



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL PENTÓXIDO DE VANADIO SOBRE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS ATM, ATR, CHK1 Y CHK2 DE LOS LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LAS FASES DEL CICLO CELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ESAÚ FRÍAS JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

(EN MEMORIA DEL DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO)

FES ZARAGOZA UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

UAM IZTAPALAPA

MÉXICO, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL PENTÓXIDO DE VANADIO SOBRE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS ATM, ATR, CHK1 Y CHK2 DE LOS LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS IN VITRO Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LAS FASES DEL CICLO CELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ESAÚ FRÍAS JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

(EN MEMORIA DEL DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO)

FES ZARAGOZA UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

UAM IZTAPALAPA

MÉXICO, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/667/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **24 de enero de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **FRÍAS JIMÉNEZ ESAÚ** con número de cuenta **31014388-6** con la tesis titulada **“Efecto de la administración del pentóxido de vanadio sobre los niveles de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2 de los linfocitos humanos tratados in vitro y su repercusión sobre las fases del ciclo celular”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
Vocal: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Secretario: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 29 de julio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Programa de Becas para Estudios de Posgrado de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido, numero de becario 928510.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT UNAM IN229220 para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Dr. Juan José Rodríguez Mercado y a los miembros del Comité Tutorial, Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes y Dr. José Miguel Betancourt Rule por todos sus comentarios y enseñanzas para la mejora de este trabajo.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por siempre brindarme su apoyo, externarme sus observaciones y contribuir con la mejora de esta tesis.

Agradecimientos

Primeramente, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme la oportunidad de poder crecer académica, intelectual y personalmente.

A los miembros del jurado

Dra. María Elena Calderón Segura

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Edmundo Bonilla González

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Por sus observaciones que permitieron mejorar este trabajo.

Con mucha admiración y lamentando profundamente el fallecimiento del Dr. Mario Altamirano, el que fue jefe de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la FES Zaragoza, por los consejos, paciencia, apoyo y por alentarme siempre a seguir logrando mis objetivos.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por sus comentarios en la realización de este trabajo y por su disposición que siempre ha mostrado para resolver las dudas surgidas.

A mis compañeros actuales y a los que han pasado por el laboratorio 5-PA de la UMIEZ. Al Dr. Arturo Valle Mendiola por el apoyo en la estandarización de la técnica Western Blot.

A la Biól. Guadalupe Gómez García por su asistencia técnica en la adquisición de datos del citómetro de flujo.

Este trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental de la FES-Zaragoza, UNAM.

Dedicatorias

A mis padres (Tomas y Ana Lilia) por siempre estar conmigo y apoyarme en todas mis decisiones, pero en especial a mi madre porque sin ella nunca podría haber logrado esto, y aunque nunca lo digo, te quiero mucha mamá.

A mis hermanos, Rodrigo, Ulises, Paulette y Gabriela, por sus consejos, compañía y comprensión.

A la Dra. Patricia Rivera, porque más que mi profesora se convirtió en una gran amiga. Muchas gracias por todo su apoyo y comprensión.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, por su amabilidad, consejos, disponibilidad y apoyo para este trabajo.

A mi querido amigo Cesar, por su gran amistad y sinceridad.

A Kathya, Iván, Mario y Daniela, por ser los mejores amigos que pude tener en mi etapa preparatoria.

A todos mis compañeros de PILARES por siempre ánimos y su gran amistad.

Y por último a Karli porque sin ser nada eres una persona muy especial para mí.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATR	Ataxia-telangiectasia y Rad3-relacionada
(VO(aca)₂)	Bisacetilacetato de vanadilo
MRN	Complejo proteico formado por MRE11, RAD50 y NBS1
Cdc25A	Ciclo de división celular 25 isoforma A
Cdc25C	Ciclo de división celular 25 isoforma C
p-Cdc25C	Ciclo de división celular 25 isoforma C fosforilada en la serina 216
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CHK1	Cinasa de punto de control 1
CHK2	Cinasa de punto de control 2
ERO	Especies reactivas de oxígeno
E2F	Familia de factores de transcripción que se una al gen <i>E2</i>
E2F1	Factor de transcripción E2F 1
PI-3K	Familia de fosfatidilinositol-3-cinasa
BRCA1	Gen que codifica la proteína conocida como cáncer de seno 1
FOXM1	Gen perteneciente a la familia de factores de transcripción FOX que codifican la proteína M1
SMC1	Mantenimiento estructural del cromosoma 1
NaVO₃	Metavanadato de sodio
MN	Micronúcleo
V₂O₅	Pentóxido de vanadio
DNAPK	Proteína cinasa dependiente de ADN
MAPK	Proteína cinasa activadora de mitógenos
RPA	Proteína de replicación A
pRB	Proteína del retinoblastoma
ATRIP	Proteína que interactúa con ATR
RH	Recombinación homologa
DDR	Respuesta al daño del ADN
BER	Reparación por escisión de bases
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
DSB	Rompimiento de cadena doble
SSB	Rompimiento de cadena sencilla
ssDNA	Segmento de ADN monocatenario
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
V	Vanadio
H2AX	Variante de la histona de la familia H2A
γH2AX	Variante de la histona de la familia H2A fosforilada

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1.1. Metales	5
3.1.2. Vanadio (V)	5
3.1.3. Vías de exposición de los organismos al V	6
3.1.4. Toxicidad	7
3.1.5. Pentóxido de vanadio (V_2O_5)	8
3.2 Ciclo celular	9
3.2.1. Respuesta al daño en el ADN	10
3.2.2. Señalización ATM-CHEK2 y ATR-CHEK1	13
3.3. Efectos del vanadio en el ciclo celular	15
3.4. Separación y detención de proteínas	16
3.5. Linfocitos como medio de estudio	16
4. Justificación	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivos	19
6.1. General	19
6.2. Particulares	19
7. Material y Métodos	20
7.1. Reactivos	20
7.2. Separación y cultivo de linfocitos	20
7.3. Viabilidad	21
7.4. Fases del ciclo celular por contenido de ADN	21
7.5. Obtención y análisis de proteínas	22
7.6. Detección de proteínas	22
7.7. Análisis estadístico	23
8. Resultados y Discusión	24
8.1. Efecto del V_2O_5 sobre la viabilidad celular	24
8.2. Efecto del V_2O_5 sobre las fases del ciclo celular evaluado por el contenido de	

ADN	28
8.3. Efecto del V ₂ O ₅ sobre los niveles de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2	36
9. Conclusiones	47
10. Referencias Bibliográficas	48

1. Resumen

El vanadio (V) se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra y es liberado al ambiente a través de procesos naturales y antropogénicos. Dentro de los compuestos de este metal que se liberan a la atmósfera se encuentra el pentóxido de vanadio (V_2O_5). En estudios *in vitro* se ha observado que el V retrasa la proliferación celular ya que interactúa con diferentes moléculas biológicas, principalmente las que dependen del ion fosfato. Sus compuestos son inhibidores de algunas enzimas como cinasas y fosfatasa; muchas de estas proteínas tienen la función de regular la estructura del genoma.

Cuando se presentan daños en el ADN a causa de agentes genotóxicos, se activan mecanismos que los detectan para repararlo. Esto se lleva a cabo por diversas proteínas que activan cascadas de señalización para reparar el daño, regular la progresión del ciclo celular o, si el daño es demasiado severo, activar los mecanismos de muerte celular por apoptosis o senescencia; esto se logra en parte por la activación de las cinasas ATM, ATR, CHK1 y CHK2. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del V_2O_5 sobre los niveles de expresión de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Por consiguiente, se obtuvieron muestras de sangre de tres donadores, se separaron los linfocitos con Histopaque-1077, se cultivaron las células y se dieron los tratamientos con el V_2O_5 . Después de los tratamientos con 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ durante 3, 24, 48 y 72 h, se determinó la viabilidad celular mediante fluorocromos. El contenido de ADN se evaluó también por citometría de flujo y finalmente se analizaron los niveles de expresión de las proteínas con la técnica de "western blot".

Los resultados mostraron que la administración de V_2O_5 modificó la viabilidad de las células a las 72 h en contraste con el grupo sin tratamiento. Con respecto al contenido de ADN, se observó que a las 48 h hubo un incremento con 8 $\mu\text{g/mL}$ en G_1 y una disminución en esta misma concentración para la fase S. En los tratamientos de 72 h se evidenció un aumento significativo en G_1 para todas las concentraciones y una reducción en S y G_2 .

En relación con los niveles de expresión de las proteínas, se observó que el tratamiento de 3 h indujo una disminución en la expresión de ATM, CHK1 y CHK2 con 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_5 y ATR aumentó significativamente con las mismas concentraciones en comparación con el grupo sin tratamiento (0 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_5). A las 24 h, se observó aumento en la expresión de todas las proteínas; sin embargo, para ATR este aumento fue significativo con la concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$. En los tiempos de exposición de 48 y 72 h, todas las proteínas tendieron a aumentar de la misma manera en que ocurrió con el periodo de exposición anterior.

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que la administración de V_2O_5 a cultivos de linfocitos humanos *in vitro* disminuye la viabilidad celular y promueve la detención del ciclo celular en la fase G_1 tras exposiciones de 48 y 72 h, lo cual concuerda con la tendencia al aumento de la expresión de las proteínas a esos tiempos. Estos efectos, posiblemente son consecuencia de la generación de rompimientos de cadena sencilla y doble que, a su vez, llevan al aumento de la expresión de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2 y con esto a la detención del ciclo celular.

2. Abstract

Vanadium (V) is widely distributed on Earth and is released to the environment through natural and anthropogenic processes. Amongst the compounds of this metal that are released into the atmosphere is vanadium pentoxide (V_2O_5). *In vitro* studies have shown that V delays cell proliferation because of its interaction with different biological molecules, mainly those dependent on ion phosphate. Its compounds inhibit enzymes such as kinases and phosphatases, and many of these proteins function as genome structure regulators.

When DNA is damaged by genotoxic agents, detection mechanisms are activated in order to do reparations. This is carried out by diverse proteins that activate signaling cascades to repair the damage, regulate the progression of the cell cycle or, if the ham is too severe, to activate the mechanisms of cell death by apoptosis or senescence; which is accomplished partly due to the activation of the ATM, ATR, CHK1 and CHK2 kinases. Hence, the objective of this study was to evaluate the effects of V_2O_5 on the expression levels of the ATM, ATR, CHK1 and CHK2 proteins in human lymphocytes treated *in vitro*. Thus, blood samples from three doners were obtained, the lymphocytes were separated with Histopaque-1077, the cells were cultivated and treated with V_2O_5 . After cells were treated with 8, 16 and 32 $\mu\text{g/mL}$ for 3, 24, 48 and 72 h, cell viability was determined through fluorochrome. DNA content was evaluated by flow cytometry as well and ultimately, the expression levels of the proteins were analyzed by western blot.

Results revealed that administering V_2O_5 modified cell viability after 72h compared to the control group which received no treatment. Regarding DNA content, after 48h, an increase with 8 $\mu\text{g/mL}$ during G_1 and a decrease with the same concentration levels at phase S were observed. Within 72h treatments, a significative increase during G_1 was evidenced in all concentrations and then a decrease during S and G_2 .

Concerning the expression levels of the proteins, the 3h treatment decreased the expression levels of ATM, CHK1 and CHK2 with 8, 16 and 32 $\mu\text{g/mL}$ of V_2O_5 and ATR increased significantly at the same concentration levels in comparison to the

control group (0 $\mu\text{g/mL}$ of V_2O_5). After 24h, the expression levels of all of the proteins analyzed increased; nevertheless, for ATR this increase was more significant at a concentration of 32 $\mu\text{g/mL}$. With time exposures of 48 and 72h, all of the proteins had a tendency to increase as had happened with the previous period of time exposure.

Based on the above results, it can be concluded that the administration of V_2O_5 to human lymphocytes decreases cell viability and promotes the arrest of the cell cycle during the G_1 phase at 48 and 72 h, which is consistent with the trend of increased expression levels of the proteins at 48 and 72 h, possibly due to the generation of single and double chain breaks that, in turn, lead to an increase of the expressions of the ATM, ATR, CHK1 and CHK2 proteins and thus, the arrest of the cell cycle.

3. Introducción

3.1.1. Metales

La exposición de los seres vivos a los metales y metaloides se ha incrementado resultado de las actividades antropogénicas, principalmente por el procesamiento de minerales o el uso de combustibles fósiles, lo que ha llevado a observar correlación entre la presencia de sus partículas en el aire con la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en residentes de áreas metropolitanas; un ejemplo son los compuestos de vanadio (Ramírez *et al.*, 1997). Ya sea por procesos naturales o causados por el hombre, su emisión a la atmósfera ha provocado aumento en la contaminación ambiental, induciendo deterioro ambiental y en la salud humana. El problema radica en que los metales no son degradados por los seres vivos tendiendo a acumularse en ellos (Duruibe *et al.*, 2007; Mateos-Nava 2012).

En la corteza terrestre se encuentran ampliamente distribuidos y algunos son considerados micronutrientes esenciales tal es el caso del calcio (Ca), el níquel (Ni), el zinc (Zn), el magnesio (Mg), el cobre (Cu), debido a que participan en el metabolismo celular; sin embargo, otros como el arsénico (As), el cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el vanadio (V) o el plomo (Pb) no son esenciales para el ser humano y su consumo, no importando que sea en muy bajas concentraciones, puede resultar tóxico (Duruibe *et al.*, 2007; Nagajyoti *et al.*, 2010).

3.1.2. Vanadio

El vanadio, con el símbolo V, es uno de los elementos químicos situados en el grupo cinco de la tabla periódica de los elementos (VB). Tiene el número atómico 23, peso atómico 50.95, puntos de fusión 1950 °C y ebullición 3600 °C, con densidad de 6.11 g/m³, es caracterizado por ser dúctil y blando (IUPAC, 2018), presenta estados de oxidación que van desde -3 a +5, siendo los de +3, +4 y +5 los más estudiados (Contreras-Cadena *et al.*, 2014).

Se distribuye ampliamente en la Tierra, con abundancia de 0.02 % en la corteza terrestre, siendo el vigésimo segundo elemento más abundante ya que se puede encontrar en 68 minerales diferentes, en el agua de mar su concentración oscila alrededor de los 35 nM. Se ha demostrado que la liberación del V al ambiente se debe a procesos naturales como las erupciones volcánicas, los aerosoles marinos e intemperismo de rocas, además de manera antropogénica por la quema de combustibles fósiles (García, 2006; Imtiaz *et al.*, 2015). Se han observado altas concentraciones en la atmósfera de ciudades industrializadas en comparación con algunas zonas rurales, siendo los óxidos de este metal los que están presentes (Tzu-Hsuen *et al.*, 2016).

En la biosfera la mayor proporción se encuentra en la flora y fauna marina, aunque alcanza una importante concentración en hongos y otras especies terrestres, también aparece en bajas concentraciones en los alimentos, como, por ejemplo: de 0.005 a 10.03 mg/kg en granos, carnes, productos lácteos y mariscos; de 0.431 a 0.987 mg/kg en pimienta negra y semillas de eneldo; en algunos frutos, verduras y pescados pueden tener concentraciones mayores a 40 mg/kg y en hongos 400 veces más (Imtiaz *et al.*, 2015). Sin embargo, para los seres humanos no es un elemento esencial a diferencia de otros organismos, tal es el caso de las ratas y los pollos en los cuales es necesario para su crecimiento (Guevara-García, 1996). En México y Alemania, el consumo de V se encuentra entre 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ para las mujeres y $>20 \mu\text{g}/\text{día}$ para los hombres; diferencias debidas a la composición de la dieta que prefiere cada sexo (WHO, 2001).

3.1.3. Vías de exposición al V

La entrada de este elemento al organismo es principalmente por los alimentos que se consumen, el aire que se respira y en menor cantidad por el contacto con la piel. Se distribuye en el cuerpo a través de la sangre unido a la proteína transferrina y es capaz de acumularse en el hígado, los riñones, los huesos, los pulmones, el bazo, entre otros, su eliminación se da principalmente en la orina y muy poco en las heces (Heinemann *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004; Rehder, 2013). En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se ha observado que el V ingresa a la célula por medio

de mecanismos de transporte aniónicos y en el citoplasma por procesos de óxido reducción por el glutatión y otros sustratos a los que se mantiene unido (Sabbioni *et al.*, 1991; Shi y Dalal, 1993; Sakurai, 1994). En estado fisiológico las especies de V presentes son el vanadilo (VO^{2+}) y vanadato (VO_4^{3-}), siendo este último estructuralmente análogo al anión fosfato, razón por la cual, diversas enzimas lo reconocen como tal y lo introducen en procesos metabólicos (Crans *et al.*, 2004).

3.1.4. Toxicidad

La toxicidad del V está estrechamente relacionada con su forma química, la solubilidad y la biotransformación que ocurra por el metabolismo de los seres vivos, la cual aumenta a medida que incrementa el estado de oxidación siendo los compuestos con el estado +5 los más tóxicos para los mamíferos. Se ha observado que personas laboralmente expuestas e intoxicadas con V presentan coloración verde en la lengua, irritación del tracto respiratorio y garganta, tos, conjuntivitis, dermatitis, congestión pulmonar, daño al epitelio alveolar, bronquitis, rinitis, faringitis, y que la exposición prolongada puede inducir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). La administración de los compuestos de V causa una amplia gama de efectos tóxicos, entre los que se encuentran, alteraciones bioquímicas y hematológicas, aumento de los niveles séricos de urea y alanina amino transferasa, cambios en la respuesta fagocítica y bacteriana por parte del sistema inmune, remodelación de las neuronas piramidales del bulbo olfatorio, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad (Domingo, 1996; NTP, 2002; Li *et al.*, 2013; Sumanta *et al.*, 2015; Ahmadi *et al.*, 2016).

A nivel celular se ha demostrado que puede alterar las actividades de diferentes ATPasas, proteínas cinasas, ribonucleasas, fosfatasas y enzimas que interactúan con los ácidos nucleicos (Roldán y Altamirano, 1990; Mukherjee *et al.*, 2004; Goc, 2006; Rehder, 2016).

3.1.5. Pentóxido de vanadio (V₂O₅)

La forma comercialmente representativa del V es el V₂O₅, que en estado sólido forma sales de color amarillo-rojizo, presenta puntos de ebullición y fusión de 690 °C y 1750 °C. Dado sus características, químicamente reacciona con las bases y da como resultado vanadatos (WHO, 1990).

Las aleaciones que forma con diversos metales como el hierro, son usadas para la fabricación de autopartes, motores y aeronaves, ya que incrementa su resistencia. También se emplea en diversas industrias: electrónica, metalúrgica, vidriera, pintura y esmalte. Se emplea como agente catalítico para la obtención de ácido sulfúrico, ftálico, acetaldehído y antraquinona (IARC, 2006; Fortoul *et al.*, 2014).

Sus numerosas aplicaciones y su amplia presencia ambiental han provocado que el ser humano este constantemente en interacción con el V y sus compuestos, razón por la cual el Programa Nacional de Toxicología (NTP) en 2002 evaluó los efectos carcinogénicos del V₂O₅ sobre ratones y ratas de las cepas B6C3F1 y F344/N, encontrando aumento mayor al 50 % en la incidencia de neoplasias alveolares y bronquiales en ratones, y también en ratas macho. Por otra parte, la Asociación Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2006) lo clasificó dentro del grupo 2B (posible carcinógeno para el humano).

En otro estudio llevado a cabo sobre ratones de las cepas BALB y B6 se encontró que promueve la aparición de tumores pulmonares activando vías de señalización dependientes del estrés oxidante (Rondini *et al.*, 2010), ya que el V₂O₅ puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno e interferir con la síntesis y reparación del ADN (Zhang *et al.*, 2001; IARC, 2006), inducir rompimientos de cadena sencilla (SSB por sus siglas en ingles) y producir efectos citotóxicos (Altamirano-Lozano., 1996; Rojas *et al.*, 1996), causar oxidación de bases, aumentar la presencia de MN en células sanguíneas (Ehrlich *et al.*, 2008). Asimismo, modifican la proliferación celular evidenciado por la disminución del índice mitótico y de replicación (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce esta disminución aun no son bien comprendidos.

3.2. Ciclo Celular

Las células somáticas pasan por un proceso de crecimiento y maduración denominado ciclo celular, el cual se divide en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M, las tres primeras comprenden la interfase y la última la división mitótica o nuclear. El tiempo que necesita la célula para llevar a cabo un ciclo puede estar determinado por diferentes factores: temperatura, nutrientes o el tipo celular, entre otros (Alberts *et al.*, 2014).

En la fase G₁, los cromosomas están constituidos por una cromátida, en ésta se presenta alta actividad química donde hay incremento del tamaño celular con la síntesis de ARN y proteínas; orgánulos como la mitocondria, los centriolos y los cloroplastos se duplican. En la fase S se lleva a cabo la duplicación del ADN, síntesis de histonas y de proteínas que se asocian al ADN, al final de esta fase el núcleo cuenta con el doble de ADN, es decir, cada cromosoma con dos cromátidas y proteínas nucleares. La fase G₂ proporciona el tiempo necesario para garantizar que la replicación del ADN se haya llevado correctamente, además del término de la duplicación de los centriolos y finalmente en la fase M los cromosomas duplicados son segregados hacia núcleos diferentes y ocurre la citocinesis originándose dos células nuevas (Jiménez y Merchant, 2006; Alberts *et al.*, 2014).

El ciclo celular contiene diferentes puntos de control, dos de ellos, ubicados en las transiciones G₁/S y G₂/M que permiten a las células prevenir cualquier modificación de su contenido de ADN. Esto garantiza la fidelidad de la replicación genómica y divisiones celulares para evitar cualquier transmisión de errores a las células hijas. El fallo en estos produce inestabilidad genómica y se ha relacionado con la carcinogénesis (Shackelford *et al.*, 1999, 2000; Schönthal, 2004).

Este ciclo es regulado por proteínas cinasas y fosfatasas que aseguran la correcta transición de una fase a otra (Malumbres, 2011). Las primeras constituyen complejos catalíticos-reguladores de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk por sus siglas en inglés); las ciclinas se sintetizan y degradan en una fase específica, están encargadas de unirse y activar a las Cdk. Los complejos así

formados fosforilan diferentes sustratos a intervalos específicos dentro del ciclo, llevando su progresión de manera ordenada (Morgan, 1997).

En células de mamíferos, se ha demostrado que las ciclinas D se unen con Cdk 4 y 6 en la etapa temprana de la fase G_1 , mientras que la ciclina E con Cdk 2 lo hace posteriormente y se encarga de enviar el mensaje para la síntesis de proteínas necesarias para la transición de la fase G_1 a la S. Las D son las primeras en sintetizarse (dentro de G_1) en presencia de un factor de crecimiento o estímulo mitógeno, razón por la cual su síntesis no es oscilante, más bien es controlada a diferencia de las demás ciclinas. El sustrato en este caso es la pRB (proteína del retinoblastoma) el cual es indispensable en el punto de restricción dentro de G_1 cuando se presenta daño al ADN. En estado hipofosforilado de la pRB se encuentra unido a E2F (familia de factores transcripcionales llamados así por la capacidad de unirse al promotor del gen E2 en adenovirus) inhibiendo la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ADN y ciclina E.

Este mecanismo de bloqueo se interrumpe primero por la fosforilación de ciclina D-Cdk 4/6 y después por ciclina E-Cdk 2 como respuesta a una señal para que el ciclo continúe (Shackelford *et al.*, 1999, 2000).

Con E2F libre, la síntesis de ciclina E inicia durante la progresión en G_1 , se une a Cdk 2 manteniendo a pRB fosforilada y asegurando que E2F esté activo. Durante la transición de S nuevamente E2F comienza la transcripción de ciclina A que junto a Cdk 2 favorece este paso (Morgan, 1995; Cmielová y Rezacová, 2011).

El último complejo en aparecer es el formado por la ciclina B-Cdk1 el cual contribuye a que las células puedan pasar la transición G_2/M y regula la entrada a mitosis (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

3.2.1. Respuesta al daño en el ADN

El mantenimiento de la estabilidad genómica es de suma importancia para las células dado que las alteraciones en la estructura del ADN pueden conducir a errores en la proliferación o incluso llevar a la muerte celular. Día a día, el genoma

muestra gran variedad de alteraciones causadas tanto por agentes endógenos o exógenos, como la luz UV o la generación de radicales libres por el metabolismo, que generan diversos tipos de lesiones; entre estas últimas, se pueden citar los DSB o rompimientos de cadena doble (DSB por sus siglas en inglés), desajustes y aductos. Las células han desarrollado sistemas de vigilancia para garantizar la segregación adecuada de la información genética, acompañados por mecanismos de reparación, los cuales evitan que las lesiones se conviertan en mutaciones hereditarias. En este caso están los puntos de control que se activan cuando se presentan daños en el ADN e inducen la detención de la progresión del ciclo celular dando el tiempo necesario para que la maquinaria de reparación realice su función, evitando así que se transmita información incorrecta a la progenie (Houtgraaf *et al.*, 2006).

Sin embargo, si la reparación falla, el ciclo celular se ve interrumpido de manera indefinida lo que lleva a un estado senescente o puede inducirse la muerte celular programada, Figura 1.

Las respuestas celulares al estrés genotóxico pueden ser entendidas a modo de cascadas de señalización en donde las lesiones ocurridas sobre el ADN despliegan marcadores iniciales detectados por los sensores que son grupos de proteínas encargadas de reconocer los daños transmitiendo una respuesta a través de los transductores en cargados de amplificar ésta, culminando con los efectores que inducen diversas funciones, Figura 2 (Lazzaro *et al.*, 2009).

Los miembros de la superfamilia de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3k) se activan en etapas tempranas, además son sensores iniciadores de respuesta al daño celular, ATM (ataxia-telangiectasia mutada) y ATR (ataxia-telangiectasia y Rad3-relacionada) son ejemplos de éstos, que a su vez reclutan a CHK1 (cinasa de punto de control 1) y CHK2 (cinasa de punto de control 2) para mediar su función (Lazzaro *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Maréchal y Zou, 2019).

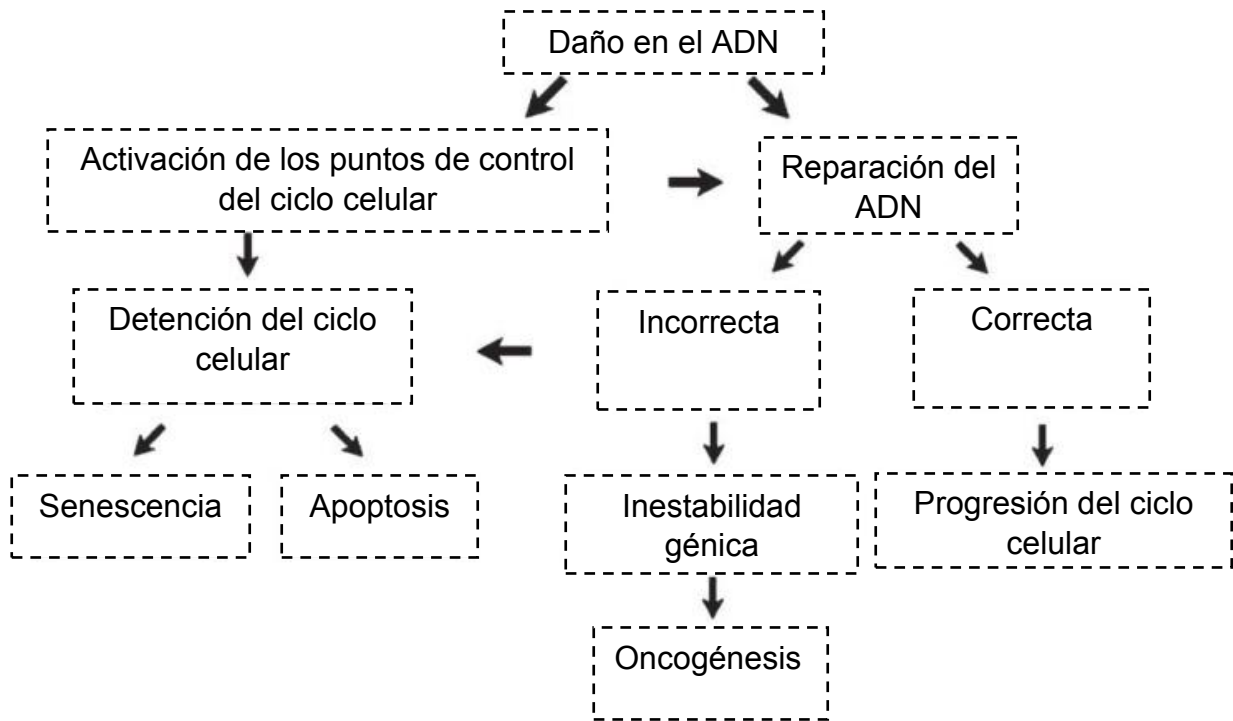


Figura 1. Diagrama de flujo que representa la respuesta celular a cualquier tipo de daño en el ADN. En células proliferativas, los puntos de control se activarán, lo que llevará a la detención del ciclo celular para dar tiempo a la maquinaria de reparación de corregir el daño ocurrido en el material génico. En células diferenciadas, la reparación inicia directamente. Cuando se completa la reparación, la célula seguirá su ciclo, pero si el daño no puede repararse o es demasiado, entonces el ciclo celular se bloqueará de manera permanente, lo que lleva a un estado senescente o a que se induzca la muerte celular por apoptosis. En caso de que los daños permanezcan, esta situación conducirá a mutaciones generando inestabilidad genómica, inclusive la inducción de alguna enfermedad crónico-degenerativa (Houtgraaf *et al.*, 2006).

3.2.2. Señalización ATM-CHK2 y ATR-CHK1

ATM y CHK2 se activan principalmente por agentes genotóxicos que inducen DSB, y posiblemente en procesos que bloquean la replicación. Se ha propuesto que, en células sin daño ATM existe en forma de homodímeros inactivos. En respuesta a los DSB, rápidamente tienden a autofosforilarse, resultando en su disociación para formar monómeros parcialmente activos. Estos se reclutan hacia los sitios de DSB por medio de interacciones con el complejo de sensores MRN, estimulando su activación completa y proporcionando un medio que permite a ATM actuar sobre

múltiples moléculas en el lugar del daño. Las proteínas a las que se dirige ATM incluyen la variante histónica H2AX, que forma la marca de histonas γ -H2AX asociada a daño, el propio complejo MRN, la cohesina SMC1 y la CHK2 (cinasa efectora). ATM fosforila a CHK2 en el residuo específico de treonina T68, induciendo la autofosforilación del bucle de activación. Se cree que, al encontrarse activa, CHK2 se disocia de los sitios de daño y dispersa en forma de monómero por todo el núcleo actuando sobre diversos sustratos involucrados en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transcripción de genes, ejemplos de estos son p53, los miembros de la familia de fosfatasa Cdc25, BRCA1 y algunos factores de transcripción como FOXM1 y E2F1 (Maréchal y Zou, 2019).

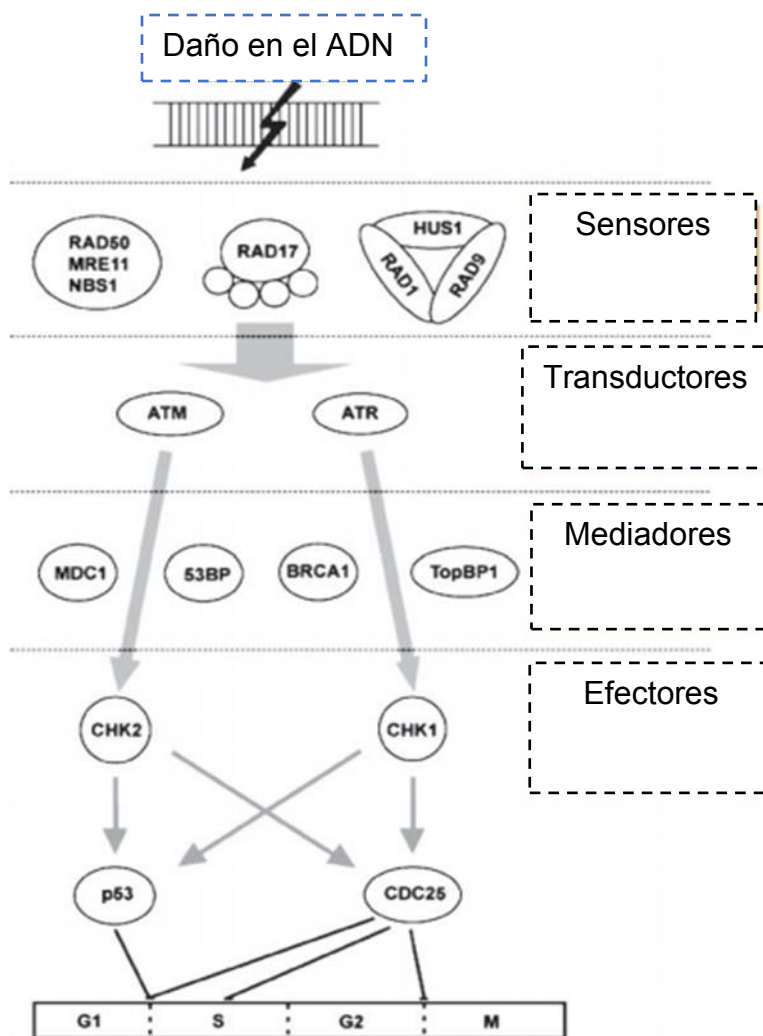


Figura 2. Representación de la respuesta generada por los puntos de control inducida después del daño en el ADN. Al momento que se da la detección de la lesión por las proteínas sensor, esta señal se transduce a las proteínas efectoras CHK1 y CHK2 a través de las proteínas transductores ATM y ATR. Dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula, esto puede conducir a la activación de p53 e inactivación de Cdc25C, lo que eventualmente detiene la proliferación. Las proteínas mediadoras se pueden asociar con sensores de daño, transductores de señal o efectores en etapas particulares del ciclo (Houtgraaf *et al.*, 2006; Lazzaro *et al.*, 2009).

horquilla de replicación generando segmentos de ADN monocatenario (ssDNA por sus siglas en inglés) que rápidamente son cubiertos por el complejo de proteínas de unión RPA. La ATR se recluta y se activa en dichos segmentos asociándose con su proteína censora, ATRIP, que interactúa directamente con el ssDNA en unión con RPA (Branzei y Foiani, 2008; Smith *et al.*, 2010).

El bloqueo de la horquilla de replicación genera ssDNA directamente; sin embargo, esta lesión puede surgir a través de la reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés). Es importante considerar que esta ruta también se activa en respuesta a los DSB al generarse ssDNA, resultado del acortamiento de las cadenas para lograr la complementariedad. De manera inversa, se pueden generar DSB si las polimerasas replicativas se encuentran con muescas o sitios abásicos. De este modo, las vías ATM-CHK2 y ATR-CHK1 con frecuencia se activan simultáneamente en células expuestas a diversos agentes genotóxicos (Branzei y Foiani, 2008).

Los sustratos importantes de CHK1 que participan en el control del ciclo celular incluyen reguladores positivos. La fosforilación mediada por CHK1 inhibe la actividad de Cdc25A y Cdc25C en condiciones de estrés genotóxico, aunque por diferentes mecanismos; Cdc25A se dirige al proteosoma para ser degradado, mientras que Cdc25C se excluye del núcleo de manera inactiva por su asociación con la proteína 14-3-3. En contraste la actividad de la cinasa Wee1 es estimulada por la fosforilación mediada por CHK1, la cual detiene el ciclo celular (Bartek y Lukas, 2001; Smith *et al.*, 2010).

3.3. Efectos del vanadio en el ciclo celular

En estudios realizados en líneas celulares a las cuales se les administró compuestos de V⁵⁺ se ha demostrado que estos alteran la proliferación celular al modificar la función o los niveles de las proteínas que se encargan de su regulación. Por ejemplo, en células de la epidermis de ratón JB6+ (C141) la administración de

metavanadato de sodio (NaVO_3) en concentraciones de 10 a 100 μM induce retraso en la fase S mediante la activación de p53 y el aumento en la expresión de p21; este mismo compuesto en la línea celular epitelial de alveolos humanos tipo II, A549, en concentraciones de 10 a 200 μM generó la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) lo cual provocó la detención del ciclo en la fase G₂/M por el incremento de p21, CHK1 y la disminución de Cdc25C, así como el bloqueo de ciclina B-Cdk1 (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002a); Huang *et al.*, (2000) en células JB6+ observaron que el NaVO_3 en concentraciones de 50 a 400 μM indujo la producción de H_2O_2 e incrementó los niveles de p53, lo que llevó a la muerte por apoptosis. En otro estudio utilizando células A549 la administración del NaVO_3 en concentraciones de 10 a 200 μM indujo la fosforilación de p53 (en la serina 15) dependiente de ATM causando arresto en G₂/M y la fragmentación del ADN; además, en células de cáncer de próstata PC-1 detuvo la proliferación en la transición de G₂/M mediante la degradación de Cdc25C en concentraciones de 50 a 200 μM (Suzuki *et al.*, 2007; Tong-Tong *et al.*, 2012).

En cultivos de linfocitos humanos, se ha observado que el V_2O_5 induce la sobreexpresión de ciclina E y Cdk2, disminución de ciclina D1 y Cdk4 y aumento en p53 y p21 en concentraciones de 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h en el mismo modelo de prueba (Mateos-Nava, 2012)

3.4. Separación y detección de proteínas

Cualquier molécula biológica ya sea proteína, carbohidrato o ácido nucleico puede separarse de otra aprovechando sus propiedades fisicoquímicas, para el caso de las proteínas las más empleadas son el tamaño y la afinidad de unión a ligandos (Lodish *et al.*, 2004). Hoy en día las técnicas que se emplean aprovechan también la forma y carga de las macromoléculas denominándose separaciones electrocinéticas, entre las más utilizadas se encuentra la electroforesis en geles, particularmente de poliacrilamida y agarosa. La electroforesis es un método en el que las biomoléculas se separan en virtud de su carga eléctrica al migrar a través de un campo eléctrico cuando se aplica una corriente eléctrica, en el caso de las proteínas, muchas de ellas tienen relaciones carga:masa similares, al usar

poliacrilamida y el detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) con el que después de ser solubilizadas dicha relación queda constante permitiendo que la separación ocurra solo por sus pesos moleculares (Kent *et al.*, 2000; García-Pérez, 2000; Lomonte, 2007). Al utilizarse en conjunto con el ensayo de inmunolectro-transferencia o “western blot”, permite detectar a una proteína en particular, para lo que se requiere de un anticuerpo primario específico que la reconozca, al cual se acopla el anticuerpo secundario unido a una enzima que en presencia del sustrato adecuado genera una respuesta lumínica que se puede evaluar visualmente o por quimioluminiscencia (Alegria-Schaffer *et al.*, 2009).

3.5. Linfocitos como medio de estudio

Entre los diferentes tipos celulares, los linfocitos son un tipo adecuado para la experimentación *in vitro*, debido a que son células no transformadas (Tucker y Preston, 1993). En el caso de los mamíferos, se usan principalmente los linfocitos de sangre periférica dado a su fácil obtención, las factibles condiciones de cultivo y la facilidad en el manejo de muestra (Tucker y Preston, 1996; López-Ortiz y Márquez-Fernández, 2002). Presentan la ventaja de circular por todo el cuerpo y por ello son aptos para diversos estudios clínicos y científicos, ya que proporcionan una estimación de la exposición a agentes químicos, físicos o biológicos (Tucker y Preston, 1996).

El ciclo celular de las células hematopoyéticas se ha estudiado mucho debido a que durante su diferenciación se encuentran detenidas en G₀. En el caso de los linfocitos T y B su ciclo puede ser estimulado en respuesta a antígenos específicos, *in vitro*, se puede hacer con las lectinas de origen vegetal. Estas son inmunomoduladores al activar glucoproteínas de superficie celular que inducen la linfoproliferación por múltiples vías de señales intracelulares entre las que están la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) que aumenta la expresión de cúmulo de diferenciación 25 (CD25) y cúmulo de diferenciación 69 (CD69) que inducen la liberación de interleucina 2 (IL-2) (Tamma *et al.*, 2003; Suviolahti *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2017).

4. Justificación

En el ámbito científico es conocido que el V se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, por lo que los seres vivos están expuestos de manera permanente, principalmente a sus óxidos, los cuales se relacionados con efectos adversos sobre la salud. En estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que estos compuestos inducen daño sobre el material genético y alteran la proliferación celular ya que pueden producir cambios en la función de las proteínas encargadas de su regulación.

En nuestro laboratorio se ha observado que la administración de V_2O_5 a cultivos de linfocitos humanos retrasa la proliferación induciendo la sobreexpresión de las proteínas ciclina E y Cdk2. Asimismo, disminuye la expresión de la ciclina D1 y de Cdk4; sin embargo, se desconoce si modifica los niveles de las proteínas encargadas de dar respuesta al daño ocasionado sobre el ADN y su reparación, por lo que resulta importante estudiar los niveles las cinasas de punto de control ATM, ATR, CHK1 y CHK2 tras la exposición al V_2O_5 y de esta manera vincular el retraso del ciclo celular con estas proteínas.

5. Hipótesis

El V_2O_5 es capaz de modificar la progresión del ciclo celular por el aumento de los niveles de las proteínas encargadas de la activación de los puntos de control como son ATM, ATR, CHK1 y CHK2.

6. Objetivos

6.1. General

Evaluar el efecto del V_2O_5 sobre los niveles de expresión de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2 de los linfocitos humanos tratados *in vitro*.

6.2. Particulares

- Determinar la viabilidad celular en los cultivos de linfocitos después del tratamiento con V_2O_5 en concentraciones de 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ y tiempos de exposición de 3, 24, 48 y 72 h.
- Analizar las fases del ciclo celular de los linfocitos tratados con las concentraciones de V_2O_5 durante los distintos tiempos de exposición.
- Evaluar los niveles de expresión de las proteínas que controlan el ciclo celular ATM, ATR, CHK1, CHK2 en los linfocitos tratados con las concentraciones de V_2O_5 durante los diferentes tiempos de exposición.

7. Material y métodos

7.1. Reactivos

Para el desarrollo de los diferentes métodos se utilizaron los siguientes reactivos: Histopaque®-1077, pentóxido de vanadio (V_2O_5) CAS No. 1314-62-1, 5(6)-diacetato de carboxifluorosceína (CFDA) mezcla de isómeros, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), ácido etileno diamino tetracético (EDTA por sus siglas en inglés), Ioduro de propidio (IP) y nonidet P-40, de la marca Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis MO EUA; medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), bromuro de etidio (Br- Et) de GIBCO, Invitrogen Corporation, NY EUA; acrilamida, duodecilsulfato de sodio, N,N'-metileno-bis-acrilamida, N,N,N,N-tetra-metil-etilenodiamina (TEMED), tris (hidroximetil)-aminometano (tris), persulfato de amonio, substrato Clarity Max Western ECL, de la marca Bio-Rad Laboratories, CA EUA; albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés), inhibidores de proteasas, aprotinina y leupeptina, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anticuerpos: anti-ATM (sc-377293), anti-ATR (sc-515173), anti-CHK1 (sc-56288), anti-CHK2 (sc-136251), Tween-20 adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA.

7.2. Separación y cultivo de linfocitos

Se obtuvo sangre de tres donadores (varones de entre 26 y 30 años de edad) por punción venosa utilizando el sistema Vacutainer® con heparina de sodio y se separaron los linfocitos con ayuda de Histopaque-1077 en una proporción 1:1 (Histopaque-sangre) centrifugando a 1800 rpm por 35 min, se realizaron tres lavados con 10 mL de PBS (entre cada uno se centrifugó a 1500 rpm por 10 min), el botón celular se resuspendió con un mL de PBS y se determinó la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer. Se sembraron alrededor de ocho millones de células en 5 mL de medio de cultivo PB-Max Karyotyping (el cual contiene fitohemaglutinina que estimula la proliferación) por cada tratamiento y tiempo de exposición, éstos se incubaron a 37 °C. Después 24 h de iniciados los cultivos se

les administró una de las siguientes concentraciones de V_2O_5 : 0, 8, 16 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se tuvo también un grupo sin tratamiento, esto se realizó por triplicado, y se dejaron incubar a los diferentes tiempos de exposición: 3, 24, 48 y 72 h. Cabe mencionar que las concentraciones y los tiempos de exposición fueron determinados con base en estudios previos realizados en el laboratorio.

7.3. Viabilidad

Al final de cada tiempo de exposición al compuesto químico, se realizó el análisis de viabilidad siguiendo la técnica CFDA-BrEt (Mateos-Nava, 2017). Se tomaron 10 μL de muestra y se incorporó con 10 μL de mezcla de colorantes 1:1 (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CFDA más 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Br-Et) incubándose en la oscuridad a 37 °C por 15 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y al final se colocó la muestra en un portaobjetos para evaluarse en el microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2). La viabilidad se obtuvo clasificando 100 células considerando como viables aquellas que presentaron su citoplasma con fluorescencia verde y no viable las que mostraron su núcleo de color rojo. Los tratamientos se realizaron por triplicado

La viabilidad celular determinada por la adición de los fluorocromos CFDA y BrEt permite distinguir las células viables de las no viables debido a que la CFDA es permeable en la membrana celular y puede reaccionar con esterasas citoplasmáticas generando una fluorescencia de color verde, mientras que el BrEt solo ingresa a la célula si la membrana se encuentra dañada logrando así intercalarse con los ácidos nucleicos generando fluorescencia roja (Strauss, 1991).

7.4. Fases del ciclo celular por contenido de ADN

Para conocer el efecto de los tratamientos del V_2O_5 sobre las fases del ciclo celular se determinó el contenido de ADN de las células en cultivo. Se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con alcohol etílico al 70 % frío. Posteriormente, se retiró el alcohol, se agregó la solución de tinción (0.1 % Tritón X-100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAsa A, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IP en PBS) y se incubó durante 30 min a 37 °C en

obscuridad. A continuación, se realizó el análisis por citometría de flujo adquiriendo al menos 10 000 células por muestra usando el citómetro BD FACSAria™ II (Becton Dickinson and Company, San José CA EUA). Los respectivos histogramas se obtuvieron con el programa para computadora WIN MDI versión 2.9 desarrollado por J. Trotter y para calcular el porcentaje de células en cada fase se utilizó el programa CYLCHRED desarrollado por la Universidad de Cardiff, ambos de libre acceso.

7.5. Obtención de las proteínas

A cada tiempo de exposición, los cultivos se centrifugaron a 1800 rpm durante 8 min, el botón celular se lavó con PBS centrifugándolo nuevamente. Se retiró el sobrenadante y el botón fue resuspendido con 120 µL de solución amortiguadora de lisis (1 % Tritón X-100, 0.1 % SDS, 0.5 % desoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 5 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, más inhibidores de proteasas, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL PMSF en PBS pH 7.4) y se pasó a tubos eppendorf dejándose en refrigeración a 4 °C por 1.5 h, al finalizar se centrifugaron los tubos a 12500 revoluciones por 15 min a 4 °C para obtener las proteínas, y se determinó su concentración de acuerdo al método de Bradford (1976) con la ayuda del reactivo “Protein Assay” (Bio-Rad) empleando una curva patrón de 1 mg/mL de BSA como parámetro.

7.6. Detección de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2

Para conocer los niveles de expresión de ATM, ATR, CHK1 y CHK2 las proteínas obtenidas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, colocando 50 µg de muestra la cual se mezcló con solución amortiguadora de muestra 6x (30 % glicerol, 10 % SDS, 0.012 % azul de bromofenol, 0.6 % de 2-betamercaptoetanol) a 100 voltios, posteriormente fueron transferidas a una membrana sólida de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) marca Bio-Rad por 1.5 h a 150 miliamperios. A continuación, la membrana se lavó con solución amortiguadora tris salina (TBS) y se incubó por 1.5 h con solución amortiguadora de bloqueo (TBS más 0.5 % Tween-20 (TTBS) con 7 % de leche sin

grasa) después se incubaron con el respectivo anticuerpo primario, anti-ATM, anti-ATR, anti-chk1, anti-chk2 (1:2500) o el marcador de carga actina (1:2500) en TTBS, toda la noche a 4 °C con agitación. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó 3 veces con agua y por 5 min con TTBS para incubarse con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP (0.5:10000) por 1.5 h. Al término de este lapso se realizaron tres lavados uno tras otro con agua y uno de 5 min con TTBS. Para el revelado de las bandas correspondientes a cada proteína se utilizó el “kit” Clarity Max™ Western ECL substrate de la marca Bio-Rad Laboratories, Inc. La proteína de interés fue detectada por quimioluminiscencia en el fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Imaging System de Bio-Rad Laboratories, Inc. como una banda. La intensidad relativa fue analizada utilizando el software *ImageJ 1.45s* del National Institutes of Health de EUA, de libre acceso, haciendo una relación con su respectivo marcador de carga (actina).

7.7. Análisis estadístico

Los datos presentados en los cuadros y las figuras están expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Para el análisis se usó el paquete estadístico SPSS versión 20 elaborado por IBM. Se usó la prueba ANOVA-Tukey y las diferencias significativas se consideraron con $p < 0.05$.

8. Resultados y Discusión

8.1. Efecto del V₂O₅ sobre la viabilidad de linfocitos tratados *in vitro*

En el Cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos para la viabilidad celular de los linfocitos tratados con V₂O₅ evaluada con la prueba CFDA-BrEt. Los datos se presentan como el promedio de tres experimentos con su repetición de cada donador. Los datos obtenidos a las 3, 24 y 48 h concuerdan con los resultados en la literatura y con ensayos realizados en el laboratorio, sin embargo, en este trabajo se observaron cambios en la viabilidad a las 72 h en los tratamientos con 16 y 32 µg de V₂O₅; lo que muestra que a tiempos largos el V₂O₅ es citotóxico.

Estudios previos en los que administraron este compuesto a cultivos de leucocitos humanos en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 µg/mL con diferentes tiempos de exposición: 2, 4 y 6 h y no observaron cambios (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Resultados similares se observaron en cultivos de linfocitos humanos a las mismas concentraciones y 48 h de tratamiento (Mateos Nava, 2012). De igual forma, Rojas *et al.*, (1996), obtuvieron viabilidades superiores al 95% al tratar leucocitos humanos con 0.3, 30 y 300 µM de V₂O₅ (0.3, 30 y 300 µM de V₂O₅ equivalen a 0.05, 5 y 48 µg/mL) durante 2 y 24 h utilizando el ensayo azul de tripano.

Cuadro 1. Viabilidad celular de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V₂O₅ por 3, 24, 48 y 72 h.

Tratamientos con V ₂ O ₅	Porcentajes de viabilidad celular			
	3h	24h	48h	72h
0 µg/mL	99 ± 1	99 ± 1	98 ± 1	98 ± 1
8 µg/mL	98 ± 1	99 ± 1	97 ± 1	97 ± 1
16 µg/mL	99 ± 1	99 ± 1	95 ± 2	93 ± 4 ^a
32 µg/mL	99 ± 1	97 ± 1	95 ± 2	91 ± 3 ^a

Los datos están representados como la media ± EEM de tres experimentos independientes con su duplicado. ^ap < 0.05 vs grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).

En estudios realizados con otros métodos que evalúan la citotoxicidad, se ha observado que la administración de 50 a 400 μM por 48 h de V_2O_5 (50 a 400 μM de V_2O_5 equivalente a 8 a 64 $\mu\text{g/mL}$) en la línea celular NK-92MI (células NK humanas) induce efectos antiproliferativos y apoptóticos de manera dependiente de la concentración. Otro compuesto en estado de oxidación +5, el NaVO_3 administrado en concentraciones de 50 a 200 μM (50 a 200 μM de NaVO_3 equivalente a 6 a 24 $\mu\text{g/mL}$) por 4 a 48 h a células EC109 (línea celular de carcinoma escamoso de esófago humano) indujo el mismo efecto (Yang *et al.*, 2016; Gallardo-Vera *et al.*, 2016). Lo que indica que las líneas celulares son más sensibles a la toxicidad inducida por el V que los cultivos primarios. Cabe hacer mención que las concentraciones utilizadas en el presente trabajo están entre los 50 y 200 μM .

Algunos trabajos han demostrado que los compuestos de V modulan la actividad de las proteínas p53 y p21 modificando por un lado la transición de una fase a otra del ciclo celular y, por el otro intervenir con la activación de otros procesos tal como la senescencia y la muerte celular programada (Ben-Porath y Weinberg, 2005; Campo-Trapero *et al.*, 2008). De este modo, la disminución significativa en la viabilidad a las 72 h puede deberse a que las células estén entrando en este proceso celular posiblemente por una severa acumulación de daños celulares y genéticos generados después del tratamiento con V_2O_5 .

Se conoce que el V_2O_5 no modifica la viabilidad en cultivos de células sanguíneas humanas en tiempos cortos de exposición (menores o iguales a 48 h), sin embargo, *in vitro* se ha observado que altera la proliferación celular, efecto evidenciado por la disminución de varios índices como el mitótico (IM) y de replicación (IR), así como induce cambios en el tiempo promedio generacional (TPG) (Roldan y Altamirano, 1990; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011; Mateos-Nava, 2012). El IM, proporciona el porcentaje de células que entran a división mitótica y es un indicador del grado de proliferación, en tanto que el IR refleja el número promedio de divisiones por las que ha pasado y TPG indica el tiempo promedio necesario para que la población celular complete un ciclo celular (Lazutka, 1991; Rojas *et al.*, 1992), que para el caso del

V₂O₅ aumenta el tiempo que requiere la célula para dividirse, es decir aumenta el TPG (Roldan y Altamirano, 1990).

Por lo anterior y con el interés de conocer los mecanismos por los cuales se modifica el proceso de división celular, en la presente tesis se estudiaron sus efectos sobre el contenido de ADN y sobre los niveles de las proteínas que controlan el ciclo celular.

8.2. Efecto del V₂O₅ sobre las fases del ciclo celular evaluado por el contenido de ADN.

En las figuras 3, 4, 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de las fases del ciclo celular de linfocitos después de los tratamientos con V₂O₅. Se observa que a las 3 h se presentó disminución significativa en la fase G₁ comparado con el grupo sin tratamiento (0µg/mL) con la concentración 8 µg/mL (de 38 a 26). Posteriormente, se evidenció aumento significativo para la fase S en la concentración 32 µg/mL (de 70 a 75) a 24 h. En el caso de 48 h se mostró incremento significativo en la fase de G₁ para la concentración de 8 µg/mL comparado con el testigo (de 30 a 47% respectivamente), al mismo tiempo que disminuye la fase S (de 60 a 47% respectivamente). Mientras que, a las 72 h se observó aumento significativo en la fase G₁ para todas las concentraciones de V₂O₅ evaluadas; 8, 16 y 32 µg/mL (de 28 a 48, de 28 a 46 y de 28 a 43%, respectivamente) comparado con el grupo sin tratamiento (0µg/mL) y disminución en la fase S (de 61 a 47, de 61 a 47 y de 61 a 51%) y en la fase G₂/M (de 11 a 5, de 11 a 7 y de 11 a 6%, respectivamente).

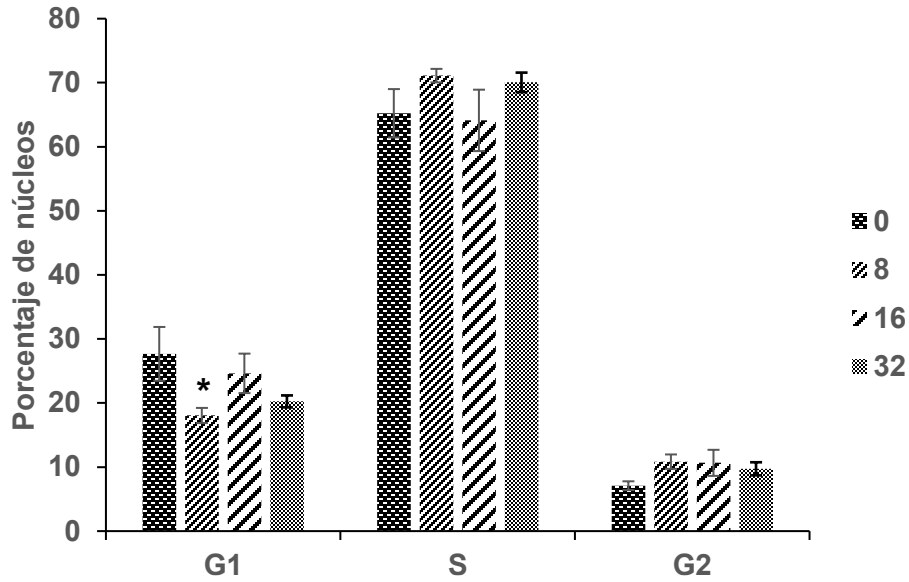


Figura 3. Seguimiento de las fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 3 h, se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. *Diferencias significativas en G₁ en el tratamiento de 8 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con p < 0.05 (ANOVA seguida de Tukey).

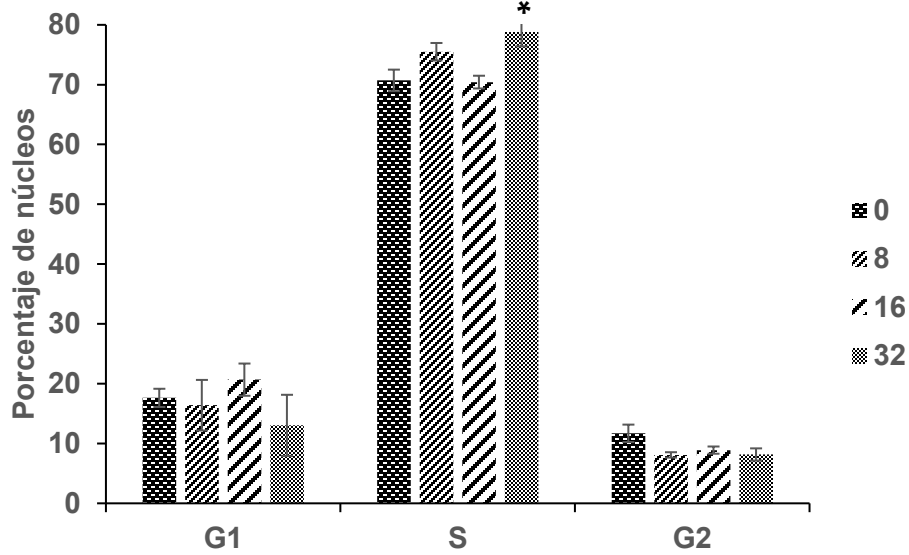


Figura 4. Seguimiento de las fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 24 h, se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. *Diferencias significativas en S en el tratamiento de 32 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con p < 0.05 (ANOVA seguida de Tukey).

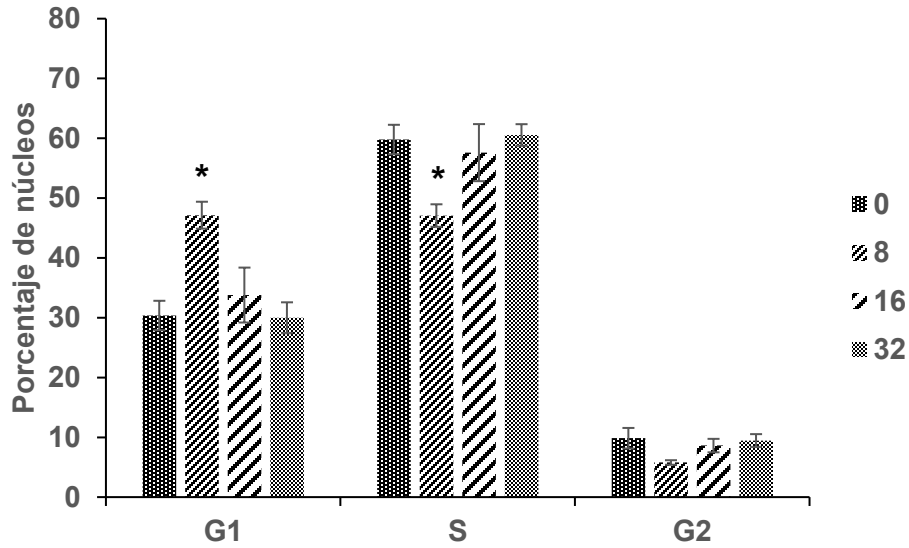


Figura 5. Seguimiento de las fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 48 h, se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. *Diferencias significativas en G₁ y S en el tratamiento de 8 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con p < 0.05 (ANOVA seguida de Tukey).

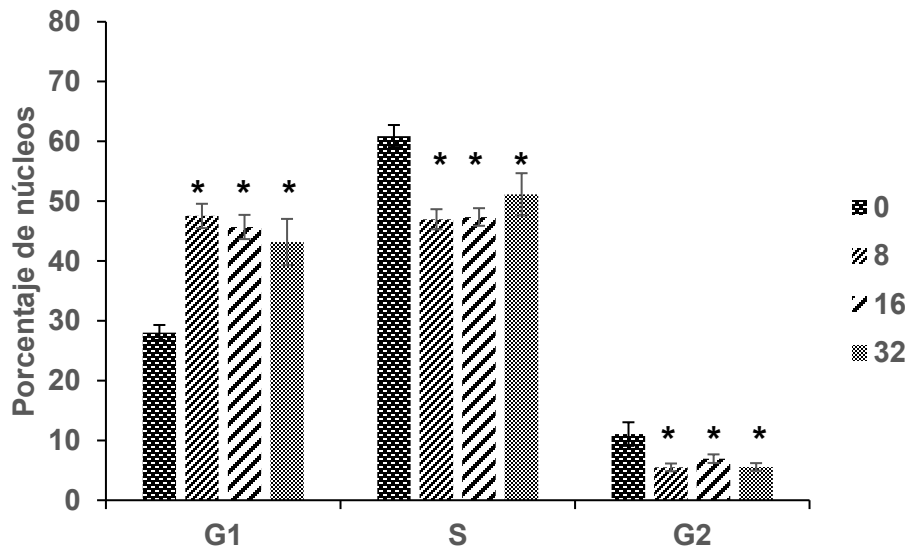


Figura 6. Seguimiento de las fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 3 h, se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. *Diferencias significativas en G₁, S y G₂ en el tratamiento de 8, 16 y 32 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con p < 0.05 (ANOVA seguida de Tukey).

Los compuestos de V se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y de esta manera pueden ejercer efectos tóxicos o carcinogénicos. De acuerdo con la evidencia científica se sabe que pueden regular vías de transducción de señales mediadas por factores de crecimiento y de esta manera promover su toxicidad (Zhang *et al.*, 2002b, 2003).

Normalmente, cuando la célula presenta lesiones en el ADN por agentes externos, responde a éstas mediante la activación de las vías de transducción de señales que controlan la modulación de los factores de transcripción y la regulación de la expresión génica, al tiempo que interrumpe de manera transitoria la progresión del ciclo celular para permitir la reparación del ADN (Shackelford *et al.*, 1999).

De esta manera, la proliferación puede ser interrumpida temporalmente en la transición G₁/S o G₂/M para evitar que los daños inducidos sobre el ADN pasen a las siguientes generaciones. Cuando el daño es severo, las células pueden entrar en un estado de reposo conocido como G₀ o desencadenar procesos de muerte como apoptosis.

La regulación de la progresión del ciclo celular se logra mediante eventos que incluyen la acumulación y degradación de ciclinas; fosforilación de Cdks y otras proteínas, así como de la dimerización de complejos ciclina-Cdk; y la unión de proteínas inhibidoras de Cdk (como p21) (Morgan, 1995; Shackelford *et al.*, 2000).

Los resultados muestran que cuando se administra V₂O₅ a los cultivos de linfocitos humanos se incrementa la fase S a las 24 h, sin embargo, a las 48 h y principalmente a las 72 h éste aumento se da en la fase G₁.

Este efecto puede deberse por la presencia de algún tipo de daño causado en el ADN durante la exposición de los linfocitos en cultivos al V₂O₅, el cual posiblemente causa que proteínas reguladoras del ciclo como p53 y p21 inhiban la función de los complejos ciclina-Cdk que intervienen en las fases G₁ y S, o que el mismo compuesto este alterando las vías de señalización que se encargan de regular este proceso (Wu *et al.*, 2016).

Se sabe que el V_2O_5 induce daño primario a la molécula de ADN cuando se emplean concentraciones de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ durante tiempos de exposición que van de 2 hasta 6 h en leucocitos humanos, el cual, disminuye si se retira el compuesto del medio, tardando en promedio 90 min en recuperarse y reparar en gran medida el daño al ADN; evaluado con el ensayo cometa (Rojas *et al.*, 1996; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Además, se ha observado que induce sobreexpresión de ciclina E y Cdk2, disminución de ciclina D1 y Cdk4 y aumento en p53 y p21 en concentraciones de 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h en el mismo modelo de prueba (Mateos-Nava, 2012; Mateos-Nava *et al.*, 2021).

Efectos similares se observan cuando se administran otros compuestos de V^{5+} a líneas celulares; por ejemplo, en células de cáncer de mama humano MCF7 el metavanadato de amonio (NH_4VO_3) a concentraciones de 250 μM por 36 h (250 μM de NH_4VO_3 equivalente a 29 $\mu\text{g/mL}$) indujo retraso del ciclo en la transición G_1/S (Ray *et al.*, 2006), mismo resultado observado en células de cáncer de hígado HepG2 al administrar bisacetilacetato de vanadilo [$\text{VO}(\text{acac})_2$], de manera dosis y tiempo dependiente (100 a 800 μM y 8 a 24 h) (100 a 800 μM de [$\text{VO}(\text{acac})_2$] equivalente a 27 a 212 $\mu\text{g/mL}$) (Fu *et al.*, 2008). De manera análoga, en células de epidermis de ratón JB6P+ C141 y células de cáncer del epitelio alveolar de pulmón humano A549 el NaVO_3 a concentraciones de 10 a 200 μM por 24 h (10 a 200 μM de NaVO_3 equivalente a 1 a 24 $\mu\text{g/mL}$), aumento el porcentaje de la fase S y G_2/M conforme se incrementa la concentración (Zhang *et al.*, 2002, 2003). Asimismo, el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), causó la baja del porcentaje de células en fase G_1 por la disminución de expresión de ciclina D1 y el aumento de p21 (Gonçalves *et al.*, 2011). También, en células C141 expuestas a NaVO_3 a concentraciones de 50 μM por 24 h (50 μM de NaVO_3 equivale a 6 $\mu\text{g/mL}$), aumentó del porcentaje de células en fase S y la expresión de la ciclina E y A, efecto que se debe al aumento en la actividad de la cinasa Akt (Zhang *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que, tras la generación de daños en el ADN, la célula activa una cascada de eventos conocidos como respuesta a este daño (DDR por sus siglas en inglés) que pausa momentáneamente la progresión del ciclo celular con la intención

de reparar los daños producidos en el ADN. Si el daño permanece sin reparar, las células pueden entrar en procesos de muerte celular o ingresar a un estado permanente de senescencia celular mantenida por la presencia de un DDR permanente. Este evento se conoce que es producido por el acortamiento de los telómeros y que, además, puede suceder por la acción de agentes genotóxicos (Lagunas-Cruz *et al.*, 2014).

Es así como la detención del ciclo celular en la fase G₁ a las 48 y 72 h puede estar asociado al mantenimiento de la actividad de p53 y a la posible activación de procesos de senescencia celular.

La proliferación se encuentra conectada con los diferentes procesos de reparación celular. Esta conexión se ve garantizada por la actividad de diversas proteínas que actúan de manera coordinada en las fases G₁, S y G₂, entre estas, ATM y ATR son importantes. La literatura marca que ATR actúa sobre todo en S y G₂, mientras que ATM en G₁ (Campo-Trapero *et al.*, 2008., Smith *et al.*, 2010, Zannini *et al.*, 2014).

De este modo, el incremento en la fase S a las 24 h posiblemente está estaría asociado con el aumento de ATR presumiblemente por la generación de daño primario o por la actividad combinada de ATM y ATR por la inducción de rompimientos en la cadena de ADN.

Posteriormente, el aumento en la fase G₁ en 48 y 72 h puede relacionarse con el incremento de rompimientos de cadena doble, aunque no se puede descartar que estén ocurriendo simultáneamente otro tipo de alteraciones que mantengan elevadas a las proteínas mencionadas.

Con base en los resultados y los estudios previos, se puede mencionar que los compuestos de V inducen retraso en la proliferación dependiendo del tipo de célula, del compuesto, la concentración y el tiempo de exposición, por lo que resultó importante estudiar sus efectos sobre las cinasas ATM, ATR, CHK1 y CHK2, las cuales una vez activas se encargan de controlar la transición de una fase a la siguiente del ciclo celular regulando la acción de p53 y p21.

8.3. Efecto del V₂O₅ sobre los niveles de las proteínas ATM, ATR, CHK1 y CHK2

En la Figura 7, se presentan las imágenes de las bandas de proteínas de ATM, ATR, CHK1 y CHK2 obtenidas por western blot de los diferentes tratamientos con V₂O₅, en tanto que en las Figuras de la 8 a la 11 se presentan las de intensidades relativas; los datos fueron normalizados con respecto al testigo y se muestran como la media \pm el error estándar.

Cuando se analizaron las membranas obtenidas a partir del western blot, se observó que el V₂O₅ en los tratamientos de 3 h disminuye significativamente la expresión de la proteína ATM (Figura 8A), mientras que ATR (Figura 8B) muestra aumento ($P < 0.05$) en todas las concentraciones probadas. Por otro lado, la expresión de CHK1 y CHK2 evidenciaron incremento, aunque este no fue significativo (Figura 8C y 8D, respectivamente).

En los tratamientos a 24 h, la expresión de todas las proteínas tiende a aumentar, en el caso de ATR es significativo en la concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9B). En los tiempos de exposición de 48 y 72 h, la expresión de todas las proteínas analizadas tiende a elevarse, pero no significativamente (Figura 10B y 11B)

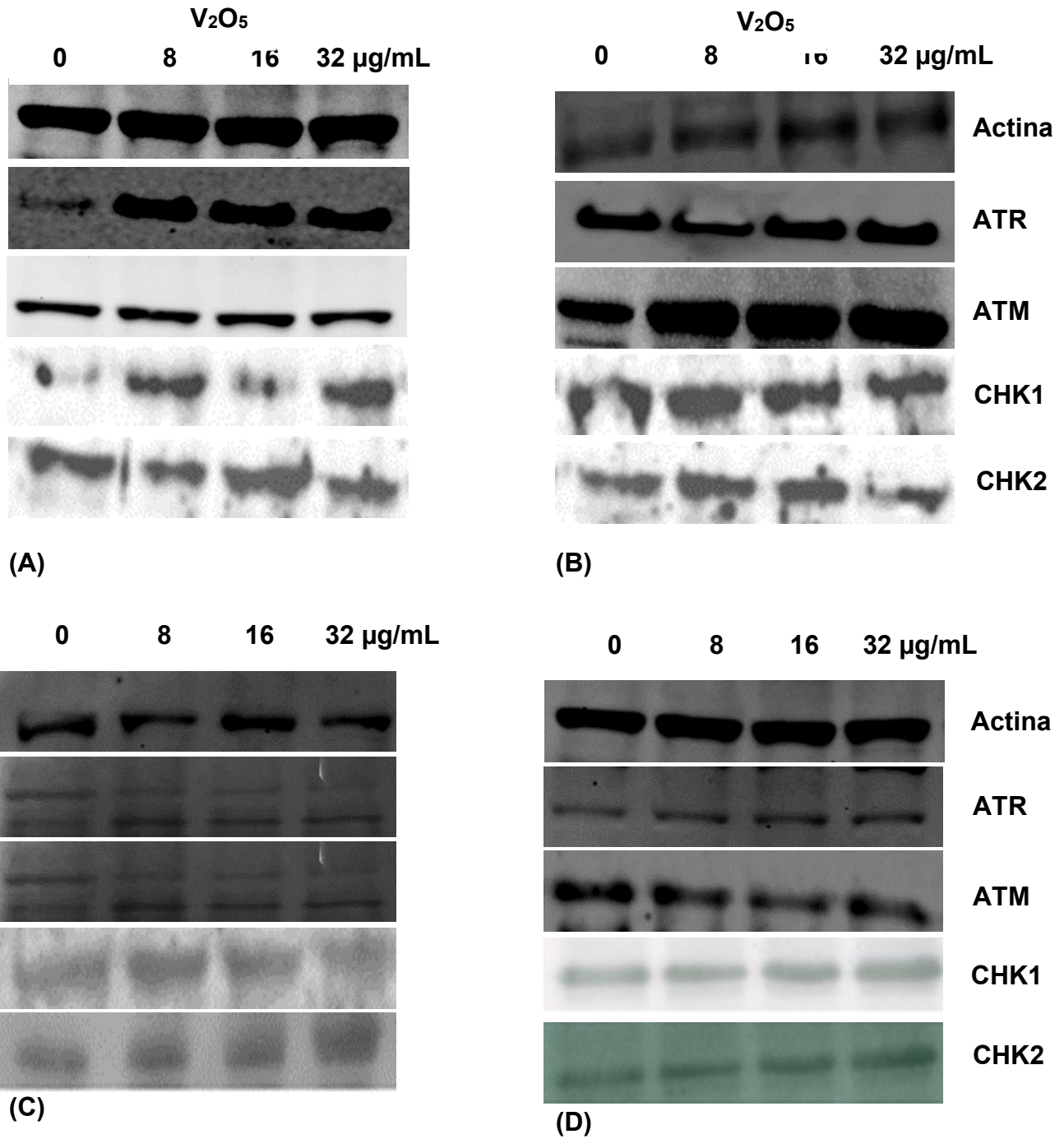


Figura 7. Detección por western blot de actina, ATM, ATR, CHK1 y CHK2 de linfocitos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_5 por 3 (A), 24 (B), 48 (C) o 72 h (D).

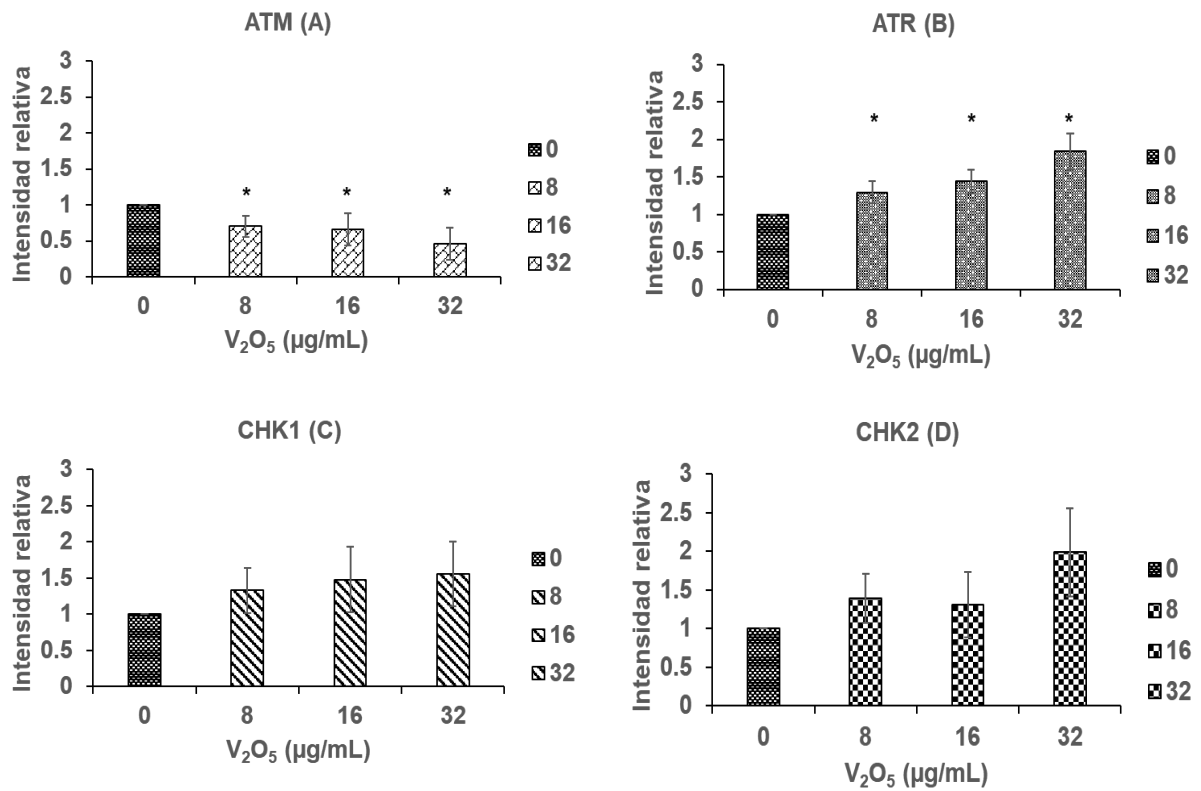


Figura 8. Intensidad relativa de las proteínas ATM (A), ATR (B), CHK1 (C) y CHK2 (D) de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 3 h. Se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado ($n = 9$). * Diferencias significativas en ATM y ATR en el tratamiento de 8, 16 y 32 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con $p < 0.05$ (ANOVA seguida de Tukey).

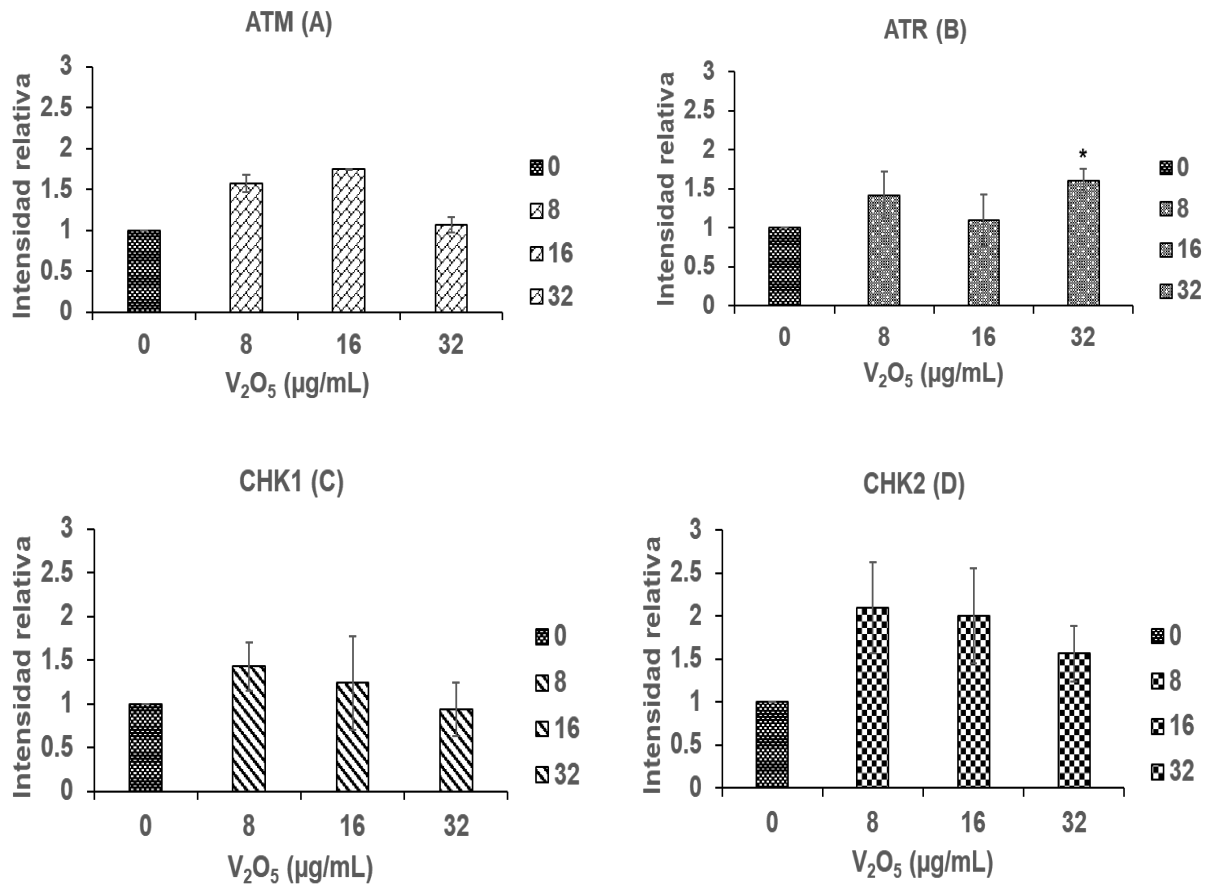


Figura 9. Intensidad relativa de las proteínas ATM (A), ATR (B), CHK1 (C) y CHK2 (D) de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 24 h. Se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado ($n = 9$). * Diferencias significativas en ATR en el tratamiento de 32 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (0 µg/mL de V₂O₅) con $p < 0.05$ (ANOVA seguida de Tukey).

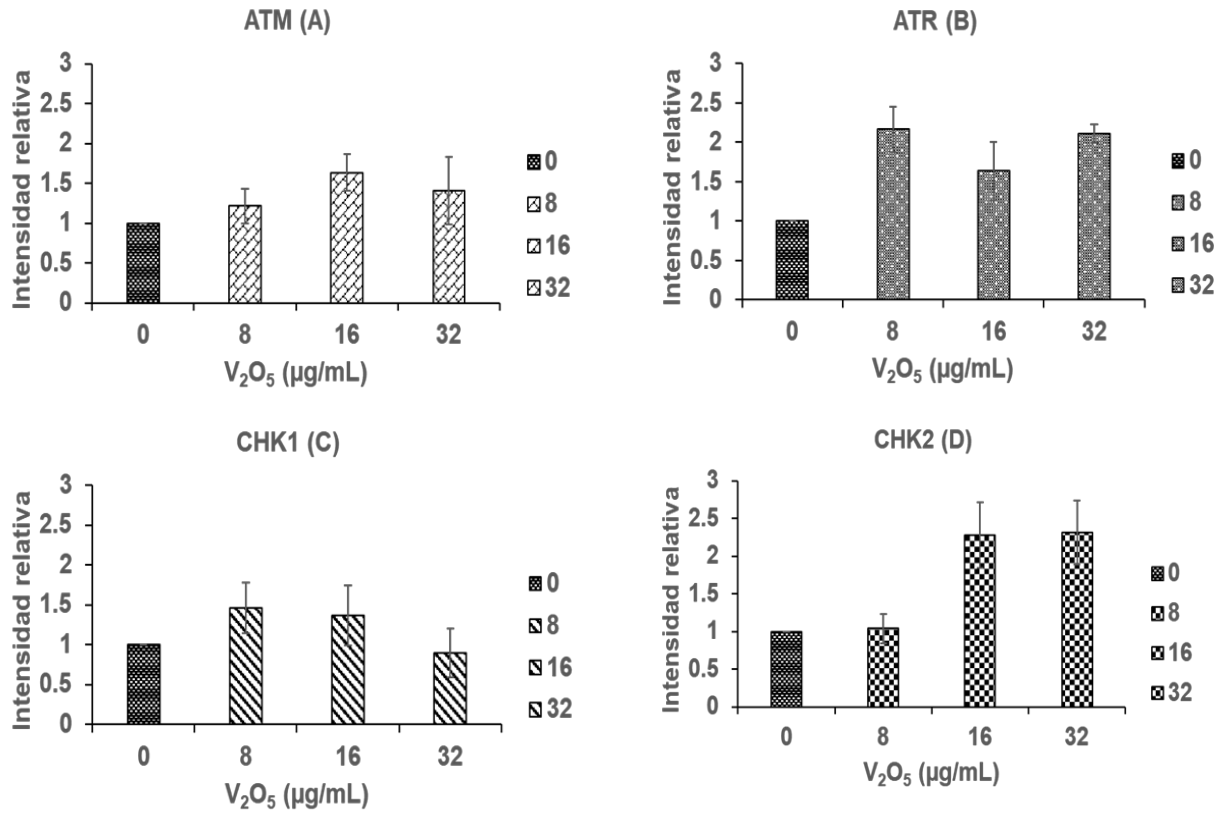


Figura 10. Intensidad relativa de las proteínas ATM (A), ATR (B), CHK1 (C) y CHK2 (D) de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 µg/mL de V₂O₅ por 48 h. Se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado ($n = 9$) (ANOVA seguida de Tukey).

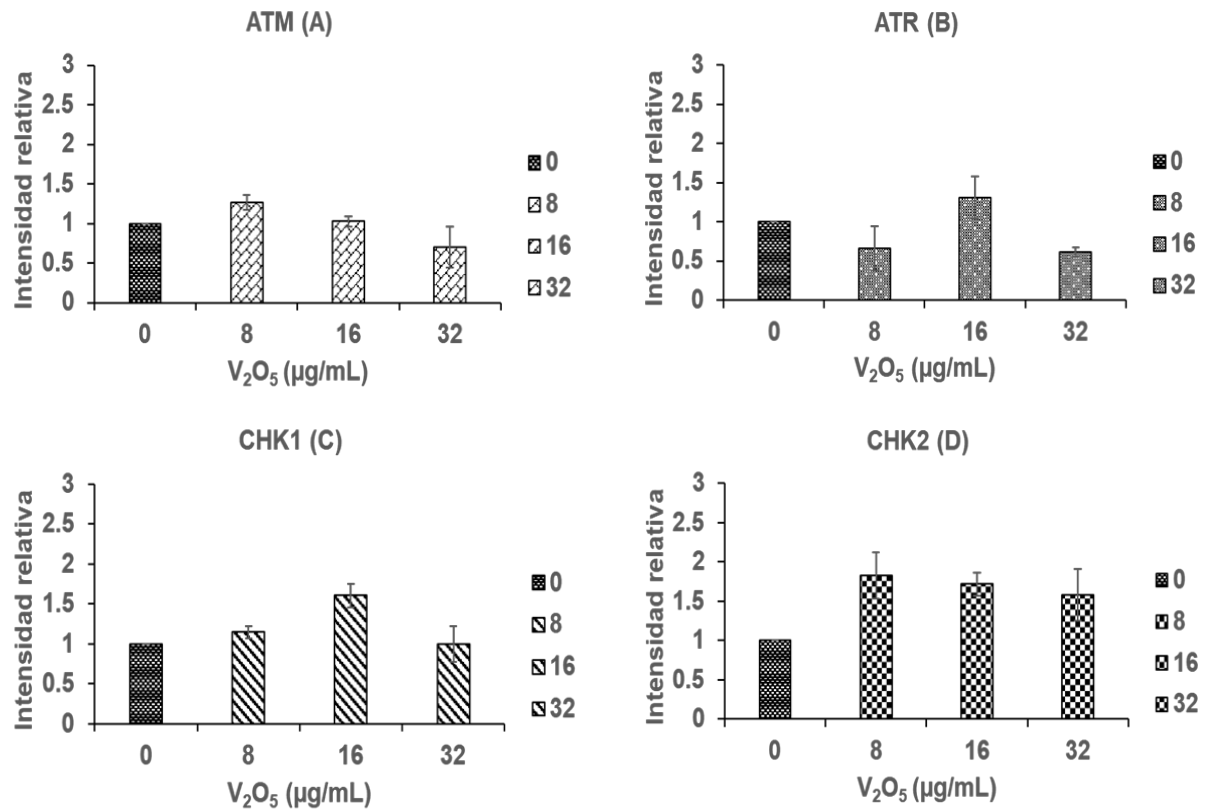


Figura 11. Intensidad relativa de las proteínas ATM (A), ATR (B), CHK1 (C) y CHK2 (D) de linfocitos humanos tratados con 0, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_5 por 3 h. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes cada uno por triplicado ($n = 9$) (ANOVA seguida de Tukey).

En diferentes estudios se ha demostrado que los compuestos de V pueden interactuar con moléculas biológicas, particularmente aquellas que dependen de iones fosfato, como las moléculas que controlan la proliferación celular como lo son ATM, ATR, p53 y p21, entre otras (Zhang *et al.*, 2002a; Mateos-Nava, 2017).

En estudios realizados en el laboratorio, se demuestra que el V₂O₅ tiene efectos genotóxicos y citotóxicos sobre leucocitos humanos de sangre periférica, ya que es capaz de generar daño primario al ADN, de inducir aberraciones cromosómicas numéricas y modificar la proliferación celular (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 1996). Además, el V en fibroblastos humanos induce SSB, y la exposición combinada de V con otros agentes genotóxicos produce DSB (Ivancsits *et al.*, 2002).

Al respecto, se ha descrito que una vez que se genera daño sobre el material genético, se detectan las lesiones y se estimulan los mecanismos de reparación. En el caso de los rompimientos de cadena sencilla (detectados por ATR) o los de doble cadena (detectados por ATM), las células activan un programa general conocido como respuesta al daño del ADN (DDR, por sus siglas en inglés), el cual promueve rutas de señalización y reparación (Smith *et al.*, 2010). Una vez que fue reconocido el daño, la señal es amplificada desde las proteínas sensor ATM y ATR hasta llegar al efector p53 con lo que se logra conectar la regulación de la estructura de la cromatina (alrededor de la lesión) con el control de las fases del ciclo celular y de esta manera activar las proteínas asociadas con la reparación, senescencia o muerte celular (Lazzaro *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el daño causado sobre el ADN por la exposición a V posiblemente acciona las vías de señalización que conducen a la activación de ATM y ATR. Además, se conoce que la proteína ATM detecta no solo los DSB sino también los eventos que no dañan el ADN, como el choque térmico, la disminución en la concentración de glucosa y el tratamiento con insulina (Lazzaro *et al.*, 2009). Tomado esto junto con los procesos miméticos de insulina que presenta el V (Barceloux, 1999), los efectos no derivados del daño al genoma podrían contribuir aún más a la activación de la vía ATM en los linfocitos humanos cultivados y expuestos al V₂O₅.

Se propone que, además de los DBS, el daño oxidante puede generar la expresión de ATM y dado que se plantea para algunos metales de transición, incluido el V, que su toxicidad está mediada por la generación de radicales libres como el radical $\bullet\text{OH}$ a través de reacciones tipo Fenton, su presencia puede ser otro factor que contribuya a los aumentos presentes en las proteínas debido a que su formación puede dañar el esqueleto de azúcar-fosfato y oxidar bases con lo cual se puede provocar en el ADN rompimientos de cadena sencilla o doble (Kawanishi *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1998).

Otros metales como el dióxido de titanio (TiO_2) activan la respuesta al daño en el ADN mediado por las proteínas ATM-CHK2 y fosforilación de la histona γH2AX en fibroblastos dérmicos humanos cuando se aplica 10 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h, de igual manera en células A549 su implementación promueve estrés oxidante, formación de roturas de cadena doble y activación de ATM-CHK2 en concentraciones de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. De manera similar, el cromo (VI) en la línea celular epitelial de pulmón H460 genera la formación de focos a γH2AX con la respectiva generación de rompimientos de cadena doble y la activación de ATR en tratamientos de 5 a 10 μM (5 a 10 μM de cromo (IV) equivalente a 0.26 a 0.52 $\mu\text{g/mL}$) por 6 h (Kansara *et al.*, 2015; DeLoughery *et al.*, 2015).

Los ensayos acerca del V_2O_5 , y de otros compuestos de V en estado de oxidación +5, sobre la función de estas proteínas son escasos. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2002b), estudiaron el efecto de la administración de NaVO_3 en la línea celular epitelial de alveolos humanos tipo II A549 y observaron aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), detención del ciclo en la fase G_2/M , incremento de la expresión de p21 y CHK1, así como disminución de Cdc25C, bloqueo de ciclina B-Cdk1, al usar concentraciones de 10 a 200 μM (10 a 200 μM de NaVO_3 equivalente a 1 a 24 $\mu\text{g/mL}$). En otro estudio utilizando el mismo modelo biológico y las mismas concentraciones, se encontró fragmentación del ADN y fosforilación de p53 en la serina 15, la cual es dependiente de ATM, lo que causó arrestos en G_2/M (Suzuki *et al.*, 2007).

Como se mencionó, uno de los daños asociados con la activación de ATM es la presencia de DSB y para ATR los SSB, de esta manera, la disminución de expresión de ATM a las 3 h se puede deber a la falta de su señal de activación a diferencia del par ATR-CHK1 que se cree están activas en niveles basales aún sin la presencia de algún desencadenante que genere su fosforilación para garantizar la correcta división celular (Smith *et al.*, 2010, Zannini *et al.*, 2014).

Con respecto al incremento de las demás proteínas a las 3 h, es posible que en este tiempo el compuesto esté generando daño primario al ADN como se ha reportado previamente por Rodríguez-Mercado *et al.* 2011, lo cual pueda estar provocando la activación de las proteínas sensor, con lo que, aumenta su expresión.

Dado que los SSB son un tipo de daño que se repara rápidamente, puede ser que la mayoría de éstos se estén reparando en los cultivos celulares a las 3 h, pero en las siguientes horas se sigan generando SSB y sean el detonante para que, algunos de éstos, cuando la célula entre en la fase S provoquen rompimientos dobles, lo que induzca el aumento de ATM, ATR, CHK1 y CHK2 a las 24, 48 y 72 h.

Otros estudios que ayudan a explicar el aumento de las proteínas evaluadas, es la actividad que tienen los compuestos de V sobre p53 y p21. Diferentes investigadores, han demostrado que la administración de Na_3VO_4 (10 a 50 μM) (10 a 50 μM equivalente a 2 a 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a células papilares TPC-1 derivadas de un carcinoma de tiroides o de NH_4VO_3 (25 a 350 μM) (25 a 350 μM de NH_4VO_3 equivalente a 3 a 41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, durante 36 h, aumentan los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 de manera dependiente de la concentración, lo que conduce a la detención de la proliferación celular (Ray *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011). Para el caso del V_2O_5 , se ha observado, en cultivos de linfocitos humanos aplicado en concentraciones semejantes a las del presente estudio (de 2 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aumento en los niveles de las proteínas p53 y p21 (Mateos-Nava *et al.*, 2021). Los resultados anteriores junto con los obtenidos en este trabajo indican que lo más probable es que los efectos en el sistema de linfocitos humanos pueden ser resultado de la inducción de daño al

ADN, consecuentemente activar las señales de la maquinaria de reparación que conducen finalmente a afectar las fases del ciclo celular.

No se ha descrito si el V interactúa directamente con el ADN celular; sin embargo, en un estudio bioquímico realizado por Ouameur *et al.* (2006) se demuestra que el catión vanadilo (VO^{2+} , V^{4+}) puede unirse a los átomos N-7 de la guanina y adenina y grupos PO_2 de la cadena azúcar-fosfato, mientras el anión vanadato (VO_3^- , V^{5+}) muestra una unión más débil con la timina, adenina y guanina. Si esto sucede en los cultivos de linfocitos humanos tratados con V_2O_5 , se puede producir un aumento en los rompimientos de enlaces fosfodiéster cuando estas lesiones anormales son detectadas y removidas por los mecanismos de reparación, lo que conduce a rompimientos en la cadena de ADN.

Otro probable mecanismo de inducción de rompimientos de cadena doble por el V es la posibilidad de interactuar con enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Campbell y Jackson en 1979 proponen que los iones metálicos inducen a que las ADNasa corten ambas hebras del ADN en el mismo punto o cerca de él. De este modo es factible que los iones de transición, como el V, interactúen localmente con el sustrato, produciendo un cambio conformacional que promueva que la ADNasa induzca rompimientos de doble hebra (Sabbioni *et al.*, 1983; Roldan y Altamirano, 1990; Domingo, 2002). Por tanto, es posible que el V interactúe con el sustrato o con la proteína induciendo la escisión del enlace fosfodiéster.

Ahora bien, en la literatura se menciona que cuando la célula es sometida a daño en su ADN, favorece la reparación de la mayoría de éstos, para mantener un nivel basal de lesiones que le permitan no interferir con la proliferación celular (Zannini *et al.*, 2014). Con base en esto, es posible que este daño, se vea intensificado después de la administración del compuesto y sea la causa del aumento de las proteínas y al mismo tiempo favorezca la detención del ciclo celular en G_1/S que se encontró en este mismo estudio a las 48 y 72 horas.

Finalmente, a partir de estos resultados se podrían plantear estudios con V_2O_5 y cultivos primarios para conocer los mecanismos por los cuales se ponga en

evidencia que se están activando proteínas sensor de daño en el ADN como ATM y ATR ya sea por la generación de estrés oxidante o por otros mecanismos que contribuyan con su activación.

9. Conclusiones

Los tratamientos aplicados a linfocitos humanos con V_2O_5 en concentraciones de 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ y en tiempos de exposición de 3, 24, 48 y 72 h:

- Induce cambios en la viabilidad celular en las concentraciones de 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h después de la exposición.
- Produce cambios visibles desde las 3 h de exposición en las diferentes fases del ciclo celular y provoca la detención del ciclo celular en la fase G_1 a 72 h.
- Lo anterior coincide con el aumento en los niveles de las proteínas que censan el daño al ADN como lo son ATM, ATR, CHK1 y CHK2, probablemente por la generación de rompimientos de cadena sencilla, cadena doble o ambos.

De manera general el V_2O_5 produce citotoxicidad a las 72 h, provoca la detención del ciclo celular en la fase G_1 y aumento de las cinasas que controlan la progresión del ciclo celular (ATM, ATR, CHK1 y CHK2), posiblemente por daño al ADN.

10. Referencias Bibliográficas

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (2014)** *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1387 p.
- Ahmadi F., Nematbakhsh M., Kargarfard M., Eshraghi-Jazi F., Talebi A., Shirdavani S. (2016)** Effect of aerobic exercise against vanadyl sulphate-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Renal Inj Prev.* 5(4): 183–187.
- Alegria-Schaffer A., Lodge A., Vattem K. (2009)** Performing and optimizing Western Blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol.* 463:574–93.
- Altamirano-Lozano M., Alvarez-Barrera L., Basurto-Alcantara F., Valverde M., Rojas E. (1996)** Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog. Teratog Carcinog Mutagen.* 16:7–17.
- Bartek J., Lukas J. (2001)** Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 490:117–122.
- Ben-Porath I y Weinberg R.A (2005)** The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 961-976.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254.
- Branzei D., Foiani M. (2008)** Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. Nature Publishing Group. Volume 9.
- Campbell W.V y Jackson A.D (1979)** The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *J Biol Chem.* 3726–373.

- Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, Bascones-Martínez A. (2008)** Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Odontoestomatol.* 24: 69–80.
- Contreras-Cadena D. A., Gómez-Pech C., Rangel-García M., Ruiz-Hernández A., Martínez-Bulit P., Barba-Behrens N. (2014)** La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química.* 25:245–253.
- Cmielova J., Rezacova M. (2011)** p21Cip1/Waf1 protein and its Function Based on a subcellular localization. *J Cell Biochem.* 112:3502–3506.
- Crans C. D., Smee J. J., Gaidamauskas E., Luqin Yang. (2004)** The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Review.* 104:849–902.
- DeLoughery Z., Luczak W. M., Ortega-Atienza S., Zhitkovich A. (2015)** DNA double-strand breaks by Cr (VI) are targeted to euchromatin and cause ATR-dependent phosphorylation of histone H2AX and its ubiquitination. *Toxicol Sci.* 143:54–63.
- Domingo J. L. (1996)** Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 10:175–182.
- Domingo J. L. (2002)** Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents. A review of their toxic effects. *Biol Trace Element Res.* Vol. 88.
- Duruibe J. O., Ogwuegbu M. O. C., Ekwurugwu J. N. (2007)** Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Scien.* 2:112–118.
- Ehrlich V. A., Nersesyan A. K., Atefiel K., Hoelzl C., Ferk F., Bichler J., Valic E., Schaffer A., Schulte-Hermann R., Fenech M., Wagner K. H., Knasmüller S. (2008)** Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environ. Health Perspect.* 116:1689–93.

- Fortoul T.I., Rojas-Lemus M., Rodriguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Ustarroz-Cano M., Cano-Gutierrez G., Gonzalez-Rendon S.E., Montaña L.F., Altamirano-Lozano M.A. (2014)** Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: An article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15–18, 2012. *J Immunotoxicol.* 11:13–18.
- Fu Y., Wang Q., Yang X. G., Yang X. D., Wang K. (2008)** Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J Biol Inorg Chem.* 13:1001–1009.
- Gallardo-Vera F., Diaz D., Tapia-Rodriguez M., Fortoul van der Goes T., Masso F., Rendon-Huerta E., Montaña L.F (2016)** Vanadium pentoxide prevents NK-92MI cell proliferation and IFN secretion through sustained JAK3 phosphorylation. *J Immunotoxicol.* 13: 27–37.
- Guevara-García J.A. (1996)** Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio. *Educación Química.* 7:185–189.
- García-Pérez H. M. (2000)** Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. University Diagnostics. 1:31-41.
- Goc A. (2006)** Biological activity of vanadium compounds. *J Biol.* 1:314–332.
- Gonçalves A.P., Videira A., Soares P., Maximo V. (2011)** Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cell involves the action of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sci.* 89:371–377.
- García G.B. (2006)** El vanadio un elemento ambiguo. *Acta Toxicol Arg.* 14:32–36.
- Heinemann G., Fichtl B., Vogt W. (2003)** Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *J Clin Pharmacol.* 55:241–245.

- Houtgraaf J. H., Versmissen J., van der Giessen W. J (2006)** A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Resc Med.* 165–172.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S.S., Shen H.M., Butterworth M., Lu Y., Costa M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Shi X. (2000)** Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem.* 42: 32516–32522.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2006)** Monograph Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide Series. Lyon, France, 227–292.
- Imtiaz M., Rizwan M.S., Xiong S., Li H., Ashraf M., Shahzad S.H., Shahzad M., Rizwan M., Tu S. (2015)** Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. *Environ Int.* 80:79–88.
- Ivancsits S., Pilger A., Diem E., Schaffer A., Rudiger H.W. (2002)** Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat. Res.* 519:25–35.
- Jiménez L.F., Merchant H.L. (2003)** *Biología Celular y Molecular*. Editorial Pearson. México. 853 p. Capítulo 8.
- Karlsson-Rosenthal C., Millar J.B.A. (2006)** Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* 16:285–296.
- Kansara K., Patel P., Shah D., Shukla K.R., Singh S., Kumar A., Dhawan A (2015)** TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environ Mol Mutagen.* 56:204–17.
- Kawanishi, S., Inoue, S., Yamamoto, K. (1989)** Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 10:2231–2235.

- Kent K.S., Ebel R.E. (2000)** Techniques in Analytical Chemistry: Chemical Measurements in Biological Systems. Wiley-Interscience. USA, pp. 147–159.
- Lagunas-Cruz M.C., Valle M.A., Soto C.I. (2014)** Ciclo celular: mecanismos de regulación. *VERTIENTES Revista especializada en ciencias de la salud*. 17(2):98–107.
- Lazzaro F., Giannattasio M., Puddu F., Granata M., Pellicoli A., Plevani P., Muzi-Falconi M (2009)** Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair* 8; 1055–1067.
- Lazutka J.R. (1991)** Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.* 17:188–195
- Li H., Zhou D., Zhang Q., Feng C., Zheng W., He K., Lan Y. (2013)** Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers. *Neurotoxicology*. 36: 49–54.
- Liu T., Liu Y., Wang Q., Yan X., Wang K. (2012)** Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. *J Biol Inorg Chem*. 17:311–320.
- Lodish H., Kaiser C.A., Berk A., Krieger M., Matsudaira P., Scott M.P. (2004)** Biología Celular y Molecular. 5a edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. pp. 87–90.
- Lomonte B. (2007)** Manual de métodos inmunológicos. Universidad de Costa Rica, pp. 92–101.
- López-Ortiz J.B y Márquez-Fernández M.E. (2002)** Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 140.

- Malumbres M. (2011)** Physiological relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol Rev.* 91:973–1007.
- Mateos-Nava R.A. (2012)** Tesis de Maestría. Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de la fase G₁ en linfocitos humanos tratados in vitro. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1–70.
- Mateos-Nava R.A. (2017).** Tesis Doctoral. Estudio del efecto de 3 óxidos de vanadio sobre la progresión del ciclo celular: ¿Mecanismo directo o indirecto? Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1–74.
- Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., García-Rodríguez M.C., Altamirano-Lozano M.A. (2021)** Vanadium oxides modify the expression levels of the p21, p53, and Cdc25C proteins in human lymphocytes treated in vitro. *Environ. Toxicol.* 6:1536–1543.
- Maréchal A., Zou L (2019)** DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5–716
- Morgan O.D. (1995)** Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131–134.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M. (2004)** Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett.* 150:135–143
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. (2010)** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 8:199–216.
- NTP, National Toxicology Program. (2002)** Toxicology and Carcinogenesis Studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). *Natl Toxicol Program Tech Rep.* 1–343.
- Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegman P. (1997)** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism

for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res.* 386:291–298.

Ray R.S., Ghosh B., Rana A., Chatterjee M. (2006) Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer.* 120:13–23.

Rehder D. (2013). The future of/for vanadium. *Dalton Trans.* 42:11749-11761.

Rehder D. (2016) Perspectives for vanadium in health issues. *Future Med Chem.* 3:325–338.

Rodríguez-Mercado J.J. (2006) Tesis Doctoral. Estudio de los efectos inducidos in vitro por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1–99.

Rodríguez-Mercado J.J y Altamirano-Lozano M.A. (2006) Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (4) 173-189.

Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A., Altamirano-Lozano M.A. (2011) DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol in Vitro.* 25:1996–2002.

Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodríguez R., Ostrosky-Wegman P. (1992) Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutat. Res.* 282:283–286

Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M., Ostrosky-Wegman P. (1996) Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res.* 359:77–84.

- Roldán R.E., Altamirano L.M.A. (1990)** Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat Res.* 245:61–65.
- Rondini E.A., Walters D.M., Bauer A.K. (2010)** Research Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner. *Part Fibre Toxicol.* 7:1–13.
- Sabbioni E., Clerici L., Brazzelli A. (1983)** Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J Toxicology and Environ Health.* 12:4–6.
- Sabbioni E., Pozzi G., Pintar A., Casella L., Garattini S. (1991)** Cellular retention, cytotoxicity and morphological transformation by vanadium (IV) and vanadium (V) in BALB/3T3 cell lines. *Carcinogenesis.* 12:47–52.
- Sakurai H. (1994).** Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect.* 3:35–36.
- Schönthal A.H. (2004)** Checkpoint Controls and Cancer. Volume 1 Reviews and Model Systems. Methods in Molecular Biology. Human Press Inc. Los Angeles. 327 p.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S. (1999)** Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1:5–24.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S. (2000)** Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 28:1387-1404.
- Shi y Dalal N.S. (1993)** Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton Mechanisms. Academic Press, Inc. 307: 336–341.

- Sumanta K.G., Rumpa S., Bidyut S. (2015)** Toxicity of inorganic vanadium compounds. *Res Chem Intermed.* 41:4873–4897.
- Sur S., Agrawal D.K. (2016)** Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. *Mol Cell Biochem.* 416:33-46.
- Suviolahti., Petrosyan A., Mirocha J., Ge S., Karasyov A., Thomas D., Galera O., Lim W., Jiménez AM., Czer L.S., Chaux G., De Leon J., Pao A., Jordan S.C., Toyoda M (2012)** Significant reduction of ATP production in PHA-activated CD4⁺ Cells in 1-day-old blood from transplant patients. *Transplantation.* 94:1243-1249.
- Suzuki K., Inageda K., Nishitai G., Matsuoka M. (2007)** Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: Involvement of ATM pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 220:83–91.
- Smith J., Mun Tho L., Xu N., Gillespie D. A (2010)** The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res.* 108:73–112
- Strauss G.H.S. (1991)** Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res.* 252:1–15.
- Tamma S.M., Kalyanaraman V.S., Pahwa S., Domínguez P., Modesto R.R (2003)** The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol.* 73:682–688.
- Tong-Tong L., Yan-Jun L., Qin W., Xiao-Gai Y., Kui W. (2012)** Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. *J Biol Inorg Chem.* 17:311–320.

- Tucker J.D y Preston R.J. (1996)** Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 365:147–159.
- Tzu-Hsuen Y., Chia-Pin C., Ruei-Hao S., Wei-Hsu P., Chang-Chuan S. (2016)** The distance-to-source trend in vanadium and arsenic exposures for residents living near a petrochemical complex. *J Exp Sci Environ Epidemiol.* 26:270–276.
- Veronique A.J., Medema R.H. (2001)** Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 1–12.
- WHO, World Health Organization. (1990)** Vanadium. Health Geneva.
- WHO, World Health Organization. (2001)** Vanadium Pentoxide and Other Inorganic Vanadium Compounds. Geneva.
- 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. *J Biol Inorg Chem.* 21:919–929.
- Yang J., Zhang Z., Jiang S., Zhang M., Lu J., Huang L., Zhang T., Gong K., Yan S., Yang Z., Shao G (2016)** Vanadate- induced antiproliferative and apoptotic response in esophageal squamous carcinoma cell line EC109. *J Toxicol Environ Health.* 79:19.
- Zannini L., Domenico D., Buscemi B (2014)** CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol.* 6: 442–457.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X. (2001)** Vanadate-Induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 392:311-320.

Zhang Z., He H., Chen F., Huang C., Shi X (2002a) MAPKs mediate S phase arrest induced by vanadate through a p53-dependent pathway in mouse epidermal C141 cells. *Chem Res Toxicol.* 15, 950-956.

Zhang Z., Huang C., Li J., Shi X. (2002b) Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg Biochem.* 89:142-148.

Zhang Z., Leonard S.S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V., Shi X. (2003) Role of reactive oxygen species and MAPKs phase arrest. *Free Radic Biol Med.* 34:1333-1342.

Zhang Z., Gao N., He H., Huang C., Luo J., Shi X. (2004) Vanadate activated Akt and promoted S phase entry. *Mol Cell Biochem.* 255:227–237.