular [179, 192].

El inicio de la necroptosis puede desencadenarse por el estímulo de diferentes receptores tales como: receptores de muerte (Fas y TNF), receptores de tipo toll 3 y 4, así como los receptores de interferones. Sin embargo, la vía de necroptosis mejor caracterizada es la inducida por TNF. Tras el estímulo de TNF, TNF-R1 activado interactúa con RIPK1 para reclutar a las proteínas 1 y 2 de inhibición celular de la apoptosis (cIAP1 y cIAP2) y formar un complejo asociado a la membrana plasmática, permitiendo la poliubiquitinación de RIPK1. Si se inhiben las proteínas cIAPs se induce la desubiquitinación de RIPK1, a través de enzimas como cilindromatosis (CYLD), lo que conlleva a la disociación de RIPK1 de la membrana plasmática y su transformación de proteína de sobrevivencia en proteína promotora de muerte. La unión de RIPK1 a FADD recluta a procaspasa-8 para activarla e inducir apoptosis e inhibir la necroptosis. Si la Caspasa-8 se inhibe, entonces RIPK1 se une a RIPK3 mediante un mecanismo físico entre sus dominios homotípicos con motivos de interacción con RIP (RHIM), para formar el necroptosoma promoviendo la autofosforilación de RIPK3 y el reclutamiento de las pseudocinasas (MLKL) para promover la fosforilación de MLKL. Esto desestabiliza su estructura monomérica generando su oligomerización y posterior inserción en la membrana plasmática, afectando su integridad y por lo tanto la muerte de la célula (Figura 4C) [179, 192-195].

1.6.3. Anoikis

Este tipo de muerte celular es dependiente de caspasas y se caracteriza por la pérdida o la inadecuada adhesión de las células a la matriz extracelular (ECM). La correcta adhesión de las proteínas es necesaria para determinar si una célula está anclada de manera adecuada a la ECM, lo cual es ineludible en la sobrevivencia celular y el mantenimiento del tejido, por lo que las células con una localización incorrecta se eliminan mediante anoikis evitando que se reincorporen o generen un

crecimiento displásico [196-199]. La anoikis es un proceso fisiológico importante en el desarrollo, la homeostasis tisular, la diferenciación y la migración, eventos que en el caso de enfermedades como el cáncer se encuentran desregulados [102, 103, 200] .

El inicio de la anoikis ocurre cuando se modifica la expresión de las proteínas llamadas integrinas y E-cadherinas, las cuales median la interacción celular con la ECM y las células vecinas. Las integrinas son receptores que se conforman por subunidades α y β . En tanto las E-cadherinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplasmático unido a β -catenina que posteriormente se unirá a la α - y γ -catenina [201]. La ejecución del proceso de anoikis puede ser mediada por diferentes vías que convergen en la activación de endonucleasas, fragmentación de DNA, así como la activación y proteólisis de las caspasas efectoras. El fenómeno de anoikis ocurre mediante la activación de ambas vías de apoptosis “extrínseca e intrínseca”, donde la familia Bcl-2 juega un papel determinante activando a las proteínas Bid y Bim, con el objetivo de inducir el desprendimiento de las células con su ECM. Este evento favorece la oligomerización de Bak-Bax en la membrana mitocondrial, así como el bloqueo de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a través de los dominios sensibilizadores proapoptóticos BH-3 (Figura 5) [102, 103, 189, 202].

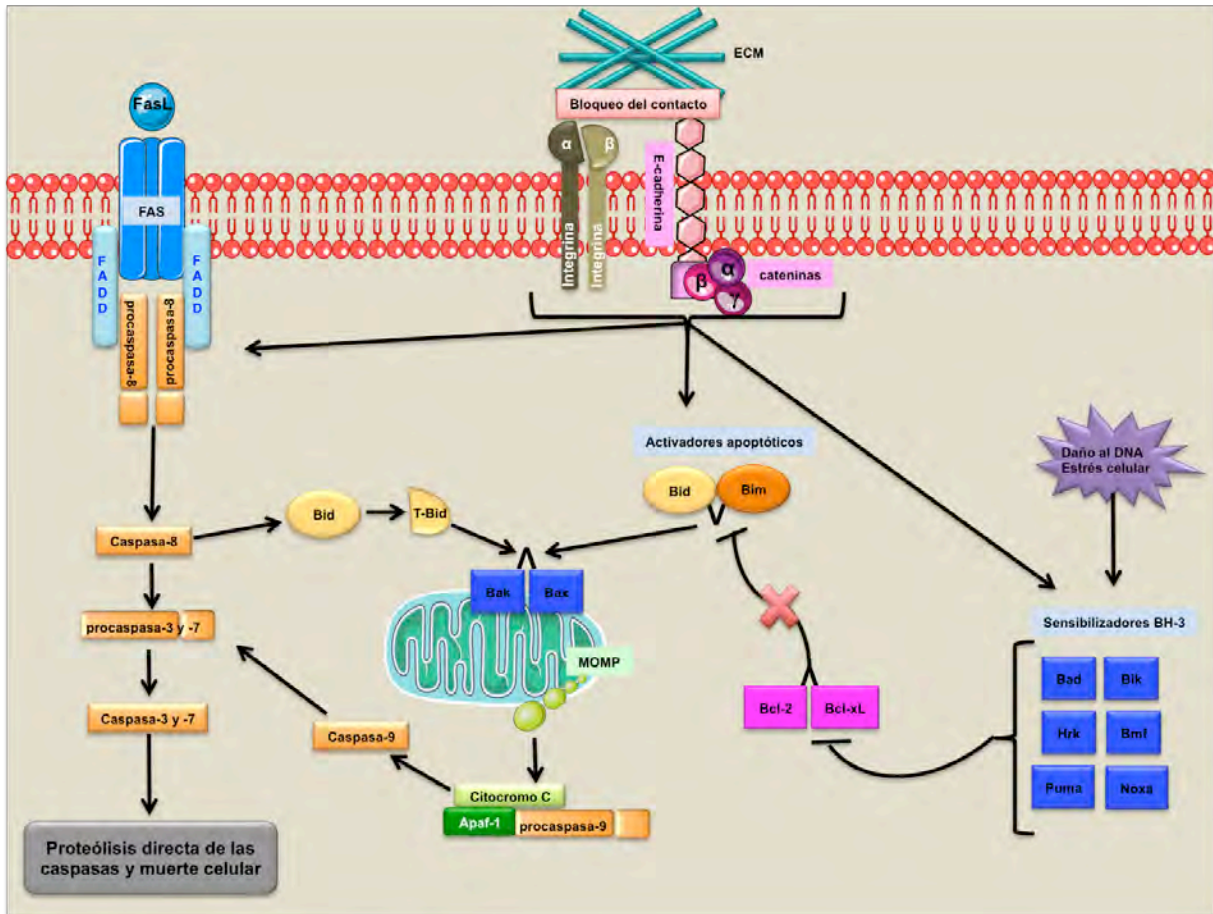


Figura 5. Vías de activación de anoikis.

1.6.4. Piroptosis

La piroptosis es una forma de muerte celular que se desencadena por la perturbación de la homeostasis extra o intracelular relacionada con la inmunidad innata, con características morfológicas específicas como la condensación de la cromatina diferente a la que ocurre en la apoptosis y la permeabilización de la membrana plasmática inducida por la inflamación. Este tipo de muerte es dependiente o no de la Caspasa-1 [179, 203-205]. La piroptosis dependiente de Caspasa-1 (Figura 6A) requiere de la activación de inflamosomas canónicos [204, 206] en la siguiente cascada de eventos:

- La proteína ausente en melanoma 2 (AIM2) se activa después de la unión directa a dsDNA citoplasmático derivado de patógeno.

- Mientras que la Pirina responde a las modificaciones inducidas por toxinas bacterianas de las Rho GTPasas que requieren del ensamblaje de microtúbulos para activarse.
- En tanto que la proteína 4 que contiene el dominio de reclutamiento y activación de caspasa de la familia NLR (NLRC4) se activa por la subunidad en forma de filamento del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) además de su interacción con la proteína inhibidora de apoptosis neuronal (NAIP).
- En esta vía, los patrones asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados con peligros (DAMPs) activan a sus respectivos sensores, las proteínas de receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR), en específico a los que contienen un dominio de pirina 3 (NLRP3) que adicionalmente requiere de la cinasa NEK7.

Para continuar con la construcción del inflamosoma se requiere de la proteína tipo punto asociada con la apoptosis (ASC), del mismo modo que a la procaspasa-1 lo que permite la activación de esta última. Posteriormente la Caspasa-1 promueve la activación de las citocinas inflamatorias interleucina (IL) -1 β e IL-18, así mismo escinde directamente a la gasdermina D, lo que culmina el proceso [205, 207, 208].

La piroptosis independiente de Caspasa-1 (Figura 6B) ocurre a través de la activación de un inflamosoma no canónico, donde Caspasa-4 y Caspasa-5 son los activadores mediante sus dominios de reclutamiento y activación de caspasas que reconocen directamente el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas en el citoplasma de la célula hospedera. Estas caspasas inflamatorias escinden directamente a gasdermina D e inician la vía de piroptosis que de manera indirecta también activa al inflamosoma NLRP3 [179, 204, 206, 207].

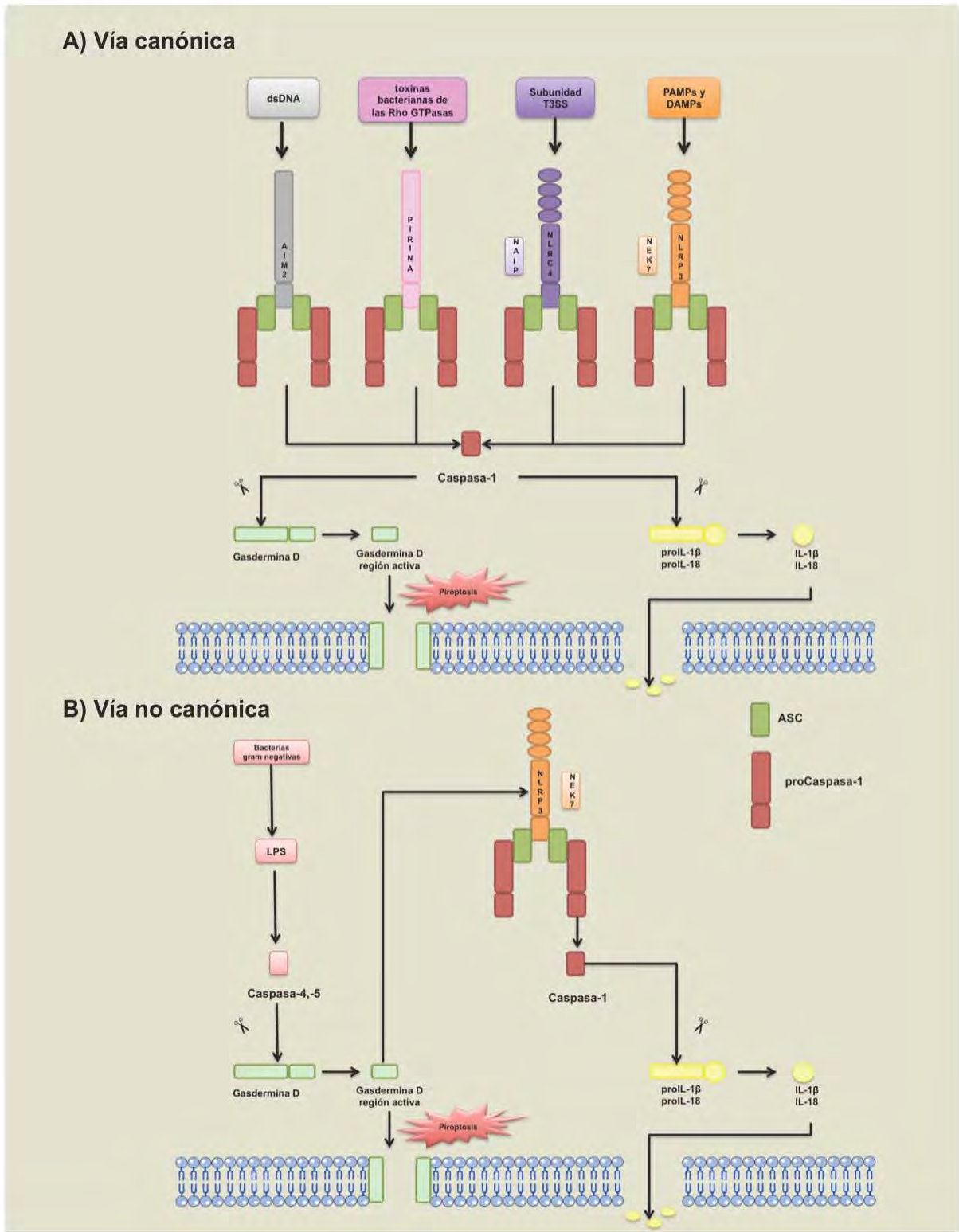


Figura 6. Vías de activación de piroptosis. Vía canónica: dependiente de Caspasa-1 y los diferentes tipos de inflamomas (A). Vía no canónica: que requiere de las Caspasas-4 y -5 para activar a la gasdermina D (B).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y su incidencia se ha incrementado en las últimas décadas, por lo que es importante buscar nuevos compuestos que a la par del efecto antineoplásico tengan menos efectos colaterales en los pacientes comparados con los tratamientos de uso actual. En esta búsqueda, se ha reportado por otros autores y en nuestro laboratorio, que algunos compuestos de vanadio tienen efecto antineoplásico en modelos *in vitro* e *in vivo*, tal es el caso de los compuestos VO_2 y NaVO_3 que han mostrado actividad apoptótica aunque se desconocen los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo, por lo que es importante dilucidar los mecanismos subyacentes que llevan a la muerte celular, con la finalidad de investigar si pueden ser utilizados en el tratamiento del cáncer.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos de vanadio VOSO₄ y NaVO₃ favorecerán la muerte celular por apoptosis en la línea celular A-549 derivada de adenocarcinoma pulmonar humano.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar la vía de muerte celular que inducen los compuestos de vanadio: VOSO₄ y NaVO₃ en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A-549.

4.2. Objetivos particulares

En la línea celular A-549 :

- Evaluar el efecto de los compuestos de vanadio en la viabilidad celular en diferentes concentraciones y tiempos.
- Determinar la translocación de la fosfatidilserina inducida por los compuestos de vanadio.
- Analizar la actividad de los compuestos de vanadio sobre la expresión de proteínas que participan en diferentes mecanismos de muerte celular.
- Evaluar el efecto de los compuestos de vanadio en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

5. MÉTODOS

5.1. Cultivo celular

La línea celular A-549 derivada de carcinoma pulmonar humano se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC[®] CCL-185[™]), se colocaron en cajas de Petri p-100 con medio RPMI-1640 (American Type Culture Collection[®], Manassas, VA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico-antimicótico (Biowest, Nuaille, France) a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire.

5.2. Preparación de los compuestos de vanadio y exposición de la línea A-549

Se preparó una solución inicial de vanadil sulfato (VOSO₄) o metavanadato de sodio (NaVO₃) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) a una concentración de 50 mM en agua Milli-Q estéril. De la solución 50 mM se generaron las diluciones en concentración μ M utilizadas en los experimentos. El Cisplatino (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) se preparó en una concentración final de 24 μ M (control positivo) en dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). Las células A-549 se expusieron a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 25, 50, 100 μ M) de VOSO₄ o NaVO₃ durante 24 y 48 h.

5.3. Ensayo de viabilidad celular

El análisis de la viabilidad celular se realizó con el fluorocromo SYTOX[®] Green (Excitación/Emisión: 504/523 nm, Invitrogen[™], Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA) el cual se une con alta afinidad a los ácidos nucleicos y penetra fácilmente en las células donde la membrana plasmática está comprometida. Después del tiempo de exposición a VOSO₄ o NaVO₃, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X frío, se tripsinizaron (Trypsina 1X, Gibco[®], Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA) y centrifugaron a 1,500 rpm (Universal Centrifuge 320R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) durante 5 min, posteriormente el botón de células se resuspendió en 400 μ L de PBS 1X con SYTOX[®] Green 5 nM y se

incubaron por 15 min a 4° C. Las células se evaluaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de enfoque acústico Attune™ Nxt-4 láseres (Thermo Fisher Scientific, Meridian, Rockford, IL, USA). Se adquirieron 20,000 eventos totales por muestra y los datos se analizaron con el software FlowJo® versión 10.0.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

5.4. Cuantificación de apoptosis

La apoptosis celular se detectó por citometría de flujo usando dos fluorocromos: Anexina V acoplada a alofococianina (APC) (Excitación/Emisión: 633/660 nm, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA) y SYTOX® Green, que permiten identificar a las células en procesos de apoptosis y necrosis. Las células A-549 se expusieron a diferentes concentraciones de VOSO₄ o NaVO₃ (10, 25, 50, 100 µM) durante 24 y 48 h. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X frío, se tripsinizaron, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en solución de unión 1X (0.1 M HEPES a pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA) a una densidad de 1X10⁶ células/mL. Se transfirieron 100 µL de la suspensión celular (1X10⁵ células) a tubos para citometría, se agregaron 5 µL de Anexina V-APC y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 400 µL de solución de unión 1X con 5 nM SYTOX® Green, se incubaron por 10 min y se cuantificaron los niveles de apoptosis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de enfoque acústico Attune™ Nxt-4 láseres. Se adquirieron 20,000 eventos totales por muestra y los datos se analizaron con el software FlowJo® versión 10.0.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

5.5. Extracción total de proteínas

Las células A-549 se sembraron en cajas de Petri p-100 a confluencia del 80%, se expusieron a diferentes concentraciones de VOSO₄ o NaVO₃ (25, 50 y 100 µM) durante 24 y 48 h. Al finalizar los tiempos de exposición, se retiró el sobrenadante, las células se lavaron con PBS 1X frío y se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa (10 µg/mL aprotinina bovina, 10 µL/mL cóctel inhibidor de fosfatasa I y II, 1 mg/mL inhibidor de tripsina, 20 µg/mL

leupeptina, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) a 4° C. Las suspensiones celulares se sonicaron (Ultrasonic processors, Vibra-Cell™ VCX 130PB, VWR International, Radnor, PA, USA) a 25% de amplitud durante 60 s y se centrifugaron a 15,000 rpm (40,240 *rcf*) por 30 min a 4° C. El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente marcados y colocados en hielo. Finalmente, de cada sobrenadante se requirió de una alícuota de 100 µL para cuantificar la proteína, misma que se realizó por el método colorimétrico de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Se utilizó albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) como proteína de referencia y se determinó la absorbancia en un espectrómetro de placas (ELx808 absorbance reader, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 595 nm.

5.6. Western Blot

La identificación de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes al cargar 50 µg de proteína por cada muestra en geles de poliacrilamida al 12%, 13% o 15%. La electroforesis se realizó a 50 mA/gel por 1.5 h. Posteriormente se transfirieron en un sistema semi-húmedo a membranas de nitrocelulosa (Merck Millipore, Tullagreen, Co, Cork) en una cámara Trans-Blot[®] SD (Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) por 1 h a 120 mA. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en TBS 1X a temperatura ambiente y con agitación suave durante 1.5 h, posteriormente se incubaron de manera independiente con los anticuerpos primarios Bax (1:200) y Caspasa-9 (1:500) (Abcam, Cambridge, UK), FasL (1:200, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), Bcl-2 (1:1000), Caspasa-7 (1:500) y Caspasa-8 (1:500) (Cell Signaling Technology[®] Inc., Beverly, MA, USA), Caspasa-1 (1:100) y Caspasa-3 (1:250) (Santa Cruz Biotechnology[®] Inc., Dallas, Texas, USA) y α-Actina (1:500, cortesía del CINVESTAV) en TTBS durante toda la noche a 4° C con agitación suave. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TTBS y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP: rabbit anti-mouse IgG H&L (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), goat anti-rabbit IgG H&L (1:1000, GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA), rabbit anti-goat IgG H&L (1:500, Thermo Fisher Scientific, Meridian, Road Rockford,

IL, USA) en TTBS durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Para finalizar se realizaron 3 lavados con TTBS y un lavado con TBS 1X de 10 min cada uno. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante el ensayo de quimioluminiscencia con los reactivos del kit SuperSignal™ (Thermo Fisher Scientific, Meridian, Road Rockford, IL, USA), como sustrato de la reacción con HRP. La densitometría se realizó con el software GelQuant versión 2.7.0 (DNR Bio-Imaging Systems Limited, Jerusalén, ISR) y los valores numéricos se expresaron en dots per point (dpp).

5.7. Ensayo de Griess

El nitrito (NO₂⁻) es un producto estable de la degradación primaria del óxido nítrico (NO). El sistema reactivo de Griess (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) se basa en la reacción química que utiliza la sulfanilamida y el dihidrocloruro *N*-1-naftiléndiamina en condiciones ácidas (ácido fosfórico) que compiten por el NO₂⁻ en la reacción. Se sembraron las células A-549 (5X10³ células/pozo) en placas de 96 pozos, se expusieron a diferentes concentraciones de VOSO₄ o NaVO₃ (25, 50 y 100 μM) durante 24 y 48 h. Al finalizar los tiempos de exposición, se transfirieron 50 μL de sobrenadante a un pozo limpio en el cual se adicionaron 50 μL del reactivo de Griess, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se determinó la absorbancia en un espectrómetro de placas (ELx808 absorbance reader, Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 595 nm. La concentración μM de NO₂⁻ se cuantificó utilizando como referencia la curva estándar generada con nitrito de sodio (NaNO₂ 0-100 μM, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

5.8. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles intracelulares de ROS se determinaron usando el kit OxiSelect™ *In Vitro* ROS/RNS (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA), el ensayo cuantifica la actividad total de radicales libres mediante el uso de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), la cual se une a los compuestos reactivos que emiten fluorescencia relativa de forma específica basada en la similitud química del 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF). Se sembraron las células A-549 (5X10⁴ células/pozo) en placas de 12 pozos y se

expusieron a diferentes concentraciones de VOSO_4 o NaVO_3 (25, 50 y 100 μM) durante 24 y 48 h. Al concluir el tiempo de exposición, se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min para eliminar restos celulares, posteriormente se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente marcados y se colocaron en hielo. En una placa negra de 96 pozos se transfirieron 50 μL de sobrenadante por muestra, se adicionaron 50 μL de solución catalizadora 1X y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se agregaron 100 μL de la solución DCFH, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. La fluorescencia relativa se determinó en un espectrofluorómetro (POLARstar Omega, BMG Labtech, Weston Parkway Cary, NC, USA) a una excitación de 480 nm con emisión de 530 nm. La concentración de ROS en las muestras se determinó mediante la curva estándar de DCF (0-10,000 nM).

5.9. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos se expresaron como la media \pm error estándar (EE). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett con el software GraphPad Prism[®] versión 6 (La Jolla, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de VOSO₄ y NaVO₃ en la viabilidad celular

Con la finalidad de estudiar los mecanismos de muerte celular que inducen los compuestos de vanadio VOSO₄ y NaVO₃, se administraron inicialmente diferentes concentraciones de estos compuestos a las células A-549, para observar sus efectos sobre la viabilidad celular

Se observó que la exposición a VOSO₄ por un periodo de 24 h no afectó significativamente la viabilidad de las células A-549, la cual solo disminuyó alrededor del 10% en la concentración de 100 µM (Figura 7A). Sin embargo, después de 48 h de tratamiento, la viabilidad celular se comprometió significativamente a partir de la concentración de 25 µM y hasta 100 µM (Figura 7B), en comparación con las células que no fueron expuestas a VOSO₄.

La exposición a NaVO₃ durante 24 h mostró una disminución de la viabilidad celular de la línea A-549 de manera dosis dependiente. La tasa de viabilidad disminuyó 10 y 20% con las concentraciones de 50 y 100 µM de NaVO₃, respectivamente, lo cual resultó estadísticamente significativo en relación con las células que no se expusieron a NaVO₃ (Figura 7C). El efecto sobre la inhibición de la viabilidad fue más evidente después de 48 h con la exposición en las concentraciones de 25 a 100 µM de NaVO₃ (Figura 7D).

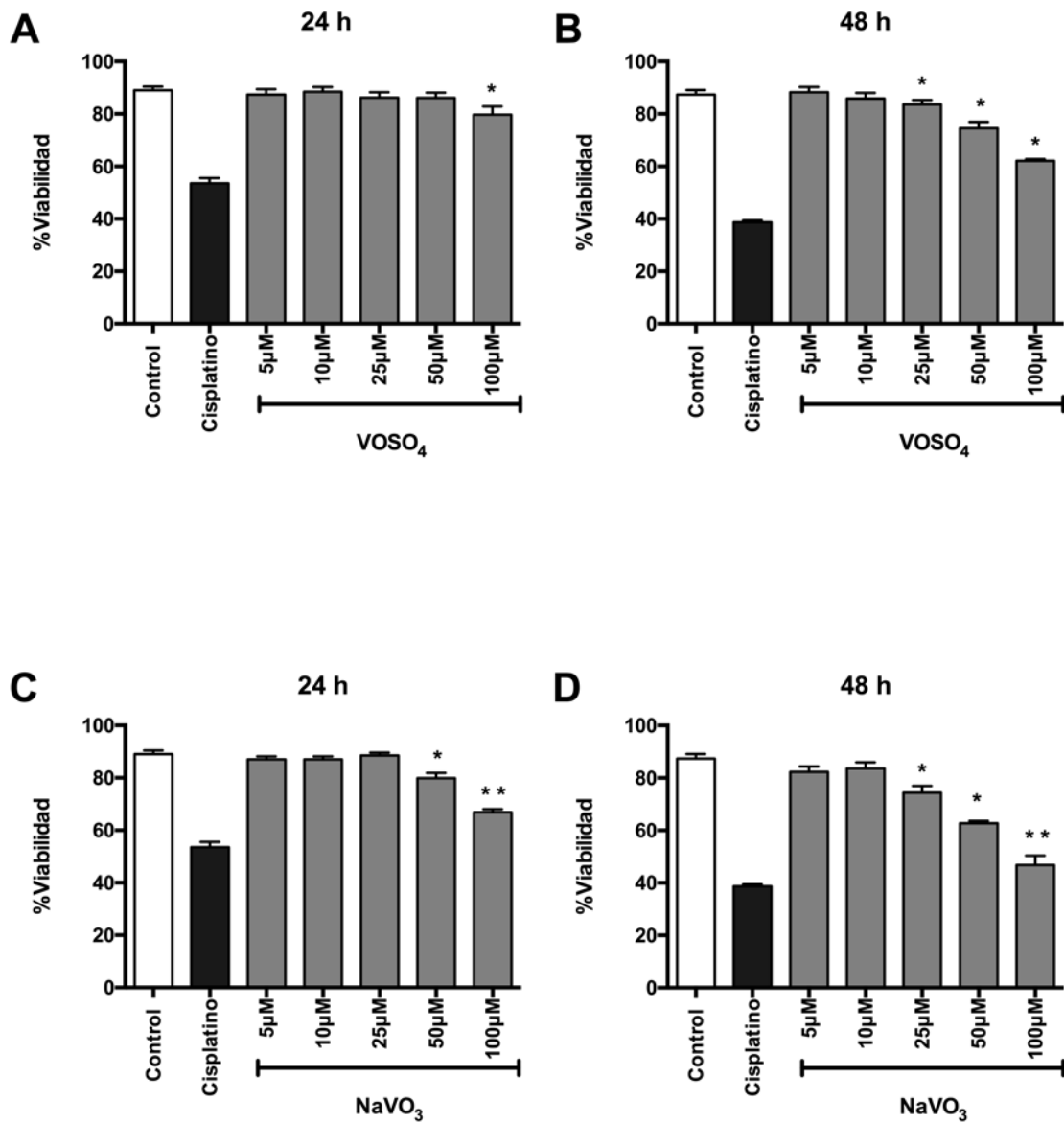


Figura 7. Efecto de VOSO₄ (A y B) y NaVO₃ (C y D) en la viabilidad celular de A-549. Las células se expusieron a concentraciones crecientes (5 a 100 μM) de los compuestos de vanadio durante 24 y 48 h. Las células se tiñeron con SYTOX[®] Green. Los datos se expresan en porcentaje de células viables y representan la media ± error estándar (EE) de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control *p<0.05 y **p<0.01, ANOVA-Dunnett.

6.2. Determinación de la translocación de la fosfatidilserina en presencia de VOSO₄ y NaVO₃

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad, donde se observó que el porcentaje de células viables disminuyó con las diferentes concentraciones de los compuestos de vanadio, se decidió explorar si este efecto se relacionaba con la inducción de apoptosis. Por lo cual se analizó como marcador de apoptosis, la translocación de la fosfatidilserina (PS) a la parte externa de la membrana plasmática.

Las células A-549 expuestas a VOSO₄ durante 24 h mostraron un incremento del porcentaje de apoptosis en comparación con el grupo control, únicamente con la concentración de 100 µM. Sin embargo el efecto que ejercen las diferentes concentraciones de VOSO₄ fue similar o incluso ligeramente menor respecto al porcentaje de apoptosis generado en el grupo expuesto a cisplatino (Figura 8A). El efecto del VOSO₄ por 48 h, con todas las concentraciones probadas (10 a 100 µM), incrementó de 2 a 3 veces la apoptosis al compararlo con el grupo control. Sin embargo, dicho efecto fue menor respecto del que ejerce el cisplatino sobre las células A-549 (Figura 8B).

La exposición a NaVO₃ por 24 h indujo la translocación de la PS a la membrana celular desde la concentración de 10 µM, observándose la máxima expresión de aproximadamente el 40%, desde la concentración de 25 µM y hasta 100 µM de NaVO₃. Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y el efecto fue similar al que mostró el cisplatino (Figura 8C).

Por otra parte, a las 48 h de tratamiento con NaVO₃, la inducción de la translocación de la PS incrementó significativamente al compararlo con el grupo control. El valor máximo de apoptosis que se alcanzó con la concentración de 100 µM (50%), fue idéntico al inducido por el tratamiento con cisplatino (Figura 8D).

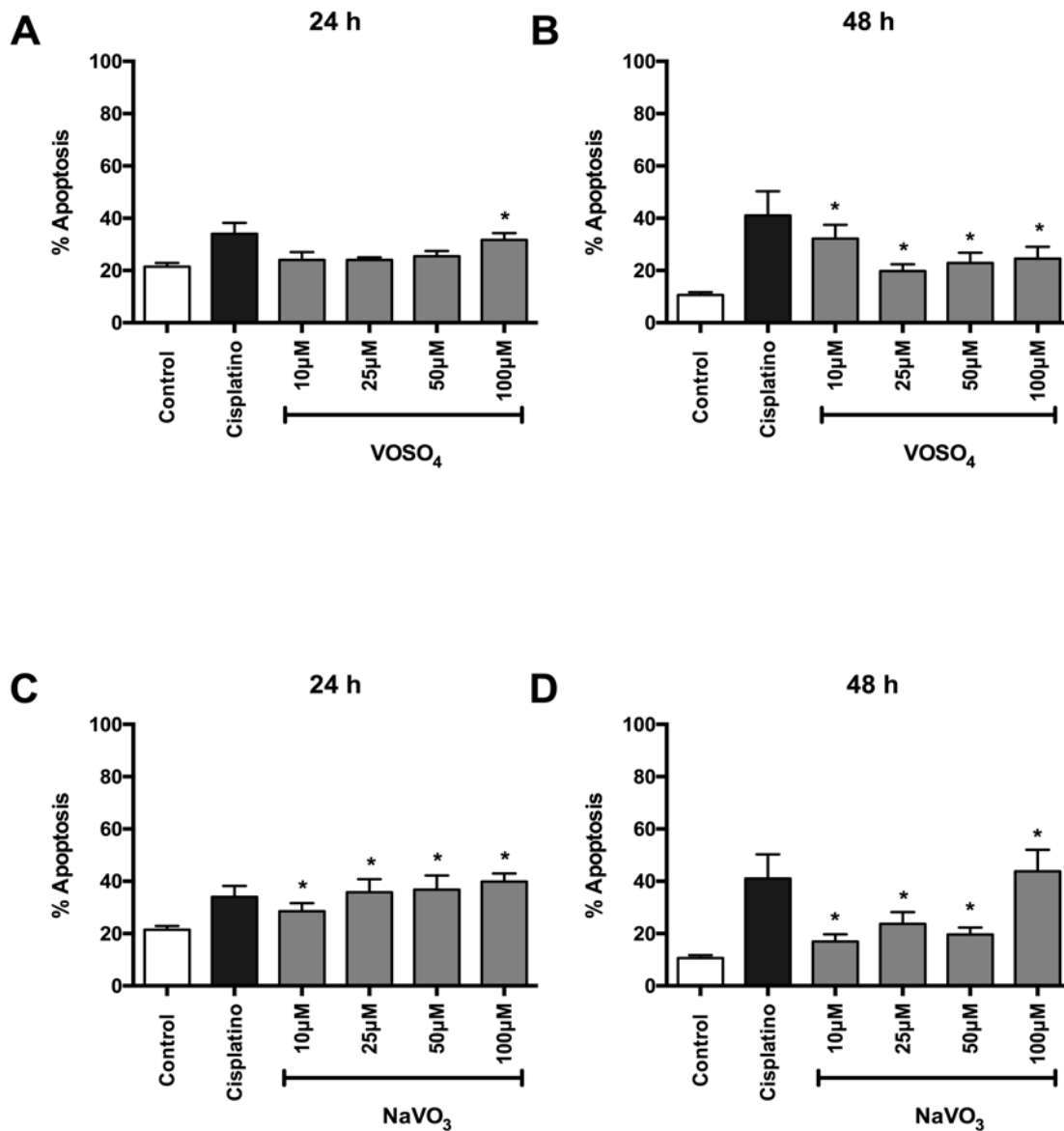


Figura 8. Externalización de la fosfatidilserina inducida por VOSO₄ (A y B) y NaVO₃ (C y D) en las células A-549. Las células se expusieron a concentraciones crecientes (10 a 100 μM) de los compuestos de vanadio durante 24 h y 48 h. Las células en apoptosis se cuantificaron por la tinción de Anexina V-APC. Los datos se expresan en porcentaje de apoptosis total y representan la media ± EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control *p<0.05, ANOVA-Dunnett.

6.3. Efecto del VOSO₄ y NaVO₃ en la expresión de proteínas que participan en diversos mecanismos de muerte celular

Con el objetivo de dilucidar la vía implicada en la apoptosis inducida por los compuestos de vanadio, se evaluaron las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa-9 que participan en la vía intrínseca, así como las proteínas FasL y Caspasa-8 de la vía extrínseca. Además, se evaluaron la Caspasa-3 y Caspasa-7 que son puntos de convergencia entre las vías de la apoptosis. Mientras que la evaluación de la Caspasa-1 se determinó por su participación en el mecanismo de muerte por piroptosis.

La exposición a VOSO₄ por 24 h disminuyó significativamente la expresión de Bax, Caspasa-3p18, Caspasa-3p11 y Caspasa-9 al compararlo con el grupo control (Figura 9A y 9B). Con relación al tratamiento y la exposición de NaVO₃, indujo un patrón similar en la expresión de estas proteínas, excepto en Caspasa-9, la cual no se modificó. Las proteínas Bcl-2 y Caspasa-3 total no mostraron cambios en presencia de los compuestos de vanadio.

Cuando se realizó el análisis de la expresión de las proteínas previamente mencionadas se observó una modificación significativa después de 48 h de exposición a VOSO₄ o NaVO₃ (Figura 10). La expresión de Bax disminuyó en las concentraciones de 25 y 50 µM de VOSO₄, situación que fue opuesta ante la exposición a NaVO₃, ya que este último incrementó la expresión de la proteína. En cuanto a la expresión de Caspasa-9 se observó un incremento significativo al compararlo con el grupo control en la concentración de 25 µM de NaVO₃, a diferencia de la concentración de 100 µM donde la expresión fue totalmente abatida, igual que con las concentraciones de 50 y 100 µM de VOSO₄. Con relación a Bcl-2, Caspasa-3 total y Caspasa-3p18, la expresión de estas proteínas mostró una tendencia significativa a la disminución (Figura 10A y 10B). La expresión de Caspasa-7 solo se observó en las células que se expusieron a cisplatino a las 24 y 48 h (Figura 9 y 10).

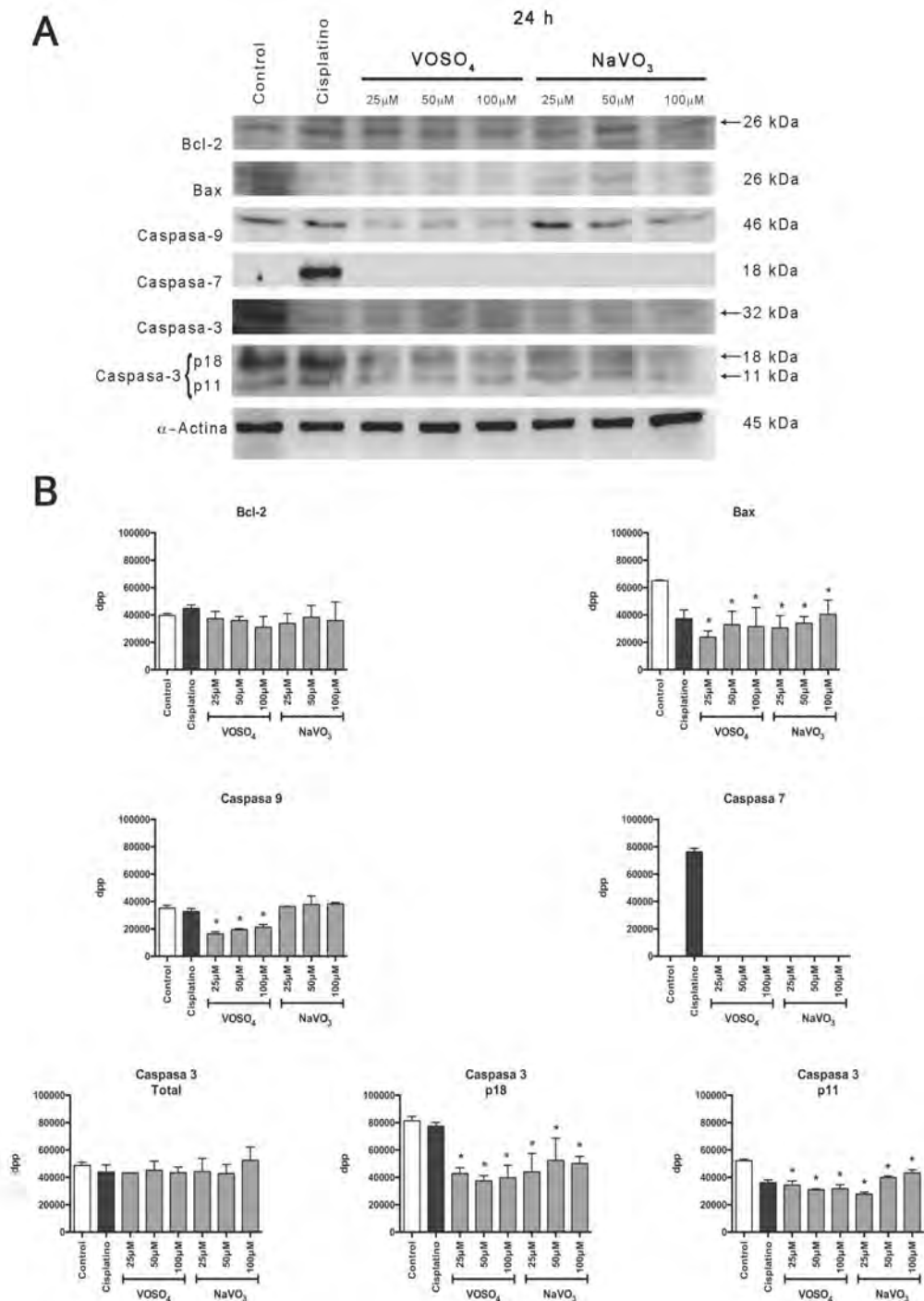


Figura 9. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 por 24 h en la expresión de proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis en las células A-549. A) Análisis de Western blot de la expresión de las proteínas: Bcl-2, Bax, Caspasa-9, Caspasa-7 y Caspasa-3. Las células se expusieron a concentraciones crecientes (25 a 100 μM) de los compuestos de vanadio. Se utilizó α -Actina como control de carga. B) Representación gráfica de los datos numéricos obtenidos por densitometría. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y representan la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control * $p < 0.05$, ANOVA-Dunnett.

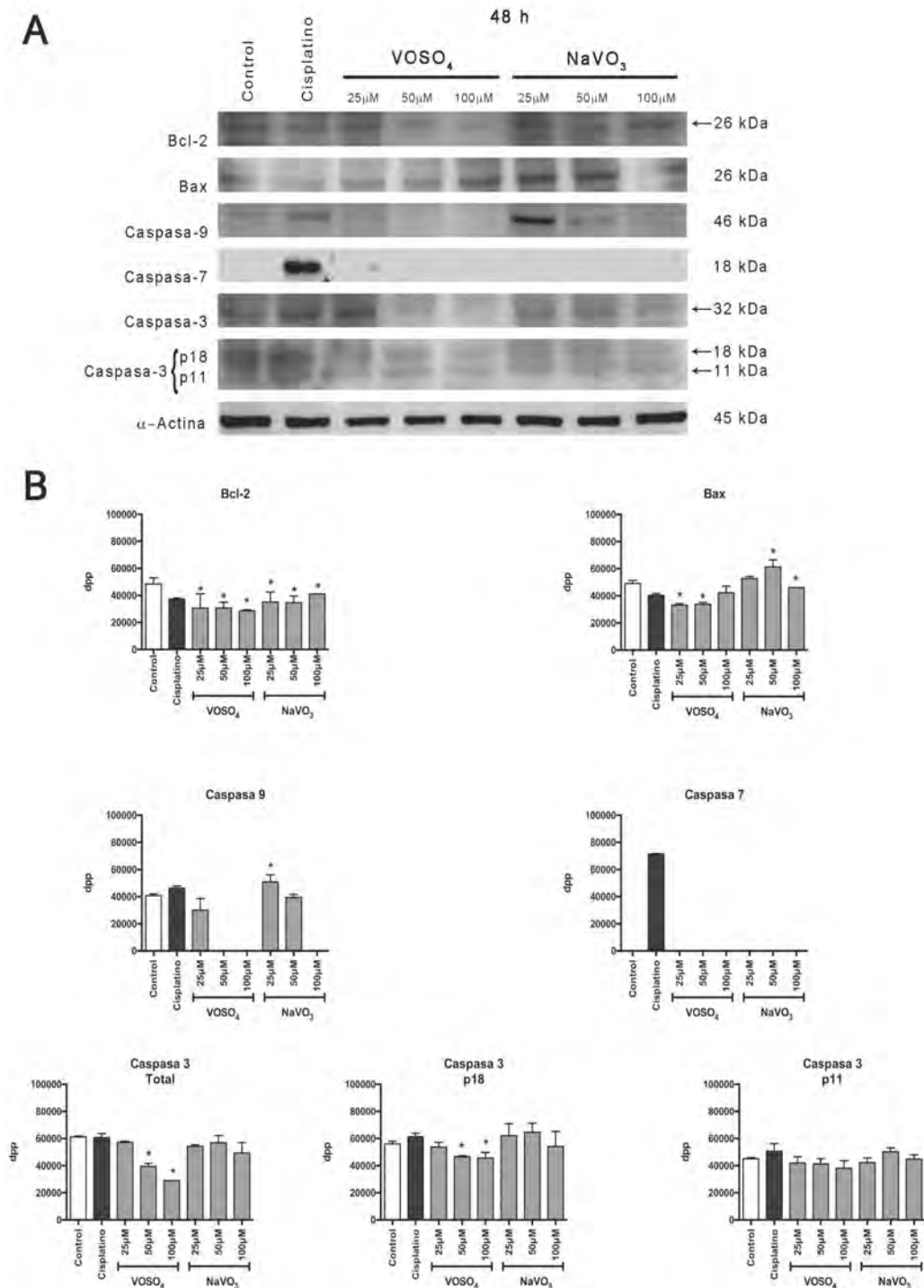


Figura 10. Efecto de VOSO₄ y NaVO₃ por 48 h en la expresión de proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis en las células A-549. A) Análisis de Western blot de la expresión de las proteínas: Bcl-2, Bax, Caspasa-9, Caspasa-7 y Caspasa-3. Las células se expusieron a concentraciones crecientes (25 a 100 μM) de los compuestos de vanadio. Se utilizó α-Actina como control de carga. B) Representación gráfica de los datos numéricos obtenidos por densitometría. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y representan la media ± EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control *p<0.05, ANOVA-Dunnett.

Además, en la expresión de las proteínas que participan en la vía extrínseca de la apoptosis, se observó que FasL disminuyó cerca del 60% después de 24 y 48 h de exposición (Figura 11A y 11B) al comparar con el grupo control, esto es independiente del compuesto y la concentración empleada.

Cabe mencionar que ninguno de los compuestos de vanadio utilizados durante 24 h indujo la expresión de Caspasa-8, la cual únicamente se expresó en el grupo tratado con cisplatino (Figura 11A). Sin embargo, los tratamientos por 48 h con 25 μM de VOSO_4 , indujeron la expresión de Caspasa-8 y el tratamiento con 50 y 100 μM de NaVO_3 , indujo la expresión de Caspasa-8 a niveles basales (Figura 11B).

Con lo que respecta a la expresión de la proteína Caspasa-1, la cual participa en el proceso de muerte celular por piroptosis (Figura 12), no se observaron diferencias con las células control después de 24 h de exposición con cualquiera de los compuestos de vanadio. No obstante, a las 48 h de tratamiento, la expresión de la Caspasa-1 disminuyó significativamente ($p < 0.05$).

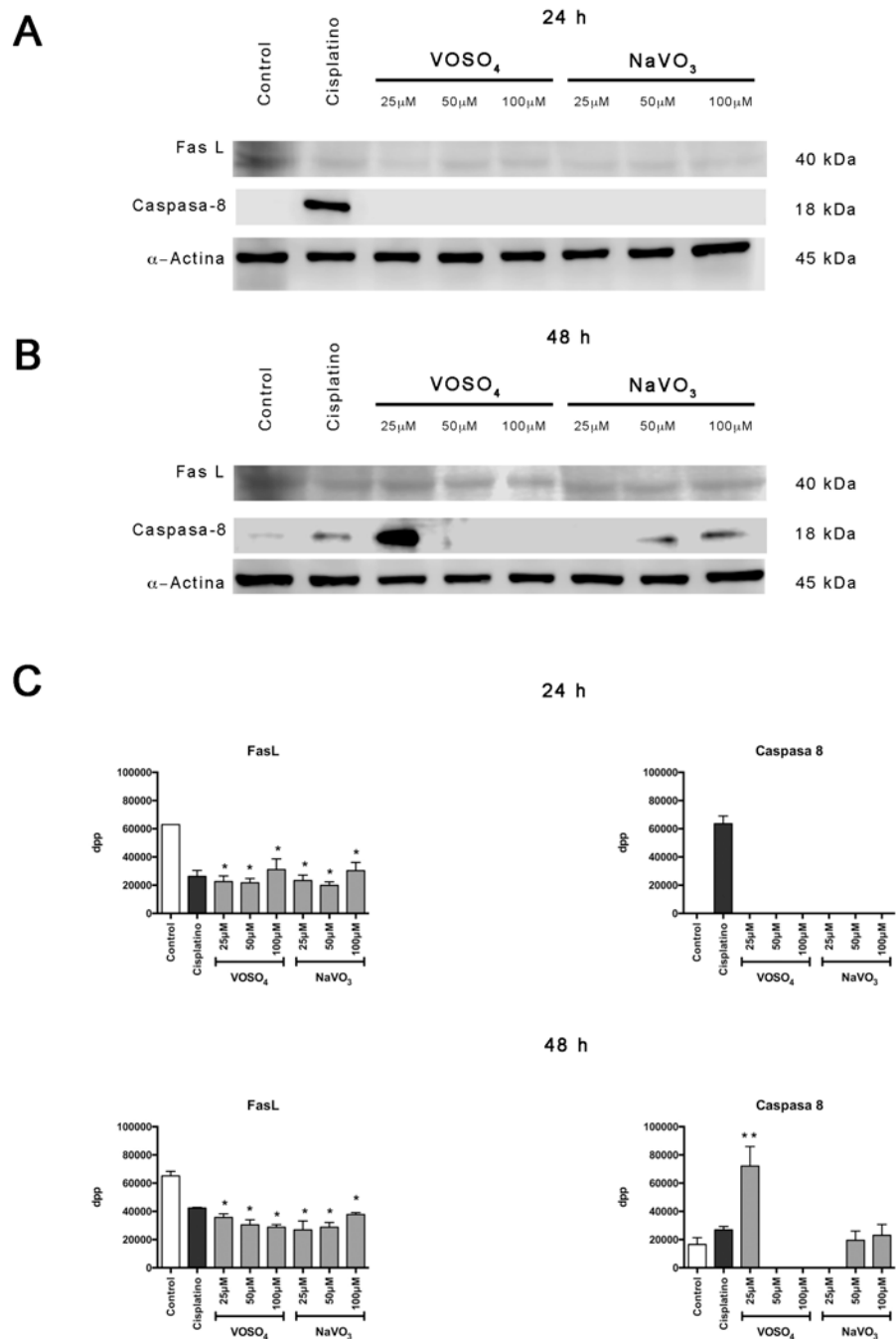


Figura 11. Efecto de VOSO₄ y NaVO₃ en la expresión de proteínas que participan en la vía extrínseca de la apoptosis en las células A-549. Análisis de Western blot de la expresión de las proteínas: FasL y Caspasa-8 se determinaron a A) 24 h y B) 48 h de exposición a los compuestos de vanadio a concentraciones crecientes (25 a 100 μM). Se utilizó α-Actina como control de carga. C) Representación gráfica de los datos numéricos obtenidos por densitometría. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y representan la media ± EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control *p<0.05 y **<0.01, ANOVA-Dunnett.

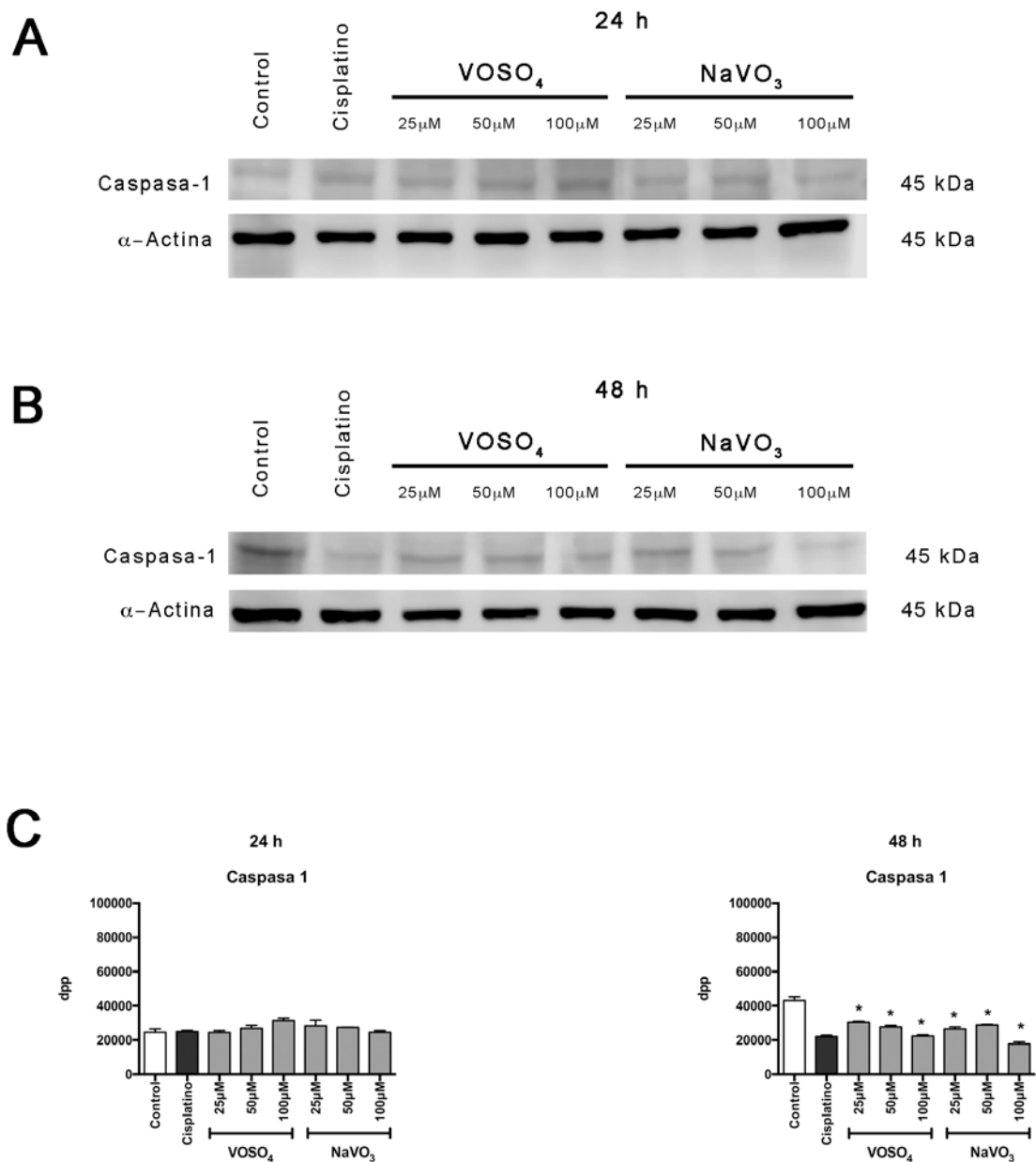


Figura 12. Efecto de VOSO_4 y NaVO_3 en la expresión de la proteína Caspasa-1 en las células A-549. Análisis de Western blot de la expresión de la Caspasa-1 fue determinada después de A) 24 h y B) 48 h de exposición a los compuestos de vanadio a concentraciones crecientes (25 a 100 μM). Se utilizó α -Actina como control de carga. C) Representación gráfica de los datos numéricos obtenidos por densitometría. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y representan la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control * $p < 0.05$, ANOVA-Dunnnett.

6.4. Efecto del VOSO₄ y NaVO₃ en la producción de NO y ROS

Se consideró que los niveles de expresión de proteínas clave en los mecanismos de muerte celular que se evaluaron no se modificaron de manera significativa y, que los efectos biológicos de los compuestos de vanadio son consecuencia del estado de oxidación en relación con la permeabilidad de la membrana celular y la capacidad de generar RNS y ROS para inducir muerte celular, se evaluó la liberación de las RNS y las ROS en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

La producción de óxido nítrico (NO) no tuvo ninguna variación en todos los tratamientos a los compuestos de vanadio a 24 h (Figura 13A) o a 48 h de exposición (Figura 13B). Sin embargo, es interesante resaltar que la generación de ROS incrementó de forma drástica con ambos compuestos, observando la mayor inducción a la concentración de 100 μ M de VOSO₄ (Figura 14).

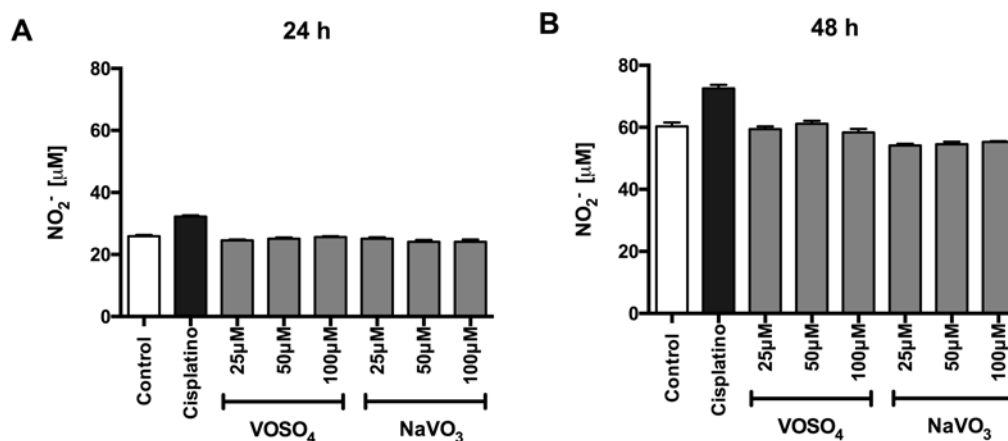


Figura 13. Producción de NO en células A-549 estimuladas con VOSO₄ y NaVO₃. La concentración de NO₂⁻ se determinó mediante el ensayo de Griess después de A) 24 h y B) 48 h de exposición a los compuestos de vanadio a concentraciones crecientes (25 a 100 μ M). Los datos representan la media \pm EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control * $p < 0.05$.

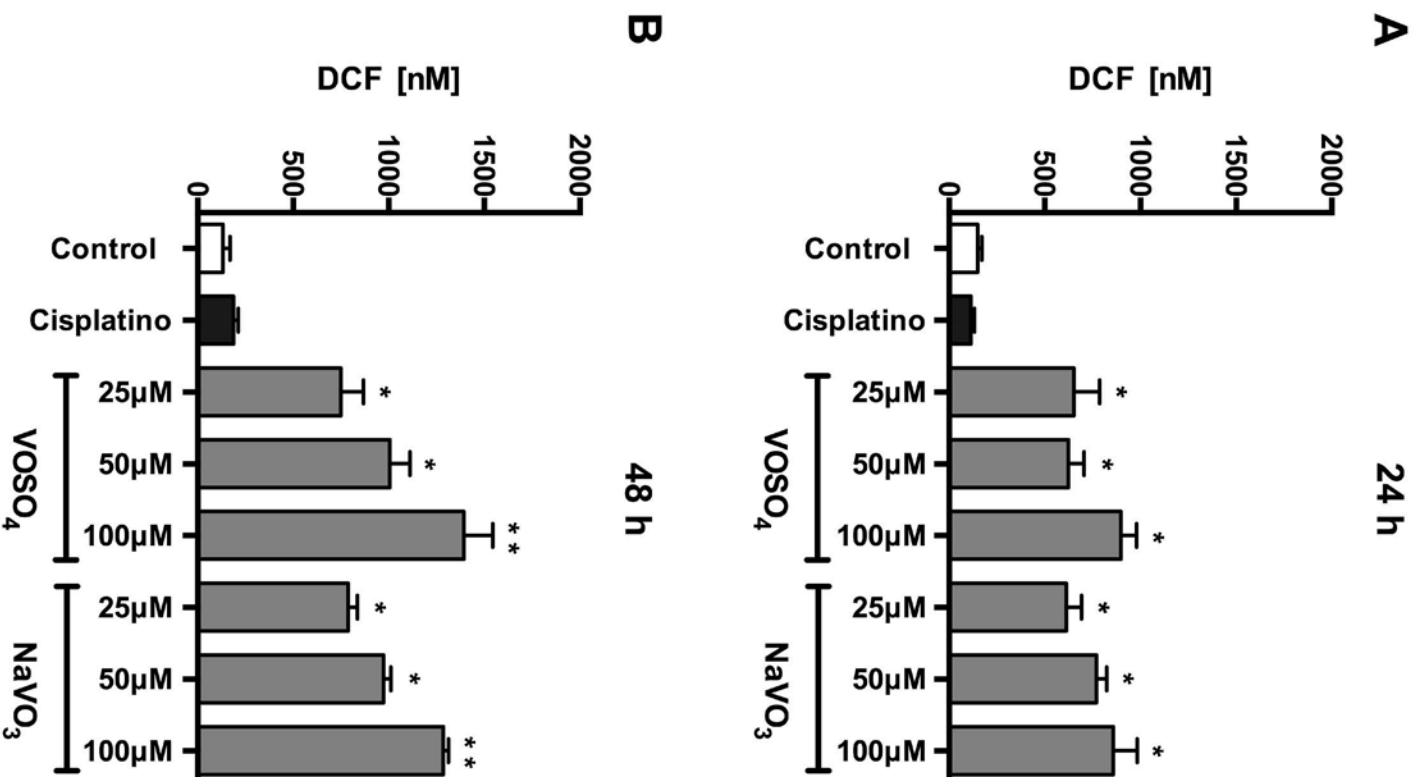


Figura 14. Generación de ROS en células A-549 estimuladas con VOSO₄ y NaVO₃. Las gráficas indican la concentración de 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína (DCF) "radicales libres totales" a las A) 24 h y B) 48 h de exposición a los compuestos de vanadio a concentraciones crecientes (25 a 100 μM). Los datos representan la media ± EE de tres experimentos por triplicado. Diferencia significativa respecto del control *p<0.05 y **p<0.01.

7. DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas moléculas que complementen o sustituyan a los procedimientos actuales que se emplean en el tratamiento del cáncer se ha convertido en una prioridad, ya que dichos tratamientos inducen efectos tóxicos severos [209]. En años recientes se ha reportado que diferentes compuestos metálicos de transición poseen actividad antineoplásica en estudios *in vitro* e *in vivo* [82, 210]. Entre estos compuestos destacan los derivados del vanadio [69].

El vanadio es un elemento de transición que se encuentra tanto en forma aniónica como catiónica, con diferentes estados de oxidación [58]. Diversos estudios reportan que algunos compuestos de vanadio previenen e inhiben el crecimiento de varios tipos de cáncer en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* [92, 130, 136].

Se ha demostrado que los compuestos VOSO₄ y NaVO₃ tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las células de rhabdomyosarcoma a concentraciones similares a las que utilizamos en nuestro estudio [111]. Otro compuesto de vanadio con valencia +4 induce arresto del ciclo celular, activación de las caspasas efectoras 3 y 7 que participan en la muerte celular por apoptosis y disminuye el potencial de membrana mitocondrial en líneas celulares de cáncer de pulmón y de mama [141].

También se ha descrito que la exposición a ortovanadato de sodio (NaVO₄) inhibe la proliferación de líneas celulares cancerígenas de colon, próstata, pulmón, riñón y de células escamosas de cavidad oral, así como la activación de la apoptosis en concentraciones semejantes a las que reportamos del NaVO₃ [163, 165, 166]. No obstante estos estudios solo sugieren que dicha actividad se debe a la interferencia entre diferentes fosfoproteínas de señalización, posiblemente p53 a través de la vía de ATM [172]. Su efecto sobre las vías de señalización celular que participan en el ciclo celular y la apoptosis parecen ser dependientes del estado de oxidación, a pesar de ello el mecanismo citotóxico de los compuestos de vanadio aún no es claro [82, 103, 165, 169, 211, 212].

Algunos compuestos de vanadio (+4) enriquecidos con luteolina también inducen apoptosis en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer de colon y de mama, mediante la activación de p53, Bax y Caspasa-3, así como la regulación negativa de Bcl-2, las cuales son proteínas clave de la vía intrínseca [145, 213-215].

En nuestro estudio los compuestos VOSO_4 (+4) y NaVO_3 (+5) representan las valencias biológicamente importantes del vanadio y de los cuales analizamos los posibles mecanismos responsables de la actividad citotóxica [65, 216-218].

Como ya se mencionó la apoptosis es uno de los mecanismos citotóxicos que desencadena la exposición a algún xenobiótico, sin embargo existen otros tipos de muerte celular que pueden activarse tales como autofagia, anoikis y piroptosis [203, 219-221]. La piroptosis es una forma de muerte celular programada que requiere de la actividad específica de la Caspasa-1, la cual no participa en las vías apoptóticas clásicas [222, 223]. Anoikis se describe como la muerte provocada por la inapropiada o la pérdida de la adhesión celular, es un evento regulador en la renovación de los epitelios y se caracteriza por la activación de Caspasa-3 [102, 103, 180, 202, 224].

Nuestros resultados de la exposición de las células A-549 a NaVO_3 mostraron que, independientemente del tiempo de exposición, las moléculas evaluadas de la vía intrínseca y extrínseca no se modificaron significativamente, así como los productos finales donde ambas vías convergen (Caspasa-3 y -7). Se obtuvieron resultados semejantes en las células expuestas a VOSO_4 , por lo que consideramos que la muerte celular programada no fue el mecanismo responsable de la actividad citotóxica de ambos compuestos. Dado que no se modificó la expresión de Caspasa-3, la muerte celular por anoikis también se descartó como la responsable del efecto citotóxico de los compuestos de vanadio que utilizamos; es posible que la inhibición de anoikis se deba a la estabilización de proteínas antiapoptóticas o a la activación de proteínas que participan en la vía de las MAPK [5, 73, 102, 103, 136, 225, 226].

En este trabajo observamos que la expresión de la Caspasa-1 disminuyó, por lo que la piroptosis difícilmente puede considerarse como responsable de la muerte celular en la línea A-549, esto aunado a que se ha descrito que la Caspasa-1 puede inducir la activación de Caspasa-7, la cual no observamos en presencia de NaVO₃ o VOSO₄ [205, 222, 227].

La muerte celular regulada requiere de estrés oxidante e incremento de la concentración de Ca²⁺ citosólico, lo cual implica el incremento en la producción de ROS [137, 228, 229]. Nuestros resultados mostraron que la generación de ROS incrementó de manera notable en las células tratadas con VOSO₄ independientemente del tiempo de exposición. La exposición a NaVO₃ también aumentó la expresión de ROS, con una diferencia aproximada del 14% en comparación con VOSO₄. Además nuestros resultados no mostraron que los compuestos de vanadio afectaran las determinaciones de NO a pesar de que este último representa la especie reactiva de nitrógeno más frecuente [230].

Los compuestos de vanadio con valencia +4 se oxidan a +5 por la acción del oxígeno molecular, acompañado por la emisión del radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo [68]. En líneas celulares los compuestos de vanadio son reducidos de +5 a +4 mediante antioxidantes intracelulares [7, 66]. A pesar de que otros autores describen que la toxicidad de los compuestos de vanadio incrementa en relación a su estado de oxidación y que el incremento de ROS se asocia con la inducción de muerte celular por apoptosis [61, 137, 231, 232], lo observado nuestros resultados no concuerda con dichos reportes.

Nuestros resultados sugieren que la citotoxicidad de VOSO₄ y NaVO₃ en las células A-549 es probablemente mediada por un mecanismo similar al observado en las células de adenocarcinoma ductal de páncreas, el cual consiste en un conjunto de procesos de muerte: apoptosis, necroptosis y catástrofe mitótica [130].

Sin embargo, es importante recordar que se ha establecido claramente que la necroptosis es dependiente de TNF- α solo en situaciones donde se inhiben las caspasas [233-235]. Por lo tanto, solo está claro que la muerte celular inducida por VOSO_4 y NaVO_3 se asocia con una mayor producción de ROS, pero no es probable que sea mediante TNF- α . Información reciente indica que, en ciudades altamente contaminadas, el material particulado en el ambiente induce necroptosis mediada por el gen de respuesta a crecimiento temprano-1 dependiente de ROS mitocondrial [236]; aunque es un enigma el mecanismo que desencadena esta forma particular de necroptosis. Además, se ha observado que la disfunción de los lisosomas inducida por los compuestos de vanadio [218, 237] podría sensibilizar a las células hacia la necroptosis, al promover la expresión de RIPK1 y RIPK3 que son las proteínas que conforman el necroptosoma [238-240]. Algunos autores [241] sugieren que los mecanismos no apoptóticos representan otra vía de muerte celular de interés, por lo que es importante dilucidar como es que se llevan a cabo su activación en diferentes tipos celulares. Futuros estudios sobre los diferentes mecanismos de muerte celular inducidos por los compuestos de vanadio serían de relevancia terapéutica para dar soporte al uso de éstos en diversos tratamientos para erradicar el cáncer de pulmón.

8. CONCLUSIONES

El tratamiento con VOSO₄ y NaVO₃ en la línea celular A-549 derivada de cáncer de pulmón, indujo muerte celular a través de un mecanismo no identificado, ya que no se observó que la concentración de Bax incrementara y que la de Bcl-2 disminuyera; la expresión de las Caspasas (-1, -3, -7, -8 y -9), de FasL y la producción de óxido nítrico no se modificaron, pero la generación de ROS aumentó de forma considerable, en especial en las células que se trataron con VOSO₄, esto debido posiblemente a mecanismos diferentes a los descritos hasta el momento (Figura 15). Nuestros resultados sugieren que la apoptosis, anoikis y piroptosis no participan en la muerte celular inducida por los compuestos de vanadio estudiados en la línea A-549, aunque no podemos descartar la necroptosis.

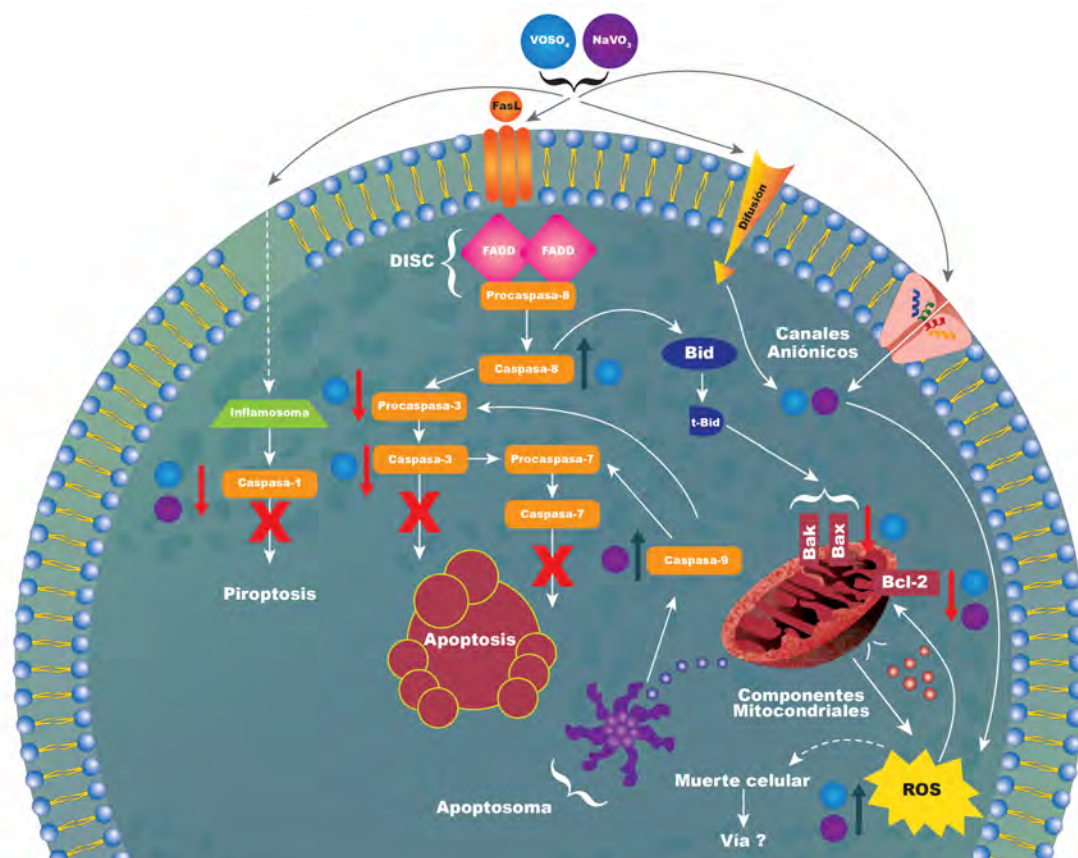


Figura 15. Actividad de los compuesto de vanadio sobre los mecanismo de muerte celular en células de cáncer de pulmón. VOSO₄ (●) inducen el incremento (↑) de la expresión de Caspasa-8 y la disminución (↓) de Bax (componentes proapoptótico) y Caspasa-3. NaVO₃ (●) induce el incremento de la expresión de Caspasa-9, y ambos compuesto de vanadio reducen la expresión de Bcl-2 (componente antiapoptótico) e inducen el incremento de los niveles de secreción de ROS ★.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de los compuestos de vanadio en la expresión de proteínas necroptóticas: RIPK1, RIPK3 y MLKL.
- Investigar si los compuestos de vanadio pueden inducir la resistencia a anoikis al evaluar la expresión de las proteínas NF- κ B, Twist, PI3K, AKT, MEK y ERK.
- Evaluar el efecto de los compuestos de vanadio en la expresión de proteínas que participan en el mecanismo de autofagia: LC3, p62 y Beclina-1.

10. REFERENCIAS

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(1): p. 7-30.
2. Karasawa, T. and P.S. Steyger, *An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity*. Toxicology Letters, 2015. **237**(3): p. 219-27.
3. Jungwirth, U., et al., *Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes*. Antioxidants and Redox Signaling, 2011. **15**(4): p. 1085-127.
4. Liang, J.X., et al., *Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **177**: p. 276-286.
5. Pessoa, J.C., S. Etcheverry, and D. Gambino, *Vanadium compounds in medicine*. Coordination Chemistry Reviews, 2015. **301-302**: p. 24-48.
6. Kioseoglou, E., et al., *The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics*. Coordination Chemistry Reviews, 2015. **301-302**: p. 87-105.
7. Korbecki, J., et al., *Biochemical and medical importance of vanadium compounds*. Acta Biochimica Polonica, 2012. **59**(2): p. 195-200.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Nathan, C. and A. Ding, *Nonresolving inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 871-82.
11. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018.
12. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. International Journal of Cancer, 2018.
13. http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=
14. de Groot, P. and R.F. Munden, *Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention*. Radiologic Clinics of North America, 2012. **50**(5): p. 863-76.
15. Duruisseaux, M. and M. Esteller, *Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications*. Seminars in Cancer Biology, 2018. **51**: p. 116-128.
16. Oroz-Parra, I., et al., *Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from Conus californicus Venom*. Toxins (Basel), 2016. **8**(2): p. 38.
17. de Groot, P.M., et al., *The epidemiology of lung cancer*. Translational Lung Cancer Research, 2018. **7**(3): p. 220-233.
18. Torre, L.A., R.L. Siegel, and A. Jemal, *Lung Cancer Statistics*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016. **893**: p. 1-19.
19. Miller, K.D., et al., *Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2018*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018.

20. Planchard, D., et al., *Differential expression of biomarkers in men and women*. *Seminars in Oncology*, 2009. **36**(6): p. 553-65.
21. Hamra, G.B., et al., *Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Environmental Health Perspectives*, 2014. **122**(9): p. 906-11.
22. Chalela, R., et al., *Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy*. *Journal of Thoracic Disease*, 2017. **9**(7): p. 2142-2158.
23. Inamura, K., *Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification*. *Frontiers in Oncology*, 2017. **7**: p. 193.
24. Reck, M. and K.F. Rabe, *Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *The New England Journal of Medicine*, 2017. **377**(9): p. 849-861.
25. Fujimoto, J. and Wistuba, II, *Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma*. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 2014. **31**(4): p. 306-13.
26. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
27. Harms, A., et al., *[The new TNM classification for lung tumors : Changes and the assessment of multiple tumor foci]*. *Pathologie*, 2017. **38**(1): p. 11-20.
28. Van Schil, P.E., R. Rami-Porta, and H. Asamura, *The 8(th) TNM edition for lung cancer: a critical analysis*. *Annals of Translation Medicine*, 2018. **6**(5): p. 87.
29. Lim, W., et al., *The 8(th) lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications*. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2018. **8**(7): p. 709-718.
30. Zarogoulidis, K., et al., *Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Journal of Thoracic Disease*, 2013. **5 Suppl 4**: p. S389-96.
31. Mott, T.F., *Lung Cancer: Management*. *FP Essentials*, 2018. **464**: p. 27-30.
32. Shroff, G.S., et al., *Staging Lung Cancer: Metastasis*. *Radiologic Clinics of North America*, 2018. **56**(3): p. 411-418.
33. Naylor, E.C., *Adjuvant Therapy for Stage I and II Non-Small Cell Lung Cancer*. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 2016. **25**(3): p. 585-99.
34. Mery, B., et al., *The evolving locally-advanced non-small cell lung cancer landscape: Building on past evidence and experience*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2015. **96**(2): p. 319-27.
35. Baker, S., et al., *A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer*. *Radiation Oncology*, 2016. **11**(1): p. 115.
36. Kris, M.G., et al., *Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(25): p. 2960-2974.
37. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *European Journal of Pharmacology*, 2014. **740**: p. 364-78.

38. Fennell, D.A., et al., *Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer*. *Cancer Treatment Reviews*, 2016. **44**: p. 42-50.
39. Johnstone, T.C., K. Suntharalingam, and S.J. Lippard, *The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs*. *Chemical Reviews*, 2016. **116**(5): p. 3436-86.
40. Theile, D., *Under-Reported Aspects of Platinum Drug Pharmacology*. *Molecules*, 2017. **22**(3).
41. Johnstone, T.C., K. Suntharalingam, and S.J. Lippard, *Third row transition metals for the treatment of cancer*. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 2015. **373**(2037).
42. Dilruba, S. and G.V. Kalayda, *Platinum-based drugs: past, present and future*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016. **77**(6): p. 1103-24.
43. Rose, M.C., E. Kostyanovskaya, and R.S. Huang, *Pharmacogenomics of cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer*. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 2014. **12**(5): p. 198-209.
44. Abada, P. and S.B. Howell, *Regulation of Cisplatin cytotoxicity by Cu influx transporters*. *Metal-Based Drugs*, 2010. **2010**: p. 317581.
45. Howell, S.B., et al., *Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs*. *Molecular Pharmacology*, 2010. **77**(6): p. 887-94.
46. Zhang, S., et al., *Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity*. *Cancer Research*, 2006. **66**(17): p. 8847-57.
47. Mezencev, R., *Interactions of cisplatin with non-DNA targets and their influence on anticancer activity and drug toxicity: the complex world of the platinum complex*. *Current Cancer Drug Targets*, 2015. **14**(9): p. 794-816.
48. Osborn, M.F., et al., *Platinum-RNA modifications following drug treatment in *S. cerevisiae* identified by click chemistry and enzymatic mapping*. *ACS Chemical Biology*, 2014. **9**(10): p. 2404-11.
49. Graf, N., et al., *Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity*. *ChemBioChem*, 2011. **12**(7): p. 1115-23.
50. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. *Cancer Treatment Reviews*, 2007. **33**(1): p. 9-23.
51. Todd, R.C. and S.J. Lippard, *Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds*. *Metallomics*, 2009. **1**(4): p. 280-91.
52. Mohammad, R.M., et al., *Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer*. *Seminars in Cancer Biology*, 2015. **35 Suppl**: p. S78-S103.
53. Dugbartey, G.J., L.J. Peppone, and I.A. de Graaf, *An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures*. *Toxicology*, 2016. **371**: p. 58-66.
54. Hartmann, J.T. and H.P. Lipp, *Toxicity of platinum compounds*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2003. **4**(6): p. 889-901.
55. Lipp, H.P. and J.T. Hartmann, *[Platinum compounds: metabolism, toxicity and supportive strategies]*. *Praxis (Bern 1994)*, 2005. **94**(6): p. 187-98.

56. Ndagi, U., N. Mhlongo, and M.E. Soliman, *Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective*. Drug Design, Development and Therapy, 2017. **11**: p. 599-616.
57. Schmitt, S.M., M. Frezza, and Q.P. Dou, *New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer*. Frontiers in Bioscience (Schol Ed), 2012. **4**: p. 375-91.
58. Deo, K.M., et al., *Transition Metal Intercalators as Anticancer Agents-Recent Advances*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(11).
59. Desoize, B., *Metals and metal compounds in cancer treatment*. Anticancer Research, 2004. **24**(3a): p. 1529-44.
60. Konkankit, C.C., et al., *Anticancer activity of complexes of the third row transition metals, rhenium, osmium, and iridium*. Dalton Transactions, 2018. **47**(30): p. 9934-9974.
61. Barceloux, D.G., *Vanadium*. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 1999. **37**(2): p. 265-78.
62. Mukherjee, B., et al., *Vanadium--an element of atypical biological significance*. Toxicology Letters, 2004. **150**(2): p. 135-43.
63. Rehder, D., *The role of vanadium in biology*. Metallomics, 2015. **7**(5): p. 730-42.
64. Goc, A., *Biological activity of vanadium compounds*. Open Life Sciences, 2006. **1**(3).
65. Kordowiak, A.M., et al., *Comparison of the effect of VOSO₄, Na₃VO₄ and NaVO₃ on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line*. Polish Journal of Pathology, 2007. **58**(1): p. 51-7.
66. Crans, D.C., et al., *The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds*. Chemical Reviews, 2004. **104**(2): p. 849-902.
67. Crans, D.C., et al., *Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution*. Inorganic Chemistry, 2010. **49**(9): p. 4245-56.
68. Cuesta, S., D. Frances, and G.B. Garcia, *ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate*. Neurotoxicology and Teratology, 2011. **33**(2): p. 297-302.
69. Evangelou, A.M., *Vanadium in cancer treatment*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2002. **42**(3): p. 249-65.
70. Imtiaz, M., et al., *Vanadium, recent advancements and research prospects: A review*. Environment International, 2015. **80**: p. 79-88.
71. Scior, T., et al., *Are vanadium compounds drugable? Structures and effects of antidiabetic vanadium compounds: a critical review*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2005. **5**(11): p. 995-1008.
72. Scior, T., et al., *Why Antidiabetic Vanadium Complexes are Not in the Pipeline of "Big Pharma" Drug Research? A Critical Review*. Current Medicinal Chemistry, 2016. **23**(25): p. 2874-2891.
73. Niu, X., et al., *The Molecular Mechanisms and Rational Design of Anti-Diabetic Vanadium Compounds*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016. **16**(8): p. 811-22.
74. Ray, R.S., et al., *Vanadium, a versatile biochemical effector in chemical rat mammary carcinogenesis*. Nutrition and Cancer, 2005. **51**(2): p. 184-96.

75. Ray, R.S., et al., *Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro*. International Journal of Cancer, 2007. **120**(1): p. 13-23.
76. Rehder, D., *Vanadium. Its role for humans*. Metal Ions in Life Sciences, 2013. **13**: p. 139-69.
77. Aubrecht, J., et al., *Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999. **154**(3): p. 228-35.
78. Ghosh, P., et al., *Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(4): p. 1536-45.
79. Havelek, R., et al., *Differences in vanadocene dichloride and cisplatin effect on MOLT-4 leukemia and human peripheral blood mononuclear cells*. Journal of Medicinal Chemistry, 2012. **8**(4): p. 615-21.
80. Navara, C.S., et al., *Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells*. Anticancer Drugs, 2001. **12**(4): p. 369-76.
81. Fu, Y., et al., *Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008. **13**(6): p. 1001-9.
82. Wu, J.X., Y.H. Hong, and X.G. Yang, *Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2016. **21**(8): p. 919-929.
83. Zhang, Y., et al., *Vanadyl complexes discriminate between neuroblastoma cells and primary neurons by inducing cell-specific apoptotic pathways*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2018. **188**: p. 76-87.
84. Ying, P., et al., *New Oxidovanadium Complexes Incorporating Thiosemicarbazones and 1, 10-Phenanthroline Derivatives as DNA Cleavage, Potential Anticancer Agents, and Hydroxyl Radical Scavenger*. Chemical Biology & Drug Design, 2015. **86**(4): p. 926-37.
85. Hilger, R.A., et al., *Titanocene Y and Vanadocene Y: Platinum Resistance-Breaking Cytotoxic and DNA-Targeting Anticancer Drug Candidates*. Letters in Drug Design and Discovery, 2011. **8**(10): p. 904-910.
86. Sugiyama, H., et al., *Regulation of the physiological effects of peroxidovanadium(V) complexes by the electronic nature of ligands*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2013. **121**: p. 66-76.
87. Sugiyama, H., et al., *Synthesis, structure, and physiological effects of peroxovanadium(V) complexes containing amino acid derivatives as ancillary ligands*. Chemistry Letters, 2012. **41**(4): p. 377-379.
88. Faure, R., et al., *Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line*. Journal of Cellular Biochemistry, 1995. **59**(3): p. 389-401.
89. Andrezalova, L., H. Gbelcova, and Z. Durackova, *DNA damage induction and antiproliferative activity of vanadium(V) oxido monoperoxido complex containing two bidentate heteroligands*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2013. **27**(1): p. 21-6.
90. Petanidis, S., et al., *In vitro and ex vivo vanadium antitumor activity in (TGF-beta)-induced EMT. Synergistic activity with carboplatin and correlation with tumor*

- metastasis in cancer patients*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016. **74**: p. 121-34.
91. Scrivens, P.J., et al., *Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues*. Molecular Cancer Therapeutics, 2003. **2**(10): p. 1053-9.
 92. Rozzo, C., et al., *Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **174**: p. 14-24.
 93. Strianese, M., et al., *Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells*. Journal of Cellular Physiology, 2013. **228**(11): p. 2202-9.
 94. Bieger, S., A. Morinville, and D. Maysinger, *Bisperoxovanadium complex promotes dopamine exocytosis in PC12 cells*. Neurochemistry International, 2002. **40**(4): p. 307-14.
 95. Cerovac, Z., et al., *Activation of MAPK by potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate (V)*. Neurochemistry International, 1999. **34**(4): p. 337-44.
 96. Rumora, L., et al., *Differential regulation of JNK activation and MKP-1 expression by peroxovanadium complexes*. Neurochemistry International, 2001. **38**(4): p. 341-7.
 97. Rumora, L., et al., *BpV (phen) induces apoptosis of RINm5F cells by modulation of MAPKs and MKP-1*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **300**(4): p. 877-83.
 98. Ban, J., et al., *Molecular mechanisms involved in the antiproliferative action of protein tyrosine phosphatase inhibitor potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate*. Life Sciences, 2000. **68**(2): p. 165-75.
 99. Chen, Q., et al., *Potassium Bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate (bpV(phen)) Induces Apoptosis and Pyroptosis and Disrupts the P62-HDAC6 Protein Interaction to Suppress the Acetylated Microtubule-dependent Degradation of Autophagosomes*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(43): p. 26051-8.
 100. Hall, I.H., et al., *Cytotoxicity and mode of action of vanada- and niobatricarbadecaboranyl monohalide complexes in human HL-60 promyelocytic leukemia cells*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003. **93**(3-4): p. 125-31.
 101. D'Cruz, O.J. and F.M. Uckun, *Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2002. **11**(12): p. 1829-36.
 102. Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. Biochimica et Biophysica Acta, 2013. **1833**(12): p. 3481-3498.
 103. Taddei, M.L., et al., *Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases*. Journal of Pathology, 2012. **226**(2): p. 380-93.
 104. Liao, X., et al., *DNA binding, antitumor activities, and hydroxyl radical scavenging properties of novel oxovanadium (IV) complexes with substituted isoniazid*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2013. **18**(8): p. 975-84.
 105. Dong, Y., et al., *Synthesis, X-ray structure, and anti-leukemic activity of oxovanadium(IV) complexes*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2000. **78**(4): p. 321-30.

106. Narla, R.K., et al., *In vivo antitumor activity of bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxovanadium(IV) (METVAN [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂])*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(7): p. 2124-33.
107. Narla, R.K., et al., *Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(4): p. 1546-56.
108. Narla, R.K., et al., *Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxovanadium(I.V.) as a novel antileukemic agent with matrix metalloproteinase inhibitory activity*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(4): p. 1094-101.
109. Narla, R.K., Y. Dong, and F.M. Uckun, *Apoptosis inducing novel anti-leukemic agent, bis(4,7-dimethyl-1,10 phenanthroline) sulfatooxovanadium(IV) [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂] depolarizes mitochondrial membranes*. Leukemia and Lymphoma, 2001. **41**(5-6): p. 625-34.
110. Gomathi Sankareswari, V., et al., *Interaction of oxovanadium(IV)-salphen complexes with bovine serum albumin and their cytotoxicity against cancer*. Dalton Transactions, 2014. **43**(8): p. 3260-72.
111. Dabros, W., et al., *Vanadium compounds affect growth and morphology of human rhabdomyosarcoma cell line*. Polish Journal of Pathology, 2011. **62**(4): p. 262-8.
112. Clark, O., et al., *Oxovanadium-based inhibitors can drive redox-sensitive cytotoxicity in neuroblastoma cells and synergise strongly with buthionine sulfoximine*. Cancer Letters, 2015. **357**(1): p. 316-327.
113. Jackson, J.K., et al., *A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(maltolato)oxovanadium in mice*. British Journal of Cancer, 1997. **75**(7): p. 1014-20.
114. Liu, S., G. Liu, and Y. Yi, *Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: synthesis, characterization, and biological activities*. Carbohydrate Polymers, 2015. **121**: p. 86-91.
115. Cunha-de Padua, M.M., et al., *Toxicity of native and oxovanadium (IV/V) galactomannan complexes on HepG2 cells is related to impairment of mitochondrial functions*. Carbohydrate Polymers, 2017. **173**: p. 665-675.
116. Yamaguchi, T., et al., *Oxovanadium complexes with quinoline and pyridinone ligands: syntheses of the complexes and effect of alkyl chains on their apoptosis-inducing activity in leukemia cells*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2012. **20**(9): p. 3058-64.
117. Yamaguchi, T., et al., *Synthesis of oxovanadium complexes and their apoptosis-inducing activity in leukemia cells*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 2012. **60**(4): p. 508-12.
118. Ni, L., et al., *Synthesis, in vitro cytotoxicity, and structure-activity relationships (SAR) of multidentate oxidovanadium(IV) complexes as anticancer agents*. Dalton Transactions, 2018. **47**(30): p. 10035-10045.
119. Lopez Valdez, N., *Mecanismos de la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México., 2013: p. 66.*
120. Bijelic, A., M. Aureliano, and A. Rompel, *Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer*. Angewandte Chemie International Edition in English, 2018.

121. Aureliano, M. and C.A. Ohlin, *Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014. **137**: p. 123-30.
122. Nunes, G.G., et al., *Synthesis, characterization and chemoprotective activity of polyoxovanadates against DNA alkylation*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2012. **108**: p. 36-46.
123. Kioseoglou, E., et al., *Binary decavanadate-betaine composite materials of potential anticarcinogenic activity*. Journal of Inorganic and General Chemistry, 2013. **639**(8-9): p. 1407-1416.
124. Li, Y.T., et al., *Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds*. Transition Metal Chemistry, 2010. **35**(5): p. 597-603.
125. Zhai, F., et al., *Synthesis and biological evaluation of decavanadate $Na_4Co(H_2O)_6V_{10}O_{28} \cdot 18H_2O$* . Biomedicine and Pharmacotherapy, 2009. **63**(1): p. 51-5.
126. Leon, I.E., et al., *Vanadium and cancer treatment: antitumoral mechanisms of three oxovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014. **134**: p. 106-17.
127. Leon, I.E., et al., *Spectroscopic characterization of an oxovanadium(IV) complex of oxodiacetic acid and o-phenanthroline. Bioactivity on osteoblast-like cells in culture*. Biological Trace Element Research, 2012. **147**(1-3): p. 403-7.
128. Rivadeneira, J., et al., *Spectroscopic characterization of a VO_2^+ complex of oxodiacetic acid and its bioactivity on osteoblast-like cells in culture*. Biological Trace Element Research, 2007. **118**(2): p. 159-66.
129. Rivadeneira, J., et al., *Cytotoxicity of a vanadyl(IV) complex with a multidentate oxygen donor in osteoblast cell lines in culture*. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **6**(1): p. 9-23.
130. Kowalski, S., et al., *Selective cytotoxicity of vanadium complexes on human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line by inducing necroptosis, apoptosis and mitotic catastrophe process*. Oncotarget, 2017. **8**(36): p. 60324-60341.
131. Sutradhar, M., et al., *Water soluble heterometallic potassium-dioxovanadium(V) complexes as potential antiproliferative agents*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2016. **155**: p. 17-25.
132. Molinuevo, M.S., et al., *Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2004. **53**(2): p. 163-72.
133. Leon, I.E., et al., *Decoding the anticancer activity of VO-clioquinol compound: the mechanism of action and cell death pathways in human osteosarcoma cells*. Metallomics, 2017. **9**(7): p. 891-901.
134. Zhang, Y., et al., *The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium (III,IV,V)-dipicolinate complexes*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**(1): p. 80-7.
135. Leon, I.E., et al., *Hydroxylamido-amino acid complexes of oxovanadium(V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model*. Metallomics, 2012. **4**(12): p. 1287-96.
136. Leon, I.E., et al., *Oxovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2015. **20**(7): p. 1175-91.

137. Leon, I.E., et al., *Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin [VO(chrysin)2EtOH]2 in a human osteosarcoma model: the role of oxidative stress and apoptosis*. Dalton Transactions, 2013. **42**(33): p. 11868-80.
138. Leon, I.E., et al., *Deciphering the effect of an oxovanadium(IV) complex with the flavonoid chrysin (VOChrys) on intracellular cell signalling pathways in an osteosarcoma cell line*. Metallomics, 2016. **8**(8): p. 739-49.
139. Martinez Medina, J.J., et al., *Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium(IV) complex*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **166**: p. 150-161.
140. Etcheverry, S.B., et al., *Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008. **13**(3): p. 435-47.
141. Islas, M.S., et al., *Insights into the mechanisms underlying the antitumor activity of an oxidovanadium(IV) compound with the antioxidant naringenin. Albumin binding studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2015. **149**: p. 12-24.
142. Ferrer, E.G., et al., *Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2006. **11**(6): p. 791-801.
143. Naso, L.G., et al., *Antioxidant, DNA cleavage, and cellular effects of silibinin and a new oxovanadium(IV)/silibinin complex*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2011. **16**(4): p. 653-68.
144. Leon, I.E., et al., *Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2014. **19**(1): p. 59-74.
145. Naso, L.G., et al., *Inhibition of the metastatic progression of breast and colorectal cancer in vitro and in vivo in murine model by the oxidovanadium(IV) complex with luteolin*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2016. **24**(22): p. 6004-6011.
146. Naso, L.G., et al., *Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium(IV) complex with luteolin*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2016. **157**: p. 80-93.
147. Leon, I.E., et al., *In vitro and in vivo antitumor effects of the VO-chrysin complex on a new three-dimensional osteosarcoma spheroids model and a xenograft tumor in mice*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2016. **21**(8): p. 1009-1020.
148. Roy, S., et al., *Anionic Dinuclear Oxidovanadium(IV) Complexes with Azo Functionalized Tridentate Ligands and mu-Ethoxido Bridge Leading to an Unsymmetric Twisted Arrangement: Synthesis, X-ray Structure, Magnetic Properties, and Cytotoxicity*. Inorganic Chemistry, 2018. **57**(10): p. 5767-5781.
149. Scalese, G., et al., *Evaluation of cellular uptake, cytotoxicity and cellular ultrastructural effects of heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of salicylaldimines and polypyridyl ligands*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **166**: p. 162-172.
150. Scalese, G., et al., *Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against Trypanosoma cruzi and prostate cancer cells*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **175**: p. 154-166.

151. Benitez, J., et al., *A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agent*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009. **103**(10): p. 1386-94.
152. Rivadeneira, J., et al., *Biological effects of a complex of vanadium(V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: mechanism of action*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009. **103**(4): p. 633-42.
153. Sankar Ray, R., et al., *Suppression of cell proliferation, DNA protein cross-links, and induction of apoptosis by vanadium in chemical rat mammary carcinogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **1675**(1-3): p. 165-73.
154. Chakraborty, T., et al., *Vanadium inhibits the development of 2-acetylaminofluorene-induced premalignant phenotype in a two-stage chemical rat hepatocarcinogenesis model*. Life Sciences, 2006. **78**(24): p. 2839-51.
155. Chakraborty, T., et al., *Vanadium induces apoptosis and modulates the expressions of metallothionein, Ki-67 nuclear antigen, and p53 during 2-acetylaminofluorene-induced rat liver preneoplasia*. Journal of Cellular Biochemistry, 2005. **94**(4): p. 744-62.
156. Chakraborty, T., et al., *Molecular basis of vanadium-mediated inhibition of hepatocellular preneoplasia during experimental hepatocarcinogenesis in rats*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **101**(1): p. 244-58.
157. Chakraborty, T., et al., *Carcinogen-induced early molecular events and its implication in the initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats: chemopreventive role of vanadium on this process*. Biochimica et Biophysica Acta, 2007. **1772**(1): p. 48-59.
158. Chakraborty, T., et al., *Vanadium limits the expression of proliferating cell nuclear antigen and inhibits early DNA damage during diethylnitrosamine-induced hepatocellular preneoplasia in rats*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2006. **47**(8): p. 603-15.
159. Kanna, P.S., et al., *Vanadium inhibits placental glutathione S-transferase (GST-P) positive foci in 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2003. **17**(6): p. 357-65.
160. Samanta, S., et al., *Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon: removal of O(6)-methylguanine DNA adducts, p53 expression, inducible nitric oxide synthase downregulation and apoptotic induction*. Mutation Research, 2008. **650**(2): p. 123-31.
161. Kanna, P.S., et al., *Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine*. World Journal Gastroenterology, 2003. **9**(5): p. 1020-7.
162. Ray, R.S., et al., *Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line*. Chemico-Biological Interactions, 2006. **163**(3): p. 239-47.
163. Klein, A., et al., *Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer cells (A549, HTB44, DU145)*. Folia Biologica (Krakow), 2008. **56**(3-4): p. 115-21.
164. Suwalsky, M., et al., *Human erythrocytes and neuroblastoma cells are in vitro affected by sodium orthovanadate*. Biochimica et Biophysica Acta, 2012. **1818**(9): p. 2260-70.
165. Tian, X., et al., *Sodium orthovanadate induces the apoptosis of SH-SY5Y cells by inhibiting PIWIL2*. Molecular Medicine Reports, 2016. **13**(1): p. 874-80.

166. Khalil, A.A. and M.J. Jameson, *Sodium Orthovanadate Inhibits Proliferation and Triggers Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma in vitro*. Biochemistry (Moscow), 2017. **82**(2): p. 149-155.
167. Chien, P.S., O.T. Mak, and H.J. Huang, *Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **339**(2): p. 562-8.
168. Goncalves, A.P., et al., *Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR*. Life Sciences, 2011. **89**(11-12): p. 371-7.
169. Wu, Y., et al., *Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo*. Cancer Letters, 2014. **351**(1): p. 108-16.
170. Gunther, T.M., et al., *Sodium orthovanadate associated with pharmacological doses of ascorbate causes an increased generation of ROS in tumor cells that inhibits proliferation and triggers apoptosis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **430**(3): p. 883-8.
171. Chin, L.S., et al., *Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB*. Journal of Biomedical Science, 1999. **6**(3): p. 213-8.
172. Suzuki, K., et al., *Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: involvement of ATM pathway*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007. **220**(1): p. 83-91.
173. Zhang, Z., et al., *Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. **392**(2): p. 311-20.
174. Petanidis, S., et al., *Novel ternary vanadium-betaine-peroxido species suppresses H-ras and matrix metalloproteinase-2 expression by increasing reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cells*. Cancer Letters, 2013. **335**(2): p. 387-96.
175. Zhang, Z., et al., *Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(10): p. 1333-42.
176. Yang, J., et al., *Vanadate-induced antiproliferative and apoptotic response in esophageal squamous carcinoma cell line EC109*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2016. **79**(19): p. 864-8.
177. Holko, P., et al., *The effect of vanadyl sulphate (VOSO₄) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines*. Polish Journal of Pathology, 2008. **59**(1): p. 3-8.
178. Wozniak, K. and J. Blasiak, *Vanadyl sulfate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa cells*. Archives of Toxicology, 2003. **78**(1): p. 7-15.
179. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death and Differentiation, 2018. **25**(3): p. 486-541.
180. Peixoto, M.S., M.F. de Oliveira Galvao, and S.R. Batistuzzo de Medeiros, *Cell death pathways of particulate matter toxicity*. Chemosphere, 2017. **188**: p. 32-48.
181. Nishida, K., O. Yamaguchi, and K. Otsu, *Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease*. Circulation Research, 2008. **103**(4): p. 343-51.

182. Saptarshi, S.R., A. Duschl, and A.L. Lopata, *Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview*. Nanomedicine (London), 2015. **10**(13): p. 2075-92.
183. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death and Differentiation, 2012. **19**(1): p. 107-20.
184. Ou, L., et al., *The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis*. International Journal of Nanomedicine, 2017. **12**: p. 6633-6646.
185. Hamacher-Brady, A. and N.R. Brady, *Bax/Bak-dependent, Drp1-independent Targeting of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) into Inner Mitochondrial Compartments Counteracts Smac/DIABLO-dependent Effector Caspase Activation*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(36): p. 22005-18.
186. Brentnall, M., et al., *Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis*. BMC Cell Biology, 2013. **14**: p. 32.
187. Cepero, E., et al., *Caspase-9 and effector caspases have sequential and distinct effects on mitochondria*. Oncogene, 2005. **24**(42): p. 6354-66.
188. Ghobrial, I.M., T.E. Witzig, and A.A. Adjei, *Targeting apoptosis pathways in cancer therapy*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2005. **55**(3): p. 178-94.
189. McArthur, K. and B.T. Kile, *Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?* Trends in Cell Biology, 2018. **28**(6): p. 475-493.
190. Ucker, D.S. and J.S. Levine, *Exploitation of Apoptotic Regulation in Cancer*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**: p. 241.
191. Krysko, O., et al., *Necroptotic cell death in anti-cancer therapy*. Immunological Reviews, 2017. **280**(1): p. 207-219.
192. Galluzzi, L., et al., *Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease*. Annual Review of Pathology, 2017. **12**: p. 103-130.
193. Chen, D., J. Yu, and L. Zhang, *Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer*. Biochimica et Biophysica Acta, 2016. **1865**(2): p. 228-36.
194. Dhuriya, Y.K. and D. Sharma, *Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death*. Journal of Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 199.
195. Grootjans, S., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview*. Cell Death and Differentiation, 2017. **24**(7): p. 1184-1195.
196. Reddig, P.J. and R.L. Juliano, *Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival*. Cancer and Metastasis Reviews, 2005. **24**(3): p. 425-39.
197. Grossmann, J., *Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"*. Apoptosis, 2002. **7**(3): p. 247-60.
198. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
199. Gilmore, A.P., *Anoikis*. Cell Death and Differentiation, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1473-7.
200. Hawk, M.A. and Z.T. Schafer, *Mechanisms of redox metabolism and cancer cell survival during extracellular matrix detachment*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(20): p. 7531-7537.

201. Alanko, J., et al., *Integrin endosomal signalling suppresses anoikis*. Nature Cell Biology, 2015. **17**(11): p. 1412-21.
202. Malagobadan, S. and N.H. Nagoor, *Evaluation of MicroRNAs Regulating Anoikis Pathways and Its Therapeutic Potential*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 716816.
203. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infection and Immunity, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
204. Taabazuing, C.Y., M.C. Okondo, and D.A. Bachovchin, *Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages*. Cell Chemical Biology, 2017. **24**(4): p. 507-514 e4.
205. Sollberger, G., et al., *Caspase-1: the inflammasome and beyond*. Innate Immunity, 2014. **20**(2): p. 115-25.
206. Man, S.M., R. Karki, and T.D. Kanneganti, *Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases*. Immunological Reviews, 2017. **277**(1): p. 61-75.
207. Sayan, M. and B.T. Mossman, *The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases*. Particle and Fibre Toxicology, 2016. **13**(1): p. 51.
208. Kovacs, S.B. and E.A. Miao, *Gasdermins: Effectors of Pyroptosis*. Trends in Cell Biology, 2017. **27**(9): p. 673-684.
209. Bishayee, A., et al., *Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence*. Cancer Letters, 2010. **294**(1): p. 1-12.
210. Markowska, A., et al., *Noble metals in oncology*. Contemporary Oncology (Pozn), 2015. **19**(4): p. 271-5.
211. Paulpandiyar, R. and N. Raman, *Oxovanadium(IV) complexes with Knoevenagel Schiff base condensate as impending chemotherapeutic agents: Synthesis, characterization, biological screening and anti-proliferative assay*. Bioorganic Chemistry, 2017. **73**: p. 100-108.
212. Zwolak, I., *Increased Cytotoxicity of Vanadium to CHO-K1 Cells in the Presence of Inorganic Selenium*. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology, 2015. **95**(5): p. 593-8.
213. Pfeffer, C.M. and A.T.K. Singh, *Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(2).
214. Roy, S. and T. Chakraborty, *Deciphering the molecular mechanism and apoptosis underlying the in-vitro and in-vivo chemotherapeutic efficacy of vanadium luteolin complex in colon cancer*. Cell Biochemistry and Function, 2018. **36**(3): p. 116-128.
215. Weigel, K.J., et al., *CAF-secreted IGF1s regulate breast cancer cell anoikis*. Molecular Cancer Research, 2014. **12**(6): p. 855-66.
216. Al-Majed, A.A., *Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats*. Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology, 2007. **100**(3): p. 145-50.
217. Duprez, L., et al., *Major cell death pathways at a glance*. Microbes and Infection, 2009. **11**(13): p. 1050-62.
218. Zwolak, I., *Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line*. Toxicology and Industrial Health, 2016. **32**(6): p. 1013-25.

219. Li, Q., et al., *Benzo[a]pyrene induces pyroptotic and autophagic death through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway in HL-7702 human normal liver cells*. Journal of Toxicological Sciences, 2019. **44**(2): p. 121-131.
220. Chen, H., et al., *Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells*. Toxicology Letters, 2016. **246**: p. 7-16.
221. Bengleil, M., S. Hassaneen, and J.R. Fry, *Induction of anoikis by sodium arsenite in rat hepatoma FGC4 cells: comparison with cadmium chloride and implications for assessment of regulation of heat shock protein 70*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2012. **22**(8): p. 611-6.
222. Miao, E.A., J.V. Rajan, and A. Aderem, *Caspase-1-induced pyroptotic cell death*. Immunological Reviews, 2011. **243**(1): p. 206-14.
223. Rosenblatt, J., M.C. Raff, and L.P. Cramer, *An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism*. Current Biology, 2001. **11**(23): p. 1847-57.
224. Ivankovic, S., et al., *Cytotoxicity of nanosize V(2)O(5) particles to selected fibroblast and tumor cells*. Toxicology In Vitro, 2006. **20**(3): p. 286-94.
225. Galluzzi, L., et al., *Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis*. Immunity, 2016. **44**(2): p. 221-31.
226. Woods, N.T., et al., *Anoikis, initiated by Mcl-1 degradation and Bim induction, is deregulated during oncogenesis*. Cancer Research, 2007. **67**(22): p. 10744-52.
227. Ke, Y., et al., *Role and Association of Inflammatory and Apoptotic Caspases in Renal Tubulointerstitial Fibrosis*. Kidney and Blood Pressure Research, 2016. **41**(5): p. 643-653.
228. Soumya, R.S., et al., *Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant potential of vanadium encapsulated guar gum nanoparticles*. Food & Function, 2014. **5**(3): p. 535-44.
229. Vanden Berghe, T., et al., *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(2): p. 135-47.
230. Salisbury, D. and U. Bronas, *Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction*. Nursing Research, 2015. **64**(1): p. 53-66.
231. Baumgartner, H.K., et al., *Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007. **293**(1): p. G296-307.
232. Wang, C.C., et al., *Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells*. Cancer Letters, 2008. **259**(1): p. 82-98.
233. Degtarev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**(2): p. 112-9.
234. Kang, T.B., et al., *Caspase-8 deficiency in mouse embryos triggers chronic RIPK1-dependent activation of inflammatory genes, independently of RIPK3*. Cell Death and Differentiation, 2018. **25**(6): p. 1107-1117.
235. Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**(9): p. 1477-85.

236. Xu, F., et al., *Necroptosis Contributes to Urban Particulate Matter-Induced Airway Epithelial Injury*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **46**(2): p. 699-712.
237. Zwolak, I., *Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line)*. Toxicology and Industrial Health, 2015. **31**(8): p. 677-90.
238. Amin, P., et al., *Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNFalpha-mediated apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(26): p. E5944-E5953.
239. Geng, J., et al., *Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 359.
240. Liu, S., et al., *Lysosomal damage after spinal cord injury causes accumulation of RIPK1 and RIPK3 proteins and potentiation of necroptosis*. Cell Death and Disease, 2018. **9**(5): p. 476.
241. Tait, S.W., G. Ichim, and D.R. Green, *Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death*. Journal of Cell Science, 2014. **127**(Pt 10): p. 2135-44.

ANEXO I. REACTIVOS**American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA**

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) – 1640

No. Catálogo
ATCC® 30-2001™**BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA**APC Annexin V
Annexin V Binding Buffer 10X concentrate**No. Catálogo**
550475
556454**Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA**Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
Acrilamida
Dodecilsulfato de sodio (SDS)
Glicina
Laemmli 2X
Metilbisacrilamida
Persulfato de amonio
Protein Assay Dye Reagent Concentrate**No. Catálogo**
1610729
1610103
1610302
1610724
1610737
1610201
1610700
5000006**Biowest, Nuaille , France**Antibiótico-antimicótico 100X
Suero fetal bovino**No. Catálogo**
L0010-100
S1810-500**Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA**

OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS assay kit (Green fluorescence)

No. Catálogo
STA-347**Gibco® , Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA**

Trypsina 10X

No. Catálogo
15090-046

Invitrogen™, Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA

SYTOX® Green nucleic acid stain

No. Catálogo
S7020**Merck Millipore, Tullagreen, Co, Cork**

Membrana de nitrocelulosa

No. Catálogo
HATF00010**Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA**

Ácido etilenglicoltetraacético (EGTA)

No. Catálogo
E4378

Aprotinina bovina

A6103

Cóctel inhibidor de fosfatasas II

P5726

Cóctel inhibidor de fosfatasas III

P0044

Desoxicolato de sodio

D6750

Dimetil sulfóxido

D8414

Inhibidor de tripsina tipo II-O

T9253

Leupeptina

L2884

Mercaptoetanol

M7154

Polisorbato 20 (Tween® 20)

P1379

Reactivo de Griess [modificado]

G4410

Tetrametiletilendiamina (TEMED)

T8133

Tris(hidroximetil)aminometano (Trizma® base)

T1503

Albúmina de suero bovino-Fracción V

85040C

Cisplatino

479306

Metavanadato de sodio (NaVO₃)

590088

Nitrito de sodio (NaNO₃)

563218

Vanadil sulfato (VOSO₄)

204862

Thermo Fisher Scientific, Meridian, Road Rockford, IL, USA

Cloruro de sodio (NaCl)

No. Catálogo
362401Fosfato de sodio, dibásico, anhidro (NaH₂PO₄)

382801

Fosfato de sodio, monobásico, monohidratado (NaH₂PO₄•H₂O)

381801

Kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate

34076

Metanol, anhidro

904903

USB Corporation Cleaveland, OH, USA

Octilfenoxipolietoxietanol ultrapuro (Igepal™)

No. Catálogo
19628

Anticuerpos primarios

	No. Catálogo
Bax rabbit polyclonal antibody Abcam, Cambridge, UK	ab7977
Caspasa-9 (E23) rabbit monoclonal antibody Abcam, Cambridge, UK	ab32539
Ligando de Fas mouse monoclonal antibody BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA	556372
Bcl-2 (124) mouse monoclonal antibody Cell Signaling Technology® Inc., Beverly, MA, USA	15071
Caspasa-7 (Asp198) (D6H1) rabbit monoclonal antibody Cell Signaling Technology® Inc., Beverly, MA, USA	8438
Caspasa-8 (Asp391) (18C8) rabbit monoclonal antibody Cell Signaling Technology® Inc., Beverly, MA, USA	9496
Caspasa-1 (14F468) mouse monoclonal antibody Santa Cruz Biotechnology® Inc., Dallas, Texas, USA	sc-56036
Caspasa-3 p11 (K-19) goat polyclonal antibody Santa Cruz Biotechnology® Inc., Dallas, Texas, USA	sc-1224
Anticuerpo α-actina hecho en ratón Donado por el Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México	

Anticuerpos secundarios

	No. Catálogo
Rabbit anti-mouse IgG H&L (HRP) Abcam, Cambridge, UK	ab6728
Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA	GTX85304
Rabbit anti-goat IgG H&L (HRP) Thermo Fisher Scientific, Meridian, Road Rockford, IL, USA	31402

ANEXO II. SOLUCIONES**Acrilamida 30%:0.8%** (100 mL)

Acrilamida	30.00 gr
Metilenbisacrilamida	0.80 gr

Amortiguadora de electroforesis 10X (1L)

pH= 8.3

Trizma [®] base	30.325 gr
Glicina	144.125 gr
SDS	10.000 gr

Amortiguadora de transferencia (1L)

Trizma [®] base	3.03 gr
Glicina	14.40 gr
Metanol	200 mL

PBS 10X (1L)

pH= 7.2

NaCl	79.00 gr
NaH ₂ PO ₄	15.00 gr
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	6.00 gr

TBS 10X (1L)

pH= 7.6

Trizma [®] base	24.23 gr
NaCl	80.00 gr

TTBS (1L)

TBS 1X	1 L
Tween [®] 20	1 mL

ANEXO III. ARTÍCULO REQUISITO



Vanadium compounds and cellular death mechanisms in the A549 cell line: The relevance of the compound valence.

Gabriela Guerrero-Palomo, Erika P. Rendón-Huerta, Luis F. Montaña, Teresa I. Fortoul.

Journal of Applied Toxicology. 2019 Mar;39(3):540-552. doi: 10.1002/jat.3746. Epub 2018 Nov 8.

RESEARCH ARTICLE

Vanadium compounds and cellular death mechanisms in the A549 cell line: The relevance of the compound valence

Gabriela Guerrero-Palomo  | Erika P. Rendón-Huerta | Luis F. Montaña | Teresa I. Fortoul 

Departamento de Biología y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico

Correspondence

Teresa I. Fortoul MD, Ph.D., Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Cd Mx 04510, Mexico. Email: fortoul@unam.mx

Funding information

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: IN200418

Abstract

Non-small lung cell carcinoma has a high morbidity and mortality rates. The elective treatment for stage III and IV is cisplatin that conveys serious toxic side effects. Vanadium compounds are metal molecules with proven antitumor activity that depends on its valence. Therefore, a better understanding of the mechanism of action of vanadium compounds is required. The aim of our study was to investigate the mechanisms of cell death induced by sodium metavanadate (NaVO_3 [V(+5)]) and vanadyl sulfate (VOSO_4 [(+4)]), both of which have reported apoptotic-inducing activity. We exposed the A549 cell line to various concentrations (0–100 μM) and to different exposure times to each compound and determined the cell viability and expression of caspases, reactive oxygen species (ROS) production, Bcl2, Bax, FasL and NO. Our results showed that neither compounds modified the basal expression of caspases or pro- and anti-apoptotic proteins. The only change observed was the 12- and 14-fold significant increase in ROS production induced by NaVO_3 and VOSO_4 , respectively, at 100 μM concentrations after 48 hours. Our results suggest that classical apoptotic mechanisms are not related to the cell death induced by the vanadium compounds evaluated here, and showed that the higher ROS production was induced by the [(+4)] valence compound. It is possible that the difference will be secondary to its higher oxidative status and thus higher ROS production, which leads to higher cell damage. In conclusion, our results suggest that the efficacy of the cell death mechanisms induced by vanadium compounds differ depending on the valence of the compound.

KEYWORDS

A549, caspases, lung cancer, NSCLC, ROS, sodium metavanadate, vanadyl sulfate

1 | INTRODUCTION

Lung cancer has the highest morbidity and mortality rates (Ferlay et al., 2015). Histologically it is classified as small-cell and non-small cell lung carcinoma (NSCLC); the latter comprises 80% of all lung cancer cases (Inamura, 2017). For stage II NSCLC, surgery is the treatment of choice, whereas platinum-based chemotherapy, which frequently includes cisplatin, is the elective choice for stage III and IV NSCLC (Fennell et al., 2016). Cisplatin induces DNA damage, oxidative stress, cell

cycle arrest and apoptosis (Hu et al., 2016; Sarin et al., 2017) but is also associated with notorious toxic side effects (Karasawa & Steyger, 2015; Wilmes et al., 2015). These toxic effects occur in both normal and cancer cells; therefore, the development of new molecules, which would overcome these disadvantages, is a priority (Ediriweera, Tennekoon, & Samarakoon, 2018). Several metal compounds with proven in vitro antitumor activity have been considered (Leon, Cadavid-Vargas, Di Virgilio, & Etcheverry, 2017; Liang et al., 2017; Markowska, Kasprzak, Jaszczynska-Nowinka, Lubin, & Markowska, 2015; Rozzo et al., 2017).

Vanadium is a metal chemically classified as an ultra-trace and transition element that can be found in both cationic and anionic forms with six oxidation states (Tslani & Fantus, 1997). The most important biological valences are III, IV and V (Barceloux, 1999). However, the majority of them exhibit insulin-like effects (Niu et al., 2016), but most significantly, several vanadium compounds prevent and inhibit the growth of various types of cancer in multiple *in vitro* and *in vivo* assays (Kowalski, Hać, Wyrzykowski, Zauszkiewicz-Pawlak, & Inkielewicz-Stepniak, 2017; Leon et al., 2015). Their cytotoxic effect (Rivadeneira et al., 2010; Zwolak, 2015), disruption of cellular signal transduction pathways, cell cycle arrest and apoptosis effect is apparently mediated by the generation of reactive oxygen species (ROS); however, these effects are valence dependent (Liao et al., 2013; Rozzo et al., 2017; Wu et al., 2014). Therefore, a better understanding of the mechanism of action of vanadium compounds is required.

Sodium metavanadate (NaVO_3 [V(+5)]) and *bis*(acetylacetonate)-oxidovanadium [V(+4)] have apoptotic-inducing activity and enter the cell through facilitated diffusion and ionic channels depending on their oxidative status (Imtiaz et al., 2015), but in biological media vanadium compounds mainly exist in the +4 and/or +5 oxidative status (Figure 1) (Al-Majed, 2007; Crans et al., 2010; Deo, Pages, Ang, Gordon, & Aldrich-Wright, 2016; Leon et al., 2015; Mutlu, Cristy, Graves, Hooth, & Waidyanatha, 2017).

The aim of this study was to investigate the mechanisms of cell death induced by vanadyl sulfate and sodium metavanadate in the human lung carcinoma cell line A549.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Reagents

Cis-Diammineplatinum (III) dichloride, cisplatinum (cat. no. 479306), Griess reagent (cat. no. G4410), vanadyl sulfate (VO_2SO_4) (cat. no. 204862) and sodium metavanadate anhydrous (NaVO_3) (cat. no. 59008-8), was from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). SYTOX® Green nucleic acid stain (cat. no. S7020), was from Invitrogen™ (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). APC Annexin V (cat. no. 550475), Annexin V Binding Buffer 10× concentrate (cat. no. 556454) and purified mouse antihuman CD178 (Fas Ligand) (cat. no. 556372) were from BD Pharmingen™ (San Jose, CA, USA). Anti-caspase-9 antibody (E23) (cat. no. ab32539), anti-Bax antibody (cat. no. ab7977) and horseradish peroxidase (HRP)-labeled rabbit antimouse

IgG H&L (cat. no. ab6728) were from Abcam (Cambridge, UK). Cleaved caspase-7 (Asp198) (D6H1) rabbit (cat. no. 8438), cleaved caspase-8 (Asp391) (18C8) rabbit (cat. no. 9496) and Bcl-2 (124) mouse (cat. no. 15071) were from Cell Signaling Technology® Inc. (Beverly, MA, USA). Anti-actin antibody was kindly donated by Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México. HRP-labeled goat antirabbit IgG H&L (cat. no. GTX85304), was from GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA). Caspase-1 (14F468) (cat. no. sc-56036) and caspase-3 p11 (K-19) (cat. no. sc-1224) were from Santa Cruz Biotechnology® Inc. (Dallas, TX, USA). HRP-labeled rabbit antigoat IgG H&L (cat. no. 31402) was from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Fetal bovine serum (cat. no. S1650-500) and streptomycin-penicillin solution (cat. no. L0010-100) were from Biowest (Nuaille, France). Bovine serum albumin fraction V (cat. no. 84961434) was from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Reactive oxygen species were determined using OxiSelect™ *In vitro* ROS/reactive nitrogen species (RNS) assay kit (Green Fluorescence) (cat. no. STA-347) Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA).

2.2 | Cell line and culture

The human lung adenocarcinoma cell line A549 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CCL-185™, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in Petri-100 dishes in RPMI-1640 culture media (ATCC® 30-2001™) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin-penicillin solution at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , until they reached confluence. This project was approved by the Research and Ethical Committee from the School of Medicine (FMED/CI/RGG/098/2017) (Comisión de Investigación y Ética, División de Investigación, Torre de Investigación, Circuito Exterior, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Zip Code 04510).

2.3 | Preparation of vanadium compounds, cisplatinum and exposure to A549 cells

A 50 mM stock solution of VO_2SO_4 or NaVO_3 in Milli-Q water was prepared. These stocks solutions were then used to generate μM final concentrations of the agents used in the experiments. Cisplatinum (positive control) was dissolved in dimethyl sulfoxide at a final working concentration of 24 μM (Hu et al., 2016). A549 cells were treated to different concentrations (0, 5, 10, 25, 50, 100 μM) of VO_2SO_4 or NaVO_3 for 24 and 48 hours.

2.4 | Dose selection

The range of NaVO_3 and VO_2SO_4 concentrations were selected based on previous reports by different authors all of which used the same concentrations of vanadium compounds with valence (+4) and (+5) on the A549 lung cancer cell line (A549) and/or MCF7, MCF10, HTB44, DU145, Cal27, SKBR3 and RMS (Chien, Mak, & Huang, 2006; Dabros, Adamczyk, Ciurkot, & Kordowiak, 2011; Islas et al., 2015; Khalil & Jameson, 2017; Klein, Holko, Ligeza, & Kordowiak, 2008; Petanidis, Kioseoglou, Hadzopoulou-Cladaras, & Salifoglou,

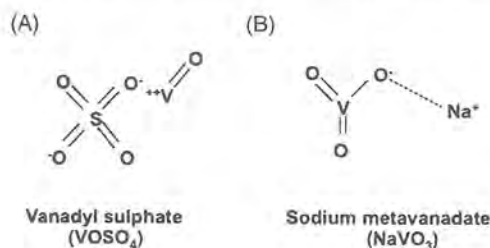


FIGURE 1 A, Structure of vanadyl sulfate. B, Structure of sodium metavanadate

2013; Suzuki, Inageda, Nishitai, & Matsuoka, 2007). In previous unreported experiments, we observed that vanadium concentrations higher than 100 μM induced a 60% or higher decrease in cell viability.

2.5 | Cell viability assay

Viability analyses were conducted using SYTOX[®] Green staining. After the time of exposure to VOSO₄ or NaVO₃ the cells were then washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), detached by trypsinization, centrifuged, suspended with 400 μL PBS/5 nM SYTOX[®] Green and incubated for 15 minutes at 4°C and the cells then underwent flow cytometric analysis using Attune™ Nxt Flow Acoustic Focusing Cytometer 4 lasers (Invitrogen™, Life Technologies Corp.). A total of 20 000 ungated events were acquired and the data were analyzed with FlowJo[®] software (v 10.0.7; Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

2.6 | Quantification of apoptosis

Apoptosis was measured by flow cytometry, using APC Annexin V and SYTOX[®] Green. Briefly, VOSO₄- or NaVO₃-treated A549 cells were washed twice with cold PBS, detached by trypsinization, centrifuged and suspended at 10⁶ cells/mL in 1× Binding Buffer. One

hundred μL of cell suspension were incubated with 5 μL of APC Annexin V for 15 minutes at room temperature in the dark. Thereafter, 400 μL of 1× Binding Buffer/5 nM SYTOX[®] Green was added for 10 minutes before quantifying it by flow cytometry using Attune™ Nxt Flow Acoustic Focusing Cytometer 4 lasers (Invitrogen™, Life Technologies Corp.). A total of 20 000 acquired events per experiment and the data obtained were analyzed using FlowJo[®] v 10.0.7 software (Tree Star, Inc.).

2.7 | Protein extraction

Cells were scraped from the plates with 1 mL cold lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% sodium deoxycholate, 1% IGEPAL, 1 mM EGTA and 1 mM EDTA) supplemented with phosphatase inhibitor cocktail II and III, 1 mg/mL trypsin inhibitor, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin (Sigma-Aldrich[®]). The cells were sonicated for 1 minute at 25% amplitude and centrifuged for 30 minutes at 21 380 g at 4°C in a Rotofix 32A centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). The supernatants were recovered, and the protein concentration was determined with a Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (cat. no. 500-0006; Bio-Rad, Hercules, CA, USA); albumin V was used as a positive control.

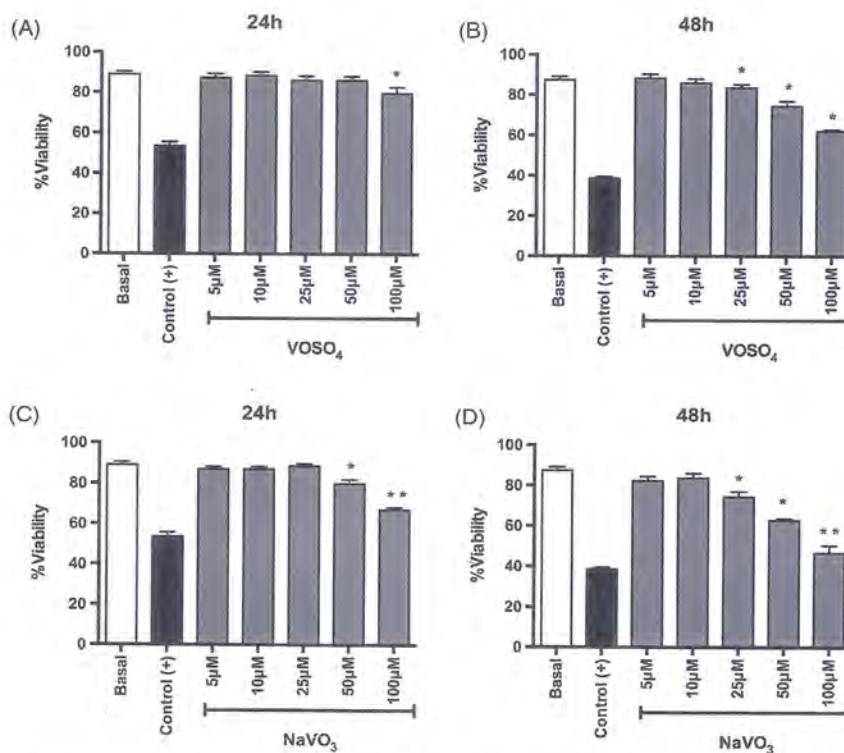


FIGURE 2 A,B, VOSO₄. C,D, NaVO₃. VOSO₄ and NaVO₃ influence on A549 cell viability. Cells were treated with increasing concentrations (5–100 μM) of vanadium compounds for 24 and 48 h determined by SYTOX[®] Green staining. Data are expressed as the percentage of viable cells and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared to the basal group

2.8 | Western blot

Fifty μg of protein extracts were boiled with Laemmli buffer and 5% β -mercaptoethanol for 5 minutes resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels (12%-17%) and transferred to nitrocellulose membranes (cat. no. HATF00010; Merck Millipore, Tullagreen, Cork, Ireland) in a Bio-Rad semi-dry blotting system for 1 hour at 120 mA. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) for 1 hour, washed twice with TBS and incubated with primary antibodies: caspase-1 (1:100), Bax and Fas Ligand (1:200), caspase-3 (1:250), α -Actin, caspase-7, caspase-8 and caspase-9 (1:500), Bcl-2 (1:1000) in Tween-20/TBS (TTBS) overnight at 4°C. Membranes were then washed with TTBS and incubated with HRP-labeled secondary antibodies: goat antirabbit IgG (1:400-1:1000), rabbit antigoat (1:500) or rabbit antimouse IgG (1:1000) diluted in TTBS for 1 hour at room temperature. Membranes were then washed three times with TTBS and once with TBS before antibody binding was detected by chemiluminescence using the SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate kit (cat. no. 34076; Thermo Fisher Scientific). The quantitative analysis of the western blot bands was performed using GelQuant v. 2.7.0 software that calculates the intensity of the band by measuring the amount of pixels/sq.in. Results are expressed as dots per point (dpp).

2.9 | Nitrite analysis

Nitric oxide (NO) was determined according to the Griess method. Briefly, modified Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2% phosphoric acid) was mixed 1:1 with the culture supernatant of the samples. The absorbance of the resulting chromophore is read at 595 nm with an enzyme-linked immunosorbent assay microplate reader (Elx808 absorbance reader; Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Nitrite concentration was quantified by comparing the results with the absorbance readings of a standard curve generated with sodium nitrite (0-100 μM).

2.10 | Reactive oxygen species determination

Intracellular ROS levels were determined using the OxiSelect™ In vitro ROS/RNS assay kit. The assay measures total ROS/RNS free radical activity through the use of the specific ROS/RNS fluorogenic probe, dichlorodihydrofluorescein. Culture supernatants were cleared by centrifugation at 1500 rpm (2138 g) for 5 minutes at room temperature, afterwards 50 μL of the supernatant and 50 μL of the catalyst were pipetted into the 96-well black microplate, mixed and

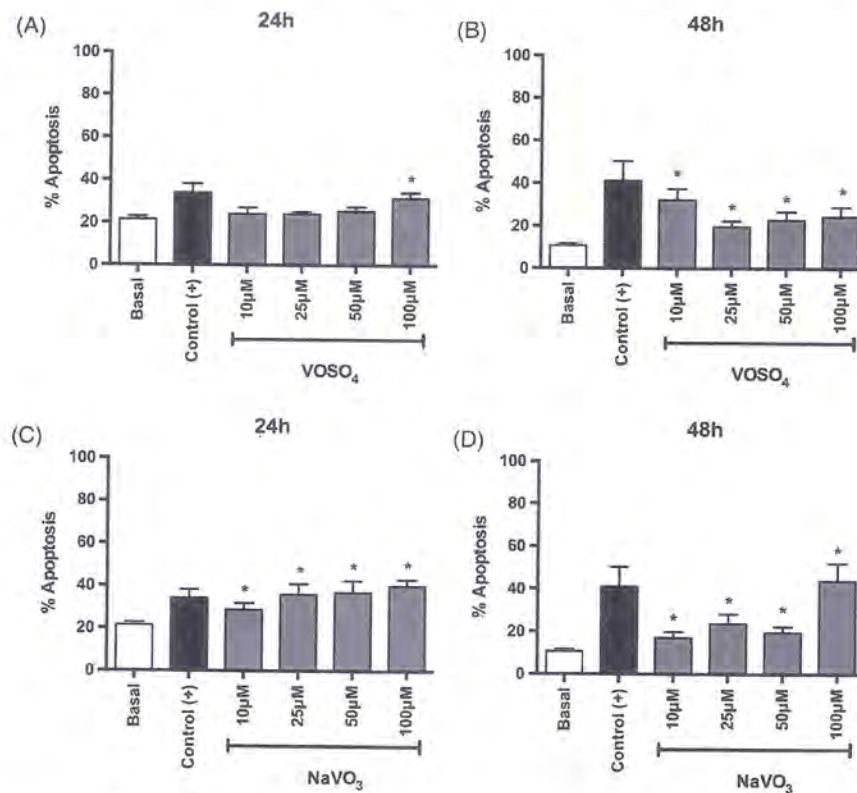


FIGURE 3 A,B, VOSO₄. C,D, NaVO₃. VOSO₄ and NaVO₃ induced phosphatidylserine externalization on A549 cells. Cells were treated with increasing concentrations (10-100 μM) of vanadium compounds for 24 and 48 h. Apoptosis cells were quantified by Annexin-APC staining. Data are expressed as the percentage of total apoptosis cells and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $p < 0.05$ as compared to the basal group

incubated at room temperature for 5 minutes. After plate incubation, the prepared dichlorodihydrofluorescein probe (100 μ L) was added to each well and incubated for an additional 15 minutes at room temperature in the dark. Fluorescence was measured with a fluorescent microplate reader (POLARstar Omega; BMG Labtech, Cary, NC, USA) at 480 nm excitation/530 nm emission. Concentration of ROS in samples was determined using a dichlorofluorescein standard curve (0-10 000 nM).

2.11 | Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. The results were evaluated by one-way analysis of variance, followed by post hoc Dunnett's test. $P < 0.05$ and $P < 0.01$ were considered statistically significant. The experiments were performed thrice and assayed in triplicate. GraphPad Prism 6 software was used for all statistical procedures (La Jolla, CA, USA).

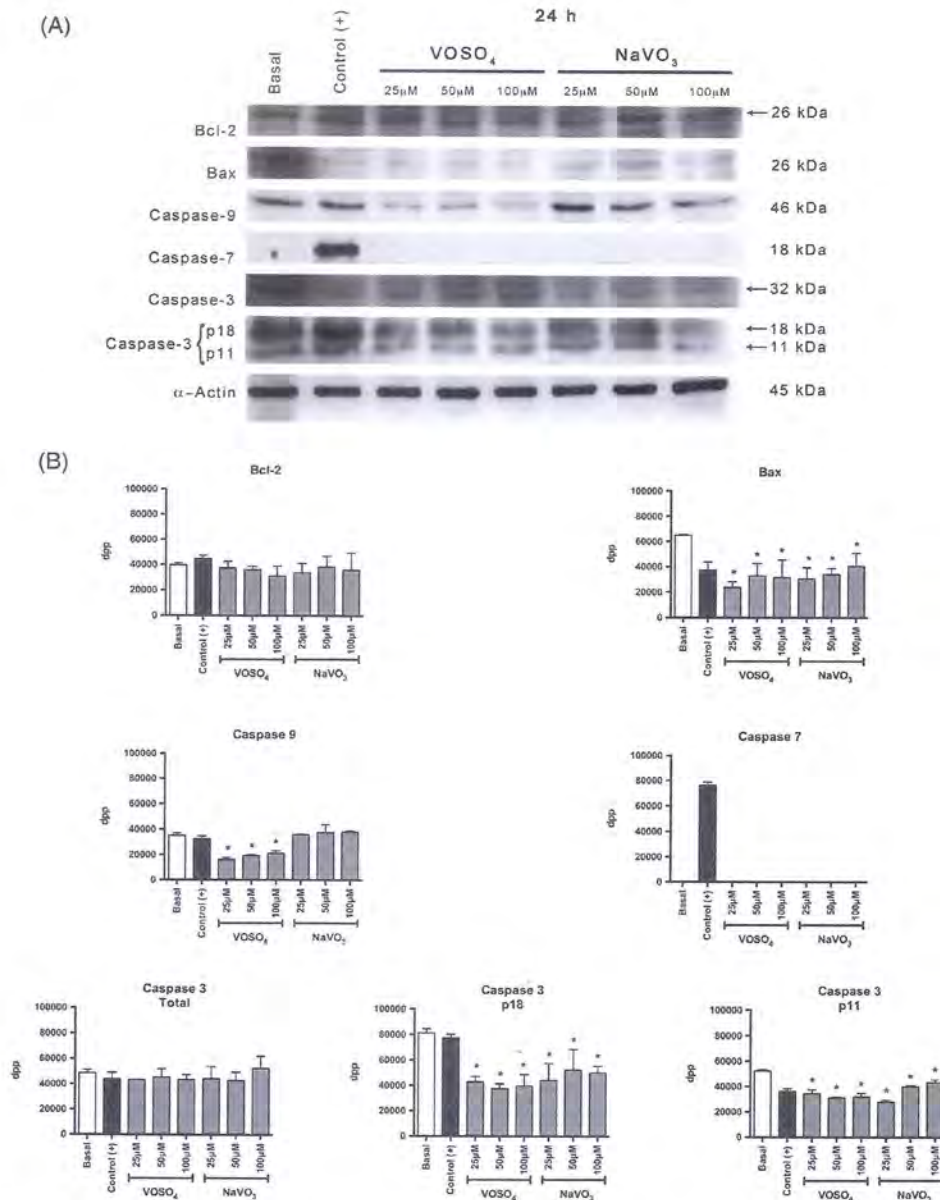


FIGURE 4 Effects of VOSO₄ and NaVO₃ on the expression of proteins involved in mitochondrial apoptotic pathway in A549 cells. A, Western blot analysis of Bcl-2, Bax, caspase-9, caspase-7 and caspase-3 proteins were determined after 24 h with concentrations of each vanadium compound (25-100 μ M). We used α -actin as the loading control. B, Graphics representation is shown for the numerical data obtained. Values are expressed as dpp and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$ as compared to the basal. dpp, dots per point

3 | RESULTS

3.1 | Effect of $VOSO_4$ and $NaVO_3$ on cell viability

$VOSO_4$ treatment for a 24 hour period did not seriously affect cell viability, as there was only a 10% decrease at 100 μM concentrations (Figure 2A). Interestingly, viability was affected when concentrations of 25-100 μM $VOSO_4$ were used for 48 hours compared to untreated cells ($P < 0.05$), but when compared to cisplatin-treated cells, even at 100 μM concentration, the latter did not exert such a strong inhibitory effect (Figure 2B).

Cell viability after 24 hours' exposure to $NaVO_3$ showed a 10% and 20% decrease in the 50 and 100 μM $NaVO_3$ -treated cells that was significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) in relation to untreated cells but compared to cisplatin-treated cells (positive control, that reduced cell viability by 40%), the only significant decrease was observed in the 100 μM $NaVO_3$ -treated cells ($P < 0.05$) (Figure 2C).

The effect was striking in 25-100 μM $NaVO_3$ -treated cells after 48 hours of exposure, as significant cell viability inhibition ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) was observed in comparison to control untreated cells. Similarly to the 24 hour treated cells, the only highly

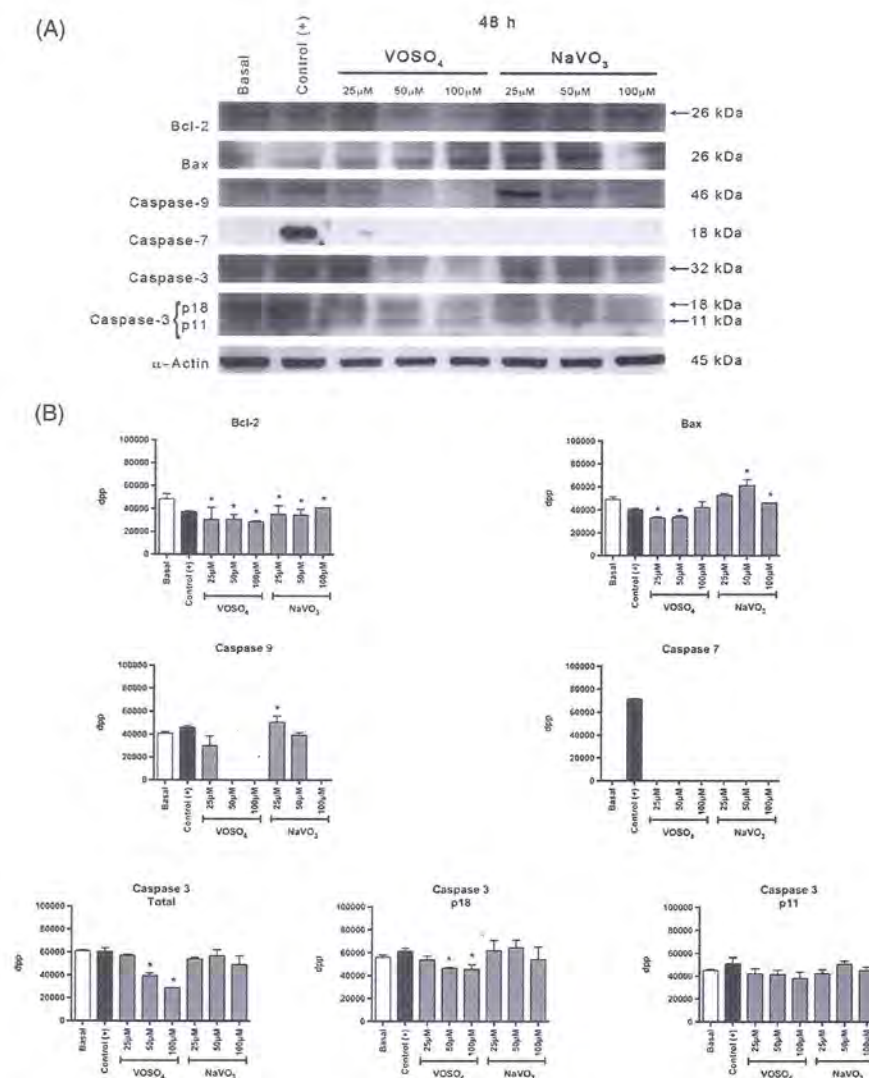


FIGURE 5 Effects of $VOSO_4$ and $NaVO_3$ on the expression of proteins involved in mitochondrial apoptotic pathway in A549 cells. A, Western blot analysis of Bcl-2, Bax, caspase-9, caspase-7 and caspase-3 proteins were determined after 48 h with concentrations of each vanadium compound (25-100 μM). We used α -actin as the loading control. B, Graphics representation is shown for the numerical data obtained. Values are expressed as dpp and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$ as compared to the basal. dpp, dots per point

significant decrease in cell viability compared to the cisplatin-treated cells was observed in the 100 μM NaVO₃-treated cells ($P < 0.05$) (Figure 2D).

3.2 | Phosphatidylserine translocation

Phosphatidylserine expression on cells treated with VOSO₄ after 24 hours' exposure was similar or slightly lower than the effect induced by cisplatin (Figure 3A); however, the expression was much lower than the cisplatin-treated cells when they were incubated for 48 hours with 25, 50 and 100 μM concentrations of VOSO₄ (Figure 3B).

The effect of 24 hours' exposure to NaVO₃ enhanced the cell membrane phosphatidylserine expression that reached its maximal value (approximately 40%) at low concentrations (25 μM); higher concentrations did not enhance further translocation. The difference was statistically significant compared to untreated control cells ($P < 0.05$) but not when it was compared to cisplatin-treated cells (Figure 3C).

Interestingly, the results were completely different after 48 hours of treatment. Translocation of phosphatidylserine in cells treated for 48 hours was slightly enhanced in comparison to control cells with a low concentration exposure (20%, 30% and 25% at 10, 25 and 50 μM respectively), but it reached a 50% value with 100 μM concentrations. The latter was identical to that induced by cisplatin treatment (Figure 3D).

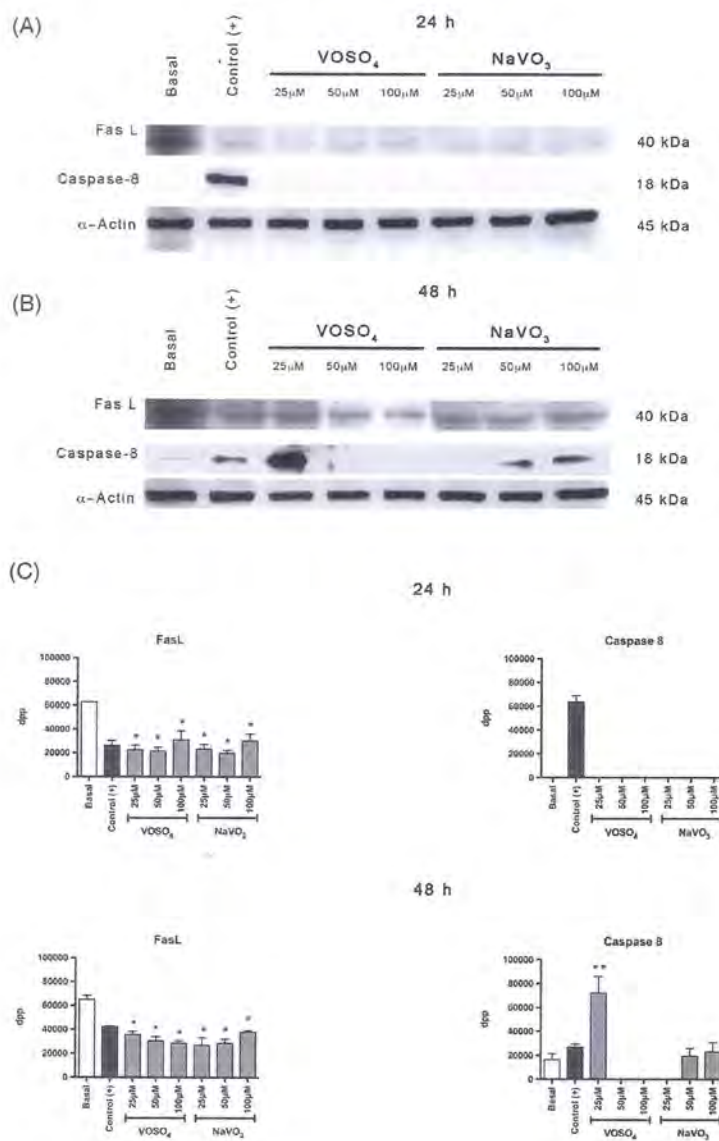


FIGURE 6 Effects of VOSO₄ and NaVO₃ on the expression of proteins involved in the extrinsic apoptotic pathway in A549 cells. A, 24 h. B, 48 h. Western blot analysis of the Fas Ligand and caspase-8 were determined after 24 and 48 h with concentrations of each vanadium compound (25–100 μM). We used α -actin as the loading control. C, Graphics representation is shown for the numerical data obtained. Values are expressed as dpp and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared to the basal group. dpp, dots per point

3.3 | Caspase expression in VOSO_4 - and NaVO_3 -treated cells

Treatment with VOSO_4 for 24 hours at concentrations ranging from 25 to 100 μM decreased the expression of Bax, caspase-3p18, caspase-3p11 and caspase-9; the decrease was statistically significant for all ($P < 0.05$) compared to the untreated cells (Figure 4A and 4B). Bcl-2 and total caspase-3 was unaltered by the vanadium compound. Interestingly, NaVO_3 at identical concentrations induced a similar pattern in treated cells, the only difference being unchanged caspase-9 expression.

The expression of the above-mentioned molecules changed significantly after 48 hours' exposure. Bax expression also diminished at 25–50 μM VOSO_4 , but NaVO_3 at 50–100 μM induced an increase in its expression. Caspase-9 expression increased at 25 μM NaVO_3 , but at 50–100 μM concentrations of VOSO_4 and NaVO_3 it was undetectable. Bcl-2, caspase-3p18 and total caspase-3 showed a decreased tendency. The differences in expression of all these molecules were statistically significant (Figure 5A and 5B).

Caspase-7 was only expressed in cisplatinum-treated cells at 24 and 48 hours (Figures 4 and 5).

The expression of FasL after 24 and 48 hours' treatment, independently of the concentration used, showed a 66% decrease in comparison to the non-treated cells (Figure 6A and 6C). Interestingly, caspase-8 expression was identical to FasL expression in cells treated for 24 hours with either component, but when cells were treated for 48 hours with 25 μM VOSO_4 its expression was significantly enhanced ($P < 0.01$). Expression was also enhanced, with 50 and 100 μM NaVO_3 treatment, but it was not greater than the expression in untreated cells (Figure 6B and C).

Caspase-1 expression remained unchanged in comparison to untreated cells after 24 hours' treatment with either compound, but in cells treated for 48 hours, the expression diminished significantly ($P < 0.05$) compared to untreated cells (Figure 7).

NO expression remained unaltered in all the treatments with both compounds (Figure 8). It was very interesting to observe that ROS expression was greatly enhanced with both compounds although the high VOSO_4 concentration induced a statistically significant higher expression ($P < 0.01$) (Figure 9).

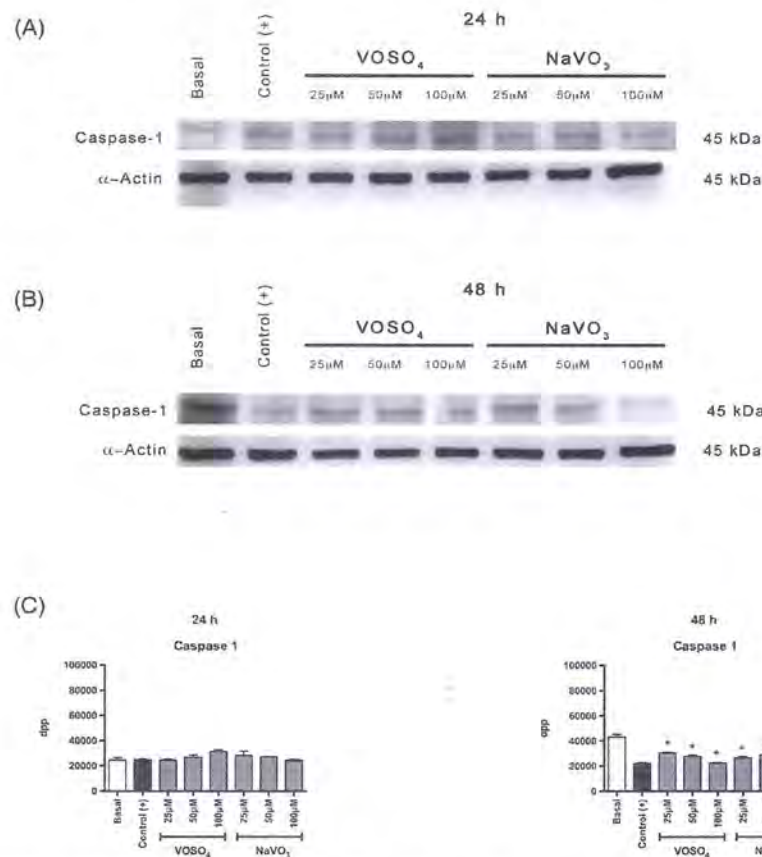


FIGURE 7 Effects of VOSO_4 and NaVO_3 on the expression of protein involved in the pyroptotic pathway in the A549 cells. A, 24 h. B, 48 h. Western blot analysis of caspase-1 was determined after 24 and 48 h with concentrations of each vanadium compound (25–100 μM). We used α -actin as the loading control. C, Graphics representation is shown for the numerical data obtained. Values are expressed as dpp and represent the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$ as compared to the basal group. dpp, dots per point

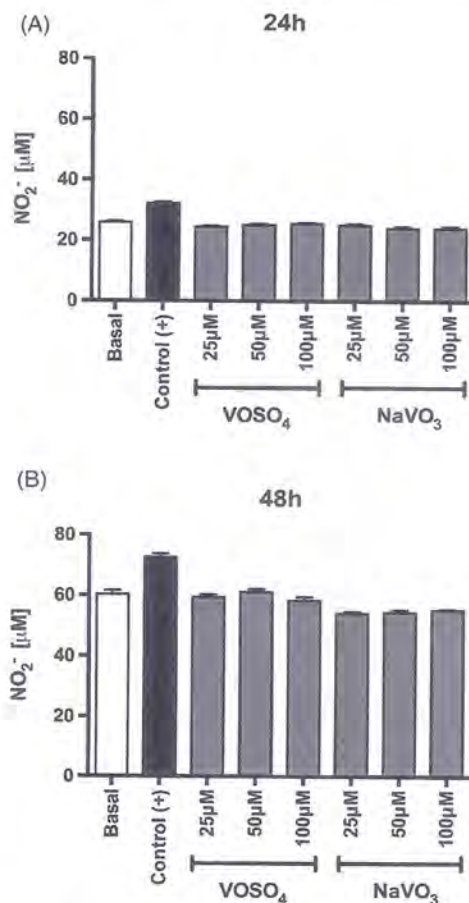


FIGURE 8 NO release from VOSO₄- and NaVO₃-treated A549 cells. A, 24 h. B, 48 h. Then, NO₂⁻ level in the culture supernatant was measured by the Griess method was determined after 24 and 48 h with concentrations of each vanadium compound (25–100 μM). Data represent mean ± SEM of three independent experiments in triplicate. **P* < 0.05 as compared to the basal group

4 | DISCUSSION

The search for new molecules that complement or substitute cisplatin, currently used in several cancer treatments, is a priority as it induces serious toxic effects in treated patients (Bishayee, Waghay, Patel, & Chatterjee, 2010). Among many possibilities, several transition metal compounds with proven *in vitro* antitumor activity have been considered (Markowska et al., 2015; Wu, Hong, & Yang, 2016).

Vanadium is a transition metal that can be found in both cationic and anionic forms with six oxidation states (Deo et al., 2016). Most significantly, several of these vanadium compounds prevent and inhibit the growth of various types of cancer in multiple *in vitro* and *in vivo* assays (Kowalski et al., 2017; Leon et al., 2015; Rozzo et al., 2017). VOSO₄ and NaVO₃ have been shown to inhibit rhabdomyosarcoma cell growth at similar concentrations that the ones we used (Dabros et al., 2011). Another +4 valence vanadium compound induce cell cycle

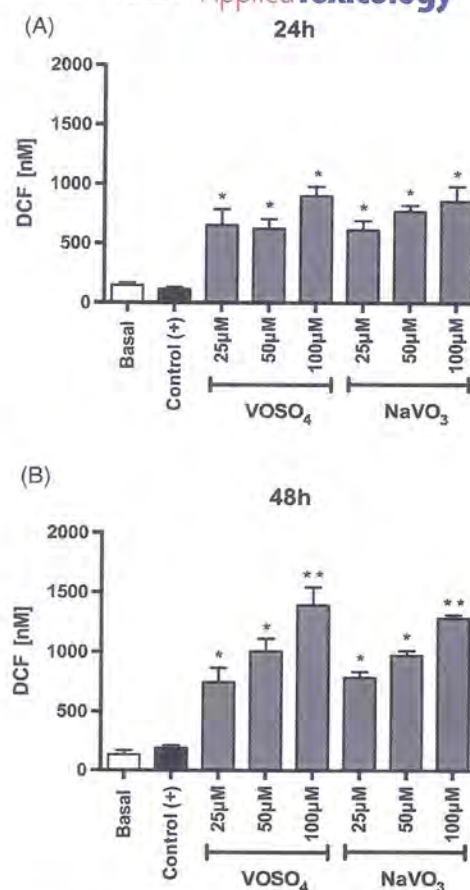


FIGURE 9 Reactive oxygen species generation in VOSO₄- and NaVO₃-treated A549 cells. A, 24 h. B, 48 h. Graphs indicate DCF (total free radicals) levels in the culture supernatant at 24 and 48 h after treatment with vanadium compounds concentration (25–100 μM). Data represent mean ± SEM of three independent experiments in triplicate. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 as compared to the basal group. DCF, dichlorofluorescein

arrest, caspase-3/7 activation, mitochondrial potential on lung and breast cancer cell lines (Islas et al., 2015). Sodium orthovanadate also inhibits oral squamous, colon and kidney cancer cell proliferation and triggers apoptosis with similar concentrations as the one we report (Khalil & Jameson, 2017; Klein et al., 2008) in a manner similar to sodium metavanadate; nevertheless, these reports only mention as possible cause the crosstalk between different signaling phosphoproteins, possibly p53 through the ATM pathway (Suzuki et al., 2007). Their effect on disruption of cell signaling transduction pathways, cell cycle arrest and apoptosis seem to be valence dependent (Paulpandiyam & Raman, 2017; Tian et al., 2016; Wu et al., 2014; Wu et al., 2016; Zwolak, 2015) but the precise cytotoxic mechanism of vanadium compounds remains undetermined (Taddei, Giannoni, Fiaschi, & Chiarugi, 2012). Therefore, we investigated the mechanisms responsible for NaVO₃ and VOSO₄ cytotoxic activity as each one is representative of biologically important valences of vanadium (Al-Majed,

2007; Duprez, Wirawan, Vanden Berghe, & Vandenabeele, 2009; Kordowiak, Klein, Goc, & Dabros, 2007; Zwolak, 2016).

The mechanisms triggered by a cytotoxic compound are necrosis and consequently cell death and/or activation of controlled cell death also known as apoptosis; however, there are other mechanisms (Fink & Cookson, 2005). Pyroptosis is a form of programmed cell death of infected immune cells mediated by caspase-1 activation in an inflammasome milieu (Rosenblatt, Raff, & Cramer, 2001). Anoikis is the cell death triggered by a lack of attachment to the extracellular matrix (Malagobadan & Nagoor, 2015) and it is a regulatory mechanism important in the epithelial cell renewal (Ivankovic, Music, Gotic, & Ljubetic, 2006).

Among vanadium compounds V_2O_5 is highly toxic (Naso et al., 2016) but the oxidovanadium/luteolin complex (Roy & Chakraborty, 2018) or vanadium/luteolin complex (Pfeffer & Singh, 2018) are also inducers of apoptosis via activation of p53, Bax and caspase-3, key proteins involved in the intrinsic pathway (Weigel et al., 2014). Our results with $NaVO_3$ showed that none of the intrinsic or extrinsic molecules was significantly modified, as the final pathways products, caspase-3 and/or caspase-7, remained unaltered independently of the treatment time. The same result was obtained with $VOSO_4$ -treated cells. Therefore, we believe that programmed cell death is not the mechanism responsible for the cytotoxic activity of both compounds. As the caspase-3 expression was not modified it is unlikely that anoikis nor intrinsic or extrinsic apoptosis are responsible for the cell death induced by both compounds; it is possible that this is the consequence of MCL1 stabilization as both compounds exert an insulin mimetic effect

mediated by the secretion of insulin growth factor (Galluzzi, Lopez-Soto, Kumar, & Kroemer, 2016; Leon et al., 2015; Niu et al., 2016; Pessoa, Etcheverry, & Gambino, 2015). Interestingly, caspase-1 expression decreased in all the experimental design, so pyroptosis can hardly be considered as responsible for the A549 cell death.

Regulated cell death (Vanden Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhuet, Walczak, & Vandenabeele, 2014) requires severe oxidative stress and cytosolic Ca^{2+} overload (Soumya et al., 2014); this implies an increase in ROS production. Our results showed that ROS expression was greatly enhanced in the $VOSO_4$ -treated cells independently of the exposure time. $NaVO_3$ also increased ROS expression but there was a 14% difference compared with the first compound. Interestingly, vanadyl sulfate ($VOSO_4$ [V (+4)]) does not induce cell cycle arrest but increases ROS concentration in H9c2 cardiac embryonic cells (Cuesta, Frances, & Garcia, 2011). Our results did not show that the vanadium compounds affected NO determinations despite that the latter represents the most frequent RNS (Salisbury & Bronas, 2015).

Tumor necrosis factor (TNF) α is known to decrease A549 cell viability increasing cell apoptosis and ROS activity (Yang et al., 2018). Toxicity of vanadium compounds increases as the valence does (Barceloux, 1999), and the main difference between vanadyl sulfate and sodium metavanadate is their valence (Mukherjee et al., 2004). Although vanadate induces TNF α secretion (Ye et al., 1999), $VOSO_4$ and $NaVO_3$ did not, similarly to the non-inducing effect of vanadium pentoxide on the NK-92MI-treated cells (Gallardo-Vera et al., 2018).

Our results suggest that $VOSO_4$ and $NaVO_3$ cytotoxicity in A549 cells is probably mediated by a mechanism similar to that observed in

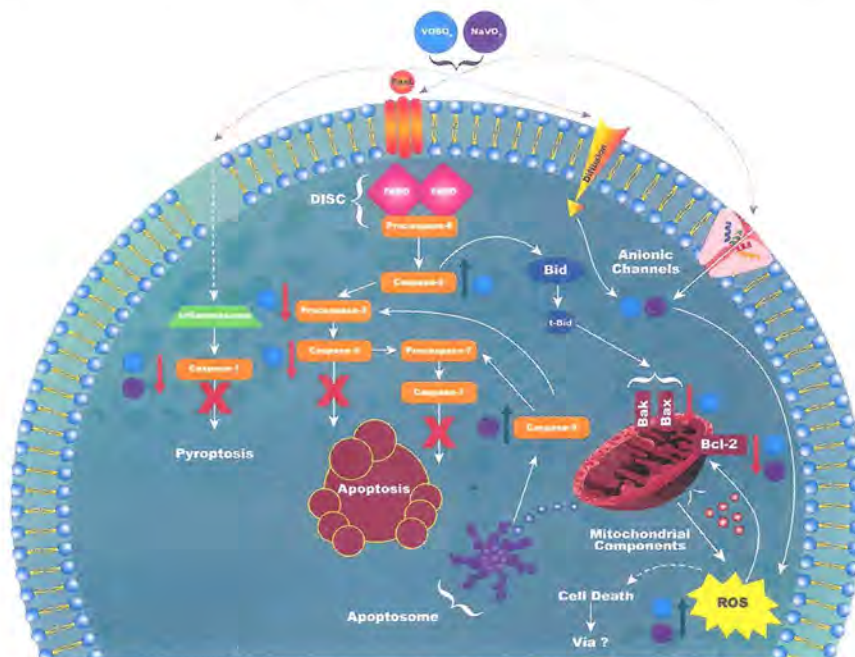


FIGURE 10 Schematic illustration of the activity of vanadium compounds on different cell death mechanisms. $VOSO_4$ (blue circles) induces increase (green arrows) of the expression of caspase-8 and the reduction (red arrows) of Bax (pro-apoptotic component) and caspase-3. $NaVO_3$ (purple circles) induce increase of the expression of caspase-9, and both vanadium compounds reduce the expression of Bcl-2 (anti-apoptotic component) and induces the increase in ROS level. ROS, reactive oxygen species

pancreatic ductal adenocarcinoma cells that consist of a mixture of alternative type of cell deaths such as apoptosis, necroptosis and mitotic catastrophe processes (Kowalski et al., 2017). Nevertheless, it has been clearly established that necroptosis is a TNF α -dependent pathway (Degterev et al., 2005) only in situations where caspases are inhibited (Kang, Jeong, Yang, Kovalenko, & Wallach, 2018; Vercammen, Vandenebeebe, Beyaert, Declercq, & Fiers, 1997); our results showed that all evaluated caspases were inhibited. Therefore it is only clear that the cell death induced by VOSO₄ and NaVO₃ was associated to increased ROS production but not via TNF α . It has recently been shown that urban particulate matter induces necroptosis via a mitochondrial ROS-dependent early growth response gene 1 (Xu et al., 2018), and the enigma is to identify the mechanism that triggers this particular form of necroptosis. The role of lysosomes in the toxic mechanism induced by VOSO₄ and NaVO₃ has recently been highlighted (Zwolak, 2016). Lysosome dysfunction sensitize cells to necroptosis by promoting RIPK1 and RIPK3 accumulation (Liu et al., 2018), but it is well known that lysosomes induce ROS production (de la Mata et al., 2016). As Tait et al. suggested (Tait, Ichim, & Green, 2014), non-apoptotic mechanisms of cell death represent another way of dying.

In conclusion, there are mechanisms of cell death that are different to those described for vanadium compounds, and have not been clearly elucidated. Our results showed that VOSO₄ and NaVO₃ induced cell death through an unidentified mechanism, as we did not observe an increase in Bax and a decrease in Bcl-2 concentrations; caspase-1, -3, -7, -8 and -9, NO and FasL expression remained unmodified, but ROS expression was greatly enhanced particularly in vanadyl sulfate-treated cells triggered by mechanisms different to those described so far (Figure 10). These results suggest that apoptosis, anolxis and pyroptosis do not participate in vanadium-induced cell death although necroptosis cannot be ruled out.

ACKNOWLEDGEMENTS

Gabriela Guerrero-Palomo was supported by a CONACYT scholarship (CVU 371305) from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This project was partially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. PAPIIT-UNAM IN200418. The authors thank Armando Zepeda-Rodríguez and Francisco Pasos-Nájera for their support in the editing of the artwork.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to report.

ORCID

Gabriela Guerrero-Palomo  <http://orcid.org/0000-0002-8357-7600>

Teresa I. Fortoul  <http://orcid.org/0000-0002-3507-1365>

REFERENCES

- Al-Majed, A. A. (2007). Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100(3), 145–150. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.00024.x>
- Barceloux, D. G. (1999). Vanadium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 265–278. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102425>
- Bishayee, A., Waghay, A., Patel, M. A., & Chatterjee, M. (2010). Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. *Cancer Letters*, 294(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.030>
- Chien, P. S., Mak, O. T., & Huang, H. J. (2006). Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(2), 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.045>
- Crans, D. C., Zhang, B., Gaidamauskas, E., Keramidas, A. D., Willsky, G. R., & Roberts, C. R. (2010). Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution. *Inorganic Chemistry*, 49(9), 4245–4256. <https://doi.org/10.1021/ic100080k>
- Cuesta, S., Frances, D., & Garcia, G. B. (2011). ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(2), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.10.010>
- Dabros, W., Adamczyk, A., Ciurkot, K., & Kordowiak, A. M. (2011). Vanadium compounds affect growth and morphology of human rhabdomyosarcoma cell line. *Polish Journal of Pathology*, 62(4), 262–268.
- de la Mata, M., Cotan, D., Villanueva-Paz, M., de Laveria, I., Alvarez-Cordoba, M., Luzon-Hidalgo, R., ... Oropesa-Avila, M. (2016). Mitochondrial dysfunction in lysosomal storage disorders. *Diseases*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/diseases4040031>
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., ... Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112–119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>
- Deo, K. M., Pages, B. J., Ang, D. L., Gordon, C. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2016). Transition metal intercalators as anticancer agents—recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111818>
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., & Vandenebeebe, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., & Samarakoon, S. R. (2018). In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *Journal of Applied Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/jat.3658>
- Fennell, D. A., Summers, Y., Cadranel, J., Benepal, T., Christoph, D. C., Lal, R., ... Ferry, D. (2016). Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 44, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.01.003>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Gallardo-Vera, F., Tapia-Rodríguez, M., Díaz, D., Fortoul van der Goes, T., Montano, L. F., & Rendon-Huerta, E. P. (2018). Vanadium pentoxide increased PTEN and decreased SHP1 expression in NK-92MI cells, affecting PI3K-AKT-mTOR and Ras-MAPK pathways. *Journal of Immunotoxicology*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1404662>
- Galluzzi, L., Lopez-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity*, 44(2), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020>
- Hu, S., Li, X., Xu, R., Ye, L., Kong, H., Zeng, X., ... Xie, W. (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 48(6), 528–535. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw026>
- Imliaz, M., Rizwan, M. S., Xiong, S., Li, H., Ashraf, M., Shahzad, S. M., ... Tu, S. (2015). Vanadium, recent advancements and research prospects: A

- review. *Environment International*, 80, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.018>
- Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7, 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>
- Islas, M. S., Naso, L. G., Lezama, L., Valcarcel, M., Salado, C., Roura-Ferrer, M., ... Williams, P. A. (2015). Insights into the mechanisms underlying the antitumor activity of an oxidovanadium (IV) compound with the antioxidant naringenin. Albumin binding studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 149, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.011>
- Ivankovic, S., Musić, S., Gotić, M., & Ljubesić, N. (2006). Cytotoxicity of nanosize V_2O_5 particles to selected fibroblast and tumor cells. *Toxicology In Vitro*, 20(3), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.011>
- Kang, T. B., Jeong, J. S., Yang, S. H., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2018). Caspase-8 deficiency in mouse embryos triggers chronic RIPK1-dependent activation of inflammatory genes, independently of RIPK3. *Cell Death & Differentiation*, 25(6), 1107–1117. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0104-9>
- Karasawa, T., & Steyger, P. S. (2015). An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicology Letters*, 237(3), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.06.012>
- Khalil, A. A., & Jameson, M. J. (2017). Sodium orthovanadate inhibits proliferation and triggers apoptosis in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Biochemistry (Moscow)*, 82(2), 149–155. <https://doi.org/10.1134/S0006297917020067>
- Klein, A., Holko, P., Ligeza, J., & Kordowiak, A. M. (2008). Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer cells (A549, HTB44, DU145). *Folia Biologica (Kraków)*, 56(3–4), 115–121. <https://doi.org/10.3409/fb.56.3-4.115-121>
- Kordowiak, A. M., Klein, A., Goc, A., & Dabros, W. (2007). Comparison of the effect of $VOSO_4$, Na_3VO_4 and $NaVO_3$ on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. *Polish Journal of Pathology*, 58(1), 51–57.
- Kowalski, S., Hac, S., Wyrzykowski, D., Zauszkiewicz-Pawlak, A., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2017). Selective cytotoxicity of vanadium complexes on human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line by inducing necroptosis, apoptosis and mitotic catastrophe process. *Oncotarget*, 8(36), 60324–60341. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19454>
- Leon, I. E., Cadavid-Vargas, J. F., Di Virgilio, A. L., & Etcheverry, S. B. (2017). Vanadium, ruthenium and copper compounds: A new class of nonplatinum metalodrugs with anticancer activity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(2), 112–148. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160824162546>
- Leon, I. E., Cadavid-Vargas, J. F., Tiscornia, I., Porro, V., Castelli, S., Katkar, P., ... Etcheverry, S. B. (2015). Oxidovanadium (IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(7), 1175–1191. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1298-7>
- Liang, J. X., Zhong, H. J., Yang, G., Vellaisamy, K., Ma, D. L., & Leung, C. H. (2017). Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 177, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.002>
- Liao, X., Lu, J., Ying, P., Zhao, P., Bai, Y., Li, W., & Liu, M. (2013). DNA binding, antitumor activities, and hydroxyl radical scavenging properties of novel oxovanadium (IV) complexes with substituted isoniazid. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8), 975–984. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1046-9>
- Liu, S., Li, Y., Choi, H. M. C., Sarkar, C., Koh, E. Y., Wu, J., & Lipinski, M. M. (2018). Lysosomal damage after spinal cord injury causes accumulation of RIPK1 and RIPK3 proteins and potentiation of necroptosis. *Cell Death & Disease*, 9(5), 476. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0469-1>
- Malagobadan, S., & Nagoor, N. H. (2015). Evaluation of microRNAs regulating anolakis pathways and its therapeutic potential. *BioMed Research International*, 2015, 716816–716810. <https://doi.org/10.1155/2015/716816>
- Markowska, A., Kasprzak, B., Jaszczynska-Nowinka, K., Lubin, J., & Markowska, J. (2015). Noble metals in oncology. *Contemporary Oncology (Pozn)*, 19(4), 271–275. <https://doi.org/10.5114/wo.2015.54386>
- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., & Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.009>
- Mutlu, E., Cristy, T., Graves, S. W., Hooth, M. J., & Waidyanatha, S. (2017). Characterization of aqueous formulations of tetra- and pentavalent forms of vanadium in support of test article selection in toxicology studies. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(1), 405–416. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7803-x>
- Naso, L. G., Badiola, I., Marquez Clavijo, J., Valcarcel, M., Salado, C., Ferrer, E. G., & Williams, P. A. M. (2016). Inhibition of the metastatic progression of breast and colorectal cancer in vitro and in vivo in murine model by the oxidovanadium (IV) complex with luteolin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(22), 6004–6011. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.058>
- Niu, X., Xiao, R., Wang, N., Wang, Z., Zhang, Y., Xia, Q., & Yang, X. (2016). The molecular mechanisms and rational design of anti-diabetic vanadium compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(8), 811–822.
- Paulpandiyar, R., & Raman, N. (2017). Oxovanadium (IV) complexes with Knoevenagel Schiff base condensate as impending chemotherapeutic agents: Synthesis, characterization, biological screening and anti-proliferative assay. *Bioorganic Chemistry*, 73, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.06.008>
- Pessoa, J. C., Etcheverry, S., & Gambino, D. (2015). Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302, 24–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>
- Petanidis, S., Kiouoglou, E., Hadzopoulou-Cladaras, M., & Salifoglou, A. (2013). Novel ternary vanadium-betaine-peroxido species suppresses H-ras and matrix metalloproteinase-2 expression by increasing reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, 335(2), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.052>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Rivadeneira, J., Di Virgilio, A. L., Barrio, D. A., Muglia, C. I., Bruzzone, L., & Etcheverry, S. B. (2010). Cytotoxicity of a vanadyl (IV) complex with a multidentate oxygen donor in osteoblast cell lines in culture. *Medicinal Chemistry*, 6(1), 9–23. <https://doi.org/10.2174/157340610791208754>
- Rosenblatt, J., Raff, M. C., & Cramer, L. P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Current Biology*, 11(23), 1847–1857. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00587-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00587-5)
- Roy, S., & Chakraborty, T. (2018). Deciphering the molecular mechanism and apoptosis underlying the in-vitro and in-vivo chemotherapeutic efficacy of vanadium luteolin complex in colon cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 36(3), 116–128. <https://doi.org/10.1002/cbf.3322>
- Rozzo, C., Sanna, D., Garrirba, E., Serra, M., Cantara, A., Palmieri, G., & Pisano, M. (2017). Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 174, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.010>
- Salisbury, D., & Bronas, U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nursing Research*, 64(1), 53–66. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000068>
- Sarin, N., Engel, F., Kalayda, G. V., Mannewitz, M., Cinatl, J. Jr., Rothweiler, F., ... Frotschl, R. (2017). Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS One*, 12(7), e0181081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181081>

- Soumya, R. S., Reshmi, R., Jomon, S., Antu, K. A., Riva, M. P., & Raghu, K. G. (2014). Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant potential of vanadium encapsulated guar gum nanoparticles. *Food & Function*, 5(3), 535–544. <https://doi.org/10.1039/c3fo60339c>
- Suzuki, K., Inageda, K., Nishitani, G., & Matsuoka, M. (2007). Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: involvement of ATM pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.028>
- Taddel, M. L., Giannoni, E., Flasci, T., & Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *Journal of Pathology*, 226(2), 380–393. <https://doi.org/10.1002/path.3000>
- Tait, S. W., Ichim, G., & Green, D. R. (2014). Die another way—non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 10), 2135–2144. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>
- Tian, X., Fan, J., Hou, W., Bai, S., Ao, Q., & Tong, H. (2016). Sodium orthovanadate induces the apoptosis of SH-SY5Y cells by inhibiting PIWIL2. *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 874–880. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4616>
- Tsiani, E., & Fantus, I. G. (1997). Vanadium compounds biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8(2), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(96\)00262-7](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(96)00262-7)
- Vander Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–147. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Beyaert, R., Declercq, W., & Fiers, W. (1997). Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine*, 9(11), 801–808. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0252>
- Weigel, K. J., Jakimenko, A., Conti, B. A., Chapman, S. E., Kalliney, W. J., Leevy, W. M., ... Schafer, Z. T. (2014). CAF-secreted IGFBPs regulate breast cancer cell anoikis. *Molecular Cancer Research*, 12(6), 855–866. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0090>
- Wilmes, A., Bielow, C., Ranninger, C., Bellwon, P., Aschauer, L., Limonciel, A., ... Jennings, P. (2015). Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. *Toxicology In Vitro*, 30(1 Pt A), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.006>
- Wu, J. X., Hong, Y. H., & Yang, X. G. (2016). Bis (acetylacetonato)-oxidovanadium (IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(8), 919–929. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1389-0>
- Wu, Y., Ma, Y., Xu, Z., Wang, D., Zhao, B., Pan, H., ... Jiang, H. (2014). Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Letters*, 351(1), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.018>
- Xu, F., Luo, M., He, L., Cao, Y., Li, W., Ying, S., ... Shen, H. (2018). Necroptosis contributes to urban particulate matter-induced airway epithelial injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(2), 699–712. <https://doi.org/10.1159/000488726>
- Yang, H. M., Zhuo, J. Y., Sun, C. Y., Nie, J., Yuan, J., Liu, Y. L., ... Li, Y. C. (2018). Pogostone attenuates TNF-alpha-induced injury in A549 cells via inhibiting NF-kappaB and activating Nrf2 pathways. *International Immunopharmacology*, 62, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.029>
- Ye, J., Ding, M., Zhang, X., Rojanasakul, Y., Nedospasov, S., Vallyathan, V., ... Shi, X. (1999). Induction of TNF-alpha in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF-kappaB and free radical reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 198(1–2), 193–200. <https://doi.org/10.1023/A:1006969008056>
- Zwolak, I. (2015). Increased cytotoxicity of vanadium to CHO-K1 cells in the presence of inorganic selenium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(5), 593–598. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1615-4>
- Zwolak, I. (2016). Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. *Toxicology and Industrial Health*, 32(6), 1013–1025. <https://doi.org/10.1177/0748233714544190>

How to cite this article: Guerrero-Palomo G, Rendón-Huerta EP, Montaña LF, Fortoul TI. Vanadium compounds and cellular death mechanisms in the A549 cell line: The relevance of the compound valence. *J Appl Toxicol*. 2018;1–13. <https://doi.org/10.1002/jat.3746>

ANEXO IV. PRESENTACIONES EN EVENTOS ACADÉMICOS

El vanadio como antineoplásico en el adenocarcinoma pulmonar. Estudio *in vitro*. Póster.

XXXIX Congreso Nacional de Farmacología con el Congreso Estudiantil de Farmacología "Dr. Marte Lorenzana Jiménez" y el XV Congreso de Investigación en Medicina de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México del 29 al 31 de mayo de 2017.

Gabriela Guerrero Palomo, Erika Patricia Rendón Huerta, Luis Felipe Montaña y Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

ANEXO V. CAPITULOS DE LIBRO

Capitulo 6. **Mecanismos de daño a la salud por los contaminantes atmosféricos.** Marcela Rojas Lemus, **Gabriela Guerrero Palomo**, Silvana Cervantes Yépez y Teresa I. Fortoul van der Goes. **Efectos de la contaminación atmosférica en la salud.** 2017. Samuel Ponce de León Rosales, Teresa Fortoul van der Goes y Rogelio Pérez Padilla. Universidad Nacional Autónoma de México. México. ISBN 978-607-8341-57-3.