



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza

EFFECTO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO  
SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS  
CICLINAS Y CDK DE LA FASE G1 EN  
LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

COMITÉ TUTOR:

Dra. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

Dra. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL** con número de cuenta **92019809** con la tesis titulada **"EFECTO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CICLINAS Y CDK DE LA FASE G1 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*"**. realizada bajo la dirección del (la) **DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**:

Presidente: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE  
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO  
Suplente: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de julio de 2012.

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.**
  
- **Al apoyo recibido por parte de:**
  - **CONACYT, número de becario 210454**
  
  - **Proyecto DGAPA-UNAM, PAPIIT-IN216809**
  
- **A los miembros del Comité Tutorial:**
  - **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**
  - **Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes**
  - **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

## **Agradecimientos a título personal**

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones a este trabajo:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dra. María Isabel Soto Cruz

Al Dr. Mario Altamirano, jefe de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la FES-Zaragoza, donde fue desarrollado este trabajo, por todos los consejos, el apoyo, la paciencia y permitirme formar parte de este proyecto, Gracias.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su disposición que siempre ha mostrado para resolver las dudas surgidas y todo el apoyo incondicional brindado a este trabajo.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por todas sus aportaciones y comentarios, siempre para mejorar profesionalmente.

A mis compañeros actuales y a los que han pasado por el Laboratorio 5-PA de la UMIEZ.

A la Bióloga Experimental Jany Mariela y al Dr. Edmundo Bonilla del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud (S-248), UAM Iztapalapa, por su paciencia en la enseñanza de uno de los métodos aquí empleados.

También a la Dra. Carolina Álvarez y al Dr. Marco Antonio Cerbón del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, por su tiempo y paciencia para que pudiera aprender la técnica de “Western blott”.

## **Dedicatorias**

A mi padre, Lázaro, por todo el amor, el cariño y los consejos que me brinda día con día para seguir en este tren que se llama vida.

A la memoria de mi madre Petra y Augusto, que con su cariño y palabras siempre me motivaron a continuar con mis proyectos y en donde quiera que se encuentren lo siguen haciendo.

A Lulú, Lety, Misa, Lili, Omar, Mary, Sandy y Lore, por sus consejos, compañía y comprensión.

A Cristina quien siempre me escucha, apoya y me ha enseñado lo grande que es la amistad.

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Vanadio.....	4
3.1.1. Usos.....	5
3.1.2. Toxicidad.....	7
3.2. Ciclo celular.....	9
3.2.1. Reguladores del ciclo.....	10
3.2.2. Inhibidores del ciclo.....	13
3.2.3. Proteína p53.....	15
3.2.4. Efecto del vanadio sobre el ciclo celular.....	16
3.3. Purificación y detección de proteínas.....	17
4. Planteamiento del problema.....	20
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivos.....	20
6.1. General.....	20
6.2. Particulares.....	21
7. Materiales y métodos.....	22
7.1. Reactivos.....	22
7.2. Separación y cultivo de linfocitos.....	22
7.3. Análisis de la proliferación celular.....	23
7.3.1. Tratamientos.....	23
7.3.2. Tinción diferencial de las preparaciones para la evaluación de la proliferación celular.....	24
7.4. Viabilidad celular.....	26
7.5. Extracción y análisis de las proteínas por inmunoblot.....	27
7.5.1. Reactivos.....	27
7.5.2. Tratamientos.....	27
7.5.3. Lisis de linfocitos para obtener proteínas.....	28



7.5.4. Expresión de ciclinas y Cdk.....	28
7.6. Análisis estadístico.....	30
8. Resultados.....	31
8.1. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre la proliferación celular.....	31
8.2. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre las proteínas ciclinas y Cdk de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> .....	34
8.2.1. Ciclina D1 y Cdk4.....	34
8.2.2. Ciclina E y Cdk2.....	36
8.2.3. Efecto en la expresión de las proteínas p53 y p21.....	38
9. Discusión.....	41
9.1. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre la proliferación celular.....	41
9.2. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre la viabilidad celular.....	43
9.3. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre las proteínas ciclinas y Cdk de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> .....	44
9.4. Efecto del V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre la expresión de las proteínas p53 y p21 de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i> .....	48
10. Conclusiones.....	52
11. Referencias.....	53
12. Anexos.....	62

## 1. RESUMEN

El vanadio (V) es un metal de transición ampliamente distribuido en la Tierra, siendo el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) la principal forma química presente en el ambiente como resultado de actividades antropogénicas y naturales. La vía por la cual los seres humanos están expuestos a él es a través de los alimentos principalmente y de manera ocupacional.

Los compuestos de vanadio pueden interactuar con las diferentes moléculas biológicas y son potentes inhibidores de algunas enzimas cinasas y fosfatasas, aunque los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos no han sido bien comprendidos.

No obstante, en líneas celulares de pulmón humano A549 y de la epidermis de ratón JB6 P<sup>+</sup> se ha demostrado que este metal interactúa con las proteínas que controlan el ciclo celular como son las ciclinas, Cdk, p53 y p21, entre otras, lo que lleva a la detención del mismo, sin embargo, existe poca información sobre esta interacción en cultivos primarios por lo que en este trabajo se determinó la expresión de las ciclinas D1, E, Cdk2, Cdk4, p21 y p53 en linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de  $V_2O_5$  (2, 4, 8, ó 16  $\mu\text{g/mL}$ ) por 48 horas, para lo cual se separaron los linfocitos de la sangre obtenida de un donador.

Se determinó el comportamiento del compuesto sobre la proliferación celular, mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas evaluando: índice de replicación (IR), índice mitótico (IM), y el tiempo promedio de proliferación celular (TPC), además de la viabilidad. Por otra parte, al final del cultivo se lisaron las células para obtener las proteínas las cuales fueron separadas por medio de electroforesis y transferidas a una membrana sólida e incubadas con los anticuerpos específicos para analizar la expresión de las mismas en los diferentes tratamientos.

Al evaluar el IM e IR se obtuvo disminución de ambos conforme se incrementa la concentración, así como aumento en el TPC de manera significativa, sin embargo, la viabilidad no presentó cambio que fuera estadísticamente significativo, por lo que se

propone que el  $V_2O_5$  está deteniendo la proliferación celular muy probablemente por la interacción con algunas proteínas que la controlan.

Con respecto a Cdk4, en todas las concentraciones hubo disminución en la expresión en comparación con los que no fueron tratados, lo mismo sucede con la ciclina D1 en la concentración más alta, a diferencia de la ciclina E y Cdk2 que presentaron sobreexpresión en todos los tratamientos. Por lo tanto, se analizó el comportamiento de los inhibidores, encontrándose que conforme se incrementa la dosis hay aumento en las proteínas p21 y p53 concluyendo que la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos induce la detención de la replicación celular mediada en parte por p53 y p21, posiblemente por algún tipo de daño a la molécula del ADN o quizás por otros mecanismos que controlan el ciclo celular que tendrían que ser estudiados.

## 2. ABSTRACT

Vanadium is a ubiquitous metal in the earth being vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ) the main chemical form present in the environment and the humans are exposed to this compound via food intake, occupationally or by the environmental contamination.

The vanadium compounds can interact with different biological molecules and can inhibit some kinases and phosphatases enzymes, although this mechanism is not well understood. Studies with cellular lines was observed that vanadium can interact with proteins that controlling the cell cycle such as cyclin, cyclin-dependent protein kinase (Cdk), p53 and p21, and others, leading to cycle arrest.

The aim of this work was determinate the expression of proteins cyclins D1, E, Cdk2, Cdk4, p21 and p53, in human lymphocytes cultures treated for 48 hours with different concentration of  $V_2O_5$  (2, 4, 8, or 16  $\mu\text{g/mL}$ ). The effect on cell proliferation was determinate by differential staining of sister chromatid and evaluating the replication index (RI), mitotic index (MI), average time proliferation (AGT), and viability. The expression of different proteins was determinate for western blott technique.

Results shown that vanadium induce a decrement dependent of concentration in both RI and MI as well as an increment in AGT, however viability did not present any change. With respect to the expression of proteins, Cdk4 decreased in all treatment meanwhile cyclin D1 only in the high concentration of vanadium, unlike to Cdk2 and cyclin E who presented an over expression in all cases. The inhibitors of cell cycle, p21 and p53, showed a few increment in the expression, concluding that the administration of  $V_2O_5$  to human lymphocytes cultures induced arrest in cell proliferation mediated by p53 and p21 possibly for some kind of damage to the DNA molecule or perhaps by other mechanisms that control the cell cycle that would have to be studied.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los metales han contribuido en el incremento de la contaminación ambiental, ya sea por sucesos naturales, como las erupciones volcánicas, o de manera antropogénica, por la quema de combustibles fósiles o los procesos industriales, entre otros, lo que ha inducido efectos negativos para el ambiente, así como para la salud humana, ya que estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a ciertos compuestos metálicos (por ejemplo: los del cromo, níquel, vanadio) incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, y es que a diferencia de los compuestos orgánicos, los metales no son degradados por los organismos vivos por lo que tienden a acumularse en ellos.

Una característica especial de los metales es el hecho de que aún siendo esenciales para la vida (tal como el hierro y el cobre) pueden ser tóxicos para la misma, esto dependerá del estado de oxidación en que se encuentren, la forma del complejo, la dosis y el modo de exposición a ellos. Lo anterior ha llevado a desarrollar estudios que evalúen la interacción de éstos con las moléculas biológicas ó en los procesos metabólicos y genéticos, así como en las vías de transducción de señales.

#### 3.1. Vanadio

El vanadio (V) está clasificado como el primer elemento del grupo V (junto con el niobio, el tantalio, y el dubnio) de la tabla periódica de los elementos, con el número atómico 23, un peso atómico de 50.95 g/mol, puntos de fusión y ebullición de 1,950°C y 3,600°C, respectivamente (IUPAC, 2007). Puede presentar diferentes estados de oxidación que van desde 1- hasta 5+, en presencia de agentes oxidantes predomina el estado de oxidación 5+ y con agentes reductores el estado 4+. Asimismo, se ha observado que en los fluidos extracelulares del cuerpo humano la forma que más predomina es la pentavalente ( $V^V$ ), mientras que la tetravalente ( $V^{IV}$ ) en los fluidos intracelulares (Barceloux, 1999; WHO, 2001; IARC, 2006; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Es un metal de transición que está ampliamente distribuido en la Tierra y dado que se encuentra en más de 50 minerales se le considera como vigésimo segundo elemento más abundante en la corteza terrestre con una concentración promedio de 150 g/tonelada (Moskalyk y Alfantazi, 2003).

Las concentraciones de V registradas en el suelo varían desde los 3 hasta los 310  $\mu\text{g/g}$ , sin embargo, estos valores se pueden incrementar a más de 400  $\mu\text{g/g}$  en las áreas contaminadas; con respecto a la cantidad que está presente en el agua, la concentración depende mucho de la localización geográfica, observándose que en aguas continentales va desde 0.2 a más de 100  $\mu\text{g/litro}$  y en los océanos de 0.2 a 29  $\mu\text{g/litro}$ , siendo el fondo del océano el principal depósito de vanadio. De igual manera, la concentración en los combustibles fósiles va desde 1 hasta 1500 mg/Kg (WHO, 2000).

A pesar de la amplia distribución de este metal sus depósitos como mineral son raros, la mayor parte de su producción se da como un bi-producto o co-producto durante la extracción y procesamiento de minerales de hierro, titanio, fósforo y uranio, siendo en forma de pentóxido ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), aunque algunas veces en forma de vanadato de sodio o amonio las más comúnmente recuperadas (Rydzynski, 2001; IARC, 2006).

### **3.1.1. Usos**

Alrededor de una docena de compuestos de V son comercialmente importantes, entre ellos el pentóxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), el cual es el que predomina, ya que forman aleaciones con hierro, aluminio, titanio, entre otros, las cuales son muy utilizadas en la fabricación de autopartes, motores de jet, aeronaves. También se usan en la industria eléctrica y electrónica, del esmaltado, vidrieras, petroquímica, metalúrgica, pintura y cerámica. Asimismo, se emplean en agentes catalíticos para la producción de ácidos como el sulfúrico, ftálico, adípico, acrílico, oxálico, así como en la obtención de acetaldehído y antraquinona (Moskalyk y Alfantazi, 2003; IARC, 2006).

Conforme a lo anterior, se ha observado que el V contribuye al incremento de la contaminación ambiental ya sea de forma natural, originada por las erupciones

volcánicas o de manera antropogénica, por procesos industriales y la quema de combustibles donde este metal está presente (Barceloux, 1999). Fortoul y colaboradores (2002), observaron en autopsias realizadas a personas que vivieron en la Ciudad de México en la década de los noventa que la concentración de V presente en el pulmón aumentó en comparación con los que vivieron en la década de los sesenta, lo que es un indicador de que las concentraciones de V en el ambiente se incrementaron en función del aumento de la contaminación ambiental.

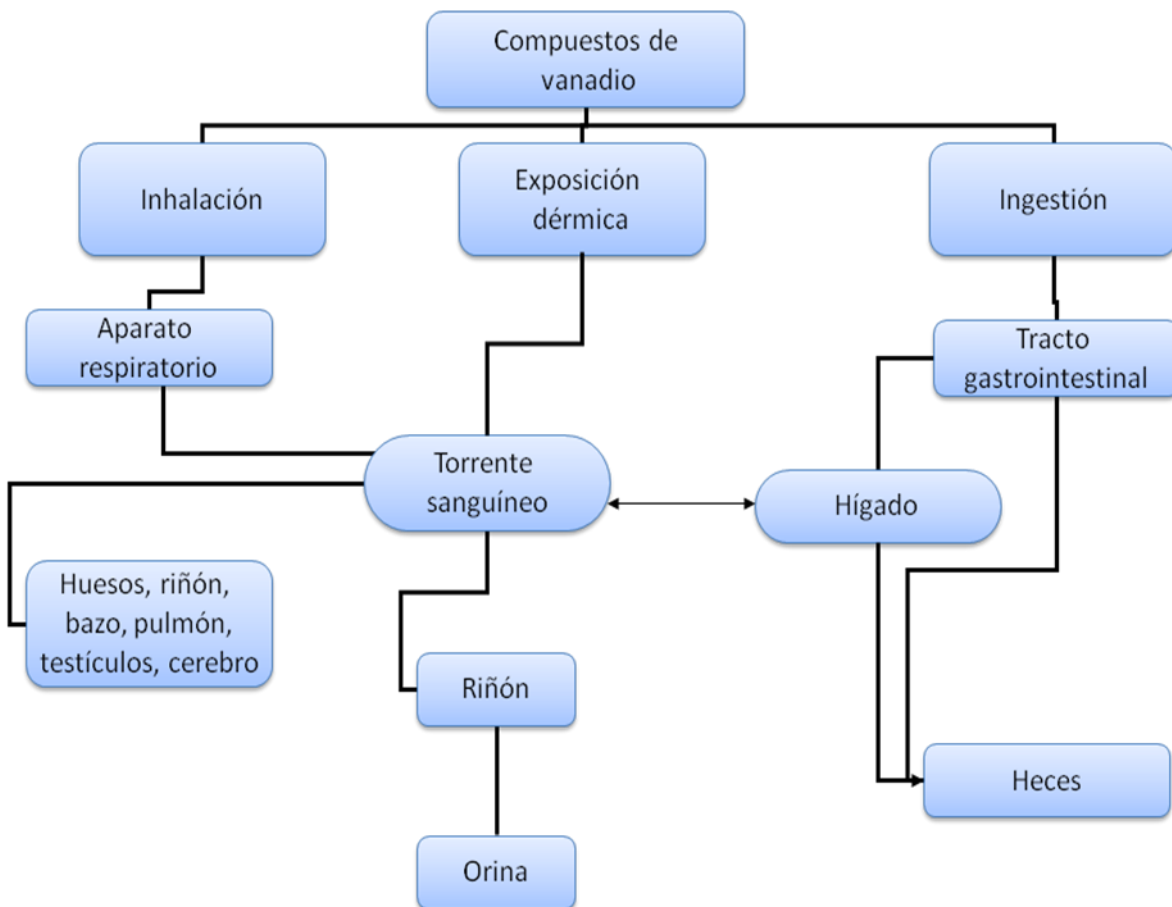
Los óxidos de V presentes en las partículas de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro de las cenizas y polvos, que se encuentran en el ambiente, están asociados con efectos adversos a la salud humana, ya que se ha demostrado que la exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y el desarrollo de enfermedades como bronquitis, rinitis, laringitis, faringitis, y en algunos casos produce alteraciones del ritmo cardiaco (WHO, 2000; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Sin embargo, una de las fuentes de V a la cual la población en general está expuesta son los alimentos, estimándose que la ingesta promedio dentro de la dieta es de 13 a 15  $\mu\text{g}$  de V por día, aunque algunos autores mencionan que alcanza valores de 60  $\mu\text{g}/\text{día}$  (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Con base en lo anterior, se ha demostrado que las principales vías por las cuales el V ingresa al organismo es por inhalación, vía oral y epidermis (Figura 1).

Una vez dentro del organismo, el V es distribuido a través de la sangre por proteínas (albumina y transferrina) hasta los órganos y tejidos, observándose que en el caso de los huesos, los riñones, el cerebro, el hígado, los testículos, los pulmones y el corazón, el V tiende a acumularse, lo que puede incrementar el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Barceloux, 1999; Mukherjee *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

### 3.1.2. Toxicidad

La toxicidad del V al parecer es diferente a la de otros metales, aunque la información en la literatura sobre la actividad carcinógena de este metal y sus compuestos es amplia, algunos autores lo consideran como un mutágeno de acción débil, sin embargo se conoce poco acerca de la interacción de este metal con las macromoléculas celulares. Asimismo, se ha observado que dicha toxicidad de los compuestos de V se incrementa conforme aumenta el estado de oxidación del metal, encontrándose que en los compuestos que tienen el estado 5+ (como en el  $V_2O_5$ ) son considerados los más tóxicos para los mamíferos (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).



**Figura 1. Vías de exposición por las que pueden ingresar los compuestos de vanadio en el organismo y su distribución (modificado de Mukherjee *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).**



En diversos estudios se ha observado que uno de los modos de acción del V en la inducción de efectos genotóxicos es por medio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) o por la interacción ADN-proteínas (Capella *et al.*, 2007), lo que puede llevar a la inducción de aberraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en cultivos de linfocitos humanos (Rodríguez-Mercado, 2006). Además de que, los óxidos de V pueden afectar el proceso normal de división celular, esto evidenciado por la disminución en el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR) (Roldán y Altamirano, 1990).

Asimismo, el V puede interactuar con diversas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, aminoácidos, nucleótidos y azúcares y se ha determinado en concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M que puede comportarse ya sea como un potente inhibidor o estimulador de diversas enzimas tales como ciertas cinasas, ribonucleasas, fosfatasas, entre otras. En el cuadro 1 se enlistan algunas enzimas con las que el V interactúa (Macara, 1980; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos todavía no han sido bien comprendidos. Compuestos de V, principalmente los metavanadatos, se comportan como inhibidores potentes y selectivos de proteínas fosfotirosil fosfatasas, específicamente de fosfotirosinas de la membrana celular en células A-431 (Swarup *et al.*, 1982), también inhibe la actividad de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasas en fibroblastos uniéndose al sitio de hidrólisis en el lado citoplasmático de la enzima (Macara *et al.*, 1980), además los compuestos orgánicos de V han demostrado que inhiben la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético de conejo (Aureliano *et al.*, 2008). Por otra parte, el V puede ejercer efectos sinérgicos con algunas moléculas tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) lo que lleva al incremento de la actividad mitogénica de este factor estimulando la síntesis de ADN, así como de nucleótidos y proteínas (Carpenter, 1981; Smith, 1983; Tojo *et al.*, 1987).

**Cuadro 1. Enzimas que pueden inhibir o estimular los compuestos de V (modificado de Macara, 1980; Rydzynski, 2001; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006)**

<b>Efecto inhibidor</b>	<b>Efecto estimulador</b>
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPasa	Fosfolipasa C
Ca <sup>+2</sup> -ATPasa	Adenil ciclasa
H <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPasa	Tirosin cinasa
H <sup>+</sup> -ATPasa	Proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK)
K <sup>+</sup> -ATPasa	Fosfatidilinositol 3- cinasa
Ca <sup>+</sup> -Mg <sup>+</sup> ATPasa	NADPH oxidasa
Dinein ATPasa	Glicógeno sintetasa
Actomiosin ATPasa	Lipoproteína lipasa
Proteína Tirosin Fosfatasa	
Glutamina deshidrogenasa	
Fosfatasa alcalina	
Fosfatasa ácida	
Glucosa-6-fofatasa	
Fosfofructocinasa	
Alanin aminotransferasa	
Aspargin aminotransferasa	

### **3.2. Ciclo celular**

Las células somáticas de los organismos eucariotas pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división llamada ciclo celular, en algunas éste se realiza en cuatro fases principales: G1 (Gap 1), S (Síntesis), G2 (Gap 2) y M, a las tres primeras juntas se les conoce como interfase y a la última como fase de división nuclear (Figura 2). Para que se lleve a cabo un ciclo completo puede requerir desde pocas horas hasta varios días, dependiendo del tipo de célula y de factores externos como la

temperatura o los nutrientes disponibles, entre otros (Lewin, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

En la fase G1, los cromosomas están constituidos por una sola cromátida (procedentes de la mitosis anterior), y es un período de actividad química intensa en donde aumenta el tamaño de la célula y se da la síntesis de ARN y proteínas; las mitocondrias, los cloroplastos y los centriolos se duplican, además hay un aumento del tamaño del retículo endoplásmico por la síntesis de lípidos y proteínas. En fase de S se lleva a cabo la duplicación del ADN, se sintetizan las histonas y las proteínas asociadas al ADN, así al término de ésta el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN, es decir, dos cromátidas por cromosoma.

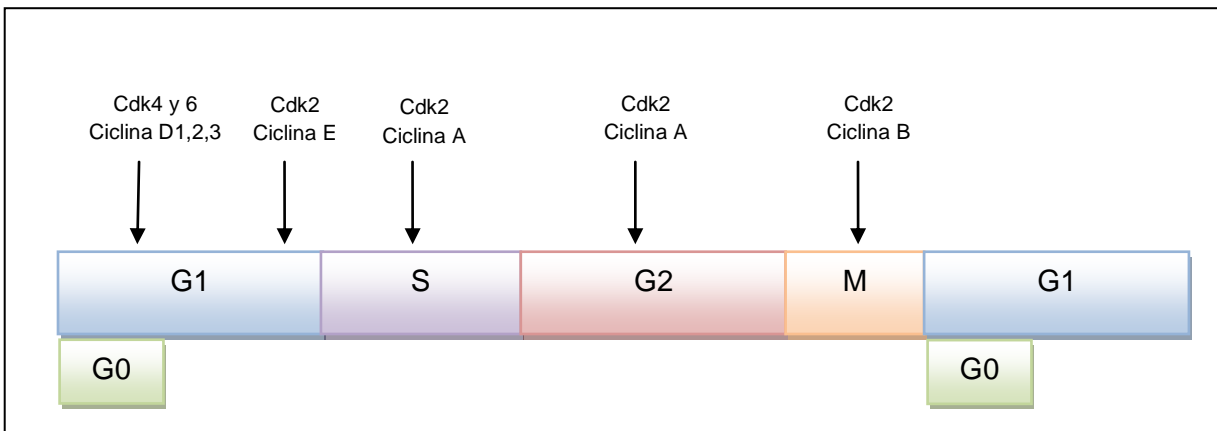
La fase G2 proporciona un lapso de seguridad que permite a la célula asegurarse de que la replicación de ADN se ha completado antes de que empiece la siguiente, además, se termina la duplicación de los centriolos (Alberts *et al.*, 2002). La fase M es en la que los cromosomas replicados son segregados en núcleos separados y ocurre la citocinesis para formar dos células hijas (Johnson y Walker, 1999).

Algunas células detienen su ciclo en una fase especializada conocida como G0 (G cero) que es un estado de no crecimiento o quiescente, el cual es diferente a las demás fases de las células que están en proliferación, en él la velocidad de síntesis de proteínas es drásticamente reducida, de esta manera la ausencia de factores de crecimiento apropiados lleva a las células a una especie de sueño del ciclo celular en el cual el sistema de control es incapaz de progresar más allá del punto de control de G1. La capacidad de entrar en G0 es lo que determina las enormes diferencias en la duración del ciclo celular en los distintos tipos celulares de los organismos pluricelulares (Alberts *et al.*, 2002).

### **3.2.1 Reguladores del ciclo**

La progresión del ciclo celular esta controlada por la formación secuencial de complejos de proteínas conformados por un grupo de subunidades reguladoras

llamadas ciclinas y otro grupo de subunidades catalíticas denominadas cinasas dependientes de ciclina (Cdk por sus siglas en inglés). Las ciclinas son proteínas que se sintetizan y degradan durante las fases del ciclo celular, estas activan a las Cdk de manera específica, y es así como se forman los complejos ciclina/Cdk (Figura 2) (Johnson y Walker, 1999).



**Figura 2. Fases del ciclo celular junto con la formación de los complejos ciclina/Cdk que los regulan.**

En células de mamífero se han identificado nueve Cdk y por lo menos 16 ciclinas, sin embargo, no todas actúan en la regulación del ciclo celular, otras de sus funciones incluyen la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación celular y la apoptosis, en el cuadro 2 se enlistan las principales ciclinas y Cdk. No obstante, todas las ciclinas contienen una región común conocida como la caja de ciclinas, la cual es usada para unirse y activar a las Cdk (Morgan, 1997; Johnson y Walker, 1999; Shackelford *et al.*, 1999; Malumbres y Barbacid, 2005).

De manera normal en células de mamífero las ciclinas D y E forman complejos con las Cdk 2, 4 y 6, que son requeridas para la progresión a través de la fase G1 a la S, como se muestra en la Figura 2, existe evidencia de que el complejo ciclina A/Cdk2 puede tener un papel en la progresión G1→S, aunque esto no ha sido bien establecido (Shackelford *et al.*, 1999). Las ciclinas D son las primeras en ser sintetizadas (en la fase

G1) y pueden estimular a las células que se encuentran en G0 a reiniciar el ciclo celular; a diferencia de muchas otras ciclinas, las D no oscilan durante el ciclo, más bien, sus niveles son controlados por la presencia de factores de crecimiento (mitógenos) las cuales a su vez se asocian para activar a las Cdk4 y Cdk6 (Johnson y Walker, 1999).

**Cuadro 2. Principales ciclinas identificadas en células de mamífero (modificado de Johnson y Walker, 1999)**

<b>Ciclinas</b>	<b>Cdk asociadas</b>	<b>Función</b>
A	Cdk1 (cdc2), Cdk2	Transición a la fase S
B1, B2	Cdk1	Salida de G2, mitosis
C	Cdk8	Transición de la fase G0 a S, Regulación transcripcional
D1, D2, D3	Cdk4, Cdk6	Transición de la fase G0 a la fase S
E	Cdk2	Transición de la fase G1 a la fase S
F	?	Transición de la fase G2 a la fase M
G1, G2	Cdk5	Respuesta al daño del ADN
H	Cdk7	Reparación del ADN, regulación transcripcional
I	?	---
K	?	Regulación transcripcional
T1, T2	Cdk9	Regulación transcripcional

?: No se ha determinado a que ciclina se une

La función de estos complejos es de fosforilar diferentes moléculas, principalmente proteínas, en intervalos de tiempo preciso para que la división celular se lleve a cabo de manera ordenada. Un sustrato muy importante para ellos es la proteína del retinoblastoma (pRB), que participa en el mecanismo que mantiene la división celular en G1 si es que existe una lesión en el ADN. La pRB no fosforilada se une al factor de transcripción E2F, mientras se mantienen unidos el E2F no puede promover la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de ADN (los de la ADN polimerasa, la ribonucleótido reductasa y otras proteínas) y la síntesis de la ciclina E. En este estado el ciclo celular no puede pasar de G1 a S, sin embargo, éste mecanismo de bloqueo se elimina cuando la pRB es fosforilada primero por el complejo ciclina D/Cdk4/Cdk6 y posteriormente por ciclina E/Cdk2, lo que ocurre como respuesta a una señal para que el ciclo celular continúe (Johnson y Walker, 1999; Shackelford *et al.*, 2000; Nelson y Cox, 2008).

A través de la liberación del E2F, la ciclina E es la siguiente que se induce durante la progresión de la fase G1, ésta se asocia y activa la Cdk2 juntos se requieren para la transición de las células de la fase G1 a la S, también participan en mantener el estado fosforilado de la pRB y de esta manera mantiene activo el E2F. Al igual que otros complejos, la ciclina E/Cdk2 fosforila la histona H1, que tiene una actividad importante durante la replicación del genoma (Johnson y Walker, 1999). Asimismo, la familia de factores de transcripción E2F regula los genes de la ciclina A que forma un complejo con la Cdk2, el cual es esencial para la progresión del ciclo celular durante la fase S (Assoian, 1997).

### **3.2.2 Inhibidores del ciclo**

Bajo condiciones normales el ciclo celular procede sin interrupciones, sin embargo, si la célula recibe un daño en la información genética, ésta es capaz de detenerse en determinadas fases del ciclo, reparar el daño y continuar, esto lo hace gracias a los censos que se llevan a cabo en los diferentes puntos de control (mejor conocidos como “checkpoints”), los cuales existen a través de todo el ciclo (Shackelford *et al.*, 2000).

El “checkpoint” en la fase G1 depende del incremento en la expresión y activación de los productos del gen *p53*, el cual ha sido caracterizado como un gen supresor de tumores ya que se ha observado que en más del 50% de los tumores humanos se encuentra con mutaciones (Shackelford *et al.*, 2000). Cuando las proteínas cinasas ATM y ATR detectan lesiones en el ADN, tales como un rompimiento de cadena sencillo, activan al *p53* para que actúe como factor de transcripción que estimule la síntesis de la proteína *p21* (*Cip1/Waf1*), la cual se une directamente a los complejos ciclina/Cdk y actúa como un inhibidor de las Cdk. Al parecer se necesitan dos o más moléculas de *p21* para inhibir la actividad cinasa de los complejos ciclina E/Cdk2, ciclina D1/Cdk4/6, ciclina A/Cdk2 (Cistulli y Kaufmann, 1998; Shackelford *et al.*, 2000).

En presencia de *p21*, *pRB* permanece hipofosforilada y unida a E2F bloqueando la actividad de este factor de transcripción, con lo que el ciclo celular se detiene en G1, esto da tiempo a la célula para que repare el ADN antes de entrar a la fase S evitando así la transferencia del genoma defectuoso a una o a ambas células hijas (Nelson y Cox, 2008). Si bien *p21* es un efector de *p53* no quiere decir que sea dependiente de éste, ya que además de asociarse con los complejos ciclina/Cdk, *p21* también se asocia con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA por sus siglas en inglés) y se considera como un mecanismo adicional por el cual puede inhibir la síntesis del ADN (Vidal y Koff, 2000).

Además de *p21* existen otras proteínas que actúan como inhibidores de los complejos ciclina/Cdk (cuadro 3), conocidas como proteínas inhibidoras de Cdk (CKI por sus siglas en inglés). De las cuales, en células de mamíferos se han identificado dos tipos, las familias *Cip/Kip* e *Ink 4*, que tienen un mecanismo específico para cada tejido por el cual la progresión del ciclo celular puede ser detenido en respuesta a señales tanto intracelulares como extracelulares. La familia *Cip/Kip* incluye a las proteínas *p21*, *p27*, y *p57*, que inhiben principalmente a los complejos ciclina-Cdk2 y Cdk4, 6 involucrados en el control de la fase G1 y la transición de G1 a S. La familia *Ink 4* contiene cuatro miembros (*p15*, *p16*, *p18*, y *p19*) los cuales inhiben de manera específica a los complejos ciclina D/Cdk4, D/6 (Morgan, 1997; Vidal y Koff, 2000).

Sin embargo, el control de las cinasas (Cdk 2, 4, y 6) también puede ser afectado por otras vías como la acumulación de las ciclinas, la manera en la cual está ensamblado el complejo ciclina/Cdk, o por eventos específicos de fosforilación y desfosforilación (Morgan, 1997).

**Cuadro 3. Inhibidores de los complejos ciclinas/Cdk que actúan a lo largo del ciclo celular**

INK4:				KIP:		
p15	p16	p18	p19	p21	p27	p57
Ciclinas D / Cdk4 y 6						
				Ciclinas A, B, y E / Cdk2		

### 3.2.3. Proteína p53

Como se mencionó anteriormente cuando existe un daño al ADN, la proteína p53 coordina la respuesta celular que lleva a la reparación del mismo o a la eliminación de las células con lesiones potencialmente oncogénicas ya sea por la detención del ciclo celular o por medio de la apoptosis, por lo que se le considera una de las proteínas más importantes supresora de tumores (Levine, 1997; Blattner, 2008).

Ésta proteína es un factor de transcripción con una secuencia específica que se une al ADN y de esta manera activa o reprime gran número de genes los cuales se categorizan de acuerdo a su función: aquellos que detienen el ciclo celular, los que reparan el ADN y los que regulan la respuesta apoptótica (Woods y Vousden, 2001).

En células normales, es poco abundante y se encuentra en estado latente, para su activación requiere tanto del incremento en sus niveles así como la modificación post-transcripcional de las moléculas existentes ya sea por acetilación, fosforilación,



metilación, ubiquitinación, ó sumoylación. Ambos eventos, el incremento y la modificación, son procesos independientes (Woods y Vousden, 2001; Blattner, 2008).

En más de la mitad de todos los cánceres humanos se ha observado que p53 pierde su función, esto debido a que puede existir una mutación en los genes que la codifican dando como resultado una proteína que ha perdido su actividad, o que haya una sobreexpresión de la proteína Mdm2 (Hdm2 en células humanas), la cual se encuentra unida a p53 de manera normal, y requiere de su modificación para ser liberado; o que sea inactivado por proteínas virales como se da en la infección viral del carcinoma cervical (Vousden, 1995; Woods y Vousden, 2001).

Una vez que p53 está activado se une al ADN para lo cual requiere de zinc, lo que hace que la proteína sea especialmente susceptible a la inactivación por metales de transición ya que se ha observado, en el caso del cadmio, que éstos pueden sustituir al zinc (Méplan *et al.*, 1999). Además de que compuestos metálicos de arsénico, cadmio, cobalto, cromo, hierro, níquel, vanadio, entre otros, pueden influir en la expresión y activación de p53 generalmente por la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Esta interacción metal-p53 depende de la composición química y el estado de oxidación del metal (Harris y Shi, 2003; Leonard *et al.*, 2004).

#### **3.2.4. Efecto del vanadio sobre el ciclo celular**

La interacción de los compuestos de V con las proteínas que controlan el ciclo celular tiene un comportamiento antagónico, por una parte puede detener la progresión del ciclo y por otra favorecerla. En estudios realizados en líneas celulares de la epidermis de ratón JB6 P+ (C141), se observó que la administración de V promovía la entrada de las células a la fase S debido a la activación de la proteína cinasa Akt la cual fosforiló a la proteína pRB provocando la liberación del factor de transcripción E2F y de esta manera se incrementaron los niveles de las ciclinas E y A, necesarias para la entrada y progresión de la fase S (Zhang *et al.*, 2004).

Asimismo, los compuestos de V pueden detener la progresión del ciclo celular de una manera dosis y tiempo dependiente. En líneas celulares de epitelio de pulmón humano A549, la administración de V produjo la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) lo que provocó que las células se detuvieran en la fase G2/M debido a que se incrementaron los niveles de la proteína p21 y Chk1, así como la inactivación del complejo ciclina B/Cdc 2; de igual manera en líneas celulares C141, al aplicar V se elevaron los niveles de p53 y p21 lo cual provocó que las células se detuvieran en la fase S. De igual manera, en células JB6 la generación de  $H_2O_2$  por parte del V llevó a la activación de p53 lo que originó la muerte de las células por medio de la apoptosis (Huang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Si bien se ha relacionado que la detención del ciclo celular por parte de los compuestos de V se debe a la generación de  $H_2O_2$ , Fu y colaboradores en el 2008, observaron que al administrar bisacetilacetato de vanadilo a células de hepatoma humano HepG2, este era capaz de detenerlas en la fase G1/S sin que hubiera aumento en la formación de  $H_2O_2$ , por lo que se propone que el V por si sólo es capaz de interactuar con las moléculas encargadas de la progresión del ciclo celular.

### **3.3. Purificación y detección de proteínas**

Las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos son las principales macromoléculas en los sistemas biológicos y dentro de cada clase se encuentran gran número de moléculas individuales, cada una de ellas pueden ser separadas unas de otras con base en sus diferentes características ya sea físicas o químicas, para las proteínas las dos más ampliamente usadas son el tamaño, definido ya sea como la longitud o la masa, y su afinidad para unirse a ligandos específicos (Stewart y Ebel, 2000; Lodish *et al.*, 2004).

Para aislar una proteína en particular de todas las que están presentes en la célula se requiere el uso de métodos combinados para poder primero separarlas del conjunto de moléculas presentes, y posteriormente, detectar la presencia de la proteína en

específico. Una de las técnicas empleadas actualmente para realizar la separación y análisis de estas macromoléculas así como de los ácidos nucleicos es la electroforesis, la cual se puede definir como la migración de iones cargados en un campo eléctrico (Stewart y Ebel, 2000; Lodish *et al.*, 2004).

La separación electroforética de proteínas es desarrollada normalmente en geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés “polyacrylamide gel electrophoresis”), debido a que es un método sencillo y sensible para analizarlas, ya que reúne una serie de propiedades idóneas, como son: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos (Lomonte, 2007).

Entre las diferentes técnicas de PAGE la más empleada es aquella en donde las proteínas son expuestas al detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. En estos complejos la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente y su relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas, de esta manera van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM) teniendo que a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, caso contrario en aquellas que tienen un mayor tamaño, lo que va a ser reflejado en las diferentes bandas que se observan en el gel (García-Pérez, 2000; Lodish *et al.*, 2004, Lomonte, 2007).

Sin embargo, la purificación de una proteína, o cualquier otra molécula, requiere de un ensayo específico que pueda detectar la molécula de interés en las bandas del gel, basándose en sus características distintivas: la habilidad de unirse a un ligando en particular, a catalizar una reacción, o a ser reconocida por un anticuerpo específico. El método más empleado ya que combina el poder de separación de la electroforesis en gel, la especificidad de los anticuerpos, y la sensibilidad de un ensayo enzimológico, es el de Western Blotting también conocido como inmunoblotting. Éste permite la transferencia de las proteínas separadas en SDS-PAGE a una membrana adsorbente, lo que forma una réplica exacta de las bandas del gel, y con ayuda de anticuerpos

específicos, se puede detectar y caracterizar una proteína específica, en especial aquellas que son poco abundantes (Lodish *et al.*, 2004; Kurien y Scofield, 2006)

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diferentes estudios realizados en el laboratorio han demostrado que los compuestos del vanadio son genotóxicos, sin embargo se conoce poco acerca de sus interacciones con el ADN y sus mecanismos de acción, por lo que es conveniente el uso de métodos combinados que permitan determinar si la genotoxicidad de este metal es producida por una interacción indirecta con el ADN, y que formas químicas son las causantes de estos efectos, lo cual podría llevar a la detención de la proliferación celular o muerte. Por lo anterior resultaría interesante estudiar de qué manera este metal está modificando la progresión del ciclo celular y particularmente como afecta la expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de la fase G1 y las involucradas en la transición a la fase S, asimismo, si se modifica la actividad cinasa por moléculas como la p21 en cultivos de linfocitos humanos.

## **5. HIPÓTESIS**

En diferentes líneas celulares se ha observado que los compuestos de vanadio pueden inducir algún tipo de daño al ADN y alterar el ciclo celular, por lo tanto, si se administra pentóxido de vanadio a linfocitos humanos en proliferación, en un estudio *in vitro*, este será capaz de modificar los niveles de expresión de las proteínas ciclinas y Cdk que controlan la transición de la fase G1/S, lo cual llevaría a la detención del ciclo.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. General**

Evaluar el efecto del pentóxido de vanadio sobre la progresión del ciclo celular en la fase G1 en linfocitos humanos expuestos *in vitro*

## 6.2. Particulares

- Evaluar si la administración de pentóxido de vanadio a cultivos de linfocitos humanos afecta la progresión del ciclo celular.
- Analizar la expresión de las proteínas ciclinas D1 y E, así como de las Cdk2 y 4 en linfocitos humanos expuestos a pentóxido de vanadio en un sistema *in vitro*.
- Analizar la expresión de la proteína p53 en linfocitos humanos expuestos a pentóxido de vanadio.
- Determinar si la administración del pentóxido de vanadio a linfocitos humanos en un sistema de exposición *in vitro* induce la expresión de la proteína p21.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Reactivos**

Para la realización de la separación y cultivo de linfocitos, así como, para la cinética de proliferación y viabilidad celular, se utilizaron: Histopaque<sup>®</sup>-1077, pentóxido de vanadio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) CAS No. 1314-62-1, 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) CAS No. 59-14-3, colchicina CAS No. 64-86-8, cloruro de sodio (NaCl) CAS No. 7647-14-5, 5(6)-diacetato de carboxifluorosceína (mezcla de isómeros) (CFDA) y solución de Giemsa (Sigma-Aldrich, Inc., S. Louis MO EUA). Solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, bromuro de etidio (Br-Et) CAS No. 1239-45-8, (GIBCO, Invitrogen Corporation, NY EUA). Heparina sódica CAS No. 9041-08-1 (Inhepar, Pisa Farmacéutica Mexicana).

### **7.2. Separación y cultivo de linfocitos**

Se obtuvieron 10 mL de sangre de una vena periférica del brazo de un donador con una jeringa que fue heparinizada previamente. Por otra parte, se colocaron 5 mL de Histopaque<sup>®</sup>-1077 en un tubo de centrifuga cónico y se llevó a temperatura ambiente (esto se hizo por duplicado). Se colocaron 5 mL de sangre en este tubo por encima del Histopaque<sup>®</sup>, observándose dos fases, sin mezclarse, y fueron centrifugados a 1,800 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos (min) a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de centrifugado se obtuvieron cuatro fases en el tubo: una con el botón de células rojas (parte inferior); otra con el sobrante de Histopaque<sup>®</sup>; la siguiente es una zona opaca, la cual contiene los linfocitos; y por encima de éstas una fase que contiene el sobrante del plasma.

Los linfocitos fueron recolectados con una pipeta Pasteur aspirando con cuidado la fase correspondiente a éstas células y transferidos a un tubo limpio, en el se realizó un primer lavado con 10 mL de PBS, mezclándolos por inversión y centrifugándolos a 1,500 rpm durante 10 min. A continuación se aspiró el sobrenadante y el botón celular

se lavó dos veces más. Al terminar los lavados, el botón celular fue resuspendido en 0.5 mL de PBS, se tomaron 20  $\mu$ L de la muestra y se realizó el conteo de las células en un hemocitómetro.

Una vez obtenida la cantidad de linfocitos, se procedió a cultivar en promedio tres millones de células en 5 mL de medio de cultivo, para cada uno de los tratamientos por duplicado y se incubaron a 37°C con un 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.3. Análisis de la proliferación celular**

#### **7.3.1. Tratamientos**

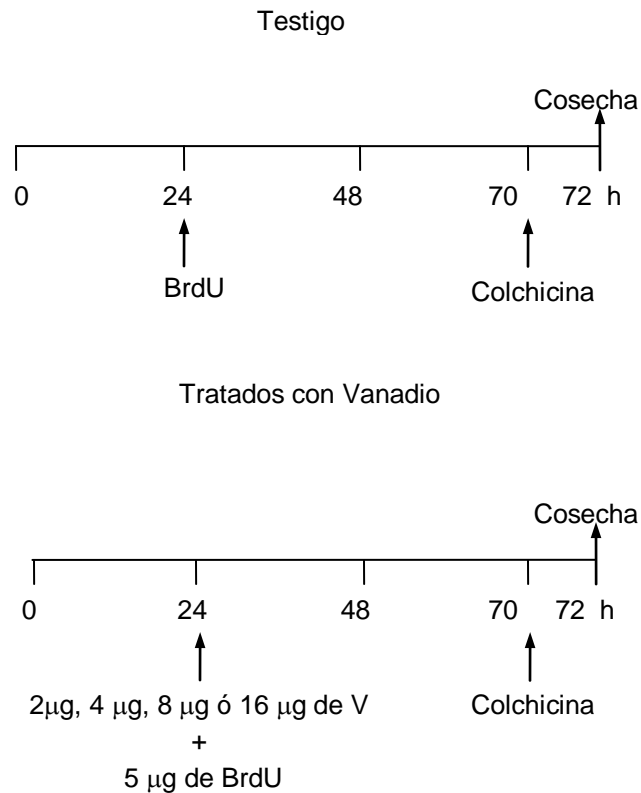
Para llevar a cabo este análisis se empleo la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas, realizando lo siguiente:

- Un grupo testigo, el cual fue un cultivo sin tratamiento.
  
- Cuatro cultivos a los cuales veinticuatro horas después de haber iniciado, se les administró V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en concentraciones de 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 8  $\mu$ g ó 16  $\mu$ g/mL.

A todos los cultivos se les agregó 5  $\mu$ g de BrdU/mL veinticuatro horas después de la siembra (en la figura 3 se muestra la manera en que se desarrollaron los protocolos). Cabe mencionar que estas concentraciones de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> han sido determinadas y empleadas en diversos estudios realizados en nuestro laboratorio (Roldán y Altamirano, 1990; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003; Rodríguez-Mercado, 2006).

Cuarenta y seis horas después de que se les administró el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y la BrdU, a los cultivos se les agregó 4  $\mu$ g/mL de colchicina, el cual inhibe la formación del huso mitótico, para obtener el mayor número de células en metafase y se incubaron por dos horas más. Al término de este tiempo se realizó la cosecha.





**Figura 3. Protocolo para el Intercambio de Cromátidas Hermanas. a) un cultivo como testigo al cual se le agregó 5 µg/ml BrdU; b) cuatro cultivos a los que se les trató, además de BrdU, con 2 µg, 4 µg, 8 µg ó 16 µg de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Para la expresión de proteínas se siguió el mismo procedimiento excepto que a estos tratamientos no se les adicionó BrdU ni colchicina.**

### 7.3.2. Tinción diferencial de las preparaciones para la evaluación de la proliferación celular

Los cultivos se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se incubaron en 5 mL de solución hipotónica (cloruro de potasio al 0.075 M) por 20 min a 37°C. A continuación se centrifugaron nuevamente y se desechó el sobrenadante, se fijó el botón celular con 5 mL de metanol-ácido acético (3:1) realizando la fijación en tres períodos: dos de 10 y uno de 5 min, entre cada período se centrifugó a 1,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Al botón celular se le agregaron 0.5 mL de fijador y se procedió a realizar las preparaciones por goteo en portaobjetos limpios.

Se dejaron secar las preparaciones por 24 horas, posteriormente se colocaron en solución doble citrato-salina (2XSSC) compuesta por citrato de sodio 0.03 M y cloruro de sodio 0.3 M irradiándolas con luz ultravioleta por 20 min, después se sumergieron en 2XSSC a una temperatura de 55°C por 20 min y finalmente se tiñeron con solución de Giemsa al 5% por 25 min. Estas preparaciones se observaron en un microscopio de campo claro a 1,000x clasificando 120 células en metafase por cada tratamiento de acuerdo al número de ciclos que habían progresado (Figura 4) con base en estos datos se obtuvieron el índice de replicación (IR) y el tiempo promedio de proliferación celular (TPC), de acuerdo con las siguientes formulas.

$$IR = \frac{1(\%M1) + 2(\%M2) + 3(\%M3)}{N}$$

$$TPC = \frac{\text{Número de horas en BrdU}}{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}$$

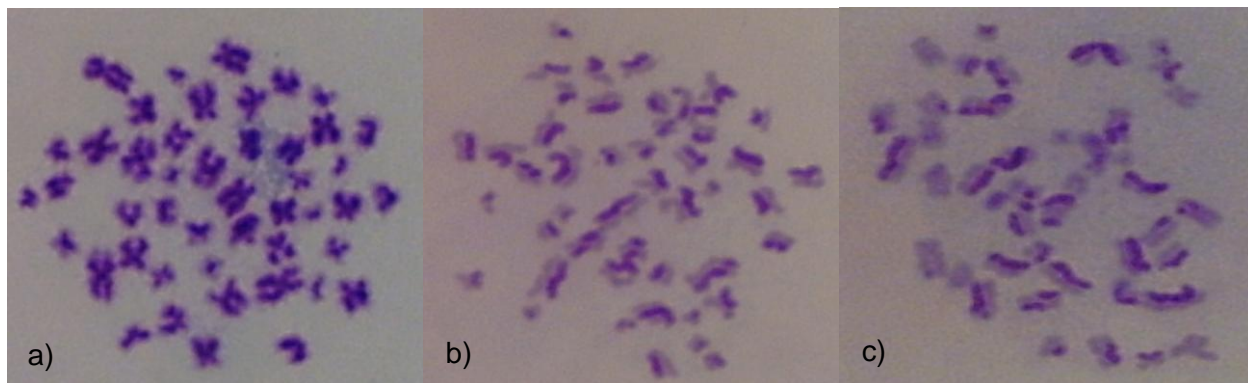
De donde:

M1, M2, M3 son el número de células en metafase que han pasado por uno, dos y tres ciclos celulares, respectivamente.

N es el número total de células analizadas

También se obtuvo el índice mitótico (IM) contando el número de células en metafase presentes en 1,000 células por tratamiento.

$$IM = \frac{\text{Número de metafases}}{1000 \text{ células}} \times 100$$



**Figura 4. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas de cromosomas metafásicos que se pueden identificar como células que han pasado por: a) un ciclo de replicación, cuyos cromosomas presentan ambas cromátidas teñidas del mismo color, b) dos ciclos, con una teñida y la otra débilmente, y c) tres o más, en donde unos cromosomas presentan una tinción similar a los de segundo ciclo y otros tienen sus dos cromátidas débilmente teñidas.**

#### 7.4. Viabilidad celular

Para realizarla se siguió el método propuesto por Strauss en 1991 con ligeras modificaciones. Se preparó una solución de tinción (1:1) de Br-Et (0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y CFDA (0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), de aquí se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de los colorantes con 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular (linfocitos) y se incubaron a 37°C por 5 min. Posteriormente se hicieron tres lavados con 1 mL de PBS centrifugándolos a 4,000 rpm por 3 min cada uno, del botón se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  la cual se colocó en un portaobjetos para evaluarse en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm.

La viabilidad se obtuvo cuantificando 100 células en total tomando en cuenta el número de viables, las cuales se observan de color verde ya que su membrana está íntegra y tienen actividad enzimática por lo que la CFDA reacciona con las esterasas induciendo la fluorescencia, y el de no viables que presentan una tinción de color rojo debido a que han perdido la integridad de la membrana y el Br-Et puede intercalarse en la estructura del ADN.

## **7.5. Extracción y análisis de las proteínas por inmunoblot**

### **7.5.1. Reactivos**

Para el desarrollo de este protocolo se utilizaron, además de algunos de los reactivos anteriores: ácido etileno diamino tetracético (EDTA por sus siglas en inglés) CAS No. 6381-92-6, nonidet P-40 CAS No. 9036-19-5, vanadato de sodio ( $\text{NaVO}_4$ ) CAS No. 13718-26-8, fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) CAS No. 10049-21-5, fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) CAS No. 10039-32-4 (Sigma-Aldrich, Inc., MO EUA). Acrilamida CAS No. 79-06-1, N,N'-metileno-bis-acrilamida CAS No. 110-26-9, glicina CAS No. 56-40-6, dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés) CAS No.151-21-3, N,N,N',N'-tetra-metil-etilenodiamina (TEMED) CAS No. 110-18-9, tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) CAS No. 77-86-1, persulfato de amonio CAS No. 7727-54-0 (Bio-Rad Laboratories, CA EUA).

También se utilizaron: inhibidores de proteasas, aprotinina, leupeptina, PMSF, anticuerpos primarios anti-Cdk 2 (sc-6248), y 4 (sc-53636), anti-ciclina D1 (sc-246), anti-ciclina E (sc-248), anti-p21 (sc-51689), y anti-p53 (sc-99), actina (sc-8432), anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (goat anti-mouse IgG-HRP por sus siglas en inglés, sc-2005), Tween-20 CAS No. 9005-64-5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA USA).

### **7.5.2. Tratamientos**

Para observar si el  $\text{V}_2\text{O}_5$  tiene la capacidad de inhibir o no la expresión de las proteínas que se evalúan en este estudio se realizaron los siguientes tratamientos:

- a) Un cultivo al cual no se le agregó ningún reactivo (aparte de los que contiene el medio de cultivo), este es considerado como grupo testigo.
- b) Cuatro cultivos, en donde veinticuatro horas después de haber iniciado la incubación se les adicionó una de las siguientes concentraciones de  $\text{V}_2\text{O}_5$ : 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$  ó 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Cuarenta y ocho horas después de dar los tratamientos a los cultivos, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min para obtener el botón celular.

### **7.5.3. Lisis de linfocitos para obtener las proteínas**

El botón celular se resuspendió con 5 mL de PBS frío, se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se le agregó 0.25 mL de solución amortiguadora de lisis RIPA frío (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al cual se le adicionaron inhibidores de proteasas (1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL PMSF) y se resuspendió pasándolo varias veces a través de una aguja 21G con ayuda de una jeringa, y se traspaso a un tubo eppendorf y se dejó en refrigeración por 2 horas a 4°C.

A continuación se agitó ligeramente el lisado procurando no incrementar su temperatura y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante, el cual contiene a las proteínas extraídas de los linfocitos, se transfirió a otro tubo.

La concentración de proteínas por microlitro (µL) presente en los lisados fue determinada por el método propuesto por Bradford en 1976, con la ayuda del reactivo "Protein Assay" (Bio-Rad) y haciendo una curva estándar de una solución de Albumina de Suero Bovino (BSA por sus siglas en inglés) 1 mg/mL.

### **7.5.4. Expresión de ciclinas y Cdk**

Para identificar las proteínas ciclinas y Cdk se llevó a cabo una separación de las mismas por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 y 15% en condiciones desnaturalizantes. Primero se mezcló 25 µg de proteína con solución amortiguadora para electroforesis 2x en proporción 1:2 y se procedió a colocarlos en agua hirviendo por 5 min para detener la reacción, esto se hizo para cada tratamiento, a continuación se colocaron en los pozos formados en el gel y se le aplicó un voltaje constante de 80 voltios, posteriormente las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) de Bio-Rad por electroblotting con una corriente constante de 140 miliamperios (mA) por una hora y media.

La membrana se incubó en solución de bloqueo (5% de leche sin grasa con amortiguador tris salino más 1% de Tween-20 (TTBS)), por 1 h a temperatura ambiente, para posteriormente lavarla tres veces con TTBS durante 10 min cada uno e incubarla con uno de los siguientes anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Concentración
anti-ciclina D1	1:1000
anti-ciclina E	1:1000
anti-Cdk2	1:1000
anti-Cdk4	1:1000
anti-p21	1:1000
anti-p53	1:1000

y anti-actina (1:5000) por toda la noche y con agitación constante. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno y nuevamente se incubó con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP (1:10000) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó cuatro veces con TTBS por 10 min cada uno.

La detección y determinación de las bandas se realizó utilizando el substrato cromogénico 3,3' diaminobenzidina tetrahidratada la cual se convierte en un precipitado marrón y para mejorar la sensibilidad del compuesto la reacción se llevó en presencia de iones de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ).

Una vez que se visualizaron las bandas, la reacción se detuvo lavando la membrana con PBS y la intensidad relativa de las mismas fue evaluada utilizando el programa para computadora *ImageJ* 1.45s del National Institutes of Health, de Estados Unidos de Norteamérica que es de libre acceso (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## **7.6. Análisis estadístico**

En los ensayos de cinética de división celular y viabilidad se utilizó la prueba *t* de student para comparar alguna diferencia entre cada grupo tratado contra el grupo sin tratamiento, con respecto al IM se realizó una Z de proporciones, en todos los casos se considero un  $\alpha$  de 0.05. Cabe mencionar que los datos en los cuadros y figuras están representados por la media  $\pm$  la desviación estándar.

## 8. Resultados

### 8.1. Efecto del pentóxido de vanadio sobre la proliferación celular

Para la evaluación de la proliferación celular se tuvieron dos donadores (prueba A y B) hombres de 28 y 30 años, respectivamente, y por cada uno de ellos se realizaron dos experimentos de manera independiente, en el cuadro 4 se muestran los promedios de los resultados obtenidos para cada una de las pruebas. Al momento de obtener el promedio del IM (Figura 5) se observó una disminución estadísticamente significativa conforme aumenta la concentración de  $V_2O_5$  al compararlos contra el grupo testigo, siendo éste el cultivo sin tratamiento, lo mismo sucede cuando se analiza el IR (Figura 6).

Al obtener la media del TPC de los diferentes tratamientos se observó que el tiempo que tarda en llevarse a cabo el ciclo celular se incrementa conforme aumenta la concentración de  $V_2O_5$ , teniendo que para el grupo sin tratamiento es de aproximadamente 26 h, mientras que para la de 8  $\mu g$  es de 38 h (Figura 7). No obstante, en la de 16  $\mu g$  el TPC no pudo ser evaluado ya que la cantidad de células en metafase era casi nula, esto evidenciado por el porcentaje del IM el cual es de 0.14.

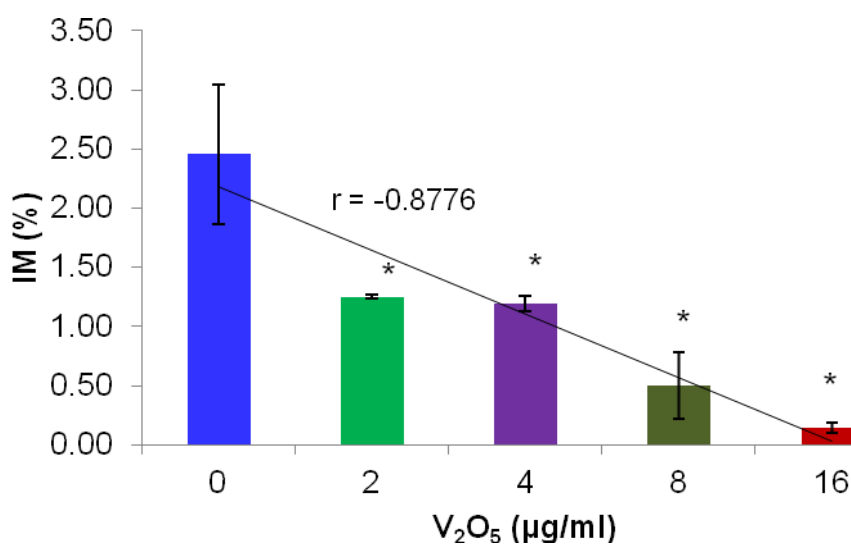


**Cuadro 4. Índice mitótico IM, índice de replicación IR y tiempo de proliferación celular TPC, de linfocitos tratados por cuarenta y ocho horas con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.**

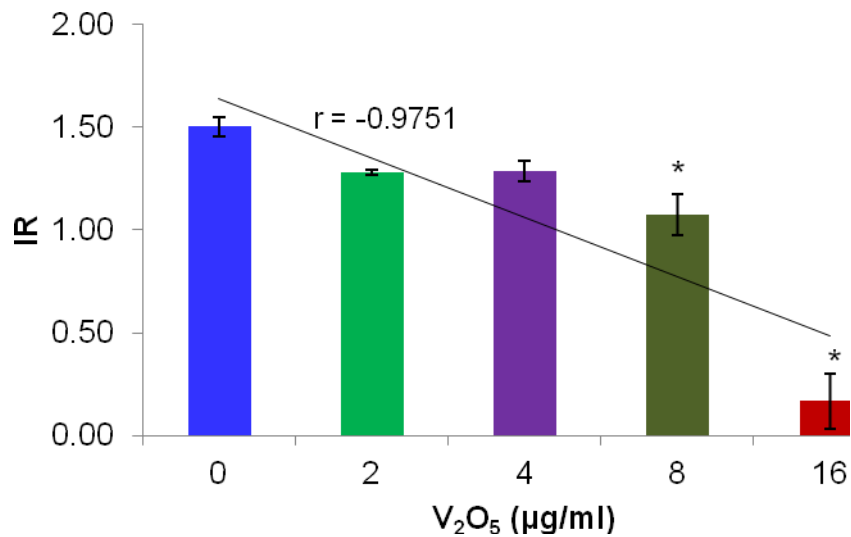
Tratamiento	IM (%)	IR	TPC (h)
Prueba A			
0 µg	2.04 ± 0.12	1.47 ± 0.07	27.20 ± 1.27
2 µg	1.26 ± 0.02*	1.29 ± 0.01	30.97 ± 0.24*
4 µg	1.15 ± 0.07*	1.25 ± 0.01	32.00 ± 0.25*
8 µg	0.70 ± 0.04*	1.15 ± 0.06	34.96 ± 1.80*
16 µg	0.18 ± 0.00*	0.07 ± 0.00*	---
Prueba B			
0 µg	2.88 ± 0.49	1.54 ± 0.11	26.07 ± 1.91
2 µg	1.24 ± 0.19*	1.27 ± 0.00	31.39 ± 0.12*
4 µg	1.24 ± 0.12*	1.32 ± 0.04	30.33 ± 0.90
8 µg	0.30 ± 0.18*	1.00 ± 0.25*	41.14 ± 10.27*
16 µg	0.11 ± 0.09*	0.26 ± 0.02*	---
Promedio			
0 µg	2.46 ± 0.59	1.51 ± 0.05	26.64 ± 0.80
2 µg	1.25 ± 0.02*	1.28 ± 0.01	31.18 ± 0.30*
4 µg	1.19 ± 0.06*	1.28 ± 0.05	31.17 ± 1.18*
8 µg	0.50 ± 0.28*	1.07 ± 0.10*	38.05 ± 4.38*
16 µg	0.14 ± 0.04*	0.17 ± 0.13*	---

--- No determinado;

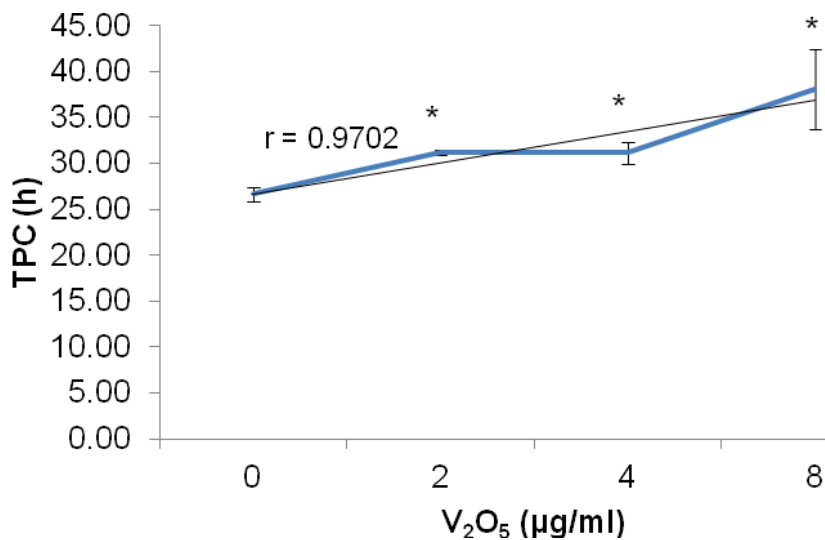
\*:  $P < 0.05$  vs. sin tratamiento



**Figura 5. Índice mitótico (IM) del tratamiento de linfocitos humanos con diferentes dosis de vanadio in vitro por 48; se consideraron el número de células en metafase de una total de 1,000 células. \*:  $P < 0.05$  vs sin tratamiento.**



**Figura 6. Índice de replicación (IR) obtenido de los distintos tratamientos de linfocitos humanos con diferentes dosis de vanadio por 48 h in vitro. \*: P < 0.05 vs sin tratamiento.**



**Figura 7. Tiempo promedio de proliferación celular de los cultivos de linfocitos tratados con diferentes dosis de vanadio por 48 h. \*: P < 0.05 vs sin tratamiento.**

Con respecto a la viabilidad celular evaluada con el ensayo de fluorocromos, ésta no presentó diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los donadores (Cuadro 5), ni cuando se obtiene el promedio de ambos.

**Cuadro 5. Viabilidad celular de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_5$  por 48 h.**

Prueba A	
0 $\mu\text{g}$	99.0 $\pm$ 1.41
2 $\mu\text{g}$	98.5 $\pm$ 2.12
4 $\mu\text{g}$	99.5 $\pm$ 0.71
8 $\mu\text{g}$	98.0 $\pm$ 0.00
16 $\mu\text{g}$	97.5 $\pm$ 0.71
Prueba B	
0 $\mu\text{g}$	98.5 $\pm$ 0.71
2 $\mu\text{g}$	98.0 $\pm$ 1.41
4 $\mu\text{g}$	96.5 $\pm$ 0.71
8 $\mu\text{g}$	97.5 $\pm$ 0.71
16 $\mu\text{g}$	97.0 $\pm$ 1.41

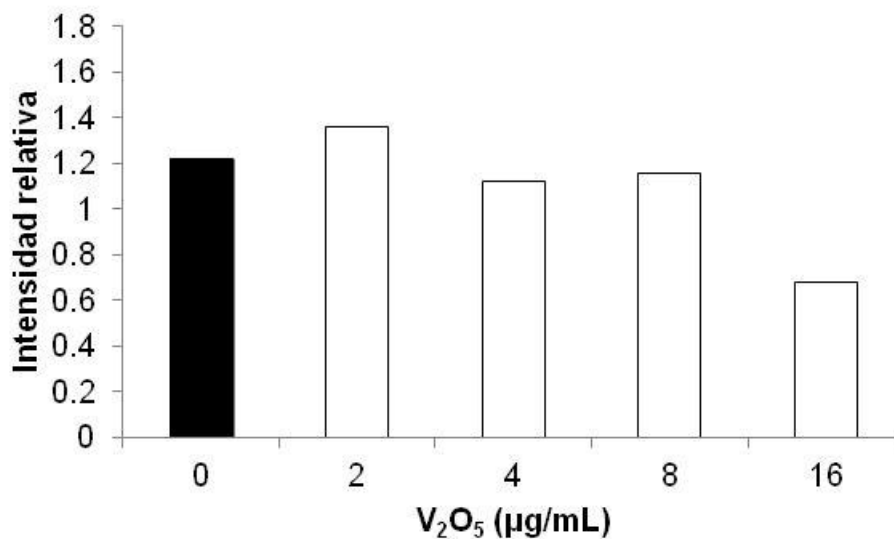
## 8.2. Efecto del $V_2O_5$ sobre las proteínas ciclinas y Cdk de linfocitos humanos tratados *in vitro*

### 8.2.1 Ciclina D1 y Cdk4

Cuando se analizaron las membranas obtenidas a partir del “western blott” después de la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos humanos se observó que el tratamiento induce incremento en la expresión de la proteína ciclina D1 en las concentraciones de 2, 4 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en comparación con el testigo. Sólo en la máxima dosis administrada (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se observó disminución en la expresión cuando se compara contra los cultivos que no recibieron el tratamiento (Figuras 8 y 9).

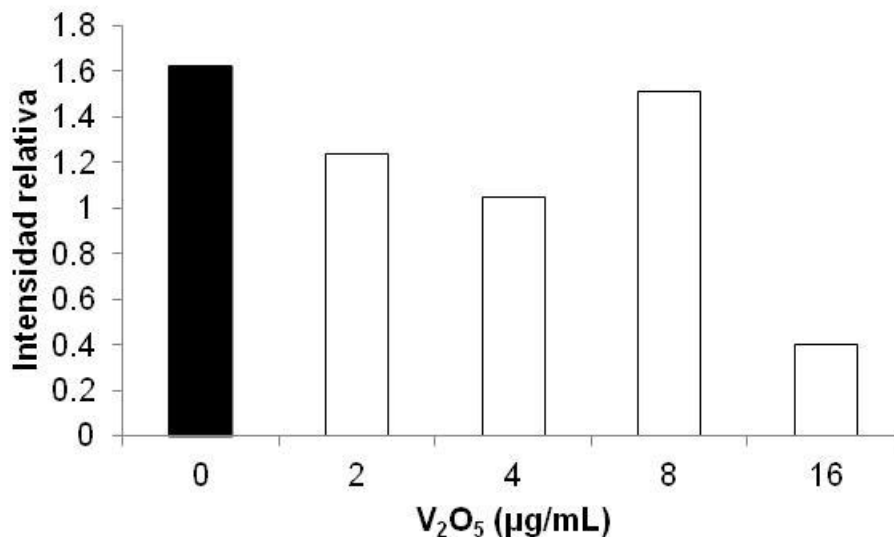


**Figura 8. Efecto del  $V_2O_5$  sobre la expresión de ciclina D1 y Cdk4, las cuales fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana por inmunoblot e incubadas con anti-ciclina D1 y anti-Cdk4. Esta es la representación de tres experimentos independientes.**



**Figura 9. Intensidad relativa de la expresión de la proteína ciclina D1 de los linfocitos tratados con diferentes dosis de  $V_2O_5$ , la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de una proteína constitutiva de la célula (actina).**

En el caso de la expresión de la proteína Cdk4, cuando se obtuvo la intensidad relativa, como se muestra en la Figura 10, los análisis mostraron también disminución en los grupos tratados (Figura 8) en comparación con el cultivo sin tratamiento, siendo más marcada en la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$ .



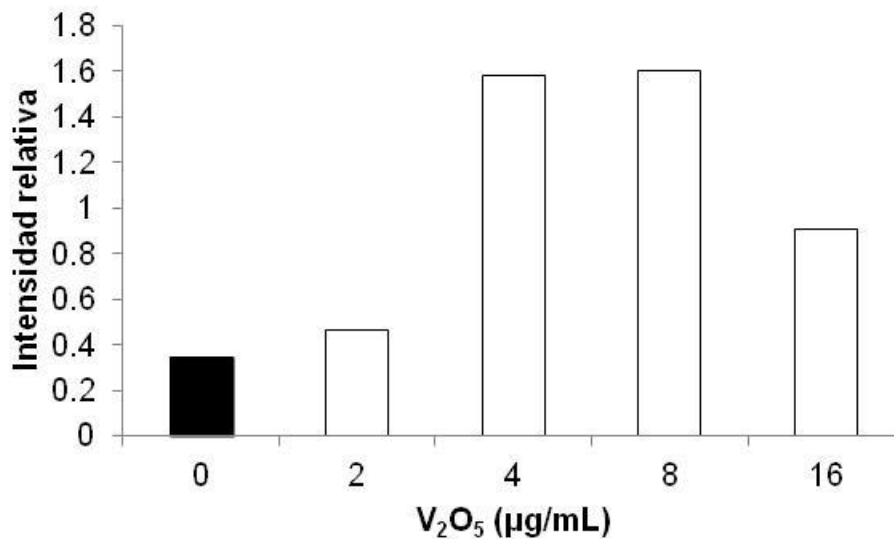
**Figura 10.** Intensidad relativa de la expresión de la proteína Cdk4 de los cultivos de linfocitos tratados con diferentes dosis de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de la actina.

### 8.2.2 Ciclina E y Cdk2

La expresión de la proteína ciclina E en los grupos testigo fue mínima, sin embargo en los cultivos tratados con se observó incremento cuando se evaluó la intensidad relativa (Figuras 11 y 12).

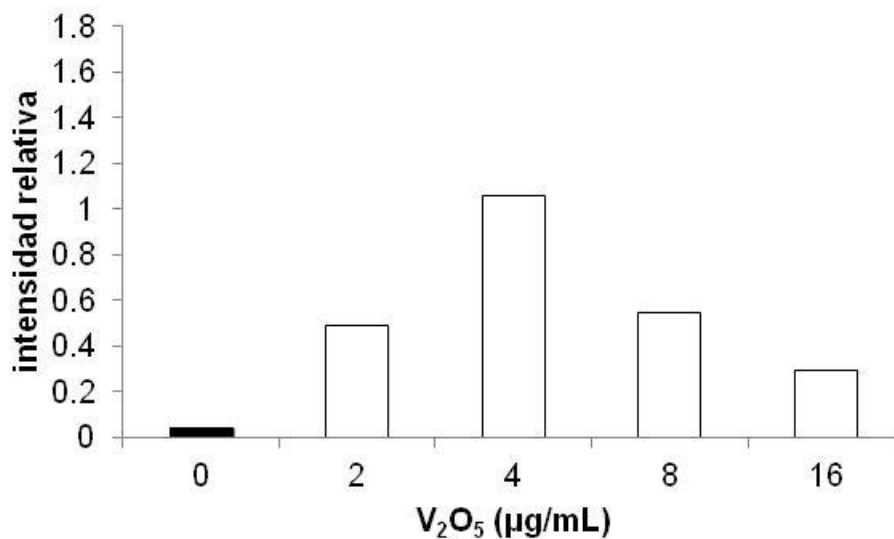


**Figura 11.** Efecto del V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre las proteínas ciclina E y Cdk2 obtenidas a partir del lisado celular de linfocitos y separadas por SDS-PAGE al 12%, transferidas a una membrana sólida e incubadas con anti-ciclina E y anti-Cdk2 para observar la expresión de ambas, esto es el resultado de tres experimentos independientes.



**Figura 12. Intensidad relativa de la expresión de la proteína ciclina E de los cultivos de linfocitos tratados con diferentes dosis de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de una proteína constitutiva de la célula (actina).**

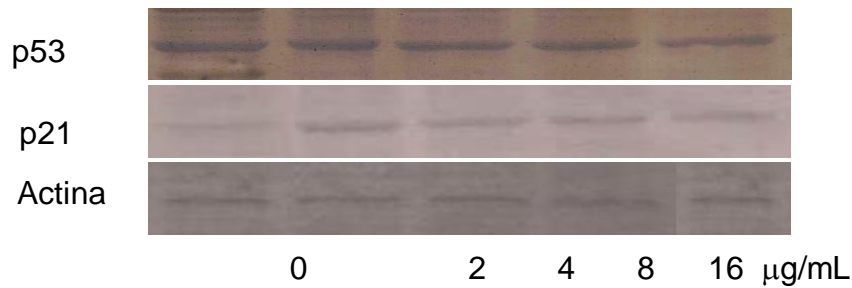
En el caso de la proteína Cdk2, al igual que en la ciclina E, la administración de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a cultivos de linfocitos humanos éste induce, en todos los tratamientos, incremento en la expresión (Figura 11) siendo más marcado en la concentración de 4 µg/mL cuando se comparan con los cultivos que no recibieron tratamiento, lo cual se comprueba al momento de obtener la intensidad relativa, como se muestra en la Figura 13.



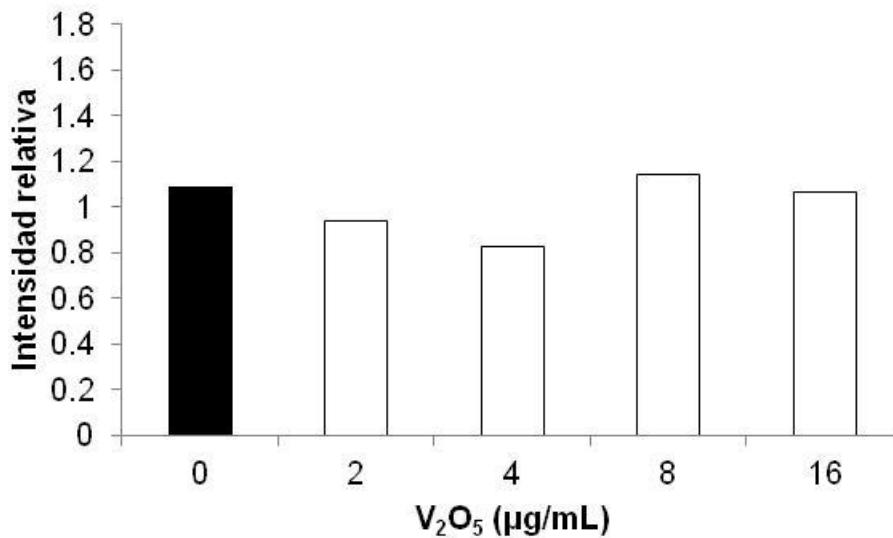
**Figura 13.** Intensidad relativa de la expresión de la proteína Cdk2 de los lisados de linfocitos tratados con diferentes dosis de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de la proteína actina.

### 8.2.3 Efecto en la expresión de las proteínas p53 y p21

La administración de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a cultivos de linfocitos humanos por 48 horas no modifica la expresión de la proteína p53 en las concentraciones de 2, 8 y 16 µg/mL (Figura 14), sin embargo, como puede observarse en la Figura 15, cuando se obtiene la intensidad relativa sólo la dosis de 4 µg/mL se presenta una disminución.



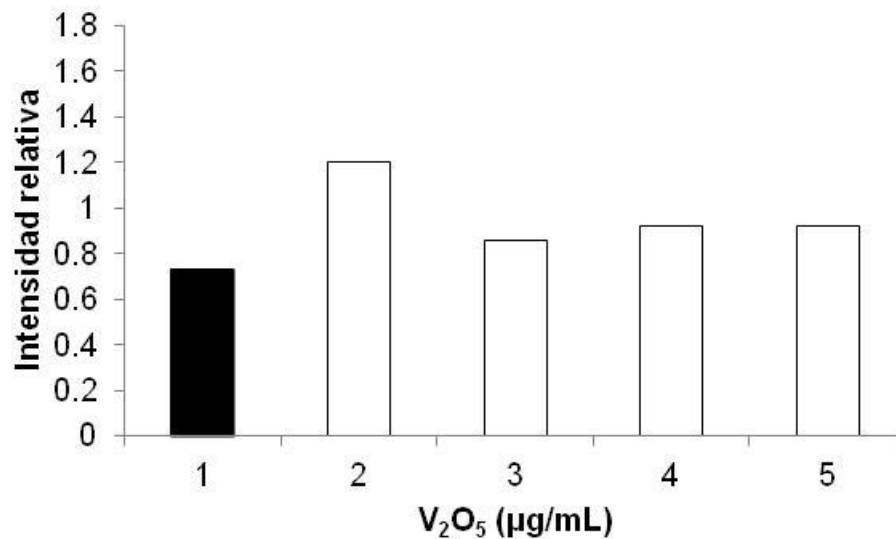
**Figura 14. Efecto del  $V_2O_5$  sobre las proteínas ciclina p53 y p21 obtenidas a partir del lisado celular de linfocitos y separadas por SDS-PAGE al 12% para p53 y al 15% para p21, transferidas a una membrana sólida por inmunoblot e incubadas con anti-p53 y anti-p21 para observar la expresión de ambas, aquí se muestra la representación de tres experimentos independientes.**



**Figura 15. Intensidad relativa de la expresión de la proteína p53 de los lisados de linfocitos tratados con diferentes dosis de  $V_2O_5$ , la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de una proteína constitutiva de la célula (actina).**

Al momento de evaluar la expresión de la proteína p21 se observa incremento en los cultivos tratados con  $V_2O_5$  (Figura 14), siendo más marcado en la dosis de 2  $\mu\text{g/mL}$  cuando se evalúa la intensidad relativa (Figura 16).





**Figura 16.** Intensidad relativa de la expresión de la proteína p21 de los cultivos de linfocitos tratados con diferentes dosis de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por 48 h la cual se obtiene mediante la razón de la intensidad obtenida por cada tratamiento entre la intensidad de la proteína actina.

## 9. Discusión

En este trabajo se observó que la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos indujo la detención de la proliferación celular evidenciado por la disminución en los parámetros del IM e IR así como en el incremento del TPC, este efecto se puede estar presentando debido a algún tipo de daño a la molécula del ADN que esté induciendo un incremento en la expresión de las proteínas ciclina E y Cdk2, así como en p21, lo que hace suponer que esta detención se haga en el transcurso de la fase G1 a S del ciclo celular.

### 9.1. Efecto del $V_2O_5$ sobre la proliferación celular

La administración de  $V_2O_5$  a los cultivos de linfocitos humanos indujo disminución en el IM e IR conforme se incrementaba la concentración, asimismo se observó aumento en el TPC de forma significativa. Los parámetros aquí empleados son utilizados para evaluar el efecto que tienen los compuestos químicos (como los del vanadio) sobre la proliferación celular: el IM proporciona el porcentaje de células que entran a la metafase mitótica y es un indicador del grado de proliferación; por su parte, el IR refleja el número promedio de replications de una sola célula durante su cultivo y el TPC indica el tiempo promedio necesario para que la población celular complete un ciclo celular (Lazutka, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Clare y Clements, 2001).

Para conocer el comportamiento del ciclo celular se empleó la tinción diferencial de cromátidas hermanas, ya que ésta técnica permite conocer como progresa el ciclo mediante el análisis de los patrones de tinción de las cromátidas en los cromosomas de células detenidas en metafase. Este ensayo se basa principalmente en la incorporación de un análogo de base (en este caso de la BrdU que se incorpora en lugar de la timina) en la nueva cadena de ADN durante dos ciclos de replicación y su posterior revelado por medio de la tinción con Giemsa (Perry y Wolff, 1974).

De esta manera se pueden identificar las metafases celulares que han replicado por uno, dos y tres o más ciclos celulares, y obtener el perfil de la cinética de proliferación

celular, ya que pueden ser clasificadas de acuerdo a su patrón de tinción (Crossen y Morgan, 1977).

Con respecto al IM, los resultados aquí mostrados concuerdan con las observaciones de Roldán y Altamirano (1990) quienes administraron el mismo compuesto en dosis de 4 y 6  $\mu\text{g/mL}$  a cultivos de linfocitos humanos lo que resultó en una disminución significativa en el IM. En otro estudio realizado por Rodríguez-Mercado y colaboradores (2003), y utilizando  $\text{V}_2\text{O}_4$  en linfocitos humanos *in vitro*, sólo en la concentración más alta (16  $\mu\text{g/mL}$ ) se mostró una disminución significativa en el IM y el IR, lo cual sugiere que los óxidos de vanadio son tóxicos, siendo los pentavalentes los que ejercen mayor efecto en este modelo de prueba (IARC, 2006; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

De manera similar, en trabajos realizados utilizando varias líneas celulares con diferentes compuestos de vanadio como el  $\text{V}_2\text{O}_3$ , el  $\text{V}_2\text{O}_4$ , el  $\text{V}_2\text{O}_5$ , el sulfato de vanadilo ( $\text{VOSO}_4$ ), y el metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), se observó la misma tendencia (Owusu-Yaw *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 1994; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003, 2010). Este comportamiento se da como consecuencia de la reducción en la tasa de proliferación aunque también puede ser una contribución de las células que han perdido su capacidad proliferativa de manera permanente (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010).

En una investigación previa, cuando se administró  $\text{V}_2\text{O}_5$  a los cultivos de linfocitos humanos este compuesto incrementó el TPC en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/mL}$ , pasando de 22 horas en promedio a 29.53 y 27.60, respectivamente (Roldán y Altamirano, 1990). En el presente estudio, utilizando concentraciones de 2, 4, 8 ó 16  $\mu\text{g/mL}$  y dando el tratamiento por 48 horas, se observó aumento de 26 a 38 horas, sin embargo, en la concentración más alta no pudo ser analizable ya que el número de células en metafase fue escasa, menos de 1 en 1000, lo cual sugiere que se está presentando un efecto citostático.

En relación con el IR, Migliore y colaboradores (1993) trataron a linfocitos humanos con metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ), ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ),  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , y  $\text{SVO}_5$ , con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80, ó 160  $\mu\text{M}$  observando sólo en las más altas (40 y 80  $\mu\text{M}$ ) reducción significativa. De igual manera cuando se administró  $\text{V}_2\text{O}_3$  a leucocitos humanos en concentraciones de 2, 4, 8, ó 16  $\mu\text{g/mL}$  se presentó disminución a partir de 4  $\mu\text{g/mL}$  (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003). En el presente estudio se observó reducción en el IR en la concentración de 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$ , lo que indica que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  detiene la proliferación celular de linfocitos humanos. Este mismo efecto fue observado en células V79 (Zhong *et al.*, 1994).

Se ha descrito que los compuestos de vanadio pueden interactuar con diferentes moléculas que intervienen en el control de la división celular como son las proteínas cinasas y fosfatasas tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, por lo que es probable que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  esté induciendo el efecto antiproliferativo sobre los cultivos de linfocitos por esta vía (Macara, 1980; Evangelou, 2002; Beyersmann y Hartwig, 2008; Bishayee *et al.*, 2010).

## 9.2. Efecto del $\text{V}_2\text{O}_5$ sobre la viabilidad celular

Si bien se ha demostrado que los compuestos de vanadio inducen una disminución en el IM y el IR en diferentes líneas celulares, lo que ha llevado a concluir que tiene efectos citotóxicos y citostáticos, en este trabajo cuando se evaluó la viabilidad de los cultivos celulares no hubo reducción en este parámetro, el cual fue mayor al 90% en todos los tratamientos, lo que confirma que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  está deteniendo la proliferación celular la cual podría ser el resultado de la interacción con las proteínas que la controlan. Resultados similares obtuvieron Rojas y colaboradores (1996) cuando administraron  $\text{V}_2\text{O}_5$  en concentraciones de 0.3, 30 ó 3000  $\mu\text{M}$  por 2 h a leucocitos y por 24 h a linfocitos humanos donde su viabilidad fue superior al 95% evaluada con el colorante azul de tripano. Cabe mencionar, que estas concentraciones son superiores a las empleadas en este trabajo, las cuales van de 0.011 a 0.088  $\mu\text{M}$ . De igual manera en otro estudio, cuando se administró  $\text{V}_2\text{O}_5$  a cultivos de leucocitos humanos por 2, 4 ó 6 h con concentraciones similares a las probadas en éste trabajo y se evaluó la viabilidad

mediante el mismo ensayo de fluorocromos, los resultados fueron semejantes (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003, 2011), además en estudios realizados en personas expuestas ocupacionalmente a este compuesto metálico, la viabilidad en cultivos de fibroblastos, leucocitos y linfocitos fue superior al 90% mediante el ensayo de azul de tripano (Ivancsits *et al.*, 2002; Ehrlich *et al.*, 2008).

### **9.3. Efecto del $V_2O_5$ sobre las proteínas Cdk y ciclinas de linfocitos humanos tratados *in vitro***

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las células somáticas de los eucariontes pasan por un proceso de crecimiento y división conocido como ciclo celular en donde se lleva a cabo la duplicación de la información genética (fase S), la segregación de la misma (M), y en medio de ambas existen fases de maduración (G1 y G2). Este proceso es controlado por complejos de proteínas formados por las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) activadas por ciclinas, entre otras (Novak *et al.*, 2010).

Para que la proliferación y sobrevivencia celular se lleve a cabo es vital que las células mantengan la integridad del genoma en respuesta a agentes que le induzcan algún tipo de daño. Este proceso puede causar una detención transitoria en el ciclo celular que le permita a las células tener más tiempo para reparar el daño antes de continuar la progresión a la siguiente fase y es aquí donde entran en juego los puntos de control, mejor conocidos en inglés como “checkpoint”, siendo los complejos ciclina-Cdk una parte fundamental de ellos (Zhang *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2010; Warmerdam y Kanaar, 2010).

En este trabajo se determinó la Cdk4 en todos los cultivos tratados con  $V_2O_5$  y se encontró que esta proteína se expresa en menor proporción cuando se compara contra la concentración del grupo testigo. Para que esta proteína realice su función requiere ser activada por la ciclina D1 la cual sólo presentó una ligera disminución significativa en la máxima concentración. Esta ciclina es una pieza clave que conecta las señales de crecimiento a la maquinaria del ciclo celular y se ha reportado que es inducida por

estímulos mitogénicos para regular la actividad de las Cdk llevando a la progresión del ciclo durante la fase G1 (Yan y Wenner, 2001; Takahashi-Yanaga y Sasaguri, 2007).

A diferencia de otros compuestos de vanadio, el  $V_2O_5$  no está induciendo una clara respuesta en los niveles de expresión de ambas proteínas. Esto puede deberse a una disminución en los nutrientes en el medio, o que esté interactuando con otras moléculas que controlan el ciclo celular ya que se ha observado que la sobreexpresión de proteínas inhibitoras del ciclo como p16 se unen a Cdk4, lo cual hace que los niveles mostrados por esta última sean mínimos (Hengstschläger *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha visto que la Cdk4 comienza a proteolizarse cuando termina su función, al contrario de la ciclina D1 la cual no lo hace por completo, ya que puede ser requerida más adelante si es que la célula llega a ser quiescente e intenta reiniciar la proliferación (Malumbres y Barbacid, 2005).

En células quiescentes, la síntesis de las ciclinas D es apenas detectable, sin embargo, cuando factores de crecimiento son agregados al cultivo comienza la producción de estas proteínas. En el caso de las Cdk4 y 6 son constitutivamente expresadas de tal forma que la inducción de la ciclina D resulta en la formación de los complejos ciclina-Cdk siendo éste uno de los principales mecanismos por medio del cual se observa la actividad de los agentes mitógenos (Matsushime *et al.*, 1994; Assoian, 1997, Malumbres y Barbacid, 2005).

Mamay y colaboradores (2001) observaron que cuando se retira el suero del medio de los cultivos de líneas celulares del epitelio de pulmón de ratón, se inhibe su crecimiento y los niveles de ciclina D1 disminuyen, y que estos efectos son revertidos cuando a las células se les cambia a un medio suplementado con suero, lo que estimula su proliferación, por lo que se considera a la ciclina D1 como una proteína que censa el suministro adecuado de factores de crecimiento necesarios para el progreso de la fase G1 (Foster *et al.*, 2010), no obstante, la falta de esta molécula puede ser compensada por la sobreexpresión de la ciclina E (Ledda-Columbano *et al.*, 2002).

Se ha reportado que el inhibidor p21 ayuda a ensamblar a la ciclina D1 y a la Cdk4 para que sean importadas al núcleo, que es en donde llevan a cabo su función, por lo que se ha propuesto que la unión de p21 al complejo ciclina D/Cdk4 forma parte de su estado activo y que a bajas concentraciones, junto con p27, inhiben a Cdk2 pero no a Cdk4 ó 6. Por el contrario, otro estudio menciona que cuando p27 está altamente expresada puede inhibir la actividad de Cdk4 mostrando una menor expresión de esta proteína en los análisis por western blott (Olashaw y Pledger, 2002; Coqueret, 2003).

En un estudio en el que se aplicó 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  a cultivos de fibroblastos de ratón C3H 10T1/2 se encontró mayor activación de la MAPK, la cual es la proteína cinasa activadora de mitógeno y que es esencial para la elevación sostenida de los niveles de ciclina D1 y para la proliferación celular, sin embargo, de manera sorprendente se observó reducción en la expresión de esta ciclina. Conforme se daba esta degradación también se indujo la detención de la síntesis de ADN, asimismo, los niveles de p27, un inhibidor de Cdk, también disminuyó (Yan y Wenner, 2001).

Con respecto a los efectos de los compuestos de vanadio sobre los niveles de ciclina D1, la exposición de cultivos de queratinocitos humanos (HaCaT) a diferentes concentraciones de  $\text{VOSO}_4$  (25 a 100  $\mu\text{M}$  por 24 h) indujo disminución en la expresión de la proteína en la concentración más alta (Markopoulou *et al.*, 2009). De igual manera en la línea celular de hepatoma humano (HepG2) se ha observado marcada disminución en la expresión de la ciclina cuando se tratan con 100  $\mu\text{M}$  de bisacetilacetato de vanadilo [ $\text{VO}(\text{aca})_2$ ], por 12 h (Fu *et al.*, 2008).

Por otra parte, en este estudio también se evaluó la expresión de las proteínas ciclina E y Cdk2, las cuales presentaron niveles significativamente superiores en todos los tratamientos, aunque se debe notar que en la máxima concentración se presenta disminución con respecto a 2, 4, y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al igual que las ciclina D1 y Cdk4 la ciclina E y la Cdk2, forman un complejo a finales de la fase G1 y continúan fosforilando a pRb, la cual hasta la mitosis permanece hiperfosforilada, para que se siga liberando el factor de transcripción E2F con lo que se asegura la expresión de los genes necesarios para

el paso a la fase S así como el transcurso de la misma, creando un “feed-back” positivo que ayuda a contribuir a la transición irreversible de G1 a S (Sherr y Roberts, 1999; Foster *et al.*, 2010).

Los niveles aquí mostrados por la ciclina E y la Cdk2 pueden deberse en parte a que este complejo realiza otras funciones específicas en la fase S del ciclo como son, la modulación de la síntesis del ADN por la vía Cdc6 y PCNA la cual controla el reclutamiento de las proteínas MCM2 y Cdc45, así como, la  $\alpha$ -polimerasa a los orígenes de replicación; también regula la duplicación del centrosoma, todo de manera dependiente de la fosforilación. Sin embargo, una de sus mayores actividades es la de activar su función fosforilando al inhibidor p27 y lo vuelven blanco para su eliminación por medio de la proteólisis (Sherr y Roberts, 1999; Bartek y Lukas, 2001; Grim y Clurman, 2003; Möröy y Geisen, 2004).

Resultados similares observaron Zhang y colaboradores (2004) cuando administraron  $\text{NaVO}_3$  en concentraciones de 0 a 100  $\mu\text{M}$  por 48 h a células epidérmicas de ratón JB6P<sup>+</sup> y evaluaron a diferentes tiempos la expresión de las ciclina E y A, el factor E2F-1 y la fosforilación de pRb. En todos los casos los niveles se incrementaron de manera dosis y tiempo dependientes, siendo la concentración de 50  $\mu\text{M}$  donde se presenta un mayor nivel y con respecto al tiempo a las 48 h se observó marcado incremento. En este mismo trabajo el vanadato promovió la síntesis de ADN y la entrada a la fase S. Tomando en cuenta estos datos se puede suponer que los resultados obtenidos en este trabajo, el  $\text{V}_2\text{O}_5$  está aumentando los niveles de ciclina E, así como de Cdk, en los cultivos de linfocitos.

Cabe mencionar que cuando el factor de transcripción E2F-1 no está controlado, este puede inducir la expresión de las proteínas ciclina E y A, así como, sus cinasas asociadas independientemente de la posición de la célula en el ciclo celular (Henstschlager *et al.*, 1999; Malumbres y Barbacid, 2005).



#### **9.4. Efecto del V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre la expresión de las proteínas p53 y p21 en linfocitos humanos tratados *in vitro***

Es sabido que cuando el material genético de las células es dañado se produce un retraso en el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN y de esta manera evitar la replicación y propagación de mutaciones que puedan ser potencialmente peligrosas, tanto para la misma célula como al organismo. Una de las proteínas que se encarga de esto es la p53 quien es transactivada y funciona como un factor de transcripción el cual regula gran número de genes lo que lleva a la expresión de otras proteínas como el inhibidor p21 y de esta manera silencia las Cdk esenciales para la entrada a la fase S (Bartek y Lukas, 2001; Yata y Esashi, 2009; Warmerdam y Kanaar, 2010).

En este trabajo se evaluó la expresión de estas dos proteínas para comprobar si están involucradas en la detención de la proliferación celular observada en los cultivos de linfocitos; p53 sólo mostró una disminución en la concentración de 4 µg/mL. Con respecto a p21, en todos los tratamientos con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> se presentó incremento.

Los resultados obtenidos en los niveles de expresión de estas proteínas son muy diferentes a lo observado en la literatura ya que la exposición de células de la epidermis de ratón JB6P<sup>+</sup> C141 a NaVO<sub>3</sub> llevó a la transactivación de p53 conforme se incrementaba la concentración (de 0 a 400 µM, y el tiempo de 12 a 72 h). En este mismo estudio se observó que uno de los mecanismos de acción del vanadato fue la generación de ERO principalmente el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dañando la membrana mitocondrial e induciendo apoptosis (Huang *et al.*, 2000). En otro ensayo empleando células A549 del epitelio de pulmón humano y tratándolas con el mismo compuesto se presentó un comportamiento similar en los niveles de p21 con concentraciones de 10 a 100 µM, y con respecto al tiempo en la máxima concentración (Zhang *et al.*, 2001).

Efectos similares se observaron utilizando la misma línea celular JB6P<sup>+</sup> C141, cuando se administró NaVO<sub>3</sub> en concentraciones de 10 a 100 µM y por tiempos de tratamiento de 6 a 48 h. En este caso, los niveles de proteína p53 se incrementaron de

manera dosis y tiempo dependientes. También se observó que las células tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 6 a 48 h mostraron incremento en la expresión de p21 conforme aumentó el tiempo. Asimismo, cuando se trataron por 24 h con diferentes concentraciones la actividad de esta proteína se elevó dependiendo de la concentración (Zhang *et al.*, 2002). Con estos resultados se demuestra que p53 se requiere para que el vanadio pueda inducir la activación de p21.

Como puede observarse, los compuestos de vanadio inducen incremento en los niveles de p21 y p53 dependiente de la concentración, por lo que puede ser que las concentraciones de  $\text{V}_2\text{O}_5$  administradas a los cultivos de linfocitos humanos en este trabajo sean bajas, sin embargo, lo suficientemente altas para disminuir la proliferación celular.

Fu y colaboradores (2008) al evaluar los efectos de un compuesto orgánico de vanadio, el bisacetilacetato de vanadilo  $[\text{VO}(\text{aca})_2]$  empleado en la medicina por sus efectos antidiabéticos, también demostraron que este metal incrementó los niveles de p21 conforme se aumentó la dosis (de 0 a 800  $\mu\text{M}$ ), lo que llevó a la detención del ciclo celular de las células de hígado humano HepG2. De igual manera, cuando se emplearon queratinocitos humanos HaCat, sólo se observó disminución de los niveles de p21 a partir de 100 y hasta 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{VOSO}_4$  por 24 h, sin embargo a concentraciones menores no hay una diferencia entre los tratamientos (Markopoulou *et al.*, 2009).

De igual manera, se ha observado que la administración de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (10 a 50  $\mu\text{M}$ ) a células papilares TPC-1 derivadas de carcinoma de tiroides, así como de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (de 25 a 350  $\mu\text{M}$  por 36 h) a la línea celular humana MCF7 de cáncer de seno, se incrementó de manera dependiente de la concentración en la expresión de las proteínas p21 y p53 lo que llevó a la detención de la proliferación celular (Ray *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011).

En el laboratorio se ha demostrado que la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos humanos induce daño primario a la molécula de ADN en concentraciones de 1 a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  después de 2 y hasta 6 h de exposición, también que, si se retira el compuesto del medio hay disminución en este daño, observándose que tarda 90 min en recuperarse y alcanzar los valores basales (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Estos mismos efectos fueron observados por otros investigadores en tratamientos *in vitro* (Rojas *et al.*, 1996; Kleinsasser *et al.*, 2003), así como en estudios *in vivo* (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996 y 1999; Rojas-Lemus, 2006) e inclusive en personas ocupacionalmente expuestas (Ehrlich *et al.*, 2008).

Los efectos observados sobre la inducción de p53 y p21, así como, en los niveles de ciclinas y Cdk probablemente se deben a que el  $V_2O_5$  de forma directa o indirecta está dañando a la molécula de ADN, lo cual induce las señales necesarias para que se active la maquinaria de reparación, provocando que haya disminución de la proliferación celular en los cultivos de linfocitos humanos. Además es posible que también estos efectos se estén dando en conjunto con otros mecanismos que son independientes de la vía p53-p21 mediante la interacción con moléculas encargadas del ciclo celular (Bartek y Lucas, 2001), ya que los compuestos de vanadio son buenos inhibidores de proteínas tirosina fosfatasa como es la Cdc25, y de el PCNA, además de que estimula la fosforilación de ERK y p38, entre otras (Yan y Wenner, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2006, Fu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).

Como se mostró a lo largo de la discusión existe gran variación entre los datos observados en este estudio y los que se pueden encontrar en la literatura, esto se debe posiblemente al tipo de célula que se utiliza en cada uno de los trabajos, por ejemplo, en líneas celulares A549 hay una detención del ciclo en la fase G2/M y usando las mismas dosis y el mismo compuesto en células C141 se lleva a cabo en la fase S (Zhang *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007). De igual manera los compuestos de vanadio utilizados son importantes en la variabilidad de los resultados (Ray *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011). Por lo anterior es importante que se sigan elucidando los mecanismos de acción del  $V_2O_5$  en cultivos primarios de células

humanas ya que a diferencia de las líneas celulares, en estos todavía no se ven afectados mecanismos como el control de la proliferación, la sobrevivencia, la muerte programada, entre otros.

## 10. Conclusiones

- La administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos humanos disminuye el IM e IR conforme se incrementó la concentración y alargó el tiempo promedio del ciclo celular, sin embargo, no modificó la viabilidad por lo que se puede considerar que este compuesto metálico es citostático.
- El  $V_2O_5$  indujo una disminución en la expresión de las proteínas Cdk4, y de la ciclina D1 (aunque en esta última sólo fue en la concentración más alta) lo que muestra que posiblemente también se está afectando a p27, otro inhibidor del ciclo celular, sin embargo, se tendrían que desarrollar más ensayos para comprobar esto.
- La sobreexpresión de la ciclina E y Cdk2 inducida por la administración de  $V_2O_5$  a los cultivos de linfocitos humanos hace suponer que el compuesto induce la detención del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S.
- Al igual que otras sales de vanadio, el  $V_2O_5$  indujo incremento de p53 en la concentración más alta, y también de p21 en todas las concentraciones, que no mostró cambio significativo en los diferentes tratamientos, por lo tanto se supone que pudo haber daño al ADN y contribuir en parte a la detención del ciclo celular.
- Es probable que el  $V_2O_5$  este interactuando con otras proteínas que controlan la progresión del ciclo celular en células de mamíferos, como son cdc25C, PCNA, ERK, entre otras, por lo que sería interesante observar su comportamiento en otro estudio.

## 11. REFERENCIAS

- Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P.** 2002. Molecular Biology of The Cell. 4a Ed. Omega. Barcelona, p. 1560.
- 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. Teratog. Carcinog. Mutag. 16:7-17.
- 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. Teratog. Carcinog. Mutag. 19:243-255.
- Assoian R.K.** 1997. Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix. Cytokine Growth F. R. 8:165-170.
- Aureliano M., Henao F., Tiago T., Duarte R.O., Moura J.J.G., Baruah B. y Crans D.** 2008. Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase is inhibited by organic vanadium coordination compounds: pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an amavadine analogue. Inorg. Chem. 47:5677-5684.
- Barceloux D.G.** 1999. Vanadium. Clin. Toxicol. 37:265-278.
- Bartek J. y Lukas J.** 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett. 490:117-122.
- Beyersmann D. y Hartwig A.** 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch. Toxicol. 82:493-512.
- Bishayee A., Waghray A., Patel M.A. y Chatterjee M.** 2010. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The *in vivo* evidence. Cancer Lett. 294:1-12.
- Blattner C.** 2008. Regulation of p53-the next generation. Cell Cycle 7:3149-3153.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Capella M.A.M., Capella L.S., Valente R.C., Gefé M. y Lopes A.G.** 2007. Vanadate-induced cell death is dissociated from  $H_2O_2$  generation. Cell Biol. Toxicol. 23:413-420.

- Carpenter G.** 1981. Vanadate, epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1115-1121.
- Chakraborty T., Chatterjee A., Dhachinamoorthi D., Srivastawa S., Panarappan L. y Chatterjee M.** 2006. Vanadium limits the expression of proliferating cell nuclear antigen and inhibits early DNA damage during diethylnitrosamine-induced hepatocellular preneoplasia in rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 47:603-615.
- Cistulli C.A. y Kaufmann W.K.** 1998. p53-dependent signaling sustains DNA replication and enhances clonogenic survival in 254 nm ultraviolet-irradiated human fibroblast. *Cancer Res.* 58:1993-2002.
- Clare G. y Clements J.** 2001. Industrial genotoxicity group (IGG): Cytotoxicity *in vitro*, Royal Society of Medicine, London, UK, 6 December 1999. *Mutagenesis* 16:179-182.
- Crossen P.E. y Morgan F.W.** 1977. Analysis of lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 104:453-457.
- Coqueret O.** 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *TRENDS Cell Biol.* 13:65-70.
- Ehrlich V.A., Nersesyan A.K., Hoelzl C., Ferk F., Bichler J., Valic E., Schaffer A., Shulte-Hermann R., Fenech M., Wagner K. y Knasmüller S.** 2008. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: Results of a multiple end point study. *Environ. Health Persp.* 116:1689-1693.
- Evangelou A.M.** 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 42:249-265.
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sanchez I., Lopez I.E., Bizarro P., Mendoza M.L., Osorio L.S., Espejel-Maya G., Avila-Costa M.R., Colin-Barenque L., Villanueva D.N. y Olaiz-Fernandez G.** 2002. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health.* 57:446-449.
- Foster D.A., Yellen P., Xu L. y Saqcena M.** 2010. Regulation of G1 cell cycle progression: Distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing cell growth checkpoint(s). *Genes Cancer* 1:1124-1131.

- Fu Y., Wang Q., Yang X.G., Yang X.D. y Wang K.** 2008. Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:1001-1009.
- García-Pérez H.M.** 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 1:31-41.
- Gonçalves A.P., Videira A., Soares P. y Máximo V.** 2011. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sci.* 89:371-377.
- Grim J.E. y Clurman B.E.** 2003. Cycling without CDK2? *TRENDS Cell Biol.* 13:396-399.
- Harris G.K. y Shi X.** 2003. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat. Res.* 533:183-200.
- Hengstschläger M., Braun K., Soucek T., Miloloza A. y Hengstschläger-Ottndad E.** 1999. Cyclin-dependent kinase at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat. Res.* 436:1-9.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S.S., Shen H., Butterworth L., Lu Y., Costa M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyanthan V. y Shi X.** 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275:32516-32522.
- IARC, International Agency for Research on Cancer.** 2006. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulphate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Vol. 86. Lyon, France.
- IUPAC, The International Union of Pure and Applied Chemistry.** 2007. [www.iupac.org/reports/periodic\\_table/](http://www.iupac.org/reports/periodic_table/). versión 22 de junio de 2007.
- Ivancsits S., Pilger A., Diem E., Schaffer A. y Rüdiger H.W.** 2002. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat. Res.* 519:25-35.
- Johnson D.G. y Walker C.L.** 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 295-312.



- Kleinsasser N.H., Dirschedl P., Staudenmaier R., Harréus U.A. y Wallner B.C.** 2003. Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Environ. Health Res.* 13:373-379.
- Kurien B.T. y Scofield R.H.** 2006. Western blotting. *Methods* 38:283-293.
- Lazutka J.R.** 1991. Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.* 17:188-195.
- Li M., Ding W., Baruah B., Crans D.C. y Wang R.** 2008. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 102:1846-1853.
- Ledda-Columbano G.M., Pibiri M., Concas D., Cossu C., Tripodi M. y Columbano A.** 2002. Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli. *Hepatology* 36:1098-1105.
- Leonard S.S., Harris G.K. y Shi X.** 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Bio. Med.* 37:1921-1942.
- Levine A.J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
- Lewin B.** 2000. *Genes VII.* Oxford University Press. Reino Unido, pp. 990.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L. y Darnell J.** 2004. *Molecular Cell Biology.* 5a. Edición. W. H. Freeman and Company. EUA, p. 973.
- Lomonte B.** 2007. Electroforesis en gel de poliacrilamida. En: *Manual de métodos inmunológicos.* Universidad de Costa Rica. Costa Rica, p. 138.
- Macara I.G.** 1980. Vanadium - an element in search of a role. *TIBS* 5:92-94.
- Macara I.G., Kustin K.A. y Cantley L.C.** 1980. Glutathione reduces cytoplasmic vanadate, mechanism and physiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 629:95-106.
- Malumbres M. y Barbacid M.** 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *TRENDS Biochem. Sci.* 30:630-641.
- Mamay C.L., Schauer I.E., Rice P.L., Dwyer-Nield L.D., You M., Sclafani R.A. y Malkinson A.M.** 2001. Cyclin D1 as a proliferative marker regulating

retinoblastoma phosphorylation in mouse lung epithelial cells. *Cancer Lett.* 168:165-172.

**Markopoulou S., Kontargiris E., Batsi C., Tzavaras T., Trougakos I., Boothman D.A., Gonos E.S. y Kolettas E.** 2009. Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by *c-fos* and involves nuclear accumulation of clusterin. *FEBS J.* 276:3784-3799.

**Matsushime H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J. y Kato J.** 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:2066-2076.

**Méplan C., Mann K. y Hainaut P.** 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultures cells. *J. Biol. Chem.* 274:31663-31670.

**Migliore L., Bocciardi R., Macrì C. y Jacomo F.L.** 1993. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 319:205-213.

**Morgan D.O.** 1997. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:261-291.

**Morita A., Zhu J., Suzuki N., Enomoto A., Matsumoto Y., Tomita M., Suzuki T., Ohtomo K. y Hosoi Y.** 2006. Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. *Cell Death Differ.* 13:499-511.

**Möröy T. y Geisen C.** 2004. Cyclin E. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:1424-1439.

**Moskalyk R.R. y Alfantazi A.M.** 2003. Processing of vanadium: a review. *Minerals Engineering* 16:793-805.

**Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. y Chatterjee M.** 2004. Vanadium an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 150:135-143.

**Nelson D.L. y Cox M.M.** 2008. Lehninger. Principles of Biochemistry. Quinta edición. W.H. Freeman and Company. EUA, p. 1119.

- Novak B., Kapuy O., Domingo-Sananes M.R. y Tyson J.** 2010. Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:801-808.
- Olashaw N. y Pledger W.J.** 2002. Paradigms of growth control: relation to Cdk activation. *Sci. STKE.* 2002:re7.
- Owusu-Yaw J., Cohen M.D., Fernando S.Y. y Wei C.I.** 1990. An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327-336.
- Perry P. y Wolff S.** 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister-chromatids. *Nature.* 251:156-158.
- Ray R.S., Ghosh B., Rana A. y Chatterjee M.** 2006. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer.* 120:13-23.
- Rodríguez-Mercado J.J.** 2006. Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. UNAM, México, p. 99.
- Rodríguez-Mercado J.J., Roldán-Reyes E. y Altamirano-Lozano M.** 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol. Lett.* 144:359-369.
- Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A.** 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L. y Altamirano-Lozano M.A.** 2010. Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 33:97-102.
- 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*. *Toxicol. In Vitro* 25:1996-2002.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P.** 1992. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutat. Res.* 282:283-286.

- Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M. y Ostrosky-Wegman P.** 1996. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 359:77-84.
- Rojas-Lemus M.** 2006. Pentóxido de vanadio y cloruro de manganeso: comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos. Modelo murino de exposición por inhalación. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM. México, p. 44.
- Roldán R.E. y Altamirano L.M.A.** 1990. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 245:61-65.
- Rydzynski K.** 2001. Vanadium, Niobium, and Tantalum. en *Patty's Toxicology*. 5a edición. John Wiley and Sons. Inc. E.U.A.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K. y Paules S.R.** 1999. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Persp.* 107:5-24.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K. y Paules S.R.** 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1387-1404.
- Sherr C.J. y Roberts J.M.** 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gene Dev.* 13:1501-1512.
- Smith J.B.** 1983. Vanadium ions stimulate DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 and 3T6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:6162-6166.
- Stewart K.K. y Ebel R.E.** 2000. Electrophoresis and other electrokinetic separations. En: *Techniques in Analytical Chemistry. Chemical Measurements in Biological Systems*. John Wiley and Sons, Inc., Publication. USA, p. 259.
- Strauss G.H.S.** 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* 252:1-15.
- Suzuki K., Inageda K., Nishitai G. y Matsuoka M.** 2007. Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: Involvement of ATM pathway. *Toxicol. Appl. Pharm.* 220:83-91.

- Swarup G., Cohen S. y Garbers D.L.** 1982. Inhibition of membrane phosphotyrosil-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 107:1104-1109.
- Takahashi-Yanaga F. y Sasaguri T.** 2007. GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. *Cell. Signal.* 20:581-589.
- Tojo A., Kasuga M., Urabe A. y Takaku F.** 1987. Vanadate can replace interleukin 3 for transient growth of factor-dependent cells. *Exp. Cell Res.* 171:16-23.
- Vidal A. y Koff A.** 2000. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1-15.
- Vousden K.H.** 1995. Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* 6:109-116.
- Warmerdam D.O. y Kanaar R.** 2010. Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat. Res.* 704:2-11.
- WHO. World Health Organization.** 2000. Vanadium. en *Air Quality Guidelines for Europe*. 2a edición. Dinamarca, p. 288.
- WHO. World Health Organization.** 2001. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. En: *Concise International Chemical Assessment Document 29*.
- Woods D.B. y Vousden K.H.** 2001. Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 264:56-66.
- Yan S. y Wenner C.E.** 2001. Modulation of cyclin D1 and its signaling components by the phorbol ester TPA and the tyrosine phosphatase inhibitor vanadate. *J. Cell. Physiol.* 186:338-349.
- Yata K. y Esashi F.** 2009. Dual role of CDKs in repair: To be, or not to be. *DNA Repair* 8:6-18.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L. y Shi X.** 2001. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 392:311-320.
- Zhang Z., Huang C., Li J. y Shi X.** 2002. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J. Inorg. Biochem.* 89:142-148.

- Zhang Z., Leonard S.S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V. y Shi X.** 2003. Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G2/M phase arrest. *Free Radic. Biol. Med.* 34:1333-1342.
- Zhang Z., Gao N., He H., Huang C., Luo J. y Shi X.** 2004. Vanadate active Akt and promoted S phase entry. *Mol. Cell. Biochem.* 255:227-237.
- Zhong B.-Z., Gu Z.-W., Wallace W.E., Whong W.-Z. y Ong T.** 1994. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 321:35-42.

## 12. ANEXOS

El presente trabajo fue presentado de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos:

**Evento:** Congreso Nacional de Genética 2010 de la Sociedad Mexicana de Genética, celebrado en la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM. Tlalnepantla de Baz, México, del 19 al 22 de octubre de 2010.

**Título de la ponencia:** Efecto del pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) sobre la expresión de p53 y p21 en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

**Autores:** Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L. y Altamirano-Lozano M.A.

**Evento:** Primer Congreso de Alumnos de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Ciudad Universitaria, UNAM. México D.F. del 18 al 20 de mayo de 2011.

**Título de la ponencia:** Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclina y Cdk de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

**Autores:** Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., Gómez-Arroyo S., Fortoul-van der Goes T.I. y Altamirano-Lozano M.A.

**Evento:** Congreso Nacional de Genética 2011 de la Sociedad Mexicana de Genética realizado en la Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula Puebla, México, del 28 al 30 de septiembre.

**Título de la ponencia:** Determinación de las proteínas ciclina D, E y Cdk 2, 4 en linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio *in vitro*.

**Autores:** Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L. y Altamirano-Lozano M.A.

**Evento:** VII Congreso de Investigación y I de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, Iztapalapa, México D.F. el 27 de octubre de 2011.

**Título de la ponencia:** Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas D y E, Cdk 2 y 4 de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

**Autores:** Rodrigo Anibal Mateos Nava, Juan José Rodríguez Mercado, Lucila Álvarez Barrera y Mario Agustín Altamirano Lozano.





*Sociedad Mexicana de Genética*

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA  
2010**

**"100 años con Drosophila como  
modelo en genética"**



---

*Programa & Resúmenes*  
*19-22 de Octubre*

---



## EFFECTO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) SOBRE LA EXPRESIÓN DE p53 Y p21 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*

Mateos-Nava R.A.<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Mercado J.J.<sup>1</sup>, Álvarez-Barrera L.<sup>1</sup>, Altamirano-Lozano M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Laboratorio 5-PA de la UMIEZ. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza. UNAM. <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. e-mail: a\_mateos\_n@yahoo.com.mx; maal@servidor.unam.mx

El vanadio (V) es un metal ampliamente distribuido en la Tierra, la vía por la cual estamos expuestos a él son los alimentos y de manera ocupacional. La información en la literatura sobre su actividad carcinógena es amplia, además de que se ha propuesto que puede interactuar con las diferentes moléculas biológicas y se considera como un potente inhibidor de algunas enzimas, aunque los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos no han sido bien comprendidos, por lo que algunos autores lo consideran como un mutágeno de acción débil.

En líneas celulares A549 y C141 se ha observado que este metal interactúa con las proteínas que controlan el ciclo celular como son p53 y p21, por lo que en este trabajo se evaluó su expresión en linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes dosis de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2, 4, 8, y 16 µg/mL), para lo cual se separaron los linfocitos a partir de la sangre obtenida de un donador y se cultivaron por 72 horas, primero se observó de manera citogenética como se comportaba el compuesto, apoyándonos en la tinción diferencial de cromátidas hermanas, obteniendo: Índice de Replicación (IR), Índice Mitótico (IM), Tiempo Promedio de Proliferación Celular (TPC) y la viabilidad celular. Al final del cultivo se extrajeron las proteínas y fueron separadas por medio de una electroforesis y transferidas a una membrana sólida e incubadas con los anticuerpos anti-p53 y anti-p21 para observar si se expresaban en los diferentes tratamientos.

Cuando se evaluaron el IM e IR se observó que el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> tiene un efecto dosis dependiente ya que disminuyen conforme aumenta la concentración y el TPC se incrementa de manera significativa, sin embargo, la viabilidad celular no presento algún cambio que fuera estadísticamente significativo, por lo que se concluyo que el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estaba deteniendo la proliferación celular, entonces se planteo observar el comportamiento de los inhibidores, encontrándose que conforme se incrementa la dosis hay una mayor expresión concluyendo que la administración de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a cultivos de linfocitos induce la detención de la replicación celular mediada por p53 y p21 posiblemente por algún daño en el ADN.

Trabajo realizado con el apoyo del proyecto DGAPA-UNAM, PAPIIT-IN216809



PRIMER CONGRESO  
DE ALUMNOS DE POSGRADO

Memoria

18, 19 y 20 de mayo



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Secretaría de Desarrollo Institucional  
Coordinación de Estudios de Posgrado

**SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA  
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**CONGRESO NACIONAL**

# Genética 2011

CHOLULA, PUEBLA

A 50 años  
DEL **Falt-Uracilo**  
Y EL **Operón lac**

Del 28 al 30 de septiembre del 2011

en Ex hacienda Sta. Catarina Mártir  
CP 72810 Cholula, Puebla, México



**UDLAP**

## DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CICLINA D, E, Y CDK 2, 4 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PENTÓXIDO DE VANADIO *IN VITRO*.

Mateos-Nava R A<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Mercado J J<sup>1</sup>, Álvarez-Barrera L.<sup>1</sup> y Altamirano-Lozano M A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental. Laboratorio 5-PA de la UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza. <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. [maal@servidor.unam.mx](mailto:maal@servidor.unam.mx)

El vanadio es un metal de transición que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente siendo el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) la principal forma química a la cual los organismos estamos expuestos. En líneas celulares A549 y JB6+P se ha demostrado que sus compuestos pueden interaccionar con las moléculas biológicas estimulando la función de ellas aunque también puede inhibirla, entre estas se encuentran las proteínas que controlan el ciclo celular como son las ciclinas y Cdk. En estudios previos se observó que la administración del  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos humanos incremento el TPC, disminuyó el IR e inhibió el IM, sin embargo, la viabilidad celular no mostro algún cambio, proponiéndose que posiblemente se esta inhibiendo la expresión de las proteínas que actúan en la progresión del ciclo. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto que tiene el  $V_2O_5$  sobre la expresión de las ciclinas D1, E y Cdk 2 y 4 de linfocitos humanos tratados *in vitro*, para lo cual se separaron los linfocitos de la sangre periférica de un donador e incubaron con una de las siguientes dosis: 0, 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$ , posteriormente se extrajeron las proteínas y se determino su expresión por medio del ensayo de Western Blott. Con respecto a la ciclina D1 esta mostro una menor expresión en la máxima dosis, en cambio para la ciclina E y la Cdk2 hay un incremento estadístico en todas las concentraciones, caso contrario en Cdk 4 la cual presento una disminución significativa cuando se comparan con el grupo testigo, concluyendo que el  $V_2O_5$  estimula la expresión las proteínas ciclinas D1, E y Cdk 2 e inhibe a la Cdk 4.

Este trabajo se desarrollo con el apoyo del proyecto DGAPA-UNAM, PAPIIT-IN216809



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

## VII CONGRESO DE INVESTIGACIÓN Y I DE POSGRADO DE LA FES ZARAGOZA



### OBJETIVOS

- Difundir los trabajos de investigación en las Ciencias Químico-Biológicas, de la Salud y del Comportamiento.
- Estimular la vinculación Pregrado-Posgrado a través del acercamiento de los grupos de investigación para potenciar y fortalecer el trabajo inter y multidisciplinario.
- Propiciar un espacio de discusión, intercambio de experiencias y colaboración entre los grupos de investigación dentro y fuera de la FES Zaragoza.

PROGRAMA  
25 AL 28 DE OCTUBRE DE 2011  
AUDITORIOS CAMPO I y II



# EFFECTO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CICLINAS D Y E, CDK 2 Y 4 DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*

**Rodrigo Anibal Mateos Nava, Juan José Rodríguez Mercado, Lucila Álvarez Barrera, Mario Agustín Altamirano Lozano.**

*Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Laboratorio 5-PA de la UMIE-Z, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. Email: a\_mateos\_n@yahoo.com.mx; maal@servidor.unam.mx*

El vanadio se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra y la principal forma química presente en el ambiente es el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ). Los humanos estamos expuestos a él por los alimentos que consumimos, por el ambiente y de manera ocupacional. Se ha observado que este metal es capaz de interactuar con las moléculas biológicas del organismo y en algunos casos comportarse como un inhibidor de proteínas, sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos no han sido bien comprendidos.

Se ha demostrado que el  $V_2O_5$  disminuye el crecimiento celular en cultivos de linfocitos humanos, y en líneas celulares A549 y JB6+P este metal interactúa con las proteínas que controlan el ciclo celular como son las ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (Cdk), así como con p53 y p21, por lo que en este trabajo se evaluó su expresión en linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de  $V_2O_5$  (2, 4, 8, y 16  $\mu\text{g/mL}$ ), para lo cual se separaron los linfocitos a partir de la sangre obtenida de un donador y se cultivaron por 72 horas. El primer análisis fue de manera citogenética apoyándonos en la tinción diferencial de cromátidas hermanas para ver como se comportaba el compuesto sobre el crecimiento celular, obteniendo el Índice de Replicación (IR) y el Índice Mitótico (IM) así como la viabilidad. Por otra parte, al final del cultivo se extrajeron las proteínas y fueron separadas por medio de una electroforesis y transferidas a una membrana sólida e incubadas con los anticuerpos anti-ciclina E, anti-ciclina D1, anti Cdk2, anti Cdk4, anti-p53 y anti-p21 para determinar su expresión en los diferentes tratamientos.

Cuando se evaluaron el IM e IR se observó que el  $V_2O_5$  tiene un efecto dosis dependiente ya que disminuyen de manera significativa conforme aumenta la concentración, no obstante, la viabilidad celular no presento algún cambio que fuera estadísticamente significativo, por lo que se concluyo que el  $V_2O_5$  estaba deteniendo la proliferación celular. Por tal motivo se planteo el analizar el comportamiento de las proteínas que la controlan, encontrándose que la expresión de la ciclina E, de la Cdk2, de p53 y p21 se incrementan y mientras que en la Cdk4 hubo una disminución en todas concentraciones. En el caso de la ciclina D1 sólo en la concentración más alta se presento una disminución, concluyendo que la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos induce la detención de la replicación celular mediada por p53 y p21 posiblemente por algún daño en el ADN.

*Palabras clave:* vanadio, crecimiento celular, p21, p53.

Fu Y., Wang Q., Yang X., Yang X., y Wang K. J. Biol. Inorg. Chem. 2008. 13(6):1001-1009

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

Zhang Z., Leonard S.S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V., y Shi X. 2003. Free Rad. Biol. Med. 34(10):1333-1342.