



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

“Las metalotioneínas y el daño oxidante al ADN inducido por trióxido de vanadio”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

Adair Aleksander Beltrán Flores

DIRECTOR DE TESIS: **Dr. Juan José Rodríguez Mercado**

ASESOR: **M. en C. Víctor Alán Alcántara Mejía**

ASESOR: **Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava**



México, Ciudad de México, 22 de mayo de 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.

AGRADECIMIENTOS



Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, responsable de la Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), en el laboratorio de Toxicología Genética localizado en el piso 1, del edificio de la UMIEZ de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, UNAM. Contó con la asesoría del M. en C. Víctor Alán Alcántara Mejía y del Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, así como con el apoyo de la UNAM a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, 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: **BELTRAN FLORES ADAIR ALEKSANDER** con número de cuenta **315326749** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **22 de Mayo de 2024** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE DRA.	ALVAREZ BARRERA LUCILA	<i>Alvarez Barrera Lucila.</i>
VOCAL DR.	RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	<i>Juan José R. M.</i>
SECRETARIO DR.	MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL	<i>[Firma]</i>
SUPLENTE MTRA.	LOPEZ LOPEZ ALMA BELLA	<i>[Firma]</i>
SUPLENTE M. EN C.	ALCANTARA MEJIA VICTOR ALAN	<i>[Firma]</i>

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Las metalotioneínas y el daño oxidante al ADN inducido por trióxido de vanadio

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 CDMX, a 5 de Abril de 2024

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ 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 Originality, con 10 % de coincidencia, 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 Adair Aleksander Beltrán Flores con número de cuenta 315326749, 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 5 de abril de 2024

Dr. Juan José Rodríguez Mercado
Director del trabajo escrito.



**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:

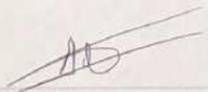
Las metalotioneínas y el daño oxidante al ADN inducido por trióxido de vanadio

que presenté para obtener el título/grado de: **Biólogo**,

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


Adair Aleksander Beltrán Flores

NOMBRE Y FIRMA

315326749

NÚMERO DE CUENTA

Agradecimientos

A la UNAM, por ser quien forjó en mi persona el carácter profesional y por darme todo el conocimiento a través del personal académico y los compañeros que me ayudaron a que mi estadía en la carrera fuese más amena y enriquecedora.

Al laboratorio de investigación UNIGEN por brindarme la confianza y las herramientas para lograr este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado que a su vez fueron quienes me enseñaron y se dieron el tiempo y la dedicación en mi formación académica.

Al maestro Víctor por su profesionalismo y su capacidad para instruirme en todo momento.

Al Dr. Juan por confiar en mi potencial y ser quien me diera la bienvenida al laboratorio.

Al Dr. Aníbal por ser un guía tanto en el aula como en el laboratorio.

A la Dra. Lucila por sus consejos y su comprensión que ayudaron en mi formación y crecimiento personal.

A la maestra Alma por ser la primera profesora que confió en mí al iniciar la carrera y por aceptar ser parte de mi jurado.

Al Dr. Mario que fue quien me ayudó a entrar al laboratorio y quien compartió conmigo su conocimiento durante las clases.

Dedicatorias

Esta tesis va dirigida hacia todas las personas que siempre se preocuparon por mis estudios y que de una u otra forma siempre me apoyaron.

Quiero agradecer a Dios y a Jesús por brindarme vida y el conocimiento para poder realizar este trabajo y sobre todo por poner en mi camino a todas aquellas personas que contribuyeron para que pudiera realizarla.

Gran parte de esta tesis la hice con la ayuda de una de las personas más importantes de mi vida, mi madre Silvia que siempre vio la forma de apoyarme y que en ningún momento dejó de alentarme, de aconsejarme y en ciertas ocasiones de regañarme y enseñarme que siempre debo aprender a escuchar a los demás y ser agradecido. Mi querida madre, esta tesis también es tuya por que siempre has estado conmigo, muchas gracias.

Gracias a mi padre David que nunca dudo de mi potencial y que siempre me ha enseñado lecciones de vida y que ha sido mi guía en muchos aspectos de mi vida, gracias, yo sé que todo lo que he vivido contigo me ha ayudado a ser la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos Karen y Miguel, que son mi motor para seguirle echando todas las ganas del mundo y que siempre me demuestran su cariño de tantas formas y que me hacen ser una mejor persona siempre, los quiero infinitamente. Confío y sé que serán mejor que yo, porque tienen todo el potencial para lograr todo lo que se propongan y ahí estaré yo para apoyarlos en todo lo que se propongan.

A mi tío Pablo quiero darle gracias por todas las veces que me ayudó y que siempre me preguntaba que tal me iba en la escuela, a mi tía Bety que siempre confió en mí y que una vez me dijo que siempre me veía usando bata, ¡Sí se pudo tía!

Para mis amigos que siempre estuvieron conmigo en las buenas y las malas, gracias Miguel y Hristo, espero que continúen conmigo muchos años más. Para mi queridísima Paty gracias por ser un rayo de luz durante toda la pandemia y por ser mi confidente, te quiero bastante. A mis amigos de la prepa, Paola, Alma, Nayelli, Lupe, Luis, Miguel Ángel, todos ustedes me ayudaron a crecer y me hicieron entender el significado de la palabra amigo, un abrazo en donde quiera que estén.

A mis amigos de la universidad Diana y Adolfo de verdad que los momentos que compartí con ustedes los llevaré siempre conmigo y que los considero de mis mejores amigos, a mí queridísima Karen quien fue de mis primeras amigas, a mi amiga y compañera de incontables aventuras Moni que de no ser por ti andaría aún más perdido, a mis amigos Asahel, Adrián e Irán que estuvieron conmigo, a mi amigo Ángel que siempre confió en mí, a mi amiga Kas que me enseñó lo que es la nobleza de la gente, a Andy por su apoyo dentro y fuera de clases, a mi socia Natali por tan bonita amistad, a mis queridos Andrés y Fabiola por su honestidad, a mi amigo Arturo quien siempre me aconsejó, y en general de todos mis amigos y compañeros que tuve a lo largo de la carrera y que de una u otra forma me ayudaron a llegar en donde estoy, les deseo éxito.

A mis alumnos Francisco, Martha y Cristian por confiar en mi y tenerme paciencia, a mis camaradas América, Layla, Yeray, Naomi, Valeria y Corina por ayudarme a practicar mis ponencias, a mis odontólogas(os) Iris, Shalom, Andy, Lore, Gisel, Rogelio y Edher por escucharme y apoyarme y mis criminalistas Nesly, Laura, Miriam, Axel y María.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Francisco, los Erick's, Keyla, Lezama, Yareni, Bryan, Alejandra, Joana y Mariana, gracias por todos sus consejos y su paciencia.

A toda la gente que a lo largo de mis trabajos siempre se preocuparon por mis estudios, no me queda más que agradecerles y desearles mis mejores deseos a Pedro, Yesi, Areli, don Jaime, Norma, Gaby, Pablito, Chucho, Luis y Oscar.

A mi asesor, al maestro Víctor porque nunca dejó de apoyarme en todos los sentidos, por la paciencia que me tuvo a lo largo de todos estos años y por brindarme todas las herramientas y forjar en mi una personalidad fuerte y capaz de lograrlo todo. Eres mi asesor, pero también te considero como mi hermano mayor y créeme que todos tus consejos los he tomado en cuenta. Quiero que sepas que contarás conmigo siempre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades del vanadio	1
1.2. Exposición a vanadio.....	2
1.2.1. Efectos del V sobre el ADN	3
1.2.2. Efectos del V sobre el ARN	5
1.2.3. Efectos del V sobre las proteínas	6
1.3. Estrés oxidante y V.....	7
1.4. Metalotioneínas	8
1.5 Electroforesis Unicelular en Gel	10
1.5.1 Ensayo cometa: generalidades	11
1.5.2. Uso de enzimas para la de detección de bases oxidadas en el ADN.....	12
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos particulares	15
V. MATERIAL Y MÉTODO	15
5.1. Obtención de linfocitos	15
5.2. Tratamiento	15
5.3. Viabilidad.....	16
5.4. Extracción de ARN	16
5.4.1. Pureza del ARN.....	17
5.4.2. Integridad del ARN	17
5.4.3. RT-PCR.....	17
5.5. Ensayo cometa.....	18
5.5.3. Detección de bases oxidadas con la enzima FPG	19
5.5.4. Lectura de cometas al microscopio de fluorescencia	20

5.5.5. Análisis estadístico	20
VI. RESULTADOS	21
VII. DISCUSIÓN	28
VIII. CONCLUSIONES	31
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ABREVIATURAS

ACe	Aberraciones cromosómicas estructurales
ACn	Aberraciones cromosómicas numéricas
APB	Agarosa de bajo punto de fusión
APN	Agarosa de punto normal de fusión
AS	Asociaciones de satélites
BE	Bromuro de etidio
CdCl ₂	Cloruro de cadmio(II)
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína, mezcla de isómeros
EndoIII	Endonucleasa III
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FPG	Formamidopirimidin-ADN-glicosilasa
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ VO ₄ ⁻	Ion dihidrógenotetraoxovanadato (V)
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IDD	Índice de daño en el ADN
IR	Índice replicativo
MN	Micronúcleo
MT	Metalotioneína(s)
NaVO ₃	Metavanadato de sodio
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NH ₄ VO ₄	Metavanadato de amonio
•O ₂ ⁻	Anión superóxido
•OH	Radical hidroxilo
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
RCD	Rompimientos de cadena doble
RCS	Rompimientos de cadena sencilla
VCl ₃	Tricloruro de vanadio
VOSO ₄	Sulfato de vanadilo
V ₂ O ₃	Trióxido de vanadio
V ₂ O ₄	Tetraóxido de vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio

RESUMEN

El vanadio (V) es un metal cuyos estados de oxidación más frecuentes son +5, +4 y +3. Puede ser liberado de manera natural mediante emisiones volcánicas, incendios forestales y aerosoles marinos. Además, se dispersa a través de actividades antropogénicas, entre las que se encuentran la quema de combustibles fósiles, la fabricación de herramientas y la producción de prótesis ortopédicas. Esto implica una exposición constante para la población humana.

Varios estudios demuestran que los óxidos de V (V_2O_5 , el V_2O_4 y V_2O_3) ejercen efectos citotóxicos y genotóxicos; sin embargo, no se han profundizado respecto al tipo de daño en el ADN, en particular con el trióxido de vanadio (V_2O_3), donde las investigaciones aún no son concluyentes. Las proteínas metalotioneínas (MT) desempeñan funciones antioxidantes en respuesta a la presencia de metales entre los cuales están el cadmio (Cd) o el zinc (Zn), por mencionar algunos. En este contexto, no se conoce si la presencia de V promueve la síntesis de las MT. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis fue determinar *in vitro* la expresión de MT y el daño en el ADN por estrés oxidante inducido por V_2O_3 en el modelo de linfocitos humanos.

Los linfocitos humanos fueron tratados con 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 durante 24 h para determinar la expresión génica y de 2 h para el daño en el ADN. Mediante RT-PCR se amplificó el gen *MT-1X* y se obtuvo la intensidad relativa. Por otro lado, con el ensayo cometa se estimó el daño en el ADN por bases oxidadas empleando la enzima de restricción formamidopirimidin ADN-glicosilasa (FPG).

Los resultados mostraron una modificación de los niveles de expresión de las *MT-1X* en los tratamientos con 4–16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 ($p < 0.05$). Los datos del ensayo cometa revelaron daño en el ADN en todas las concentraciones probadas y aumento en el mismo con el uso de la FPG ($p < 0.05$). Lo anterior indica que el V_2O_3 induce estrés oxidante en los linfocitos humanos que conduce a daño en el ADN, oxidando las bases nitrogenadas, y activando procesos de desintoxicación modificando la expresión de *MT-1X* posiblemente como respuesta antioxidante y para unirse al V.

ABSTRACT

Vanadium (V) is a metal whose most frequent oxidation states are +5, +4 and +3. It can be released naturally through volcanic emissions, forest fires and marine aerosols. It is also dispersed through anthropogenic activities, including the burning of fossil fuels, the manufacturing of tools and the production of orthopedic prostheses. This implies a constant exposure of the human population.

Several studies show that V oxides (V_2O_5 , V_2O_4 and V_2O_3) exert cytotoxic and genotoxic effects; however, the type of DNA damage has not been studied in depth, particularly with vanadium trioxide (V_2O_3), where the research is still inconclusive. On the other hand, the metallothionein (MT) proteins perform antioxidant functions in response to the presence of metals including cadmium (Cd) or zinc (Zn), to name a few. In this context, it is not known whether the presence of V promotes MT synthesis. Therefore, the objective of this thesis was to determine the *in vitro* MT expression and DNA damage by V_2O_3 -induced oxidative stress in the human lymphocyte model.

Human lymphocytes were treated with 2, 4, 8 and 16 $\mu\text{g/mL}$ V_2O_3 for 24 h to determine gene expression and 2 h for DNA damage. By RT-PCR, the MT-1X gene was amplified and the relative intensity was obtained. However, the comet assay was used to estimate DNA damage by oxidized bases using the restriction enzyme formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG).

The results showed a modification of MT-1X expression levels in treatments with 4-16 $\mu\text{g/mL}$ V_2O_3 ($p < 0.05$). Comet assay data revealed DNA damage at all concentrations tested and increased DNA damage with the use of FPG ($p < 0.05$). The above indicates that V_2O_3 induces oxidative stress in human lymphocytes leading to DNA damage, oxidizing nitrogenous bases, and activating detoxification processes modifying the expression of MT-1X, possibly as an antioxidant response and to bind to V.

I. INTRODUCCIÓN

La exposición ambiental a diferentes agentes y sustancias que provienen de los desechos industriales, los residuos de actividades agrícolas, la combustión de hidrocarburos o descargas domésticas constituyen problemas de salud pública en el mundo (Tirado-Amado *et al.*, 2015; Vinod *et al.*, 2020).

Entre los diferentes elementos a los que se exponen las poblaciones humanas destacan los metales (Tirado-Amado *et al.*, 2015), que son liberados de manera natural a través de la erosión de los suelos, las emisiones volcánicas, incendios forestales y aerosoles marinos, **Figura 1** (Schlesinger *et al.*, 2017), entre estos se encuentra vanadio (V).

1.1. Generalidades del vanadio

El V se encuentra ampliamente distribuido tanto en la naturaleza como en los sistemas biológicos, siendo de los elementos metálicos más abundantes en los combustibles fósiles. Ubicado en el grupo 5 de la tabla periódica de los elementos químicos, posee número atómico de 23 y masa atómica de 50.95 g/mol. En los sistemas biológicos, exhibe estados de oxidación principales de +3, +4 y +5 (Gustafsson, 2019).

Ocupa el lugar 21 de los elementos mayormente presentes en la corteza terrestre, y se puede hallar en aproximadamente 65 minerales (Gustafsson, 2019). Se ha reportado la producción de 130 000 toneladas anuales (Monakhov *et al.*, 2004) y con respecto a la concentración de V en la corteza terrestre se han reportado en promedio 100 µg/g de peso seco, aunque no de forma elemental, más bien combinado con otros elementos para conformar minerales (IPCS, 1988).

Su alta demanda en los últimos años se debe a sus diferentes aplicaciones, entre las que destacan la elaboración de herramientas, prótesis ortopédicas, maquinaria, usos medicinales o derivados del petróleo (Fortoul *et al.*, 2011; Scibior *et al.*, 2020). El V se libera en el medio ambiente por la quema de combustible fósil, reacciona con el oxígeno para formar óxidos, los cuales son el trióxido de V (V_2O_3), el tetraóxido de V (V_2O_4) y el pentóxido de V (V_2O_5) (Venkataraman y Sudha, 2005).

1.2. Exposición a vanadio

La mayoría de los alimentos contienen cantidades de V que van de 0.01 a 0.02 mg/Kg, entre los que se encuentran los erizos de mar, ascidias, holoturias, ostras y calamares. Las cantidades de V aumentan en suplementos nutricionales (0.0004 a 12.5 mg/Kg), en carnes (0.4 ng/g), leguminosas (<0.4 ng/g), cereales (10 ng/g), hígado (38 ng/g), pescado (10 ng/g), espinacas (35 ng/g) y hongos (50–2000 ng/g) (ATSDR, 2012; Miramand y Fowler, 1998; Byrne y Kosta, 1977). Se ha reportado que la ingesta diaria en la dieta oscila entre 10–20 µg/día para mujeres y de 20–35 µg/día para hombres en México y Alemania (Anke, 2004).

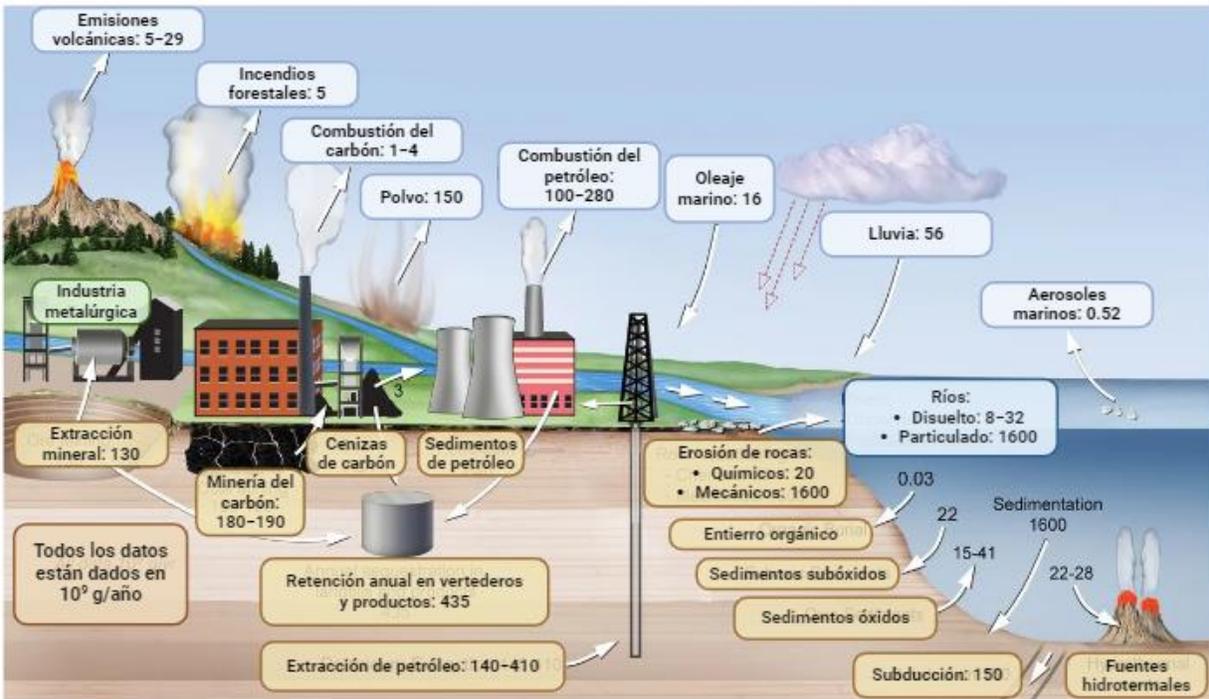
La otra ruta de exposición es a través del aire, se ha registrado concentraciones de V en aire de 0.001 µg V/m³ (WHO, 2001). La principal fuente de contaminación ambiental deriva de la combustión incompleta del petróleo, los reportes de las cantidades de V para el petróleo athabasca de Canadá y el petróleo maya de México son de 640 y 243 mg/Kg, respectivamente (según Funk y Gómez, 1977; Hernández y Rodríguez, 2011). Asimismo, este metal se encuentra en el humo del cigarrillo, su contenido es aproximadamente 0.0004 mg de V por cigarrillo (ATSDR, 2012).

Algunos estudios asocian al V dentro de la materia particulada (PM). En la ciudad de México, reportes mencionan niveles de este elemento que oscilan los 0.114 µg/m³ para la PM de 10 µm o 0.093 µg/m³ para la PM de 2.5 µm (Espinoza-Zurutuza *et al.*, 2018) y así aumenta la probabilidad de contraer asma bronquial y otras enfermedades respiratorias (Tu *et al.*, 2023). Del mismo modo, Niu y colaboradores (2020) en la región de Beijín, China evaluaron el efecto de la PM en la línea celular 16HBE (células de epitelio bronquiales de humano) y observaron la presencia de micronúcleos, rompimientos de la cadena de ADN y bases oxidadas.

El cuerpo absorbe el V del aire a través de la inhalación de la PM, siendo la principal ruta de entrada responsable del 25 % del V absorbido. La ingestión, por otro lado, contribuye con un 10 % en la absorción (Yu y Yang, 2019). En la sangre las concentraciones de V son bajas, y se presentan como anión vanadato, H₂VO₄⁻ (Costa-Pessoa y Tomaz, 2010) y su unión con la albúmina o la transferrina (Tf) facilita su transporte a los diferentes tejidos del cuerpo (Mukherjee *et al.*, 2004); donde sus cantidades son cercanas a los 10

μM (Chasteen, 1986). Se acumula en el hueso, riñón, hígado, pulmones, bazo, testículos, piel, por mencionar algunos (Nielsen, 1995). El V puede entrar a la célula mediante endocitosis (Levina y Lay, 2017, 2020) para acumularse en el núcleo, mitocondria, microsomas y en el citosol de las células (Sakurai, 1994).

El ciclo biogeoquímico del V adaptado a las condiciones actuales



(Schlesinger, *et al.*, 2017)

Created in BioRender.com

Figura 1. El ciclo biogeoquímico del V adaptado a las condiciones actuales, los datos se presentan como 10^9 g/año, a partir de la extracción de carbón, y de las estimaciones del aumento de este, se calcula que la extracción de V asociada a la minería del carbón ha aumentado (modificado de Schlesinger *et al.*, 2017).

1.2.1. Efectos del V sobre el ADN

El V se ha evidenciado por tener el potencial para inducir efectos adversos en el ADN. Los compuestos con estado de oxidación +5 como metavanadato de amonio (NH_4VO_3), vanadato de sodio (NaVO_3) y el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) producen células binucleadas en linfocitos humanos en concentraciones que van de 10–80 μM por 24 h de

exposición. El NH_4VO_3 en concentraciones de 40–80 μM , el NaVO_3 en tratamientos de 20–80 μM y Na_3VO_4 en la concentración de 80 μM inducen intercambio de cromátidas hermanas (ICH). El NH_4VO_3 en la concentración de 5 μM , el NaVO_3 con 20 μM y el Na_3VO_4 en 20–40 μM incrementan las asociaciones de satélites (AS) entre los cromosomas acrocéntricos (Migliore *et al.*, 1993).

El V_2O_5 ha mostrado la capacidad de aumentar la frecuencia de las AS en linfocitos humanos expuestos por 24 h en concentraciones de 4 y 6 $\mu\text{g/mL}$ (Roldán y Altamirano, 1990). En la línea celular de fibroblastos de pulmón de criceto chino (V79) la exposición durante 24 h con V_2O_5 en concentraciones de 1–12 $\mu\text{g/mL}$, incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (ACn) y de micronúcleos (MN) (Zhong *et al.*, 1994). Mientras que, en leucocitos humanos expuestos a concentraciones de 0.3, 30 y 3000 μM de V_2O_5 durante 48 h el daño al material genético se evidenció por la inducción de rompimiento de cadena sencilla (RCS) (Rojas *et al.*, 1996). El mismo compuesto en concentraciones de 0.001, 0.01 y 0.1 μM indujo la formación de ACn en linfocitos humanos expuestos por 24 h (Ramírez *et al.*, 1997). Por su parte, Kleinsasser *et al.*, (2003) encontraron en linfocitos humanos y células de mucosa de tracto digestivo tratados por 1 h con V_2O_5 (0.06–0.047 mM) provocan RCS en el ADN.

Los efectos genotóxicos del V^{5+} también se han observado en sistemas de prueba *in vivo*. El V produce RCS en el ADN en células de diferentes órganos de ratones de la cepa CD–1 después de la administración intraperitoneal de 5, 75, 11, 50 o 23 mg de $\text{V}_2\text{O}_5/\text{Kg}$ por 24 h; por ejemplo, en células de hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón, testículo y médula ósea incrementa la longitud de los cometas y la cantidad células dañadas, siendo hígado, riñón y corazón los más susceptibles; además de que su comportamiento tóxico es dependiente de la dosis (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996, 1999).

Para los compuestos con estado de oxidación +4 como el sulfato de vanadilo (VOSO_4) se ha observado que induce MN en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis en concentraciones de 10–80 μM e incrementa la frecuencia de ICH y ACn en concentraciones de 40–80 y 5–40 μM , respectivamente (Migliore *et al.*, 1993). Otro ensayo, con el mismo modelo *in vitro*, se observó que el V_2O_4 puede inhibir el IM y la modificación del índice replicativo (IR) en concentraciones de 4–16 $\mu\text{g/mL}$ con la

exposición de 24 h (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003); además de inducir rompimiento cromatídicos y formación de fragmentos acéntricos y dicéntricos a concentraciones de 2–8 µg/mL (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010) y en concentraciones de 8 µg/mL por 4 h rompimientos de cadena doble (RCD) en el ADN evaluado con el ensayo cometa (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011).

Con relación a los compuestos en estado de oxidación +3, en leucocitos de sangre periférica tratados con V₂O₃ en concentraciones de 1–8 µg/mL por 2, 4 y 6 h aumento la migración en el ADN en la cauda debido a RCS (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). En otros modelos, como en células V79 el V₂O₃ induce ICH y ACE en concentraciones de 16, 23 y 25 µg/mL (Owusu-Yaw *et al.*, 1990). En un estudio realizado por Caicedo *et al.*, (2007) dilucidaron que el V³⁺ genera daño en el ADN, determinado por el índice de daño en el ADN (IDD), esto a partir de haber tratado linfocitos T de la línea Jurkat con 0.05 y 0.1 mM de VCl₃ por 48 h.

Recientemente, se informó que la administración de 4.22, 8.46 y 16.93 mg/Kg de V₂O₃ a ratón CD-1, aumenta la frecuencia de las aberraciones cromosómicas estructurales (ACe) y produce alteración en la división celular (Álvarez-Barrera *et al.*, 2023).

1.2.2. Efectos del V sobre el ARN

El V puede modificar los niveles de expresión del ARNm. En cultivos de células C127 de ratón, derivadas de un tumor mamario, el NaVO₃, de 5–10 µM aumenta los niveles de ARNm de *actina* y *c-Ha-ras* hasta cuatro veces los valores de control (Yin *et al.*, 1992).

El V₂O₅ en fibroblastos pulmonares humanos adultos normales (ATCC 16 Lu) durante 24 h a concentración de 10 µg/cm² alteró más de 1400 genes, en su mayoría fueron suprimidos (1100) y el resto (300) fueron inducidos. Entre los genes que presentan expresión diferencial están los relacionados con la regulación de la transcripción, procesamiento del ARN, ciclo celular, respuesta de daño al ADN, reparación del ADN, transporte del ARN, muerte celular programada, detención del ciclo celular e incluso genes de respuesta al estrés oxidante (Ingram *et al.*, 2007).

Un estudio realizado sobre la expresión del ARNm de las ciclinas *D* y *E*, y de sus respectivas *CDK2* y *CDK4* muestran disminución en los niveles de expresión en linfocitos

humanos cultivados y tratados por 48 o 72 h con V_2O_3 en concentraciones de 2–16 $\mu\text{g/mL}$ (Alcántara-Mejía, 2021).

1.2.3. Efectos del V sobre las proteínas

El V tiene la capacidad de inhibir la actividad de ribonucleasas, diferentes ATPasas, fosfatasa y cinasas, así como imitar los efectos de la insulina y elevar los niveles de *cAMP* en mamíferos, lo cual se asocia con su actividad en las proteínas (Crans *et al.*, 1989, 2004).

El Na_3VO_4 inhibe la actividad de la proteína tirosina fosfatasa causando 90 % de formación pronuclear, exocitosis de gránulos corticoides e induce disminución de la actividad de la proteína cinasa activada por mitógeno con 1 mM durante 7 h en ovocitos de cerdo (Kim *et al.*, 1999). En células de ratón epidérmicas JB6 P⁺ de la línea celular (Cl 41) la aplicación de 200 μM de V_2O_5 por 36 y 48 h induce sobreexpresión de la proteína p53 (Huang *et al.*, 2000), en tanto que en linfocitos humanos expuestos por 24 h disminuye los niveles de expresión de p21 en concentraciones de 4 $\mu\text{g/mL}$ y p53 en 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$, e incrementa la expresión de Cdc25C en la concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$ (Mateos-Nava *et al.*, 2021).

El V_2O_5 en linfocitos humanos expuestos por 48 h disminuye la expresión de la proteína cdk4 en concentraciones que van desde los 2–16 $\mu\text{g/mL}$, también disminuye la cantidad de ciclina D1 en la concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$; pero induce la sobreexpresión de la ciclina E y de la cdk2 en todos los tratamientos (Mateos-Nava, 2012).

En queratinocitos humanos (HaCaT), los tratamientos con VOSO_4 inhiben la proliferación e inducen apoptosis de manera dependiente de la concentración (25–1000 μM), donde dicha inhibición se asocia con la regulación a la baja de las ciclinas D1 y E, E2F1 y los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina p21^{Cip1/Waf1} y p27^{Kip1}, en concentraciones mayores a 50 μM (Markopoulou *et al.*, 2009).

En linfocitos humanos expuestos a V_2O_4 por 24 h, se afecta a la síntesis de las proteínas p53 y Cdc25C, para p53 se muestra sobreexpresión en concentraciones de 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$, mientras que Cdc25C disminuyen sus niveles en los tratamientos de 2, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ (Mateos-Nava *et al.*, 2021).

Son limitados los estudios relacionados con el V^{3+} . En cultivos de linfocitos humanos, el tricloruro de vanadio (VCl_3) aumentó los niveles de la proteína p21 en tratamientos de 32 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 y 72 h de exposición, así como de la proteína p53 a las 48 h (Guzmán-Reyes, 2019). Por su parte, el V_2O_3 disminuye los niveles de expresión de las ciclinas D y E en concentraciones de 16 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h, mientras que para el caso de la cdk4 disminuye su expresión en 2 y 16 $\mu\text{g/mL}$ y la cdk2 en las concentraciones de 2, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, en 48 h de exposición aumentó la ciclina D y la cdk2 en 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$ y, la ciclina E en 8 $\mu\text{g/mL}$ (Alcántara-Mejía, 2017). Además, se ha demostrado que este compuesto aumenta los niveles de p21 en 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h de exposición (Mateos-Nava *et al.*, 2021).

1.3. Estrés oxidante y V

Se conoce que la oxidación del ADN es uno de los tipos más comunes y ocurre por factores endógenos o inducida por xenobióticos. El estrés oxidante es provocado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen de forma natural en las células debido a procesos metabólicos que involucran al O_2 , para cumplir funciones de moléculas mensajeras que regulan procesos entre los que se encuentran la proliferación, la diferenciación, muerte celular por apoptosis (Shmidt *et al.*, 2015; Di Meo *et al.*, 2016) y en la respuesta inmune contra agentes biológicos externos por medio del proceso inflamatorio (Mittlal, 2014). Así mismo, se logran generar mayor cantidad de estas por diferentes agentes que incluyen la radiación ionizante o UV, solventes orgánicos, químicos y por la presencia de metales (Azqueta *et al.*, 2009).

Se tiene información que ha demostrado que el V aumenta la producción de ERO (Narla *et al.* 2000). Dentro de los mecanismos descritos, el metal entra en las reacciones de óxido-reducción para promover la síntesis de estas, una de ellas es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es formado por la dismutación de radicales de anión superóxido ($\bullet O_2^-$), quienes son generados por la enzima NADPH (Crans *et al.*, 2004).

El V^{5+} dentro de la célula se reduce a V^{4+} por GSH, las catecolaminas o al unirse a moléculas como NAD^+ o ADP. Debido a que los iones de vanadato son de estructura similar a los aniones fosfato actúan inhibiendo cinasas y fosfatasas (Crans *et al.*, 2004).

Por su parte, el V^{4+} reacciona con el H_2O_2 y produce radicales ($\bullet OH$) que oxidan biomoléculas.

En un trabajo realizado por Wang *et al.*, (2003) se estudiaron los efectos del V en ratones macho BALB/cJ al administrar $NaVO_3$, los macrófagos alveolares mostraron la formación de ERO que incluían radicales H_2O_2 , O_2^- y $\bullet OH$. Al emplear el mismo compuesto en células de hígado de ratas Wistar en concentraciones de 25–200 μM indujo el progreso de la formación de ERO en la mitocondria, oxidación del glutatión (GSH) y modificar el potencial de la membrana de la mitocondria (Hosseini *et al.*, 2013), previamente los ensayos evidenciaron aumento del H_2O_2 que proviene de la mitocondria (Shaki *et al.*, 2012). Otra investigación ha demostrado que en células pancreáticas humanas de la línea AsPC-1 el $NaVO_3$ tiene la capacidad de detener el ciclo celular en la fase G_2/M a través de la producción de ERO (Wu *et al.*, 2016).

Con respecto al V_2O_5 en células de ratón C127 este compuesto genera H_2O_2 que inhibe las catalasas en concentraciones de 60–200 μM durante 5 h de exposición (Yin *et al.*, 1992). También aumenta la producción de H_2O_2 en la línea celular JB6 de ratón en una concentración de 200 μM en tiempos de exposición de 36 y 48 h (Huang *et al.*, 2000). Un estudio realizado por Ngwa *et al.*, (2009) ha demostrado que el mismo compuesto aumenta la cantidad de H_2O_2 en células neuronales mesencefálicas productoras de dopamina (N27) en concentraciones de 30–300 μM durante 12 h.

Se tiene registro que el VCl_3 provoca la síntesis de ERO y aumenta la actividad del superóxido mieloperoxidasa (MPO) en neutrófilos humanos expuestos a concentraciones de 1 a 25 mM durante 6 h (Fickl *et al.*, 2006). En células espermáticas de salmón la administración de 75 μM de VCl_3 produce la oxidación de bases 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, 8-OHdG (Lloyd *et al.*, 1998) y desde el punto de vista bioquímico, que el V_2O_3 se oxida en presencia de H_2O_2 para formar vanadilo (VO^{2+}) y $\bullet OH$ (Du y Espenson, 2005), el cual escinde la cadena de ADN.

1.4. Metalotioneínas

Las células expuestas a metales conducen a la expresión de genes con diferentes productos proteicos, entre los que se encuentran las metalotioneínas (MT), las cuales se unen a iones metálicos. Las MT, son un grupo de proteínas ricas en cisteínas (poseen el

dominio determinado para el sitio de unión con los metales), en mamíferos están formadas por cerca de 61–68 aminoácidos, dependiendo su isoforma donde MT-1, MT-2 y MT-4 cuentan con 61–62 aminoácidos y MT-3 con 68 (Vasak y Meloni, 2011). En humanos los genes de las MT se ubican en la región q13 del cromosoma 16 (Subraminian y Deepe, 2017).

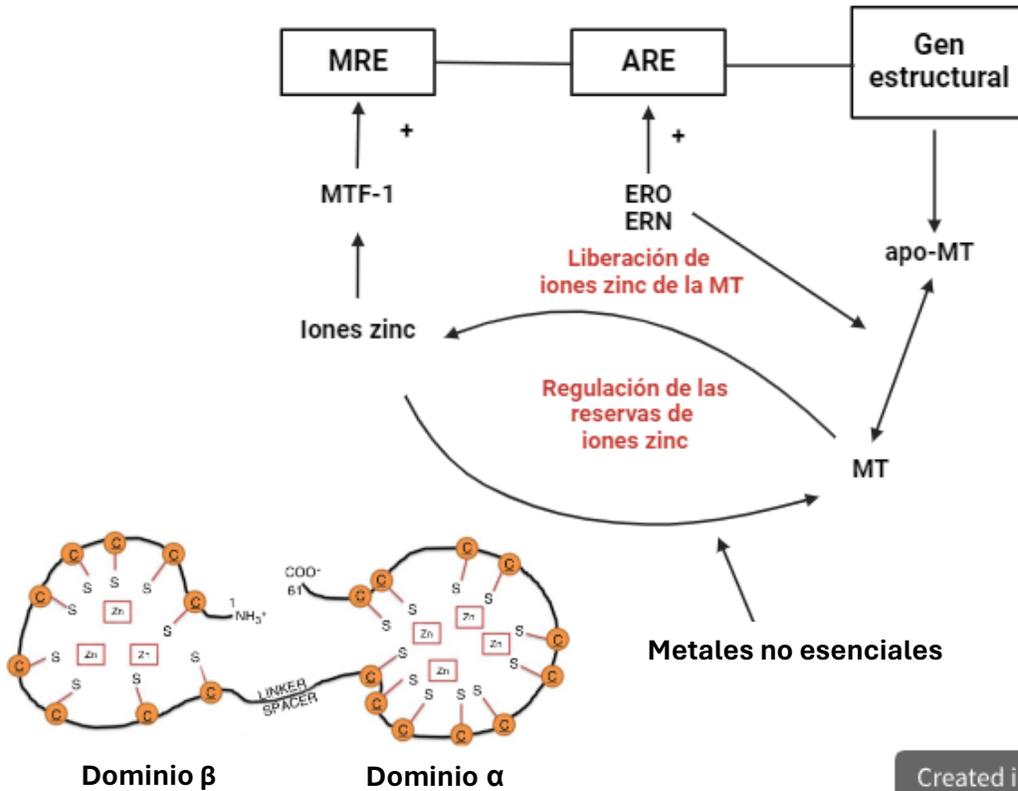
La familia de las MT-1 está conformada por 7 genes (*MT-1A*, *-1B*, *-1E*, *-1F*, *-1G*, *-1H* y *-1X*) y 6 pseudogenes (*MT-1C*, *-1D*, *-1I*, *-1J*, *-1K* y *-1L*), los cuales tienen un perfil específico responsable de innumerables procesos metabólicos tales como la conversión de energía, respiración celular, la fotosíntesis y regulan la expresión génica. Además, se ha señalado que tienen participación en activación y unión de sustratos, transporte, almacenamiento y son catalizadores (Varshney *et al.*, 1986).

Los genes constan de 3 exones que codifican el dominio α (exón 1) y el dominio β (exones 2–3). Los mecanismos reguladores de la isoforma MT-1 es de las más conocidas a la fecha. Evidencias muestran que esta isoforma es inducible por varias sustancias y agentes, por ejemplo, metales no esenciales, ERO y ERN. De hecho, se han observado varios elementos de respuesta a metales (MRE) y elementos de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de los genes de la MT-1 (Dziegiel *et al.*, 2016).

Los iones metálicos, especialmente los iones zinc (Zn) que se encuentran de forma natural en el organismo, parecen ser los inductores más potentes de la expresión de esta proteína. Estudios han dilucidado que se unen al factor de transcripción regulador de metales (MTF-1), que interactúa con el promotor MRE lo cual permite el inicio de la transcripción génica **figura 2** (Dziegiel *et al.*, 2016).

Xiu-Li *et al.*, (2006), al evaluar la expresión por RT-PCR de genes de las *MT-1* en linfocitos humanos de sangre periférica tratados con dicloruro de cadmio (CdCl_2) en concentraciones de 10, 20, 40 y 80 μM del compuesto encontraron que se incrementan los niveles de expresión de *MT-1A*, *-1E*, *-1F*, *-1G*, *-1H* y *-1X*, pero no de *MT-1B*. Además, de que se expresan de manera diferencial dependiendo de la concentración y tiempo de exposición, donde *MT-1A* respondió lentamente a 40 μM y *MT-1G* respondió más rápidamente a la concentración de 10 μM . Lo anterior indica que los niveles de expresión de estas MT tienen función de bioindicador de exposición al Cd y a otros metales.

Mecanismo de activación de las MT



Created in BioRender.com

Figura 2. Posible mecanismo de la regulación de los genes de las metalotioneínas (MT). En **a)** se observa el mecanismo mediado por diferentes proteínas que son la apo-MT, apo-metalotioneína; ARE, elemento de respuesta antioxidante; MTF-1, factor-1 de transcripción regulador de metales; MRE, elemento de respuesta a metales; ERO, especies reactivas de oxígeno; ERN, especies reactivas de nitrógeno. En **b)** se representa la forma de una metalotioneína que posee dominios α y β que por lo regular retienen elementos esenciales zinc (modificado de Dziegiel *et al.*, 2016).

1.5 Electroforesis Unicelular en Gel

La electroforesis unicelular en gel a pH > 13, también llamado ensayo cometa es un método sensible para estudios genotoxicológicos en células eucariotas en estudios *in vitro* e *in vivo* y tiene aplicaciones en diferentes áreas de la investigación entre las que destacan la vigilancia medioambiental, la biocompatibilidad de los fármacos en la

población humana y la investigación fundamental sobre el daño y la reparación del ADN (Azqueta y Collins, 2013). El principio de este ensayo es que, bajo un campo eléctrico, el ADN celular que fue fragmentado (o dañado) migra fuera del nucleóide, dando la forma de un cometa con su “cabeza” y su “cauda”, respectivamente, **Figura 3** (Lu *et al.*, 2017).

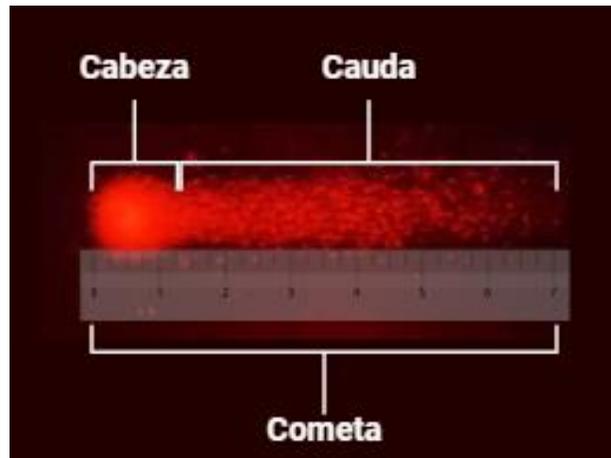


Figura 3. Cometa conformado por dos partes, la región donde se concentra el ADN integro (cabeza) y la región que muestra el daño generado en el ADN el cual es arrastrado por acción del buffer de la electroforesis unicelular. Una de las formas para evaluar los cometas es con el uso de una regla adaptada al microscopio con el objetivo 40X en unidades μm .

1.5.1 Ensayo cometa: generalidades

El ensayo cometa fue descrito y elaborado en 1984, desde esa fecha se ha seguido utilizando debido a la amplia variedad de aplicaciones que tiene, ya que es una técnica que detecta RCS, RCD y sitios álcali lábiles. Además, bajo ciertas modificaciones con el uso de enzimas de restricción se detectan daño por bases oxidadas, e incluso tipos específicos de daño como RCD (Ostling y Johanson, 1984; Olive *et al.*, 1991).

Para realizar esta metodología es necesario tener células en suspensión de forma unicelular, algunos tipos de muestras ya cuentan con estas características, no obstante, casos con muestras de tejidos o células adherentes se debe recurrir a un proceso mecánico o enzimático que permita tener células individuales. De manera general, este ensayo se divide en cuatro etapas que son:

- a. La preparación de células recién aisladas o congeladas.
- b. La elaboración de los geles de agarosa que permiten adherir las células a los portaobjetos.
- c. El proceso de lisis celular, que ayuda a resguardar exclusivamente los núcleos de las células y la aplicación de enzimas de restricción en las laminillas que contienen las células; esto último solo cuando se quieren medir parámetros como el estrés oxidante.
- d. La formación de los cometas mediante el uso de la cámara de electroforesis y el amortiguador de corrimiento que desnaturalizan el ADN y arrastran el daño inducido por los tratamientos, permite la visualización de estos con el uso de un microscopio de fluorescencia con analizador de imágenes (Collins *et al.*, 2023).

1.5.2. Uso de enzimas para la de detección de bases oxidadas en el ADN

Inicialmente, el ensayo cometa es un método que detecta la formación de RCS, RCD y sitios álcali en el núcleo de las células eucariotas (Collins *et al.*, 2023), sin embargo, la versión depende mucho del daño en el ADN que se quiera conocer, las cuales incluyen: la medición de lesiones específicas como la oxidación de bases, reconociendo la presencia de la 8-oxoG y escindirlos por las enzimas de reparación: la formamidopirimidin ADN-glicosilasa (FPG, por sus siglas en inglés) o la endonucleasa III, EndoIII (Dusinska y Collins, 1996; Evans *et al.*, 1995), y en humanos OGG1. Otra variante es el uso de enzimas bacterianas como son la 3-metiladenina (AlkD, por sus siglas en inglés) y la 3-metiladenina-ADN-glicosilasa-II (AlkA, por sus siglas en inglés) que su función es encontrar nucleobases alquiladas (Collins *et al.*, 2001; Hašplová *et al.*, 2012). Más enzimas usadas con el ensayo cometa son la T4 endonucleasa V que, es capaz de ubicar dímeros de pirimidina de ciclobutano formados en el ADN por la luz UV que es un tipo de agente físico, que inhiben la síntesis de ADN (Collins *et al.*, 1996). Hay más versiones que ayudan a detectar entrecruzamientos del ADN ocasionado por diferentes agentes químicos y biológicos, lo cual se ha demostrado que retrasa la migración del ADN durante la electroforesis (Noll *et al.*, 2006).

1.5.3. Medición del daño en el ADN

Diferentes colorantes, incluyendo fluorocromos, son los que se utilizan para teñir el ADN, de los nucleoides de las células en el ensayo cometa, dentro de los más utilizados está el bromuro de etidio (BE) que produce fluorescencia que no se desvanece fácilmente. El BE se puede utilizar para el conteo manual de cometas al microscopio de fluorescencia y para la captura de imágenes mediante el uso de analizadores de imágenes (Kumaravel *et al.*, 2009).

El conteo tradicional de los nucleoides es con el uso de microscopios de fluorescencia con filtros de 515–560 nm a 40X, en donde se suelen contabilizar 100 células (o más) y con ayuda de una regla adaptada al microscopio se mide en μm la longitud de la cabeza, la cauda y el total del cometa, los cuales son parámetros de daño (Kumaravel *et al.*, 2009). No obstante, el uso de un software puede dar otros parámetros a evaluar y para su uso en principio se toma la imagen deseada por una cámara y esta captura la intensidad de la luz emitida de cada punto del cometa, lo cual posteriormente se traduce en señales eléctricas. Esas señales se transforman en píxeles que van en una escala de grises que permite detectar en donde comienza y termina la región de la cabeza y de la cola, lo cual da resultados más confiables y puede detectar valores desde el momento de la cauda, el porcentaje de ADN en la cauda, la longitud del cometa, por mencionar algunos (Tice *et al.*, 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

La emisión de metales al ambiente ha propiciado que los seres vivos mantengan contacto de manera constante a estos agentes que tienen efectos perjudiciales en la salud humana, entre ellos está el V presente en el aire siendo el producto de la industrialización formando óxidos entre ellos el V_2O_3 del cual se conocen los efectos genotóxicos de este compuesto, los cuales se cree están relacionados con el estrés oxidante; sin embargo, se conoce poco de la expresión génica de la MT-1 como biosensor o antioxidante en presencia de V_2O_3 y el mecanismo de daño en el ADN que induce.

Por lo anterior, la pregunta de investigación es:

¿El V_2O_3 induce genotoxicidad por estrés oxidante y por modificar la expresión de genes que participan en la regulación de la toxicidad a metales?

III. HIPÓTESIS

La administración de V_2O_3 a linfocitos humanos modificará la expresión génica de las MT-1 y promoverá la oxidación de bases en el ADN.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar *in vitro* la expresión de MT-1 y el daño en el ADN por estrés oxidante inducido por V₂O₃ en el modelo de linfocitos humanos.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de expresión de las *MT-1*.
- Estimar el daño en el ADN por bases oxidadas con la enzima de restricción FPG.

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Obtención de linfocitos

Se obtuvo sangre periférica de tres donadores sanos mediante sistema Vacutainer, posteriormente se agregó por goteo en tubos cónicos que contenían 4 mL de Histopaque-10771 (Sigma-Aldrich, UK) y se centrifugaron a 1 800 rpm durante 30 min. Se obtuvieron cuatro fases en el tubo y se recolectó la zona opaca (que contiene los linfocitos), se traspasaron a tubos nuevos y se llevaron a cabo 3 lavados con PBS (Por sus siglas en inglés; solución salina amortiguadora de fosfatos) (Sigma-Aldrich, UK) en cada lavado se centrifugó a 1 500 rpm durante 15 min y se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer (Propper Lumicyte, Bright-Line, NY).

5.2. Tratamiento

Con los linfocitos de cada donador se hicieron los experimentos de manera independiente y por duplicado (n = 6). El compuesto de vanadio se disolvió en agua estéril.

Para cada experimento se cultivaron aproximadamente 8 000 000 de células en medio que contenía 3 mL de PB-MAX Karyotyping Medium (Gibco, Life Technologies Corporation, NY, USA) se les dio tratamiento de 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ (CAS No. 1314-34-7, 99.9% de pureza, Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee WI), además del grupo control (sin tratamiento) y se incubaron a 37 °C por 24 h para evaluar los niveles de expresión de las *MT-1*. Para estimar el daño en el ADN y el daño al ADN por bases oxidadas con la enzima de restricción FPG se cultivaron 400 000 células en medio que

contenía 3 mL de RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies Corporation, NY, USA) y se dieron los mismos tratamientos con el compuesto durante 2 h.

5.3. Viabilidad

La viabilidad fue evaluada al principio y después de las 24 h de tratamiento. Se preparó una solución de tinción (1:1) de bromuro de etidio (BE, 0.025 µg/mL) y diacetato de carboxifluoresceína mezcla de isómeros (CFDA por sus siglas, 0.125 µg/mL) (Sigma–Aldrich, Inc., MO, USA), se tomaron 10 µL de esta solución y se mezclaron con 10 µL de suspensión de linfocitos y se incubaron a 37 °C por 15 min. Posteriormente, se hicieron tres lavados con 1 mL de PBS y se centrifugó a 4 000 rpm durante 3 min, se tomó luego una alícuota de 10 µL la cual se puso en un portaobjetos y fueron analizadas con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon optiphot-2) con filtro de excitación 515–560 nm.

Con respecto a su determinación se contaron 100 células en donde se tomó en cuenta el número de células viables que se tiñeron de color verde debido a la actividad enzimática con la CFDA que interactúa con las esterasas e inducen la fluorescencia y aquellas que fueron no viables dieron un núcleo teñido de color rojo debido a que la membrana plasmática se encontraba comprometida y el BE se intercala en el ADN (Strauss, 1991).

5.4. Extracción de ARN

Después de los tratamientos con V₂O₃, las muestras se trabajaron a 4 °C en donde se centrifugaron a 1 500 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante y al botón se le agregaron 500 µL del reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, CA) y se resuspendió junto con las células, posteriormente se le añadieron 100 µL de cloroformo y se mezclaron en el tubo para dejarlo reposar por 10 minutos.

Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min y al término se obtuvieron 3 fases de las cuales se extrajo la fase acuosa para transferirla a tubos Eppendorf nuevos y se le adicionó 500 µL de isopropanol (para precipitar el ARN), nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min, el contenido del tubo se decantó y se dejó secar la muestra por 5 min, finalmente se dio lavado con alcohol etílico al 75 %. Por último, se centrifugó a 7 500 rpm por 15 min para decantar el sobrenadante y se mezcló con 40 µL de agua tratada dietilpirocarbonato.

5.4.1. Pureza del ARN

Para evaluar la pureza del ARN se utilizó un biofotómetro marca Eppendorf BioPhotometer 6161 con longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm para determinar la concentración de ARN y su posible contaminación con proteínas o compuestos orgánicos. Las muestras previamente se realizaron en alícuotas con 4 µL de ARN y 196 µL de agua libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 200 µL, para tener la proporción 1:50 y a su vez se preparó un blanco que contenía 200 µL de agua libre de nucleasas. El biofotómetro se calibró primero con el blanco colocando 100 µl en la celda y posteriormente se colocaron cada una de las muestras tratadas. Se obtuvo la relación de 260/280 nm donde las muestras aceptables estaban en el rango de 1.8 a 2.

5.4.2. Integridad del ARN

Para la integridad del ARN se realizó una electroforesis horizontal en donde se preparó un gel de agarosa al 1.5 % con BE para visualizar la subunidad 28s y 18s del ARN ribosomal, que representa el 85 % del ARN total.

5.4.3. RT-PCR

Para el método de la RT-PCR se siguieron las indicaciones del fabricante. Se agregó ARN total (1 µg), junto con MgCl₂ 10X (1 µL) y DNasa I (1 µL), se colocaron en agua libre de nucleasas en un volumen final de 10 µL en el tubo Eppendorf y se incubaron por 30 min a 37 °C, para posteriormente añadir 1 µL de EDTA y se incubó por 10 min a 65 °C.

Para la transcripción inversa se agregó buffer de reacción 5X (4 µL), Ribolock inhibidor de RNasas (1 µL), dNTP 10 mM (1 µL), RevertAid M-MuL V RT (1 µL) y el oligo(dT)₁₈ para centrifugar el contenido, después se incubó a 42 °C por 60 min y finalmente para concluir la reacción se calentó a 70 °C por 5 min.

Para determinar los niveles de expresión de las isoformas de la MT (Cuadro I) se realizó la mezcla con Master Mix SYBR Green/Rox (2.5 µL), MgCl₂ 10X (1 µL), dNTP 10 mM (1 µL), oligo sentido (1 µL), oligo antisentido (1 µL) y ADNc (0.5 µg) hasta un volumen final de 25 µL y las condiciones del termociclador fueron las siguientes; a 94 °C por 5 min para el paso inicial, posteriormente a 94 °C por 60 s, a 60 °C por 30 s y a 72 °C por 60 s durante 30 ciclos, finalmente se terminó con la elongación a 72 °C durante 5 min. Los

productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en el gel de agarosa al 2 %. Se utilizó como gen constitutivo al gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

Cuadro I. Oligonucleótidos empleados para la RT-PCR, longitud del producto (en pb) y temperatura de alineación (T_m).

Primer	Sentido	Variante	pb	T_m
<i>GAPDH</i> Sentido Antisentido	5' GGAGCGAGATCCCTCCAAAT 3' 3' GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG 5'	Variante 7	197	60 °C
		Variante 2	197	
		Variante 3	197	
		Variante 4	197	
		Variante 1	197	
<i>MT-1</i> Sentido Antisentido	5' TCTCCTTGCCTCGAAATGGAC 3' 3' GGGCACACTTGGCACAGC 5'	MT-1X	151	59 °C
		MT-1E	151	
		MT-1E "like"	151	
		MT-1E V2	151	
		MT-1E V1	499	
		MT-1A	151	
		MT-1M	151	
		MT-1F	193	
MT-1F V1	151			

Para conocer la especificidad de las secuencias fueron cargadas en Primer-BLAST y la base de datos mostro las variantes del mismo gen que se amplifican, lo longitud del producto y la T_m sugerida.

5.5. Ensayo cometa

Se siguió el protocolo establecido por Tice y Vázquez (1999). Brevemente, para la elaboración de la agarosa se utilizaron de dos tipos: la primera que fue agarosa de punto de fusión normal al 1 % (APN, Sigma-Aldrich, USA) en donde se pesaron 500 mg de agarosa de punto de fusión normal y se disolvió en 50 mL de PBS con ayuda del calentamiento gradual hasta llegar a los 60 °C. La segunda agarosa que fue de punto

bajo de fusión al 0.5 % (APB, Sigma, USA) se pesaron 250 mg de agarosa y se disolvieron en 50 mL de PBS en donde se hizo uso del calentamiento gradual hasta los 40 °C para diluir completamente. Los portaobjetos (o laminillas) se sumergieron en APN para así obtener la primera capa de agarosa (que sirvió posteriormente como andamiaje para la segunda y tercera capa de agarosa) y se dejaron secar por 48 h.

Después del tratamiento de 2 h con V₂O₃ las muestras se centrifugaron a 6 000 rpm durante 6 min. Luego se hizo una mezcla de 30 µL células (por tratamiento) en 210 µL de APB y de esta se vertió 70 µL en cada una de las laminillas (previamente preparadas con APN) y se dejaron reposar por 15 min en cama fría a 4 °C y se repitió el mismo proceso para agregar una tercera capa con 70 µL de APB. Terminado este proceso se colocaron las laminillas en solución de lisis (NaCl 2.5 M [Sigma, USA], Na₂-EDTA 100 mM [Sigma-Aldrich, USA] Trizma® base 10 mM [Sigma, USA] a pH 10 ajustado con NaOH [Macron, Suecia] y con DMSO al 10 % y tritón X-100 al 1% [Sigma, St. Louis, MO, USA]) y se dejaron en reposo durante 24 h a 4 °C; a partir de este paso se trabajó en oscuridad o con luz indirecta para evitar daño adicional en el ADN.

Para el corrimiento de las laminillas primero se colocaron las laminillas en 80 mL de PBS por 5 min lo cual garantizó que la solución de lisis fuera removida y se colocaron las laminillas en la cámara de electroforesis horizontal (Claver Scientific, CSL-COM Series, México) para en ese momento agregar el amortiguador de electroforesis (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM a pH > 13) y dejar en reposo las laminillas por 20 min que permitió la desnaturalización y desenrollamiento del ADN, al término de este tiempo se conectó la fuente de poder (Consort, EV3610, Bélgica) durante 20 min con voltaje de 25 V y 300 mA. Al terminar la electroforesis, los portaobjetos se pasaron a solución neutra (Trizma® base 0.4 mM a un pH 7) por 10 min y luego se colocaron en alcohol etílico al 70 % durante 10 min, para finalmente dejarse secar al aire por 24 h.

5.5.3. Detección de bases oxidadas con la enzima FPG

Se preparó previamente la enzima FPG en donde se tomaron 0.5 µL (4 unidades/mL) (New England BioLabs®) 0.5 µL con NEB1 (0.5 µL, New England BioLabs®), suero fetal bovino (BSA, por sus siglas en inglés, New England BioLabs®, 10 µL) y el amortiguador de reacción (1 mL) (HEPES, ChemCruz®, Dallas, TX), KCl (Sigma-Aldrich, USA) y EDTA

en un tubo cónico de 15 mL y se dejó en incubación por 1 h a 37 °C, lo cual dio paso a su activación.

A cada lamina destinada para la detección de daño en el ADN por bases oxidadas con la enzima FPG, se le añadió 50 µL de la enzima FPG activada y se incubaron por 20 min a 37 °C, para luego llevar a cabo el corrimiento de la electroforesis alcalina (pH > 13) como se describió anteriormente.

5.5.4. Lectura de cometas al microscopio de fluorescencia

Finalmente, las laminillas fueron teñidas con 25 µL BE (0.025 µg/mL) y puestas bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro verde, (515–560 nm) a 40X y se midieron los nucleoides con tratamiento y los grupos control. El daño se evaluó con la regla adaptada al ocular que permitió medir la longitud (cabeza + cauda), la longitud de la cabeza y la migración del ADN (cauda). Se cuantificaron 200 células por tratamiento de cada donador que fueron 600 en total de cada tratamiento.

5.5.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentan como la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes, cada uno con su duplicado (n= 6). La diferencia significativa de los resultados entre los grupos tratados y sin tratamiento se determinó con la prueba *t Student* para la evaluación de la viabilidad y de integridad de los genes MT-1X, y mediante el análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de Tukey (ANOVA-Tukey) para el ensayo cometa. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

En el **Cuadro 2** se muestran los resultados de la viabilidad de los linfocitos humanos antes y después de 24 h de exposición a 0 (sin tratamiento), 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 ; donde el porcentaje de células vivas con respecto a las células no viables se redujo ($p < 0.05$) en la concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 2. Porcentaje de viabilidad de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V_2O_3 por 0 y 24 h.

Tratamientos con V_2O_3 en $\mu\text{g/mL}$	Tiempo	
	0 h	24 h
0	98.3 \pm 0.6	96.7 \pm 0.6
2	97.0 \pm 1.0	93.0 \pm 1.7
4	96.3 \pm 1.2	94.3 \pm 2.3
8	97.3 \pm 0.6	92.3 \pm 0.6
16	96.0 \pm 1.0	86.0 \pm 1.7 *

Los datos se presentan con la media \pm error estándar de la media ($n = 6$). * $p < 0.05$ respecto al grupo control (prueba *t Student*).

En la **Figura 4** se muestran los resultados de la integridad del ARN obtenido mediante el uso de geles de agarosa al 1.5 % teñidos con BE de las muestras tratadas con V_2O_3 y su respectivo control, las bandas presentes representan las subunidades 28s y 18s del ARNr, sirve como indicador de integridad del ARN total.

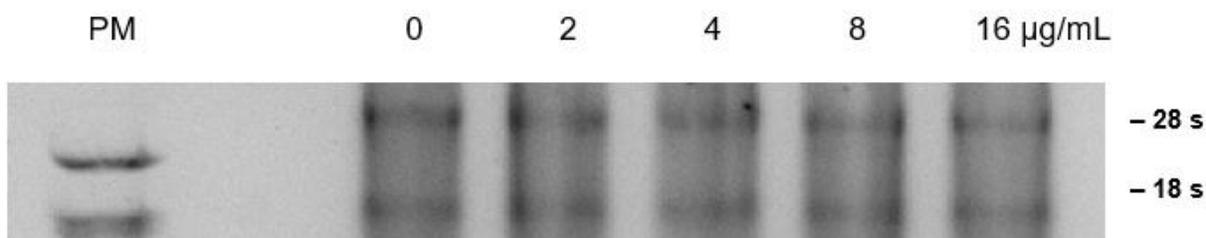


Figura 4. Integridad del ARN, se muestran las subunidades 28s y 18s del ARN, donde se muestran los tratamientos de 0 a 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 (izquierda a derecha) y el marcador de peso molecular (Pm) en linfocitos humanos por exposición de 24 h.

En el **Cuadro 3** se aprecian los resultados obtenidos en el biofotómetro Eppendorf 6131, en el cual se estimó la absorbancia del ADNc a 260 nm. Se utilizó una relación 260/280, para evaluar la pureza de las muestras, que en promedio fue de 1.7–1.8 y de esta manera estimar la concentración del ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Cuadro 3. Resultados del biofotómetro de la pureza del ADNc

Tratamientos con V_2O_3 en $\mu\text{g/mL}$	Concentración de ADNc ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Relación 260/280 nm
0	6.9 ± 2.6	1.79 ± 0.43
2	6.2 ± 6.8	1.66 ± 0.17
4	4.8 ± 8.7	1.72 ± 0.14
8	8.8 ± 3.7	1.75 ± 0.11
16	9 ± 2.2	1.79 ± 0.06

Los datos se presentan con la media \pm desviación estándar ($n = 6$).

La **Figura 5** hace referencia a los fragmentos amplificados del gen *GAPDH* que fueron tratados con V_2O_3 y un control, tomado como gen constitutivo o de referencia, que permitió corroborar que la técnica se realizó de manera adecuada.

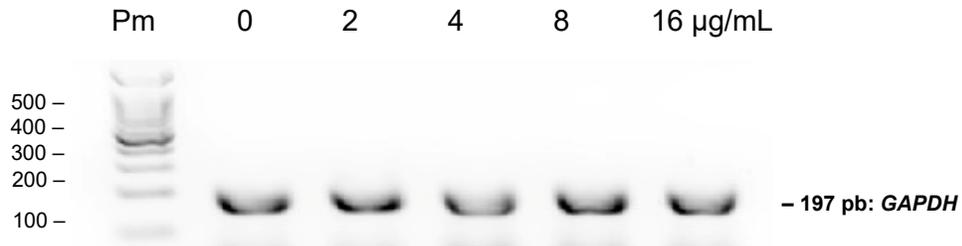


Figura 5. Integridad del ADNc de los genes de los cultivos de linfocitos humanos tratados con 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ y su grupo control. Se muestra la integridad del *GAPDH* que contiene 197 pb y el marcador de peso molecular (Pm).

En la **Figura 6** se muestra como los tratamientos con V₂O₃ aumentan la intensidad de las bandas de expresión de las isoformas de *MT-1*, las diferencias se observaron en las concentraciones de 4, 8 y 16 µg/mL con respecto al control.

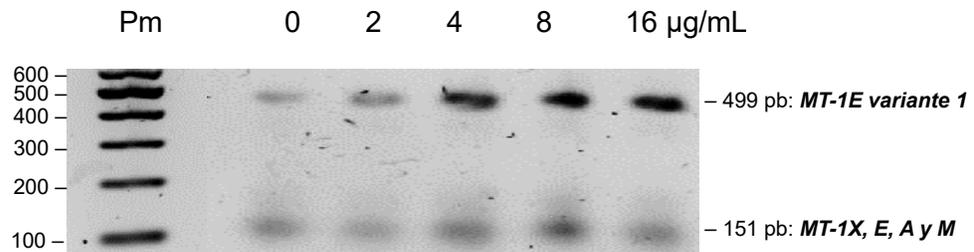


Figura 6. Niveles de expresión de las *MT-1X* con sus diferentes variantes en los cultivos de linfocitos humanos tratados con 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ y su grupo control. Pm, marcador de peso molecular.

Las imágenes del fotodocumentador fueron analizadas mediante el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java: <https://imagej.net/ij/download.html>) para conocer los píxeles y posteriormente con este valor calcular la intensidad relativa de las *MT-1*, con respecto al grupo sin tratamiento (**Figura 7**). Sin embargo, los grupos tratados con 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control.

Expresión de las *MT-1X*

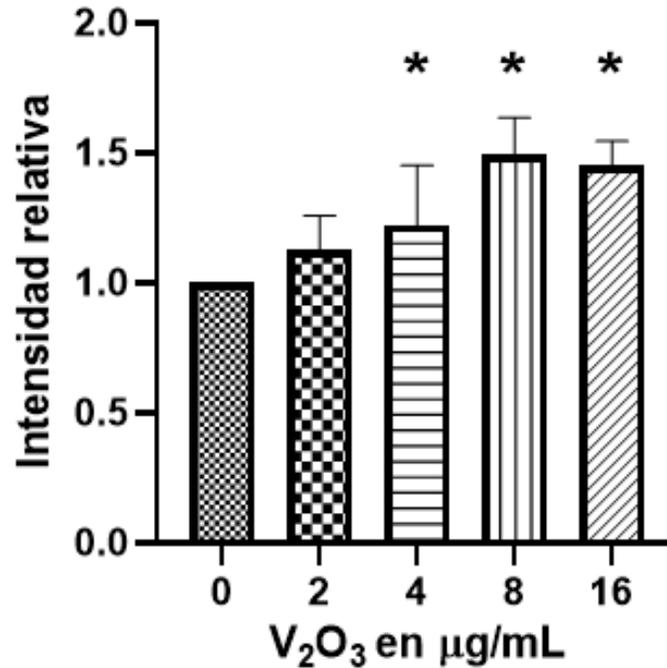


Figura 7. Niveles de expresión de las *MT-1X* en cultivos de linfocitos humanos tratados con 0 (sin tratamiento), 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ por 24 h. Los datos fueron normalizados por los niveles de expresión de *GAPDH* y se presentan con la media ± error estándar (n = 6). * $p < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento (prueba t de Student).

En la **Figura 8**, se muestran los resultados del ensayo cometa en donde cada barra representa 600 células por tratamiento. La gráfica a) ilustra la longitud de las cabezas del cometa que no mostraron diferencias significativas, la gráfica b) y c) muestran la longitud de la cauda y el cometa completo, respectivamente; los cuales evidenciaron diferencias significativas de todos los grupos tratados con respecto al grupo control.

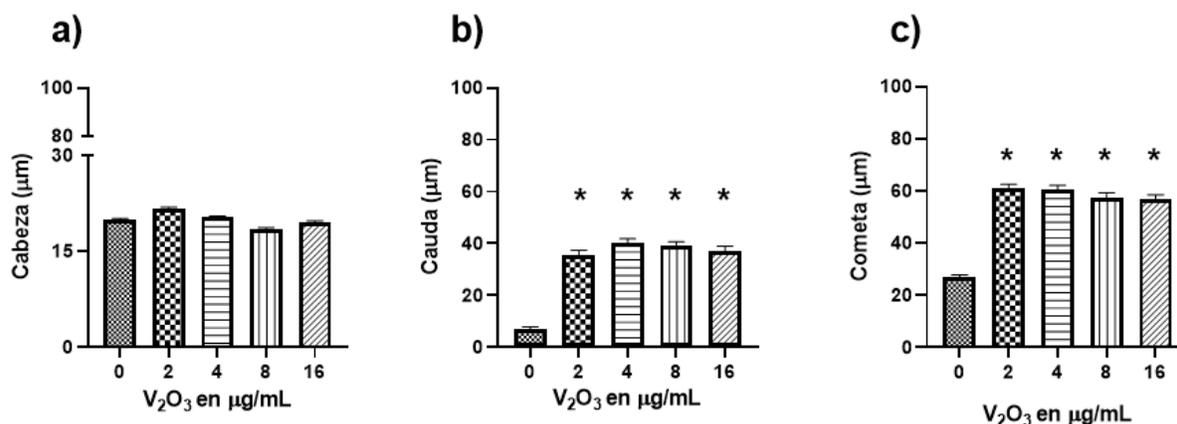


Figura 8. Daño en el ADN en cultivos de linfocitos humanos tratados con 0 (sin tratamiento), 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ por 2 h. En **a)** la longitud de las cabezas de los cometas, en **b)** la longitud de la cauda de los cometas y en **c)** la longitud de los cometas (cabeza + cauda). Los datos se presentan con la media ± error estándar (n = 6). * p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (prueba ANOVA-Tukey).

En la **Figura 9**, se presentan los resultados de la versión del ensayo cometa modificado con la enzima FPG que detecta y escinde las bases oxidadas como la guanina en sus formas 8-oxo-7,8-dihidroguanina y la 8-hidroxiguanina. En a) se muestran los resultados de la longitud de la cabeza de los cometas, para los casos de b) y c) se aprecian diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos con respecto al grupo sin tratamiento, que es la migración del ADN fragmentado que además sigue una tendencia dependiente de la concentración.

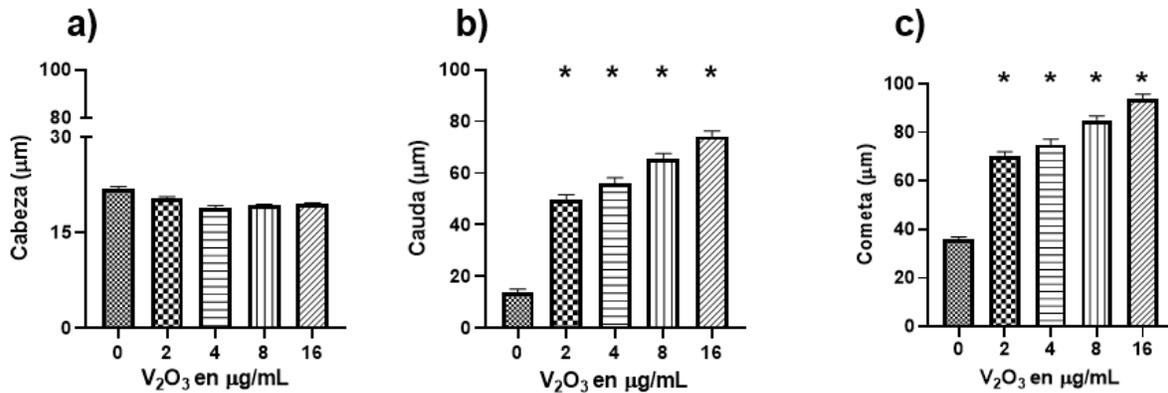


Figura 9. Daño en el ADN en cultivos de linfocitos humanos tratados con 0 (sin tratamiento), 2, 4, 8 y 16 µg/mL de V₂O₃ por 2 h e incubados con FPG. En **a)** la longitud de las cabezas de los cometas, en **b)** la longitud de la cauda de los cometas y en **c)** la longitud de los cometas (cabeza + cauda). Los datos se presentan como la media ± error estándar (n = 6). * p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (prueba ANOVA-Tukey).

Con los datos obtenidos se realizó la diferencia de la longitud de la cauda o cometa de cada tratamiento con respecto al control (tratamiento - testigo) y eso entre la diferencia de la longitud de la cauda o cometa con la enzima FPG (tratamiento FPG - testigo FPG), lo cual dio como resultado la **Figura 10** que muestra la diferencia entre el ensayo cometa con pH > 13 y el ensayo cometa a pH > 13 modificado con la enzima; en este caso el eje “y” representa unidades designadas como arbitrarias. Específicamente en la gráfica de cometas se detectó que el daño aumentó al tener concentraciones más altas, el cual fue al alza en todos los tratamientos, mientras que para las caudas únicamente se encontró esta tendencia en las concentraciones de 8 y 16 µg/mL de V₂O₃.

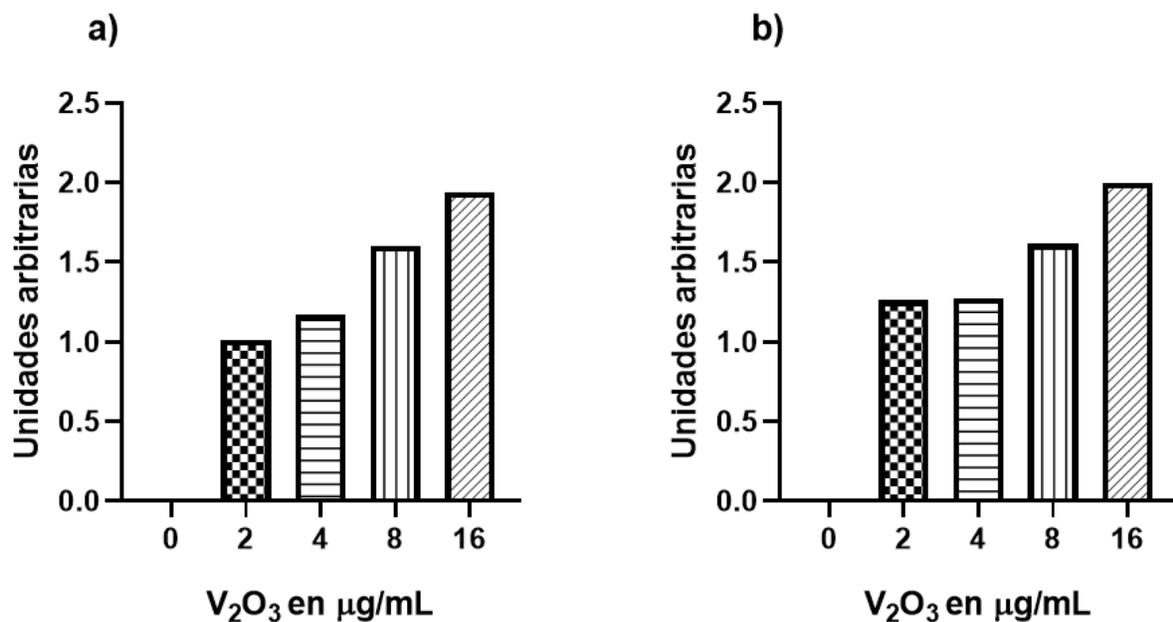


Figura 10. Incremento de bases oxidadas por V₂O₃ reveladas con la enzima FPG. En **a)** se muestra aumento de bases oxidadas tomando los datos de la longitud de los cometas que muestra que el daño es dependiente de la concentración, en tanto que en **b)** se observa el incremento tomando el valor de las caudas con tendencia a incrementar conforme a la concentración en 8 y 16 µg/mL de V₂O₃.

VII. DISCUSIÓN

El uso generalizado de los compuestos de V y consecuente liberación al medio ambiente ha provocado aumento de su presencia en los ecosistemas, en las cadenas tróficas y por consiguiente la exposición constante a este metal. Dentro de los mecanismos por los que ejerce su toxicidad es por estrés oxidante; sin embargo, no hay datos relacionados con la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante, tal como lo son las MT. Por lo anterior, este estudio se centró en determinar *in vitro* la expresión de MT y el daño en el ADN derivado del estrés oxidante inducido por uno de los óxidos que se libera atmósfera, el V_2O_3 .

Los resultados de este estudio mostraron que únicamente el tratamiento de 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 modifica la viabilidad. Una de las ventajas de evaluar la viabilidad celular con la combinación de CFDA y BE es que permite evaluar la integridad de la membrana plasmática de la célula. El CFDA es permeable a la membrana, por lo que al ser hidrolizado por las esterasas intracelulares se produce la fluorescencia en el microscopio se observan las células teñidas de color verde, viable; mientras que, el BE no es permeable a la membrana y solo puede entrar cuando dicha estructura se encuentra comprometida o dañada y al tener afinidad al ADN se dirige al núcleo de las células donde se intercala con la doble cadena, lo cual da una tinción de color rojo que representa una célula no viable. Trabajos realizados anteriormente con V_2O_3 en las mismas concentraciones y con leucocitos humanos no reportan diferencias estadísticas en la viabilidad (Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que el V_2O_3 en las concentraciones y tiempos empleados no induce cambios en la viabilidad cultivos celulares.

Con respecto a los resultados de la expresión de las MT, en todos los grupos tratados fueron al alza, con diferencias significativas en las concentraciones de 4–16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 ; lo cual está asociado con una de las principales funciones de las MT, su actividad desintoxicante de metales. En sangre humana se encuentra en concentraciones de 0.1–1.0 ng/L (Nordberg *et al.*, 1982) y para aumentar su cantidad tienen que ser activadas por factores específicos (**Figura 2**), en los que se incluyen al factor-1 regulador de metales activado posiblemente por la presencia de V_2O_3 para poder llevar a cabo su función de

capturar metales no esenciales. Xiu-Li *et al.*, (2016) en sus experimentos realizados con CdCl_2 mostró que a las 24 h de tratamiento las variantes de los genes MT-1 fueron en aumento cuyos resultados pueden respaldar lo que se obtuvo en este trabajo con las variantes -1X, -1E, -1M y -1A con el mismo tiempo de exposición con V. Otra posible causa del aumento en la expresión genética de las MT-1 está asociada con las funciones antioxidantes, ya que a mayor presencia de ERO en las células la apo-MT activa la producción de MT para contrarrestar exceso de ERO (Andrews, 2000) que puede estar generando el V_2O_3 en los cultivos de linfocitos humanos. Con relación a esto último, como se ha mencionado con anterioridad el V^{3+} puede inducir la formación de ERO al reaccionar con el H_2O_2 y producir el $\bullet\text{OH}$ (Lloyd *et al.*, 1998; Fickl, *et al.*, 2006).

Los resultados del ensayo cometa confirman los resultados de daño en el ADN reportados con el mismo óxido de vanadio en el modelo de leucocitos humanos de sangre periférica completa tratados con 1–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 h (Rodríguez Mercado, *et al.*, 2011). La diferencia de este estudio es que se trabajó con linfocitos humanos aislados, se conoce que los eritrocitos pueden captar vanadio en grandes cantidades y mantenerlo formando complejos con las proteínas férricas de estas células (Tracey, *et al.*, 2007) y de esta manera disminuir la cantidad de V_2O_3 al que estén expuestos los linfocitos; por lo anterior, en esta tesis se demuestra que el efecto es por la concentración empleada.

El V es un metal cuyos estados de oxidación +3, +4 y +5, inducen efectos genotóxicos, los cuales pueden estar relacionados con la generación de ERO, que a su vez aumentan el daño oxidante en el ADN formando bases oxidadas y consecuentemente RCS, RCD y daño cromosómico. Al respecto, trabajos *in vitro* con V^{3+} han mostrado aumento en la frecuencia de ICH y ACe en células de ovario de criceto chino con tratamientos de 16, 23 y 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de V_2O_3 (Owusu-Yaw *et al.*, 1990), y aumento en el índice de daño en el ADN (IDD) en linfocitos T de la línea “Jurkat” al aplicar 0.05 y 0.1 mM de V^{3+} por 48 h (Caicedo *et al.*, 2007). Para el caso de estudios *in vivo*, recientemente en células de médula ósea de ratones CD-1 en a los que se les administró 4.22, 8.46 y 16.93 mg/kg de V_2O_3 aumentaron estadísticamente las ACe (Álvarez-Barrera *et al.*, 2023).

En exceso, las especies reactivas pueden desbordar la capacidad normal de amortiguación antioxidante de la célula, provocando daños significativos en los

componentes celulares, incluidas las proteínas, los lípidos y el ADN. Así, las especies reactivas contribuyen a la formación de mutaciones y posteriormente, a la etiología de enfermedades degenerativas, entre las que figura el cáncer (Azqueta, et al., 2009). Se ha identificado una gran variedad de bases oxidadas en el ADN nuclear, pero la 8-oxoG es una de las más abundantes. La presencia de 8-oxoG en el ADN tiene la capacidad de llevar a la incorrecta adición de adenina si no se repara el daño antes de la replicación. Por lo tanto, la presencia de esta base oxidada en células puede dar lugar a mutaciones transversales (Cooke, et al. 2003). Los resultados mostraron que el V ingresa a la célula y causa daño al ADN dentro de las primeras 2 h de tratamiento, entre sus efectos aumentan las ERO. Todos estos reportes tienen en común que el V^{3+} tiene potencial genotóxico que, en conjunto con los resultados de este trabajo, contribuye al estudio del V y su papel en los sistemas biológicos que están en contacto constante con este metal.

VIII. CONCLUSIONES

En los linfocitos humanos tratados *in vitro* con concentraciones de 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 :

- Los niveles de expresión de las *MT-1* con sus variantes fueron mayores y mostraron diferencias significativas en los grupos tratados de 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h de exposición, lo cual puede asociarse con su actividad desintoxicante.
- Los tratamientos de 2 h con 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 , indujo daño en el ADN (RCS, sitios AP y sitios de reparaciones incompletas) como ya se había reportado en previos trabajos con leucocitos humanos.
- El daño oxidante evaluado con el uso de la enzima FPG mostró que los grupos tratados por 2 h con 2–16 $\mu\text{g/mL}$ de V_2O_3 genera daño por bases oxidadas dejando sitios AP que se transforman en RCS, siendo uno de los mecanismos de acción del V^{3+} .
- El aumento en la expresión del producto génico de las MT se debe a la respuesta del estrés oxidante generado por el V_2O_3 .

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, FES-Zaragoza, UNAM, México.
- Alcántara-Mejía, V.A. (2021). Efecto del trióxido de vanadio (V_2O_3) sobre la expresión del ARNm de las proteínas que regulan la proliferación en la fase G_1 de linfocitos humanos. Tesis de Maestría, Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM, México.
- Altamirano-Lozano, M., Álvarez-Barrera, L., Basurto-Alcántara, F., Valverde, M. y Rojas, E. (1996). Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 16(1), 7–17.
- Altamirano-Lozano, M., Valverde, M., Álvarez-Barrera, L., Molina, B. y Rojas, E. (1999). Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V_2O_5) in male mice II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 19(4), 243–245.
- Anke, M. (2004). Vanadium-an element both essential and toxic to plants, animals, and humans. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 70(4), 961–999.
- Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 95–104.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2012). Toxicological profile for vanadium. GA: U.S. Department of health and human services, Public Health Services. Atlanta, Georgia, 30333.
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S. y Collins, A. (2009). DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagénesis with comet assay. *Mutation Research*, 674(1–2), 101–108.
- Azqueta, A. y Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87, 949–968.
- Byrne, A. R. y Kosta, L. (1978). Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Science of the Total Environment*, 10(1), 17–30.

- Caicedo, M., Jacobs, J.J., Reddy, A. y Hallab, N.J. (2007). Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A (4), 905–913.
- Chasteen, D., Lord, E.M., Thompson, H.J., y Grady, J.K. (1986). Vanadium Complexes of transferrin and ferritin in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 884(1), 84–92.
- Collins, A. R., Mitchell, D. L., Zunino, A., Wit, J. D. y Busch, D. (1997). UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(2), 152–160.
- Collins, A. R., Dusinska, M. y Horská, A. (2001). Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 611–614.
- Collins. A., Moller. P., Gajski. G., Vodenkova. S., Abdulwahed. A., Anderson. D., Bankoglu. E., Bonassi. S., Boutet-Robinet. E., Brunborg. G., Chao. C., Cooke. M., Costa. C., Costa. S., Dhawan. A., De Lapuente. J., Del Bo. C., Dubus. J., Dusinska. M., Duthie. S., Yamani. N., Engelward. B., Gaivao. I., Giovannelli. L., Godschalk. R., Guilherme. S., Gutzkow. K., Habas. K., Hernández. A., Herrero. O., Isidori. M., Jha. A., Knasmuller. S., Kooter. I., Koppen. G., Kruszewski. M. Ladeira. C., Laffon. B., Larramendy. L., Le Hegarat. L., Lewies. A., Lewinska. A., Liwszyc. G., López. A., Manjanatha. M., Marcos. R., Milic. M., Moraes. V., Moretti. M., Muruzabal. D., Novak. M., Oliveira. R., Olsen. A., Owiti. N., Pacheco. M., Pandey. A., Pfuhler. S., Pourrut B., Reisinger. K., Rojas. E., Runden. E., Sanz. J., Shaposhnikov. S., Sipinen. V., Smeets. K., Stopper. H., Teixeira. J., Valdiglesias. V., Valverde. M., Acker. F., Schooten. F., Vasquez. M., Wentzel. J., Wnuk. M., Wouters. A., Zegura. B., Zikmund. T., Langie. S. y Azqueta A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: A compedium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929–989.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu. M. y Lunec. M. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.

- Costa-Pessoa, J. y Tomaz, I. (2010). Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Current Medicinal Chemistry*, 17(31), 3701–3738.
- Crans, D.C., Bunch, R.L. y Theisen, L.A. (1989). Interaction of trace Levels of Vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems. *Journal of the American Chemical Society*, 111(19), 7597–7607.
- Crans, D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E. y Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*, 104(2), 849–902.
- De Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S. A., Borràs, M., Martins, M. G., Costa, P. M. y Pacheco, M. (2015). The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in genetics*, 6, 103544.
- Di Meo, S. Reed, T. T., Venditti, P. y Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–44.
- Du, G. y Espenson, J.H. (2005). Oxidation of vanadium(III) by hydrogen peroxide and the oxomonoperoxo vanadium(V) ion in acidic aqueous solutions: A kinetics and simulation study. *Inorganic Chemistry*, 44(15), 5514–5522.
- Dziegiel. P., Pula. B., Kobierzycki. C., Stasiolek. M. y Podhorska-Okolow. M. (2016). Metallothioneins in normal and cancer cells. De la serie: *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Vol. 218, Springer, pp. 100–117.
- Espinosa-Zurutuza, M., González-Villalva, A., Albarrán-Alonso, J. C., Colin-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Rojas-Lemus, M. y Fortoul, T. I. (2018). Oxidative stress as a mechanism involved in kidney damage after subchronic exposure to vanadium inhalation and oral sweetened beverages in a mouse model. *International Journal of Toxicology*, 37(1), 45–52.

- Evans, M.D., Podmore, I.D., Daily, G.J., Perrett, D., Lunec, J. y Herbert, K.E. (1995). Detection of purine lesions in cellular DNA using single cell gel electrophoresis with FPG protein. *Biochemical Society Transactions*, 434S–434S.
- Fickl, H., Theron, A.J., Grimer, H., Oomen, J., Ramafi, G.J., Steel, H.C., Visser, S.S. y Anderson, R. (2006). Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(1), 146–155.
- Fortoul, T.I., Rodríguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colin-Barenque, L., Montaña, L.F., García-Pelez, I., Bizarro-Nevarés, P., López-Valdez, N., Falcon-Rodríguez, C.I., Jimenez-Martínez, R.S., Ruiz-Guerrero, M.L., López-Zepeda, L.S., Morales-Rivero, A. y Muñiz-Rivera-Cambas, A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(11).
- Funk, E.W. y Gómez, E. (1977). Determination of vanadium in athabasca bitumen and other heavy hydrocarbons by visible spectrometry. *Analytical Chemistry*, 49(7), 972–974.
- Gustafsson, J.P. (2019). Vanadium geochemistry in the biogeosphere -speciation, solid-solution interaction, and ecotoxicity. *Applied Geochemistry*, (102) 1–25.
- Guzmán-Reyes, D.L. (2019). Efecto del tricloruro de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 de linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM, México.
- Hašplová, K., Hudecová, A., Magdolénová, Z., Bjørnas, M., Gálová, E., Miadoková, E. y Dušinská, M. (2012). DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology Letters*, 208(1), 76–81.
- Hernández, H. y Rodríguez, R. (2011). Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(9), 5327–5342.

- Hosseini, M. J., Shaki, F., Ghazi-Khansari, M. y Pourahmad, J. (2013). Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics*, 5(2), 152–166.
- Huang, C., Zhang, Z., Ding, M., Li, J., Ye, J., Leonard, S.S., Shen, H.M., Butterworth, L., Lu, Y., Costa, M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Vallyathan, V. y Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32516–32522.
- Ingram, J.L, Antao-Menezes, A., Turpin, E.A., *et al.* (2007). Genomic analysis of human lung fibroblasts exposed to vanadium pentoxide to identify candidate genes for occupational bronchitis. *Respiratory Research*, 8, 34.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. (1988). Environmental health criteria, World Health Organization, 81, Ginebra.
- Kim, J.H., Do, H.J., Wang, W.H., Macháty, Z., Han, Y.M., Day, B.N. y Prather R.S. (1999). A protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, causes parthenogenetic activation of pig oocytes via an increase in protein tyrosine kinase activity. *Biology of Reproduction*, 61(4), 900–905.
- Kleinsasser, N.H., Dirschedl, P., Staudenmaier, R., Harreús, U.A. y Wallner, B.C. (2003). Genotoxic effects of vanadium pentoxide of human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *International Journal of Environmental Health Research*, 13(4), 373–379.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. y Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53–64.
- Levina, A. y Lay, P.A. (2017). Stabilities and biological activities of vanadium drugs: What is the nature of active species? *Chemistry – an Asian Journal*, 12(14), 1692–1699.
- Levina, A. y Lay, P. A. (2020). Vanadium (V/IV)–transferrin binding disrupts the transferrin cycle and reduces vanadium uptake and antiproliferative activity in human lung cancer cells. *Inorganic Chemistry*, 59(22), 16143–16153.

- Lloyd, D.R., Carmichael, P.L. y Phillips, D.H. (1998). Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single-and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chemical Research in Toxicology*, 11(5), 420–427.
- Lu, Y., Liu, Y. y Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments*, 128, e56450.
- Markopoulou, S., Kontargiris, E., Batsi, S., Tzavaras, T., Trougakos, I., Boothman, D.A., Gonos, E.S. y Koletas, E. (2009). Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. *The FEBS Journal*, 276(14), 3784–3799.
- 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 Posgrado en ciencias biológicas, FES-Zaragoza, UNAM, 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(4), 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.
- Migliore, L., Bocciardi, R., Macrí, C. y Lo Jacono, F., (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(3), 205–213.
- Miramand, P. y Fowler, S. W. (1998). Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organisms. *Advances in Environmental Science and Technology NY*, 30, 167–198.
- Monakhov, I. N., Khromov, S. V., Chernousov, P. I. y Yusfin, Y. S. (2004). The flow of vanadium-bearing materials in industry. *Metallurgist*, 48, 381–385.

- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A. y Charttejee, M. (2004). Vanadium an elemental of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2), 135–143.
- Narla, R. K., Dong, Y., D'Cruz, O. J., Navara, C. y Uckun, F. M. (2000). Bis (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) sulfatooxovanadium (IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1546–1556.
- Ngwa, H. A., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Song, C., Witte, T., Houk, R. y Kanthasamy, A. G. (2009). Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase Cdelta dependent oxidative signaling mechanisms: relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(2), 273–285.
- Nielsen, F.H. (1995). Vanadium in mammalian physiology and nutrition. *Metal ions in biological systems*, 31, 543–573.
- Niu, B. Y., Li, W. K., Li, J. S., Hong, Q. H., Khodahemmati, S., Gao, J. F. y Zhou, Z. X. (2020). Effects of DNA damage and oxidative stress in human bronchial epithelial cells exposed to PM_{2.5} from Beijing, China, in winter. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4874.
- Noll, D. M., Mason, T. M. y Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews*, 106(2), 277–301.
- Nordberg, G. F., Garvey, J. S. y Chang, C. C. (1982). Metallothionein in plasma and urine of cadmium workers. *Environmental Research*, 28(1), 179–182.
- Olive, P. L., Wlodek, D. y Banáth, J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, 51(17), 4671–4676.
- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
- Owusu-Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y. y Wei, C.I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicology Letters*, 50(2–3), 327–336.

- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P. y Ostrosky-Wegman, P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as mechanism for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 386(3), 291–298.
- Rodríguez-Mercado, J.J., Roldán-Reyes, E. y Altamirano-Lozano, M., (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*, 144(3), 359–369.
- Rodríguez-Mercado, J.J. y Altamirano-Lozano, M.A., (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. *Drugs 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.
- 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/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 359(2), 77–84.
- Roldán, R.E. y Altamirano-Lozano, M.A. (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research Letters*, 245(2), 61–65.
- Sakurai. H. (1994). Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: Implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 3), 35–36.

- Schlesinger, W.H., Klein, E.M. y Vengosh, A. (2017). Global biogeochemical cycle of vanadium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52), E11092–E11100.
- Scibior, A., Pietrzyk, L., Plewa, Z. y Skiba, A. (2020). Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61, 126508.
- Shaki, F., Hosseini, M., Ghazi-Khansari, M. y Pourahmad, J. (2012). Toxicity of depleted Uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(12), 1940–1950.
- Strauss, G. H. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 252(1), 1–15.
- Subramanian. Vignesh, K. y Deepe Jr., G. S. (2017). Metallothioneins: emerging modulators in immunity and infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2197.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyama, E., Rojas, J.C. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221.
- Tirado-Amador, L.R., González-Martínez, F.D., Martínez-Hernández, L.J., Wilches-Vergara, L.A. y Celedón-Suárez, J.N. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en la salud. *Revista Nacional Odontológica*. 11(21), 83–99.
- Tracey, A.S., Willsky, G.R. y Takeuchi, E.S. (2007). *Vanadium: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Practical Applications*. Francis Group Taylor (Ed.), CRC Press, Florida, p. 250.

- Tu, W., Xiao, X., Lu, J., Liu, X., Wang, E., Yuan, R., Wan, R., Shen, Y., Xu, D., Yang, P., Gong, M., Gao, P. y Huang, S. K. (2023). Vanadium exposure exacerbates allergic airway inflammation and remodeling through triggering reactive oxidative stress. *Frontiers in Immunology*, 13, 1099509.
- Varshney, U., Jahroudi, N., Foster, R. y Gedamu, L. (1986). Structure, organization, and regulation of human metallothionein IF gene: differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology*, 6(1), 26–37.
- Vasak, M. y Meloni, G. (2011). Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1067–1078.
- Venkataraman, B.V. y Sudha, S. (2005). Vanadium Toxicity. *Asian Journal of Experimental Science*, 19(2), 117–134.
- Vinod, K., Anket, S. y Artemi, C. (2020). Heavy Metals in the Environment: Impact, Assessment and Remediation. Elsevier (1–7) Chennai, India.
- Wang, L., Medan, D., Mercer, R., Overmiller, D., Castranova, V., Shi, X., Ding, M., Huang, C. y Rojanasakul, Y. (2003). Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *Journal of Cellular Physiology*, 195(1), 99–107.
- WHO, World Health Organization. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Concise International Chemical Assessment Document 29. Elsevier, Génova.
- Wu, J.X., Hong, Y.H. y Yang, X.G. (2016). Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(8), 919–929.
- Yin, X., Davison, A. y Tsang, S. (1992). Vanadate-induced gene expression in mouse C127 cells: Roles of oxygen derived active species. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 115(1), 85–96.

- Yu, Y. Q. y Yang, J. Y. (2019). Oral bioaccessibility and health risk assessment of vanadium (IV) and vanadium (V) in a vanadium titanomagnetite mining region by a hole digestive system *in-vitro* method (WDSM). *Chemosphere*, 215, 294–304.
- Xiu-Li, C., Tai-Yi, J. y Yuan-Fen, Z. (2006). Metallothionein 1 Isoform gene expression induced by cadmium in human peripheral blood lymphocytes. *Biomedical and Environmental Sciences*, 19(2), 104–106.
- 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/Genetic Toxicology*, 321(1–2), 35–42.