



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**CARRERA BIOLOGÍA**

---

**“Evaluación de las proteínas ATM y  $\gamma$ -H2AX  
en linfocitos tratados con tricloruro de  
vanadio *in vitro*”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**  
**Mónica Quiterio Sánchez**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava**

**ASESOR:**  
**Dr. Juan José Rodríguez Mercado**

**ASESORA:**  
**Dra. Lucila Álvarez Barrera**



Ciudad de México, 22 de mayo del 2024.



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.



La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Toxicología de Metales a cargo del Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental que dirige el Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

Este trabajo se desarrolló gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM-PAPIIT clave IN210324.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**FORMATO F-5**



**OFICIO DE FECHA DE EXAMEN**

**QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ**  
**JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
 Presente

Le comunico que al alumno: QUITERIO SANCHEZ MONICA con número de cuenta 315117031 de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día 22 de Mayo de 2024 a las 13:00 hrs. para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. EN C. ALVARADO DOMINGUEZ MARIA CRISTINA	
VOCAL	DR. MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL	
SECRETARIO	DRA. ALVAREZ BARRERA LUCILA	
SUPLENTE	DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	
SUPLENTE	M. EN C. ALCANTARA MEJIA VICTOR ALAN	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

**Evaluación de las proteínas ATM y  $\gamma$ -H2AX en linfocitos tratados con tricloruro de vanadio in vitro**

En la modalidad de: **TESIS**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 CDMX, a 8 de Abril de 2024

DR. VICENTE JESUS HERNANDEZ ABAD  
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES ZARAGOZA



## Constancia de verificación de trabajo escrito

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

P R E S E N T E

A través del presente, notifico que el reporte emitido por la herramienta tecnológica (Software) Turnitin, con el 20 % de similitud general, el cual, de acuerdo con los requisitos solicitados por el H. Consejo Técnico de la Facultad, determinó que cumple con los criterios para que él o la sustentante Mónica Quiterio Sánchez, cuenta 315117031, pueda iniciar con los trámites correspondientes para la presentación de su Examen Profesional.

Sin más, emito mi visto bueno para beneficio de la o él sustentante.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad de México, a 4 de abril de 2024

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Nombre y firma del Director del  
trabajo escrito.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

### PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL (Titulación o Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Evaluación de las proteínas ATM y y-H2AX en linfocitos tratados con tricloruro de vanadio in vitro

que presenté para obtener el título/grado de: Bióloga, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

**ATENTAMENTE**

05/ABRIL/2024

Mónica Quiterio Sánchez

NOMBRE Y FIRMA

315117031

NÚMERO DE CUENTA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por no solo brindarme una formación académica excepcional, sino además personas maravillosas que conocí durante este tiempo, quienes no solo enriquecieron mi experiencia académica, sino que también dejaron una huella en mi vida.

De manera especial a mi director de tesis, el Dr. Aníbal Rodrigo Mateos Nava, por su dedicación, orientación y sobre todo paciencia a lo largo de este proceso. Su conocimiento y apoyo han sido fundamentales para la culminación de este trabajo. Gracias por inspirarme y motivarme a alcanzar mis metas.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado y a la Dra. Lucila Barrera Álvarez por sus comentarios, observaciones y consejos a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mis sinodales, la M. en C. María Cristina Alvarado Domínguez y el M. en C. Víctor Alan Alcántara Mejía por su tiempo y disposición para la retroalimentación de este trabajo.

A la M. en C. Guadalupe Gómez García por su invaluable ayuda en la adquisición de los datos del citómetro de flujo.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración, apoyo y compañerismo durante este tiempo. En especial a Grecia y a Aleks por todas las veces que me ayudaron para hacer posible este trabajo. Gracias por ser parte de este viaje académico conmigo.

A mi mamá y a mi abuelita, porque, aunque no están físicamente sé que me acompañaran en cada etapa de mi vida.

A mi papá y a mi hermano, por su amor, cuidados, paciencia y sobre todo por brindarme las herramientas para poder cumplir mis objetivos.

A mi familia, por su amor y compañía a lo largo de toda mi vida.

A mis amigos, en especial a Asahel, Karen, Ana, Sam, Adrián, Irán, América, Emilio, Iván, Eli y Arely a quienes conocí en diferentes etapas de mi vida; sin embargo, a todos les agradezco por su amistad, alegría y por ser mi fuente de apoyo constante no solo en el ámbito académico sino también en lo personal. Sus palabras de ánimo y su compañía han sido un regalo invaluable.

A mis ahora colegas Jessica y Guadalupe, por su amistad, sus enseñanzas, sus consejos y por inspirarme a ejercer con vocación.

Y, por último, pero no menos importante, a Canelita y a Sirius por siempre acompañarme.

## Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Metales en la Contaminación</b> .....	1
<b>Vanadio</b> .....	1
<b>Tricloruro de Vanadio</b> .....	4
<b>Ciclo Celular</b> .....	4
<b>ATM</b> .....	5
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b> .....	5
<b>El Papel de las Proteínas ATM, ATR y <math>\gamma</math>-H2AX en el Ciclo Celular</b> .....	6
<b>Efecto del vanadio sobre proteínas que controlan el ciclo celular</b> .....	6
<b><i>Western Blot</i></b> .....	8
<b>Citometría de Flujo</b> .....	8
<b>Linfocitos como modelo de estudio</b> .....	8
<b>HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>Reactivos</b> .....	12
<b>Obtención de linfocitos</b> .....	12
<b>Tratamientos</b> .....	13
<b>Viabilidad por tinción de colorantes fluorescentes</b> .....	13
<b>Análisis del contenido de ADN</b> .....	13
<b>Obtención de proteínas</b> .....	14
<b>Separación y detección de proteínas</b> .....	14
<b>Análisis estadístico</b> .....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	16
<b>DISCUSIÓN</b> .....	23
<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27

## **INTRODUCCIÓN**

### **Metales en la Contaminación**

Desde la época de la Revolución Industrial las actividades antropogénicas han ido en aumento a lo largo del mundo. Esto, aunado a fenómenos naturales como las erupciones volcánicas o los incendios forestales, ocasiona la liberación de diversos compuestos dañinos no solo para el medio ambiente, sino también para los seres vivos.

Uno de los problemas que ha tomado mayor interés en los últimos años es la contaminación ambiental, ya que en ella existe la presencia de sustancias o elementos tóxicos en cantidades superiores a los límites tolerados por el ser humano, de tal modo que causan desequilibrio ecológico y afectaciones a la salud de los organismos (Araujo, 2010).

Entre las partículas contaminantes más abundantes están los metales pesados, que son aquellos elementos químicos que presentan densidad igual o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  con respecto al agua. Proviene de manera natural de los minerales y en general se encuentran en la superficie terrestre a la concentración aproximada de  $100 \text{ mg/kg}$  de sustrato (Reyes *et al.*, 2016; Delgado *et al.*, 2019). Debido a sus propiedades tóxicas y su capacidad para bioacumularse en los organismos vivos, los convierte en una preocupación importante para la salud humana y el medio ambiente. Se transportan a través del viento, son depositados en el suelo o el agua y en consecuencia pueden ser inhalados o ingeridos (Sabath y Robles-Osorio, 2012; WHO 2014; Aguilera *et al.*, 2020). Algunos ejemplos son el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el hierro (Fe), el titanio (Ti), el vanadio (V), entre otros.

### **Vanadio**

Es un metal de transición ubicado en la familia 5 (VB) de la tabla periódica de los elementos químicos con el símbolo V, de color grisáceo, su número atómico es 23, masa molar de  $50.942 \text{ g/mol}$ , densidad  $6.09 \text{ g/cm}^3$ , punto de fusión  $1890 \text{ }^\circ\text{C}$  y de ebullición  $3380 \text{ }^\circ\text{C}$  (IUPAC, 2022). Está distribuido universalmente en el suelo y tiene una abundancia de  $0.02 \%$  en la corteza terrestre, mientras que el agua de mar posee una concentración cercana a  $35 \text{ nM}$  (Rehder, 2012).

Presenta estados de oxidación que van desde -3 a +5, siendo +3, +4 y +5 los que se han estudiado más ya que tienen actividad biológica (Michibata, 2012). Comúnmente se encuentra en forma de anión vanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) y en formas iónicas combinadas con oxígeno, como el ion vanadilo ( $\text{VO}_2^+$ ) que actúan igual que agentes oxidantes o en combinación con azufre, por ejemplo, el catión ditionato de vanadio +2 o el hidrogenosulfuro de vanadio +2:  $\text{VS}^{2+}$  y  $\text{VSSH}^+$  respectivamente (Castillo *et al.*, 2005; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

En vertebrados entra al organismo a través del tracto digestivo y respiratorio mediante la ingesta de alimentos y la inhalación de aire que lo contenga, sin embargo, en cantidades muy pequeñas se absorbe a través de la piel. Se acumula en los tejidos de seres humanos, principalmente en huesos, hígado, riñón, pulmones y cerebro. A nivel intracelular se ha reportado la concentración de  $0.3 \mu\text{M}$  (Rehder, 2008, 2015).

Una vez dentro, el  $\text{V}^{4+}$  se encuentra como  $\text{VO}^{2+}$ . Puede formar complejos penta o hexacoordinados y es inestable a pH menores a 3, lo que hace que se oxide a  $\text{VO}_4^{3-}$ . Para distribuirse en todo el organismo, el V usa el transporte de hierro en el plasma sanguíneo y se presenta en forma del complejo transferrina-vanádica o ferritina-vanádica (Contreras *et al.*, 2014).

En el caso del  $\text{V}^{5+}$  existe principalmente en forma de  $\text{VO}_4^{3-}$ , el cual se asimila en los organismos mediante el transporte de aniones fósforo, por lo que diversas enzimas pueden reconocerlo e introducirlo a procesos metabólicos que dependan del grupo fosfato principalmente (Goodno, 1979).

Para el  $\text{V}^{3+}$  no se conoce bien la biocinética, pero debido a la presencia de oxígeno en la sangre es posible que pueda oxidarse a  $\text{V}^{4+}$  o  $\text{V}^{5+}$  y parte permanecer unido a diferentes ligandos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

La esencialidad de este elemento no ha sido probada en los seres humanos, pero sí en ciertas especies, por ejemplo, en los pollos su deficiencia produce retardo del crecimiento,

problemas de reproducción y alteraciones del metabolismo lipídico; en las ratas regula los niveles de hormona tiroidea en sangre y afectan el metabolismo de la glucosa y los lípidos; además inhiben la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$  en riñón, cerebro y corazón; en los tunicados se encuentran altas concentraciones de V, este es absorbido del agua de mar en forma de  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  y almacenado en unas células sanguíneas llamadas vanadocitos, en forma de  $\text{V}^{3+}$ . Se cree que su función es la de intervenir en la síntesis de la túnica, la cual actúa para ahuyentar a posibles depredadores (Nriagu, 1998; Rehder, 1999; Ochiai, 2008).

De forma natural se encuentra a bajas concentraciones en alimentos, entre ellos, la pimienta, los cereales, las setas, el perejil, los aceites vegetales, los huevos, la carne bovina, los peces, las aves, los mariscos, entre otros. Se calcula que los humanos consumen aproximadamente de 10 a 30  $\mu\text{g}$  de vanadio al día; aunque cerca del 96 % se excreta por las heces y el 4 % por la orina; aunque, se ha visto que en mujeres lactantes este porcentaje cambia, pues suelen excretar el 79 % mediante vía fecal y el 17 % en la leche materna (Anke, 2004; Willsky *et al.*, 2011; Korbecki *et al.*, 2012).

En procesos antropogénicos, se emplea en la fabricación de algunos colorantes que son utilizados en la elaboración de tintas, aceleradores en el secado de pinturas y barnices, en insecticidas, productos químicos fotográficos y en la elaboración de vidrio (Earnshaw *et al.*, 1981). En aleación con hierro para crear herramientas, partes de automóviles y dentro de la industria aeroespacial y eléctrica (Vanitec, 2022).

Los complejos de V poseen amplia gama de características que les permiten ser desde micronutrientes esenciales hasta agentes tóxicos; no obstante, sus propiedades dependen, entre otras cosas, de la naturaleza de los ligantes a los que se encuentre coordinado, el estado de oxidación y la concentración a la cual esté presente (Contreras-Cadena *et al.*, 2014).

Debido a la susceptibilidad de oxidarse y su alta tendencia a hidrolizar en el estado de oxidación +3 no se tiene mucha información acerca de los mecanismos en los que podría intervenir dentro de la célula, no obstante, estudios con trióxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_3$ ) indican que induce aberraciones cromosómicas numéricas, separación prematura del centrómero,

rompimientos de cadena sencilla en el ADN, aumento en el tiempo promedio de proliferación, disminución del índice mitótico y del índice de replicación (Owusu-Yaw, 1990; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010, 2011; Mateos Nava, 2017). También se ha demostrado que los óxidos de vanadio como el trióxido de vanadio y el pentóxido de vanadio ( $V_2O_3$  y  $V_2O_5$ , respectivamente) en cultivos de linfocitos humanos modifican los niveles de expresión de las proteínas p53, p21, ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4, lo que induce la detención del ciclo celular en la transición de la fase  $G_1$  a S (Mateos-Nava, 2012; Alcántara-Mejía, 2017; Mateos-Nava *et al.*, 2017).

### **Tricloruro de Vanadio**

El tricloruro de vanadio ( $VCl_3$ ) es un compuesto inorgánico con masa molar de 157.3 g/mol, higroscópico, sensible a la oxidación y en condiciones normales tiene aspecto de cristales color púrpura oscuro. Presenta punto de fusión de 300 °C, temperatura a la que se descompone, su densidad es de 3 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C, se utiliza como catalizador y precursor para la síntesis de otros compuestos basados en V (Gangolli, 1999; García-Núñez *et al.*, 2018; TODINI, 2020), es agente reductor en la determinación de nitritos y nitratos presentes en muestras de agua, también se emplea en la fabricación de baterías, en el flujo redox que tiene su solución electrolítica, lo que lleva a que tenga alto almacenamiento de energía, en la fabricación de algunas herramientas (VANITEC, 2022). Sin embargo, se conoce poco acerca de los efectos que pueda inducir a nivel celular, ya que los seres vivos están expuestos a este compuesto, es por eso que se emplea en el presente trabajo.

### **Ciclo Celular**

Es un proceso en el cual la célula se desarrolla y se divide para crear una copia de sí misma, permitiendo crecer y reemplazarlas a medida que se desgastan. En los animales, toma alrededor de 24 h de principio a fin para los diferentes tipos de células, aunque hay algunas excepciones, como las de la piel o las tumorales, que realizan esto constantemente, mientras que otras, rara vez se dividen o incluso no lo hacen. Esta transformación desempeña un papel importante en la vida de los organismos, ya que se involucra durante la renovación y reparación, sustituyendo las células que mueren (Lagunas *et al.*, 2014).

Se divide en cuatro etapas: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. En la fase G<sub>1</sub> las células se preparan para la replicación del ADN, es aquí cuando se integran las señales mitogénicas e inhibitoras del crecimiento y toman la decisión de continuar, pausar o salir del ciclo. La duplicación del ADN nuclear se da en la S y en la G<sub>2</sub> la célula está lista para la división nuclear. Por último, en la fase M de mitosis, los cromosomas replicados se segregan de manera equitativa hacia dos núcleos separados y se produce la citocinesis lo que lleva a la formación de dos células nuevas. Existe una fase que no se considera propia del ciclo, denominada G<sub>0</sub>, en donde la célula se puede encontrar en cuatro diferentes procesos: un estado de quiescencia, que estén diferenciadas, senescentes o en apoptosis (Johnson y Walker, 1999).

La progresión del ciclo celular se asocia con la expresión de genes específicos que codifican a diferentes proteínas encargadas de los puntos de control. En presencia de daño al ADN, estas evitan que el ciclo continúe, dando tiempo para que la reparación se produzca y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse a generaciones posteriores (Lagunas *et al.*, 2014).

### **ATM**

La proteína ATM es una serina-treonina cinasa, su peso molecular es de 350 kDa y está formada por 3056 aminoácidos. Se encuentra en dímero inactivo en condiciones normales y tras producirse daño en el ADN se desencadenan diferentes procesos que conducen a su activación. Su papel principal es detectar y transducir el daño en la recombinación homóloga (Lee y Paull, 2007; Sun *et al.*, 2007; Kozlov *et al.*, 2011).

### **$\gamma$ -H2AX**

Las histonas son un grupo de proteínas que constituyen a los cromosomas y les proporcionan una unión estable con la doble hélice del ADN. Entre las principales tenemos a H2A (Passarge, 2001). Esta posee una variante denominada H2AX que se expresa constitutivamente y es incorporada al azar dentro de los nucleosomas, representando entre el 10-15 % del total de H2A celular (Pusarla y Bhargava, 2005). Cuando hay roturas de doble cadena de la molécula de ADN (DSB, por sus siglas en inglés), la cola C-terminal se fosforila en serina 139, por diversas cinasas como ATM, proteínas cinasas C (PKC, por sus siglas en

ingles) y ATR. Las dos primeras participan principalmente tras la radiación ionizante, mientras que ATR lo hace en respuesta al daño en el ADN que retrasa o paraliza las horquillas de replicación (Bonner *et al.*, 2008). De modo que,  $\gamma$ -H2AX está involucrada en la detección y reparación, su activación se produce en los sitios de alteración, por lo que se ha considerado como marcador de daño al ADN (Rogakou *et al.*, 1998; Kinner *et al.*, 2008).

### **El Papel de las Proteínas ATM, ATR y $\gamma$ -H2AX en el Ciclo Celular**

Durante el ciclo celular, existen diferentes complejos enzimáticos de transducción de la señal que actúan en respuesta a daño en el ADN. Una de las principales familias que participa en esto es la PIKK (quinasas relacionadas a la fosfatidilinositol-3-quinasa) de la cual provienen las cinasas ATM y ATR (Su, 2006). Ambas transmiten el mensaje por la vía más clásica de señalización, la fosforilación de proteínas.

Se ha observado que estas dos están involucradas en la respuesta al daño en el ADN. Por una parte, ATM y ATR actúan como sensores iniciadores, que a su vez reclutan a las cinasas de puntos de control 1 y 2, Chk1 y Chk2 respectivamente, para mediar su función (Lazzaro *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Maréchal y Zou, 2019). La ATM y Chk2 se activan principalmente por agentes genotóxicos que inducen rupturas de doble cadena y posiblemente en procesos que bloquean la replicación,  $\gamma$ -H2AX se localiza en la cromatina presente en el sitio, lo que provoca la movilización de las proteínas de señalización que llevan a cabo la reparación. Se ha reportado que ATM es la principal enzima encargada de la fosforilación de H2AX cuando el daño es inducido por radiaciones ionizantes, mientras que ATR participa cuando se producen alteraciones inducidas por rayos ultravioleta (Hanasoge y Ljungman, 2007) o al estrés en la replicación (Ward y Chen, 2001).

### **Efecto del vanadio sobre proteínas que controlan el ciclo celular**

El vanadio presenta diversos efectos en el ciclo celular dependiendo de su concentración, el compuesto y la forma de exposición. En general, se ha observado que interfiere con la división celular y la replicación del ADN, lo que puede llevar a cambios en su regulación y, en algunos casos, a la apoptosis (Butler y Carrano, 1991).

En 2008, Fu y colaboradores propusieron que el V se relaciona con moléculas que controlan la progresión del ciclo celular. Se ha demostrado que alteran la actividad de diferentes ATPasas, proteínas cinasas, ribonucleasas, fosfatasas y enzimas que interactúan con los ácidos nucleicos, asimismo, induce efectos genotóxicos y mutagénicos (Zhong *et al.*, 1994; Valko *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2008).

Existen estudios sobre el metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ), en donde demuestran que en células epidérmicas JB6 P+ (C141) de ratón tratadas con 0 a 100  $\mu\text{M}$ , durante 0, 6, 12, 24 y 48 h a partir de los 50  $\mu\text{M}$  a 24 h, promovieron la entrada a la fase S, debido a la activación de la cinasa Akt, induciendo la fosforilación de la proteína pRB y provocando la liberación del factor de transcripción E2F, lo que aumentó los niveles de ciclina E y A (Zhang *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que en células de epitelio pulmonar humano A549 este mismo compuesto a concentraciones de 10 - 200  $\mu\text{M}$  promueve la formación de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lo que detiene a las células en el punto de control G<sub>2</sub>/M debido al aumento en los niveles de proteínas p21 y Chk1 e inactiva el complejo de ciclinas B/Cdc2. En otros ensayos, se observó aumento en los niveles de p53 y p21, lo que indujo la detención de las células en la fase S. Además, la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte del V en el mismo tipo de células conduce a la activación de p53 y provoca la muerte celular por apoptosis (Huang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002).

En cultivos de linfocitos humanos, se ha observado que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  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 (Mateos-Nava, 2012).

Sobre el V en estado de oxidación +3, hay pocos estudios que evalúen su efecto sobre las moléculas en relación con el control del ciclo celular. No obstante, se sabe que la administración de 0.1 mM de  $\text{VCl}_3$  a la línea celular de linfoma T Helper (Jurkat) modifica la proliferación, lo que se puede relacionar con el daño al ADN y el desarrollo de la apoptosis (Caicedo *et al.*, 2008). En la Unidad donde se realizó este trabajo (UNIGEN, FES Zaragoza), se ha demostrado que los tratamientos con 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{VCl}_3$  a cultivos de linfocitos

humanos induce la expresión de las proteínas p21, p53, ciclina D, Cdk2 y Cdk4, lo que lleva al retraso del ciclo en la fase S (García-Sosa, 2023; Díaz-Sandoval, 2024).

### ***Western Blot***

Es una herramienta que se emplea con frecuencia en la investigación para separar y distinguir proteínas según su peso molecular. Hace uso de la electroforesis en gel, la cual implica la separación de partículas cargadas que atraviesan un campo eléctrico cuando se les hace pasar la corriente eléctrica. Las proteínas son transferidas a una membrana sólida, incubada con anticuerpos específicos a la proteína de interés y finalmente revelada. La densidad de la banda resultante, indica la cantidad de proteína presente en la muestra. Actualmente, sus aplicaciones son muy numerosas, sobre todo en el campo de la biología experimental, la biomedicina y áreas afines (de la Fuente *et al.*, 2007; Mahmood y Ping-Chang, 2012).

### **Citometría de Flujo**

Es una técnica que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como, la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (Marti *et al.*, 2001).

Esta herramienta permite estudiar distintas funciones celulares como la proliferación, la fagocitosis y la apoptosis, por mencionar algunas. Lo anterior es posible gracias al marcaje con moléculas fluorescentes específicas que se incorporan cuando las células realizan este tipo de funciones (Quah y Parish, 2010).

### **Linfocitos como modelo de estudio**

Los linfocitos son células que participan de forma esencial en la respuesta inmune y están representados por dos tipos, B y T. Los primeros se originan en la médula ósea de los mamíferos y son responsables de la inmunidad humoral; mientras que los T son originados

en la médula, pero se diferencian en el timo y son responsables de la inmunidad celular y regulan la producción de anticuerpos de las células B (González *et al.*, 2005).

Las células periféricas son las más examinadas, ya que son fáciles de obtener, crecen con facilidad en cultivo tisular, tienen una vida relativamente larga y pueden extraerse grandes cantidades en metafase. También presentan la ventaja para el análisis de la exposición a algún agente interno o externo, ya que circulan por todo el cuerpo y pueden proporcionar la estimación de la exposición media de todo el organismo. Dentro de la experimentación *in vitro* son una buena opción, ya que son células humanas no transformadas, fáciles de obtener y de estimular su proliferación (Tucker y Preston, 1996).

Han sido ampliamente utilizados en la evaluación del potencial genotóxico de diferentes compuestos *in vitro*, en los que se encuentran los metales de transición, agentes alquilantes, fármacos y herbicidas (Hartmann, 1994; Soloneski, 1997; Eisenbrand *et al.*, 2002). Su uso en estudios de genética toxicológica se debe a que son metabólicamente eficientes, ya que se ha demostrado que los linfocitos humanos poseen niveles detectables de ARNm de la enzima CYP2E1, la cual está involucrada en el metabolismo oxidativo de xenobióticos de bajo peso molecular (Hukkannen y Krovat, 2000).

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la exposición de los seres vivos a metales ha ido en aumento debido al incremento de la actividad industrial. El V es un metal que se encuentra presente en nuestra vida diaria, desde los alimentos que consumimos hasta el aire que respiramos. Dentro del organismo puede inducir cambios a nivel celular y poner en riesgo el material genético. Se ha observado que la toxicidad de los compuestos de V aumenta conforme su estado de oxidación, siendo los de estado +4 y +5 los más tóxicos, en linfocitos humanos retrasa la proliferación e induce la sobreexpresión de las proteínas ciclina E y Cdk2, asimismo, disminuye la expresión de la ciclina D1 y de Cdk4; sin embargo, del estado de oxidación +3 aún se desconoce su efecto en algunas proteínas que participan durante el ciclo celular. Por esto, la presente investigación busca elucidar el efecto de uno de los compuestos de V en estado de oxidación +3, el  $VCl_3$ , en la expresión de ATM y  $\gamma$ -H2AX que son moléculas presentes en la reparación de daño al ADN.

## **HIPÓTESIS**

En estudios *in vitro* se ha observado que los compuestos de V inducen daño al ADN y modifican la expresión de diversas proteínas involucradas en el control del ciclo celular, por lo que, si se administra  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos, se detendrá la proliferación y modificará la expresión de ATM y  $\gamma$ -H2AX.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Evaluar *in vitro* la expresión de las proteínas ATM y  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos expuestos a 2, 4, 8 o 16  $\mu$ g/mL de  $VCl_3$  durante 24 y 48 h.

### **Objetivos particulares:**

Determinar la viabilidad de los linfocitos tratados con  $VCl_3$  utilizando la tinción de colorantes fluorescentes.

Evaluar el contenido de ADN en linfocitos humanos tratados con  $VCl_3$  mediante citometría de flujo.

Analizar la expresión de proteínas como ATM y  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos tratados con  $VCl_3$  utilizando *Western blot*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

Para llevar a cabo la metodología se utilizaron los siguientes reactivos: tricloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ) CAS 7718-98-1 pureza del 97 % disuelto en agua inyectable y preparado cada vez que se iba a utilizar, Histopaque®-1077, 5(6)-diacetato de carboxifluoresceína mezcla de isómeros (CFDA, por sus siglas en inglés), solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), ribonucleasa A (RNasa), solución de tinción (0.1 % de Tritón X-100 en PBS más 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNasa y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de yoduro de propidio), ácido etileno diamino tetracético (EDTA por sus siglas en inglés), bromuro de etidio (Br-Et), yoduro de propidio de la marca Sigma-Aldrich, Inc., MO EUA; medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, 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, de la marca Bio-Rad Laboratories, CA EUA; albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) inhibidores de proteasas, aprotinina y leupeptina, anticuerpo anti-ATM (sc-53173), anti-p-H2AX (sc-517348), anti-actina (sc-8432) y anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) de ratón IgGκ-proteína de unión (sc-516102), Tween-20 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA; Clarity Max ECL Substrate, Protein Assay de Bio-Rad Laboratories Inc., CA EUA.

### **Obtención de linfocitos**

Se obtuvo sangre periférica de donadores (sin antecedentes de toxicomanía o enfermedades recientes; con previo consentimiento escrito) por venopunción con sistema Vacutainer® y se agregó sobre Histopaque®-1077 en un tubo de centrifuga cónico en relación 1:1; teniendo las dos fases sin mezclarse, se centrifugaron a 1800 rpm durante 33 min, al final se obtuvieron cuatro fases, una fase opaca en la cual están presentes los linfocitos. Estos fueron transferidos a un tubo limpio y se lavaron en tres ocasiones con solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), entre cada lavado se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, posteriormente se obtuvo la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer, Propper Manufacturing Co. Inc.

### **Tratamientos**

Se cultivaron 8 millones de células por tratamiento en medio de cultivo PB-Max Karyotyping, transcurridas 24 h se les administró una de las diferentes concentraciones de  $\text{VCl}_3$ : 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubaron por 24 y 48 h más; cabe mencionar que se contó con un grupo sin tratamiento (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En total se tuvieron seis experimentos independientes.

### **Viabilidad por tinción de colorantes fluorescentes**

La viabilidad celular se evaluó al inicio y al final de cada tratamiento, para realizarla se siguió el método propuesto por Strauss en 1991 con ligeras modificaciones. Se preparó una solución de tinción (1:1) de bromuro de etidio (0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y diacetato de carboxifluoresceína (0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), de aquí se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de los colorantes con 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se incubaron a 37 °C por 15 min. Posteriormente se hicieron tres lavados con un mL de PBS centrifugándolos a 4000 rpm por 6 min cada uno, el botón celular se colocó en un portaobjetos para determinar la viabilidad en el microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm, clasificando 100 células en total tomando en cuenta el número de viables, las cuales se observaron de color verde debido a la integridad de su membrana y a la presencia de actividad enzimática, pues el diacetato de carboxifluoresceína reacciona con las esterasas induciendo la fluorescencia, de las no viables que presentaron fluorescencia roja, ya que al perder la integridad de la membrana el bromuro de etidio puede intercalarse en la estructura del ADN.

### **Análisis del contenido de ADN**

Para conocer si alguna fase del ciclo celular se ve modificada por los tratamientos se procedió a evaluar el contenido de ADN por citometría de flujo utilizando la técnica de tinción con yoduro de propidio. Al término del tiempo de incubación, las células se fijaron con alcohol etílico al 70 % frío por 24 h, después se retiró e incubó en solución de tinción por 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, se adquirieron 20000 eventos por tratamiento en el citómetro BD FACSAria™II (Becton Dickinson and Company, CA EUA). Con los datos se realizaron los histogramas en el programa para computadora <https://floreada.io/analysis> que es de libre acceso, en el cual se determinó el porcentaje de núcleos en cada fase.

### **Obtención de proteínas**

Al final del tratamiento los cultivos se centrifugaron y el botón celular se lavó con 5 mL de PBS frío, se centrifugó a 1800 rpm por 8 min, se desechó el sobrenadante y se le agregó la solución amortiguadora de lisis RIPA (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % SDS, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) resuspendiéndolo 21 veces a través de una aguja 21G con ayuda de una jeringa y se traspasó a un microtubo, el cual se dejó en refrigeración por toda la noche, a continuación se centrifugaron a 12500 rpm por 12 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante con una pipeta y se determinó la concentración de proteínas presente en cada cultivo mediante el reactivo Protein Assay de Bio-Rad empleando el lector de placas Epoch™ BioTek Instruments, Inc. a 595 nm de longitud de onda.

### **Separación y detección de proteínas**

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida mediante electroforesis, primero fueron desnaturalizadas mezclando 50 µg con solución amortiguadora de muestra 6X que contenía SDS y se añadió β-mercaptoetanol, a continuación se calentaron las muestras a 92 °C durante 5 min y se colocaron en los pozos del gel, la separación se llevó a cabo al aplicar corriente constante de 100 voltios, posteriormente se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Bio-Rad por electroblotting con corriente constante de 145 miliamperios (mA) por 1.5 h. La membrana fue incubada en solución de bloqueo (5 % de leche sin grasa con amortiguador tris salino más 0.05 % de Tween-20 (TTBS)) por 1.5 h; a continuación, se incubaron con cada anticuerpo primario, anti-ATM, anti-p-H2AX y anti-actina 1:2500 durante la noche en agitación constante a 4 °C. Se hicieron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) de ratón IgGκ-proteína de unión (1:5000), por 1.5 h, al final se lavaron la membrana tres veces con TTBS para realizar la detección y determinación de las proteínas de interés, la cual se presentaba como una banda, la detección fue llevada a cabo en el fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Imaging System de Bio-Rad Laboratories, Inc. La intensidad relativa de las bandas resultantes, fue analizada mediante el software ImageJ del National Institutes of Health de EUA que es de libre acceso, para hacer una relación con su respectivo marcador de carga (actina).

### **Análisis estadístico**

Se obtuvo la media y el error estándar de la media (EEM) de los seis experimentos independientes. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey, dependiendo de la homogeneidad de las varianzas, para comparar diferencias entre cada grupo tratado contra el grupo sin tratamiento, considerando el valor de  $p < 0.05$  como diferencia significativa.

## RESULTADOS

### Efecto del VCl<sub>3</sub> en la viabilidad de los linfocitos tratados

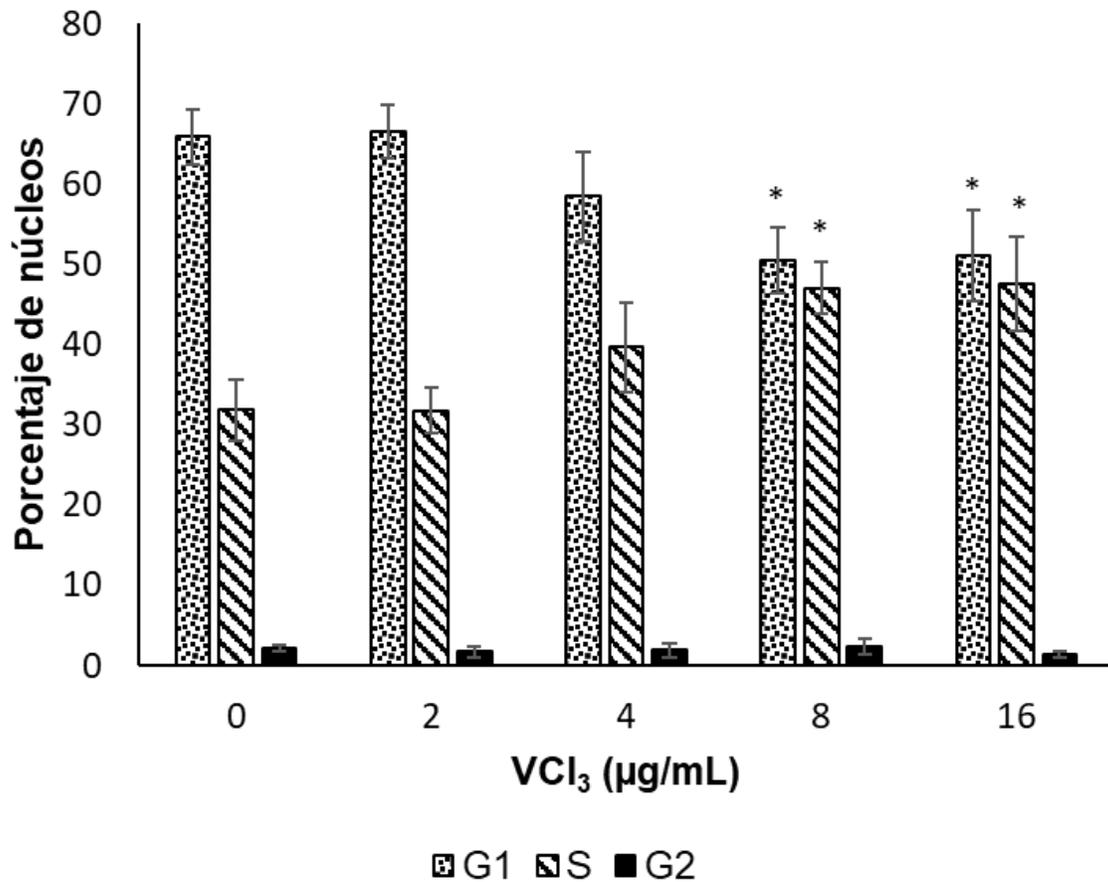
En el **Cuadro I** se presenta el porcentaje de viabilidad de cada tratamiento, en donde se observó que la administración del VCl<sub>3</sub> no indujo cambios significativos en ningún tiempo de exposición comparado con el grupo sin tratamiento.

**Cuadro I.** Porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos tratados *in vitro* con VCl<sub>3</sub> a 24 y 48 h, donde se muestra la media  $\pm$  el EEM.

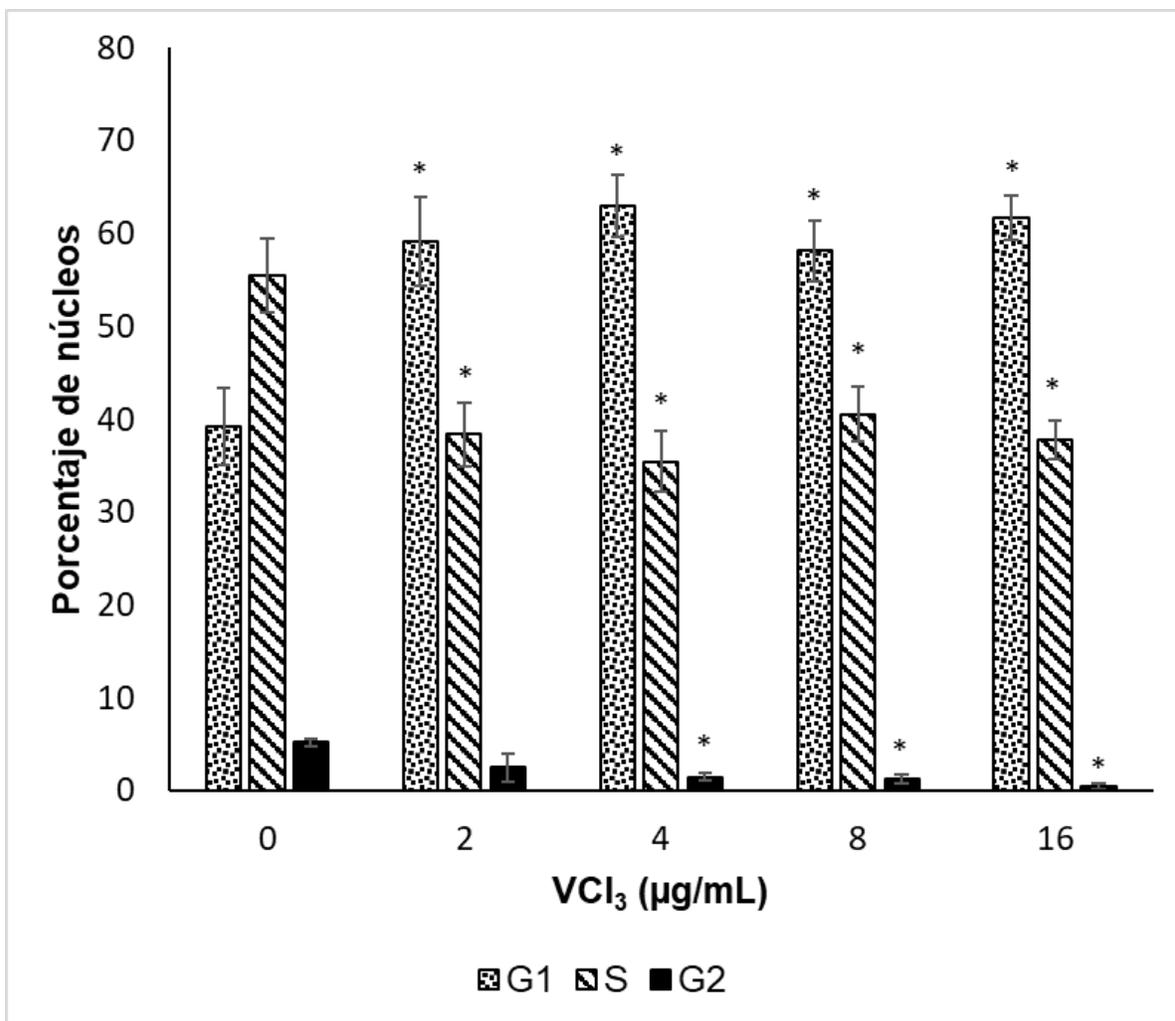
Tratamientos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tiempo de exposición	
	24 h	48 h
0	98.5 $\pm$ 0.3	98.3 $\pm$ 0.3
2	98.3 $\pm$ 0.4	98.0 $\pm$ 0.4
4	97.6 $\pm$ 0.2	97.0 $\pm$ 1.6
8	98.8 $\pm$ 0.4	98.1 $\pm$ 0.4
16	98.1 $\pm$ 0.4	97.6 $\pm$ 0.8

### Efecto del VCl<sub>3</sub> sobre las fases del ciclo celular evaluado por el contenido de ADN

En la **Figura 1**, se muestra el análisis del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de los linfocitos tratados con VCl<sub>3</sub>. A las 24 h del tratamiento, se observó aumento en la fase S conforme incrementó la concentración, siendo significativo en 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$ . Pero a las 48 h (**Figura 2**) hubo cambios significativos en todos los tratamientos, por un lado, hay reducción en la fase S mientras que en G<sub>1</sub> aumentó, lo que indica la detención en esta última.



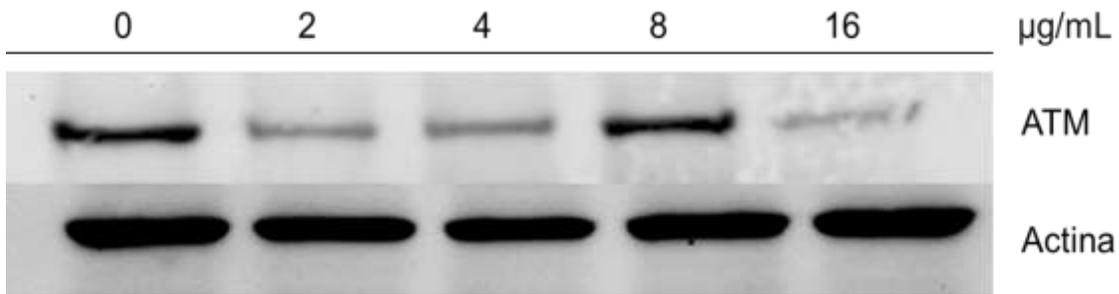
**Figura 1.** Porcentaje del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados *in vitro* con las concentraciones de VCl<sub>3</sub> durante 24 h, se muestra la media ± EEM de seis experimentos independientes. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).



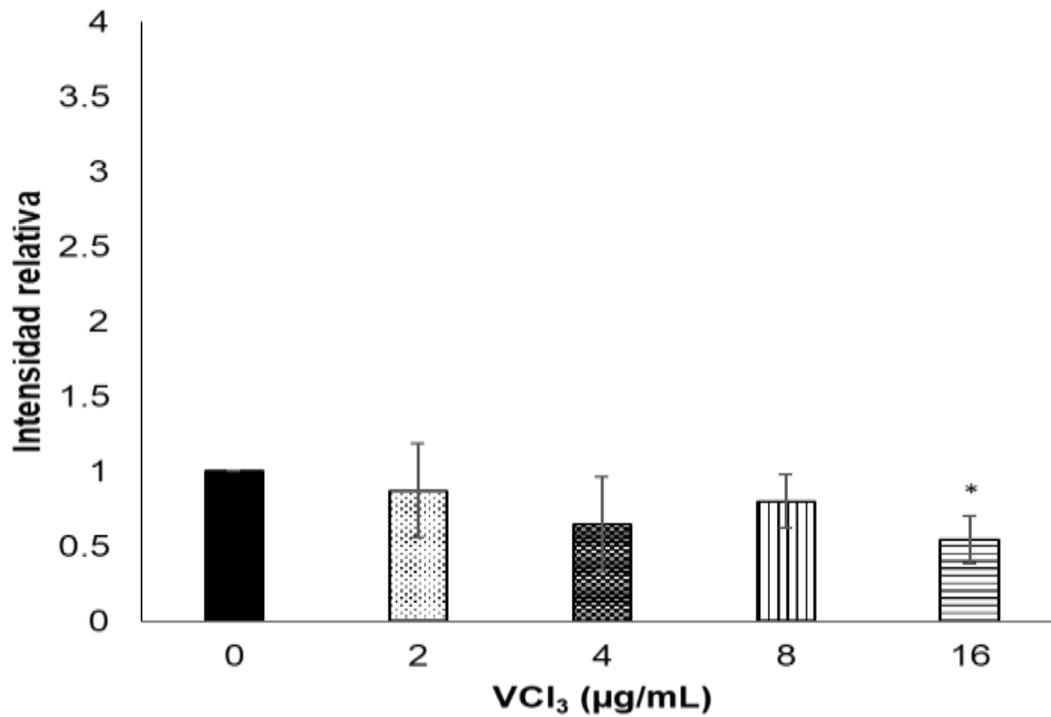
**Figura 2.** Porcentaje del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados *in vitro* con las concentraciones de VCl<sub>3</sub> durante 48 h, se muestra la media ± EEM de seis experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).

### Efecto del VCl<sub>3</sub> en la expresión de las proteínas ATM y $\gamma$ -H2AX

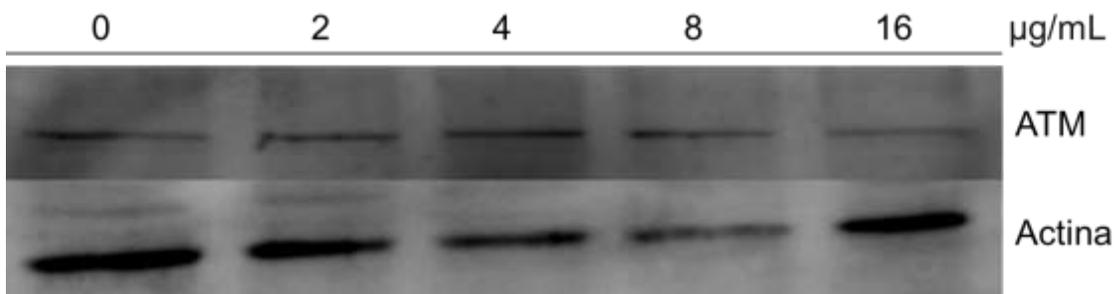
Como puede observarse en la **Figura 4** la intensidad relativa de la proteína ATM a 24 h disminuyó con respecto al control, siendo significativo a la concentración de 16 µg/mL, mientras que a las 48 h (**Figura 6**) se mantuvo sin cambios.



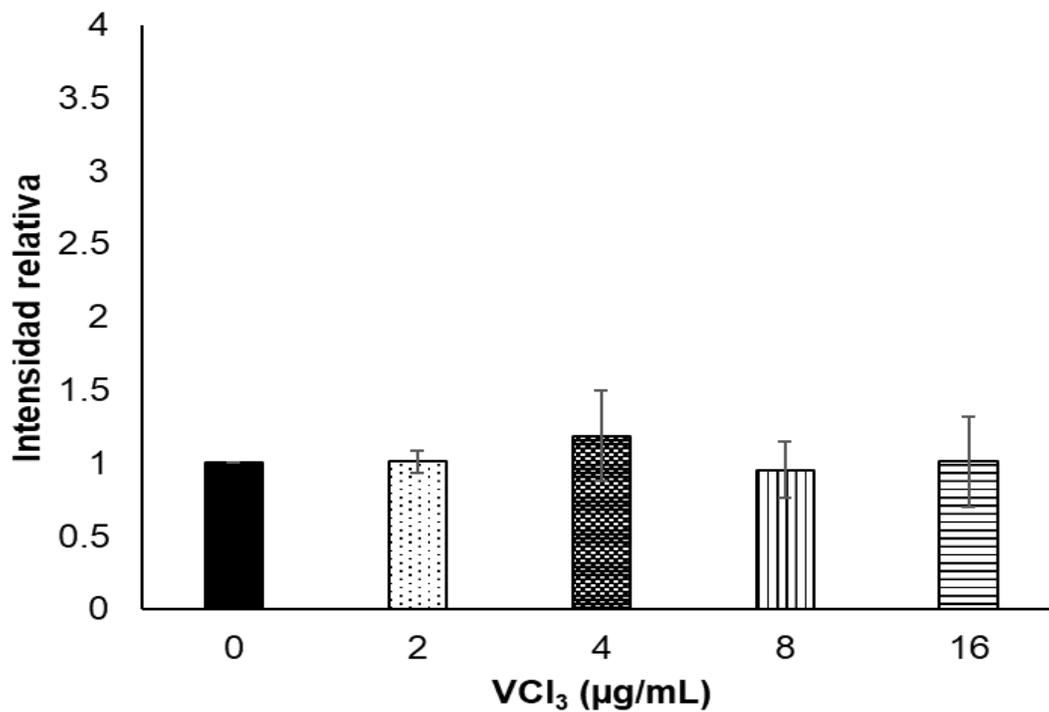
**Figura 3.** Fotografías representativas de las bandas de las proteínas ATM y actina de los cultivos de linfocitos tratados con  $VCl_3$  por 24 h.



**Figura 4.** Intensidad relativa de la proteína ATM en linfocitos humanos tratados *in vitro* con  $VCl_3$  durante 24 h. Se muestra la media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).

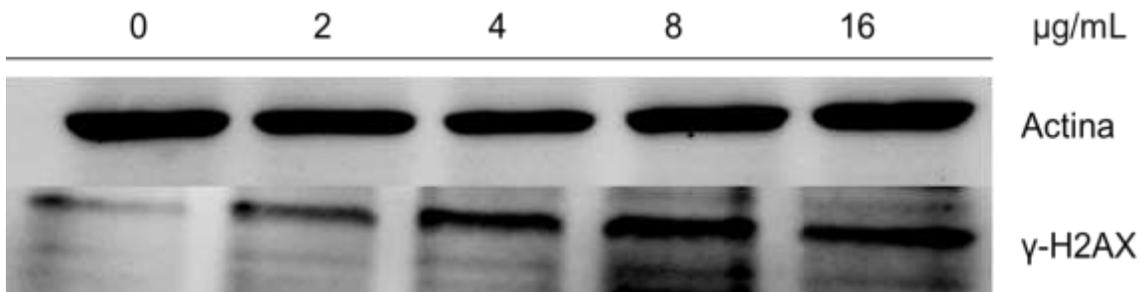


**Figura 5.** Fotografías representativas de las bandas de las proteínas ATM y actina de los cultivos de linfocitos tratados con  $VCl_3$  por 48 h.

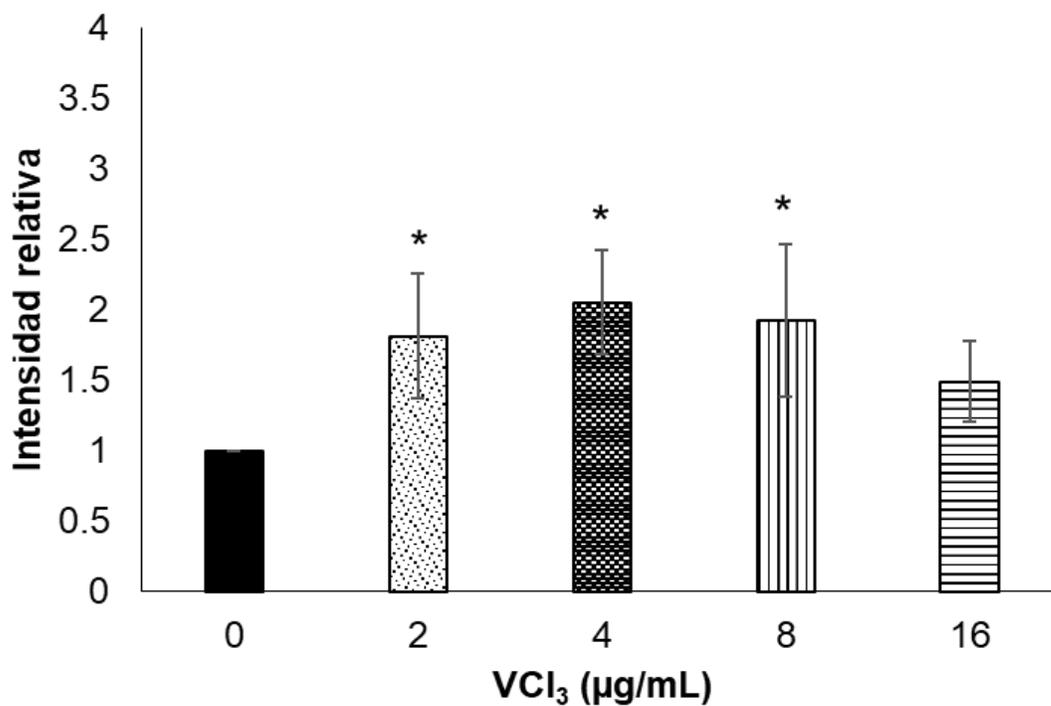


**Figura 6.** Intensidad relativa de la proteína ATM en linfocitos humanos tratados *in vitro* con  $VCl_3$  durante 48 h. Se muestra la media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes.

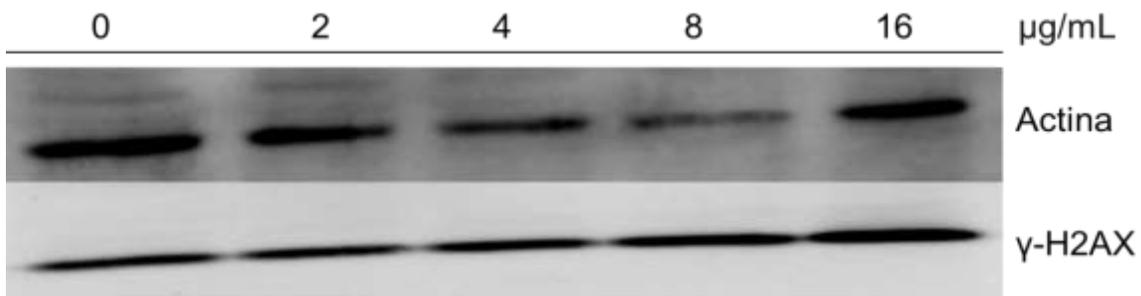
Mientras que  $\gamma$ -H2AX a 24 h incrementó significativamente a concentraciones de 2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 8**) y a 48 h solo se presentó en 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$ , **Figura 10**.



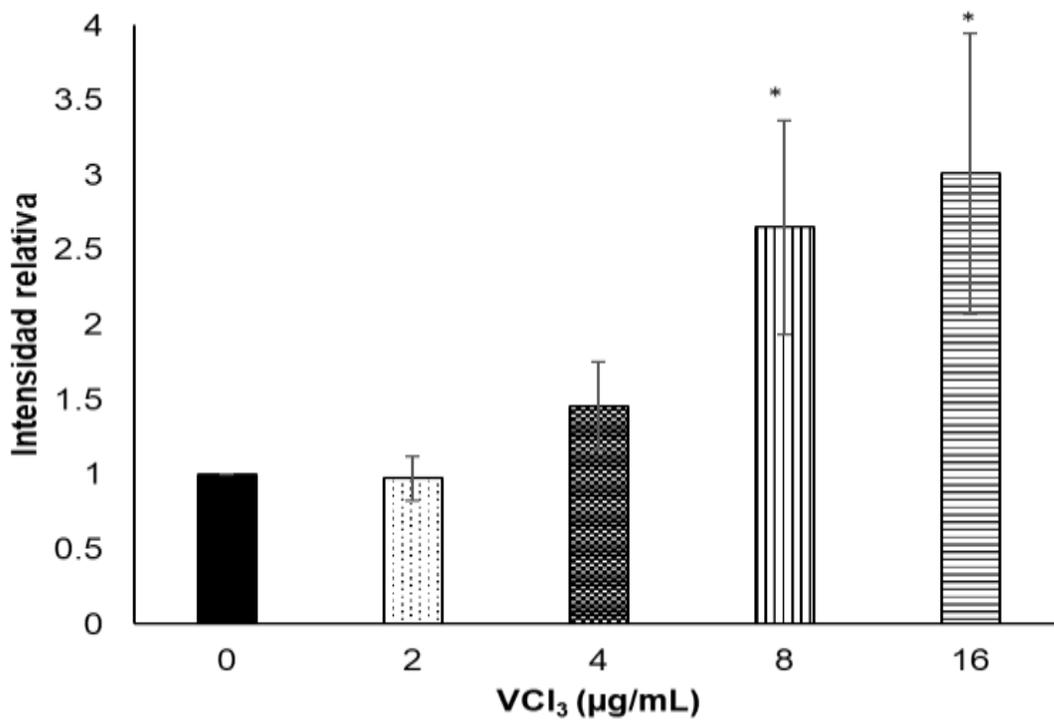
**Figura 7.** Fotografías representativas de las bandas de las proteínas  $\gamma$ -H2AX y actina de los cultivos de linfocitos tratados con  $\text{VCl}_3$  por 24 h.



**Figura 8.** Intensidad relativa de la proteína  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos tratados *in vitro* con  $\text{VCl}_3$  durante 24 h. Se muestra la media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).



**Figura 9.** Fotografías representativas de las bandas de las proteínas  $\gamma$ -H2AX y actina de los cultivos de linfocitos tratados con  $VCl_3$  por 48 h.



**Figura 10.** Intensidad relativa de la proteína  $\gamma$ -H2AX en linfocitos humanos tratados *in vitro* con  $VCl_3$  durante 48 h. Se muestra la media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA-Tukey).

## DISCUSIÓN

### **Efecto del $VCl_3$ sobre la viabilidad celular.**

En este trabajo se observó que la administración de  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos durante 24 y 48 h de exposición no afecta la viabilidad celular. Diversos estudios han obtenido resultados similares, tal como la administración de diferentes óxidos de vanadio ( $V_2O_3$ ,  $V_2O_4$  o  $V_2O_5$ ) en linfocitos humanos a las mismas concentraciones utilizadas en este trabajo, que no presentaron cambios en la viabilidad celular a ningún tiempo de exposición (Alcántara-Mejía, 2017; Mateos-Nava *et al.*, 2021; García-Sosa, 2023; Díaz-Sandoval, 2024). De igual manera, se tiene registro de que el  $V_2O_5$  a 300, 30 y 0.3  $\mu M$  en leucocitos humanos durante 2 h, tampoco induce cambios significativos en la viabilidad celular (Rojas *et al.*, 1996).

El mismo efecto fue observado *in vivo*, en un estudio realizado en ratones CD-1 machos expuestos por inhalación a dosis de 0.01 M a 0.02 M de vanadio (V) por 1 h dos veces por semana, durante un mes; la viabilidad celular no se vio afectada en ningún tiempo evaluado (día 0, 1,7,14, 21 y 28), ya que en todos los grupos fue mayor al 85 % (Ramírez, 2021).

### **Efecto del $VCl_3$ sobre el contenido de ADN**

Con base al análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo, los tratamientos con  $VCl_3$  a linfocitos humanos durante 24 h retrasan el ciclo celular, esto debido al incremento en el número de núcleos en fase S en las concentraciones de 8 y 16  $\mu g/mL$ , y al aumento de núcleos en  $G_1$  en todas las concentraciones a 48 h, lo cual sugiere que el compuesto induce la detención en la progresión del ciclo celular en esta última fase. Algo parecido encontraron Caicedo *et al.*, 2008, quienes demostraron en cultivos de células Jurkat, que la administración de  $VCl_3$  a concentraciones de 0.1 a 5 mM por 48 h inhibe la proliferación; efecto que relacionaron con sus determinaciones de daño en el ADN.

En otras líneas celulares se han obtenido diferentes resultados; por ejemplo, en células del carcinoma escamoso de esófago (EC109) tratadas con 0.1 a 50  $\mu M$  de  $NaVO_3$ , ( $V^{5+}$ ), por 24 h, se detiene el ciclo en fase S además de que se induce apoptosis (Yang *et al.*, 2016).

Asimismo, en células de cáncer pancreático humano AsPC-1 en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  detiene el ciclo en G2/M (Wu *et al.*, 2016).

En el laboratorio de la UNIGEN, se ha observado que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  a concentraciones de 2, 4 y 6  $\mu\text{g/mL}$  en el mismo modelo utilizado en este estudio, causa disminución del índice mitótico (IM) y produce retraso en la duración del ciclo celular (Roldan y Altamirano, 1990), así como, detención del ciclo celular en la fase G1 a 72 h a concentraciones de 8, 16 y 32  $\mu\text{g/mL}$  (Frías, 2022) y en el caso del  $\text{V}^{3+}$  aplicado como  $\text{V}_2\text{O}_3$  induce cambios en el porcentaje de núcleos en fase S en 24 h de exposición (Alcántara, 2017).

Lo anterior indica que el V y sus compuestos detienen el ciclo celular, y su efecto depende del tipo de célula, la especie química, la concentración y la interacción con las moléculas encargadas de las señales de proliferación.

### **Efecto del $\text{VCl}_3$ sobre los niveles de expresión de las proteínas ATM y $\gamma\text{-H2AX}$**

Como ya se mencionó, las proteínas desempeñan un papel fundamental en el ciclo celular, ya que regulan cuidadosamente cada etapa para garantizar que se lleve de manera secuencial y ordenada. En conjunto, ATM y  $\gamma\text{-H2AX}$  son componentes muy importantes cuando se produce daño en el ADN, ya que se aseguran de retrasar o detener la división, para que la célula pueda reparar dicho daño y mantener la integridad genómica.

En este estudio, ATM sólo presentó aumento significativo a 16  $\mu\text{g/mL}$  en 24 h, mientras que en experimentos previos realizados con  $\text{V}_2\text{O}_5$  en la UNIGEN observaron que a partir de las 3 h la expresión de esta misma proteína disminuye (en concentraciones de 8, 16 y 32  $\mu\text{g/mL}$ ) y tiende a incrementarse en tiempos mayores de exposición, a 24, 48 y 72 h (Frías, 2022). Por lo anterior, el efecto del V sobre la expresión de proteínas que regulan el ciclo depende del estado de oxidación en el que se encuentre el metal y del tiempo de exposición.

Por otro lado, se sabe que una vez que hay daño en el material genético, este es detectado y empieza una serie de mecanismos para su reparación. En el caso de ser rompimientos de doble cadena, ATM inicia la respuesta hasta llegar a la proteína efectora para 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 a las proteínas asociadas con la reparación, senescencia o muerte celular (Lazzaro *et al.*, 2009).

Aunque no podemos concluir que sean rompimientos de cadena sencilla o doble, el incremento de  $\gamma$ -H2AX evidencia el daño al ADN ocasionado por la administración de  $VCl_3$  a linfocitos humanos, en ambos tiempos de exposición. Este fenómeno ya había sido observado en otros compuestos de vanadio, por ejemplo, en 2002, realizaron un estudio con trabajadores que estaban expuestos a  $V_2O_5$  y se dieron cuenta que induce roturas de la cadena de ADN en células de fibroblastos humanos a partir de concentraciones mayores a  $5 \mu M$  tanto de forma *in vivo* como *in vitro* (Sabine *et al.*, 2002). Fortoul *et al.*, en el 2011, confirmaron la inducción de roturas de cadena sencilla, no solo en modelos de ratón, sino también en leucocitos de sangre, en linfocitos humanos y en células testiculares con este mismo compuesto.

En el laboratorio se ha observado que los óxidos de vanadio ( $V_2O_3$ ,  $V_2O_4$  y  $V_2O_5$ ) inducen daño al ADN evidenciado por roturas de cadena sencilla e incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010, 2011), lo cual puede estar relacionado con lo observado en el presente trabajo, que el  $VCl_3$  induce daño al ADN, esto hace que el ciclo celular se detenga para repararlo sin que haya muerte celular.

## CONCLUSIONES

En los linfocitos humanos tratados con 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{VCl}_3$  durante 24 y 48 h:

- No modifica la viabilidad celular.
- Induce la detención del ciclo en la fase S a las 24 h de tratamiento en concentraciones de 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ , y en la fase G0/G1 a las 48 h en todas las concentraciones.
- No hubo cambios significativos en ATM; sin embargo, incrementa la expresión de la proteína  $\gamma\text{-H2AX}$ .

Por lo anterior, se propone que el  $\text{VCl}_3$  tiene efectos citostáticos, debido a que retrasa la proliferación sin que altere la viabilidad, también genotóxicos, ya que induce cambios en la proteína que censa daño al ADN.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, A., Bautista, F., Gogichaichvili, A., Gutiérrez-Ruiz, M. E., Cenicerós-Gómez, A. E., y López-Santiago, N. R. (2020). Spatial distribution of manganese concentration and load in street dust in Mexico City. *Salud Pública de México*, 62(2), 147-155.
- Alcántara-Mejía, V. A. (2017). Efecto del trióxido de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de linfocitos humanos tratados in vitro. Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Zaragoza, México.
- Anke, M. (2004). Vanadium - An element both essential and toxic to plants, animals and humans? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70(4), 961-999.
- Araujo, G. (2010). Contaminación ambiental y sus efectos sobre la salud. *Viva Salud*, Instituto Nacional de Salud Pública, 2(6), 1-5.
- Bonner, W., Redon, C., Dickey, J., Nakamura, A., Sedelnikova, O., Solier, S., y Pommier, Y. (2008).  $\gamma$ -H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 957-967.
- Butler, A., y Carrano, C. (1991). Coordination chemistry of vanadium in biological systems. *Coordination Chemistry Reviews*, 109(1), 61-105.
- Caicedo, M., Jacobs, J. J., Reddy, A., y Hallab, N. J. (2008). Analysis of metal ion induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T cells demonstrates  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{V}^{3+}$  are more toxic than other metals:  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{5+}$ ,  $\text{Nb}^{5+}$ ,  $\text{Zr}^{2+}$ . *Journal of Biomedical Materials Research*, 86(4), 905-913.
- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., y Luque, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tébar, España, pp. 238.
- Contreras-Cadena, D. A., Gómez-Pech, C., Rangel-García, M., Ruiz-Hernández, A., Martínez-Bulit, P., y Barba-Behrens, N. (2014). La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*, 25(E1), 245–253.
- De la Fuente-González, A., Lozano, J. R., y Capdevila, E. F. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (*Western blot*). *Piel*, 22(5), 252-258.
- Delgado, C., Bautista, F., Gogichaishvili, A., Cortés, J. L., Quintana, P., Aguilar D., y Cejudo, R. (2019). Identificación de las zonas contaminadas con metales pesados

en el polvo urbano de la ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(1), 81-100.

- Diaz-Sandoval, P. (2024). Evaluación del efecto del tricloruro de vanadio en las proteínas reguladoras de la transición de la fase g1 (ciclina D/Cdk4 y ciclina E/Cdk2) de linfocitos humanos tratados in vitro. Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Zaragoza, México.
- Earnshaw, K. R., Vetter, R. J., Garry, G., Stebbins, y Schnell, R. C. (1981). Lack of effect of vanadyl trichloride on hepatic drug metabolism in the rat. *Pharmacological Research Communications*, 13(4), 323-330.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., y Shi, X. (2000). Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2-3), 193-236.
- Frías-Jiménez, E. (2017). Efecto del pentóxido de vanadio sobre los niveles de la proteína Cdc25C de linfocitos humanos tratados in vitro. Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Zaragoza, México.
- Fortoul, T. I., Rodriguez Lara, V., Gonzalez Villalva, A., Rojas Lemus, M., Cano Gutierrez, G., y Ustarroz Cano, M. (2011). Vanadium Inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particle system repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-11.
- Fu, Y., Wang, Q., Yang, X. G., Yang, X. D., y Wang, K. (2008). Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(6), 1001-1009.
- García-Núñez, I., Algaba-Mármol, M. A., Suárez-Vergara, M., Fuentes-Soltero, J., Fernández-Barrera, C., Bartolomé, B., y Grau-Bonete, A. (2018). Vanadium contact dermatitis: Case report and studies performed. *Contact Dermatitis*, 218, 1-2.
- García-Sosa, B. A. (2023). Efecto del tricloruro de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Zaragoza, México.
- González, A., Fernández, E., y Lorenzo, S. (2005). Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades

- funcionales. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9, 2162–2173.
- Goodno, C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(6), 2620-2624.
  - Hanasoge, S., y Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28(11), 2298-2304.
  - Huang, C., Zhang, Z., Ding, M., Li, J., Ye, J., Leonard, S. S., y Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32516-32522.
  - IUPAC, The International Union of Pure and Applied Chemistry (mayo de 2022). Periodic Table. [www.iupac.org/reports/periodic\\_table/](http://www.iupac.org/reports/periodic_table/)
  - Johnson, D. G., y Walker, C. L. (1999). Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 295–312.
  - Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., y Iliakis, G. (2008).  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678-5694.
  - Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., y Chlubek, D. (2012). Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2), 195–200.
  - Kozlov, S. V., Graham, M. E., Jakob, B., Tobias, F., Kijas, A. W., Tanuji, M., y Lavin, M. F. (2011). Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9107–9119.
  - Lagunas, M., Valle, A., y Soto, 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., Pelliccioli, A., Plevani, P., y Muzi-Falconi, M. (2009). Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair*, 8(9), 1055–1067.
  - Lee, J. H., y Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26(56), 7741–7748.

- Mahmood, T., y Ping-Chang, Y. (2012). Western Blot: technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434.
- Martí, G. E., Stetler-Stevenson, M., Bleasing, J. J., y Fleisher, T. A. (2001). Introduction to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2), 93–99.
- Mateos-Nava, R. A. (2012). Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de Maestría. UNAM FES-Zaragoza, México.
- Mateos-Nava, R. A., Rodríguez-Mercado, J. J., y Altamirano-Lozano, M. A. (2017). Premature chromatid separation and altered proliferation of human leukocytes treated with vanadium (III) oxide. *Drug and Chemical Toxicology*, 40, 457-462.
- Mateos-Nava, R. A., Rodríguez-Mercado, J. J., Álvarez-Barrera, L., García-Rodríguez, M. C., y Altamirano-Lozano, M. A. (2021). Vanadium oxides modify the expression levels of the p21, p53 and Cdc25C proteins in human lymphocytes treated *in vitro*. *Environmental Toxicology*, 36(8), 1536-1543.
- Maréchal, A., y Zou, L. (2019). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5-716.
- Michibata, H. (2012). Vanadium: biochemical and molecular biological approaches. *Springer Science & Business Media*. Estados Unidos.
- Nriagu, J. P. (1998). Vanadium in the Environment, Part 2: Health Effects. John Wiley and Sons, Inc. Estados Unidos.
- Ochiai, E. (2008). Bioinorganic Chemistry. Elsevier. Estados Unidos.
- Owusu-Yaw, J., Cohen, M. D., Fernando, S. Y., y Wei, C. I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicology Letters*, 50, 327-336.
- Quah, B. J. C., y Parish, C. R. (2010). The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (44).
- Passarge, E. (2001). Color Atlas of Genetics (2nd ed.). Thieme Stuttgart.
- Pusarla, R. H., y Bhargava, P. (2005). Histones in functional diversification Core histone variants. *FEBS Journal*, 272, 5249-5268.

- Ramírez, K. (2021). Evaluación del potencial genotóxico mediante la técnica de micronúcleos en un modelo murino expuesto a la inhalación de vanadio combinado con la ingesta de sacarosa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Rehder, D. (1999). The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coordination Chemistry Reviews*, 182(1), 297-322.
- Rehder, D. (2008). Bioinorganic vanadium chemistry. John Wiley and Sons, Ltd. Estados Unidos.
- Rehder, D. (2012). The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*, 4(2012), 1823-1837.
- Rehder, D. (2015). The role of vanadium in biology. *Metallomics*, 7(5), 730–742.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Diaz, M., y González, E. (2016). Contaminación por Metales Pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66-77.
- Rodríguez-Mercado, J. J., y Altamirano-Lozano, A. M. (2006). Vanadio: Contaminación, Metabolismo Y Genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(4), 173–189.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Álvarez-Barrera, L., y Altamirano-Lozano, M. A. (2010). Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 33(1), 97-102.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Mateos-Nava, R. A., y Altamirano-Lozano, M. A. (2011). DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1996-2002.
- Rogakou, E. P., Plich, D. R., Ivanonva, V. S., y Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *Journal Biological Chemistry*, 273(10), 5858-5868.
- Rojas, E., Valverde, M., Herrera, L. A., Altamirano-Lozano, M., y Ostrosky-Wegman, P. (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutation Research*, 359, 77-84.
- Roldán, R. E., y Altamirano-Lozano, M. A. (1990). Chromosomal aberrations, sister chromatid Exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human

- lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 245, 61-65.
- Sabath, E., y Robles-Osorio, M. L. (2012). Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrología*, 32(3), 279-286.
  - Ivancsits, S., Pilger, A., Diem, E., Schaffer, A., y Rüdiger, H. W. (2002). Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 25-35.
  - Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., y Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*, (108), 73-112.
  - Su, T. T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annual Review of Genetics*, 40, 187-208.
  - Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., y Price, B. D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 8502-8509.
  - Ward, I. M., y Chen, J. (2001). Histone H2Ax is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal Biological Chemistry*, 276(51), 47759-47762.
  - Willsky, G. R., Chi, L. H., Godzala, M., Kostyniak, P. J., Smee, J. J., Trujillo, A. M., y Crans, D. C. (2011). Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), 2258-2269.
  - World Health Organization (WHO). (2014). 7 million premature deaths annually linked to air pollution. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/12/04/2018>.
  - Wu, J., Hong, Y., y Yang, X. (2016). Bis (acetylacetonato)-oxidovanadium (IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer ASPC-1 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, (21), 919-929.

- Yang, J., Zhang, Z., Jiang, S., Zhang, M., Lu, J., Huang, L., y Shao, G. (2016). Vanadate-induced antiproliferative and apoptotic response in esophageal squamous carcinoma cell line EC109. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, (79), 864-868.
- Zhang, Z., Huang, C., Li, J., y Shi, X. (2002). Vanadate-induce cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 89(1-2), 142-148.
- Zhang, Z., Gao, N., He, H., Huang, C., Luo, J., y Shi, X. (2004). Vanadate active Akt and promoted S phase entry. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1-2), 227-237.
- Zhong, B. Z., Gu, Z. W., Wallace, W. E., Whong, W. Z., y Ong, T. (1994). Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*, 321(1-2), 35-42.