



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INMUNOLOGÍA

*“Evaluación de los Efectos Inmunotóxicos en la Línea Celular
NK-92mi Expuestas a Pentóxido de Vanadio (V_2O_5)”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO GALLARDO VERA

TUTOR:

DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA, FM.

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ROMINA RODRIGUEZ SANOJA, IIB.
DR. MARCO A. CERBÓN CERVANTES, FQ.**

MÉXICO D.F.

JULIO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



PDCB/grad/062/Jur/2015

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **366** del 13 de mayo del 2015, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **JOSÉ FRANCISCO GALLARDO VERA**, con número de cuenta **508011119**, con la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS INMUNOTÓXICOS EN LA LÍNEA CELULAR NK-92MI EXPUESTAS A PENTÓXIDO DE VANADIO (V₂O₅)"**, dirigida por el Dr. Luis Felipe Montaña Estrada.

Presidente: Dr. Mariano Martínez Vázquez
Secretario: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Vocal: Dr. Carlos Rosales Ledezma
Vocal: Dr. Emilio Rojas Del Castillo
Vocal: Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 18 de mayo del 2015

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumno

DPD/CRL/aap

ÍNDICE	Páginas
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iii
Tablas y Figuras	iv
Resumen	v
Abstract	vi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Vanadio	3
2.2 Distribución, beneficios y potencial toxico	5
2.3 Especiación y Biodisponibilidad	8
3.1 Células NK	14
3.2 Localización y migración	16
3.3 Receptores	19
3.4 Producción de citocinas por subtipos de NK	21
3.5 Citocinas que afectan a NK (IL-2)	23
3.6 Desarrollo de líneas celulares de NK	25
3.7 Vías de señalización efectora	26
4.1 Vanadio y el Sistema Inmune	28
4.2 Evidencia en animales	31
4.3 Evidencia a nivel Celular	32
III. Planteamiento del problema	37
IV. Hipótesis	37
V. Objetivos	38
VI. Metodología	39
VII. Resultados	45
VIII. Discusión	54
IX. Conclusión	58
X. Bibliografía	60

DEDICATORIA

A mi hijo: JOSÉ JULIÁN, gracias por salvarme. . .

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM: Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CONACyT por la beca de manutención recibida (CVU: 232341)

A mi Tutor: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, por todo el apoyo incondicional brindado en este proyecto, por todo su conocimiento y por mostrarme la sencillez del cómo se puede afrontar la fascinante labor de investigación.

Así como la ayuda brindada en la realización de esta tesis en aspectos; Teóricos a Dra. Erika Rendón Huerta y Dr. Felipe Masso Rojas; Técnicos a: Dr. Miguel Tapia Rodríguez y Biol. Patricia Espinosa Cueto y Bibliográficos a: Lic. Lucia Brito Ocampo y Lic. Martha Cariño Aguilar.

A mis Padres: Francisco y Yolanda, Porque siempre me han brindado su Amor, Cariño, Cuidado, Respeto y sobretodo siempre han estado a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida y también en los más gratos, son uno de los motores más grandes en mi vida y hoy más que nunca, este logro también es suyo, los amo con todo mi ser y mi alma...

A mis Hermanos: Saraí y Martín, por ser mi guía y mi reflejo, por todo su apoyo a lo largo de mi vida y por qué juntos siempre me han brindado ese cariño que solo un hermano puede dar, los amo Монголчууд...

A mi familia: Geraldine y José Julián, por estar siempre a mi lado, por ser la razón de luchar todos los días, porque realmente han hecho la diferencia y son la mayor satisfacción en mi vida, los amo...

A mis amigos: Omar, Mario ^(Q.E.P.D), Delfino, Ulises, Audy, Víctor Dávila, Daniel Díaz, Mariel, Claudia y Cesar, Gonzalo, Rodolfo, Allan, Cecilia, Eréndira, Gabriel, Mariana.

Al laboratorio 3 de Inmunobiología de la Fac. Med.: Anita, Cristian, Cecilia E., Rosalba, Jeny, Cecilia M., Alheli, Luis, Priscila T., Ashlin, Hanen, Priscila M., Jane, Toño, Jahaziel, Diego, Marilú y Monse.

Al Equipo de Fútbol Biomédicas: Hugo, Daniel, Miguel, Isaac, Bladimir, Juan Pablo, Erick, Francisco, Miguel S. Daniel Glez. Esteban, Adrián, Gabriele, Cristian, Ernesto, Héctor y Raúl,

He encontrado muchos amigos a lo largo de estos años, realmente “son como gotas que refrescan mi camino al medio día”, una vez más gracias por su amistad.

Finalmente a Dios, porque creo en algo superior a mí, que siempre ha estado a conmigo y ha cuidado todo lo que más amo en este mundo para alcanzar mis sueños.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
APC	Células presentadoras de antígeno	FSC	Dispersión de la luz frontal
CBA	Arreglo de perlas por citometría	FACS	Separación celular activada por fluorescencia
CD's	Grupos de diferenciación	FcεRIγ	Receptor Iγ de alta afinidad por la fracción Fc de una IgE
DC	Células dendríticas	ISGF3	Factor 3 de genes estimulados por IFN
DNA	Ácido desoxirribonucleico	IL-2Rγ	Subunidad γ común del receptor a IL-2
Fas	Fragmento estimulador de apoptosis	LPS	Lipopolisacáridos
FasL	Ligando de Fas	PTP	Proteínas tirosina fosfatasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos/granulocitos	Bcl-2	Linfoma de células B-2
IFNγ	Interferón	EBV	Virus de Epstein-Bar
Ig	Inmunoglobulina	ISRE	Elementos de respuesta estimulados por IFN
IL	Interleucina	FBS	Suero fetal bovino
IL-15Rα	Subunidad α del receptor a IL-15	PBS	Solución de Buffer de Fosfatos
IL-2Rα	Subunidad α del receptor a IL-2	JNK	c-Jun N-terminal Kinases
JAK	Janus kinase	ERK	Cinasas reguladoras de la señalización extracelular
KAR	Receptores activadores de muerte	APC	Allophycocyanin
KIR	Receptores inhibidores de muerte	ITIM	Inmunoreceptor con dominios inhibidores basados en tirosina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	mTOR	Blanco mecanístico de rapamicina
N-CAM	Molécula de adhesión de células neurales	ITAM	Inmunoreceptor con dominios activadores basados en tirosina
NF-κB	Factor nuclear de la cadena kappa ligera de células B activadas	MFI	Intensidad media de fluorescencia
NK	Natural Killers	V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
p53	Proteína supresora de tumores	MO	Macrófagos
RNA	Ácido ribonucleico	ChIP-Seq	Inmunoprecipitación de cromatina y Secuenciación de DNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
SOCS	Supresores de la señalización de citoquinas	MAP	Proteínas activadas por mitogeno
STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción	IL-2Rβ	Subunidad β del receptor a IL-2
TF	Transferrina	PE	Ficoeritrina
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β	CFSE	Carboxifluoresceína
TNFα	Factor de necrosis tumoral	7-AAD	7-actinomicina D
UV	Ultravioleta	SSC	Dispersión de la luz lateral

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Localización anatómica de células NK maduras
Figura 1	Formación de vanadatos y polímeros del pentóxido de vanadio.
Figura 2	Farmacocinética y farmacodinamia del vanadio.
Figura 3	Estructura química del fosfato, vanadato y pervanadatos
Figura 4	Efectos del vanadio en el Sistema Inmune
Figura 5	Receptores de células NK expresadas en la mayoría de las superficies de células NK
Figura 6	Tres clases de Receptor de IL-2 con diferentes afinidades (K_d), composición y cinasas Jak asociadas
Figura 7	Metabolismo intracelular de vanadato y cambios toxicológicos selectivos
Figura 8	Inmunomodificaciones observadas después de la exposición <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> a compuestos de vanadio
Figura 9	Efecto de V ₂ O ₅ en la proliferación de células NK-92mi
Figura 10	Externalización de fosfatidilserina inducida por V ₂ O ₅ a diferentes tiempos 6, 12 y 24 h
Figura 11	Producción de citocinas en células NK-92mi expuestas a V ₂ O ₅
Figura 12	Modificaciones en la expresión de ligandos de membrana en células NK-92mi tratadas con V ₂ O ₅
Figura 13	Efecto de V ₂ O ₅ en la activación de JAK3/STAT5
Figura 14	Imágenes de la fosforilación de JAK3 en células tratadas V ₂ O ₅ durante 24 h
Figura 15	Expresión de CD45 y SOCS1 en células NK-92mi expuestas a V ₂ O ₅
Figura 16	Representación esquemática del mecanismo de toxicidad inducido por V ₂ O ₅

RESUMEN

El vanadio es el principal contaminante ambiental con efectos tóxicos, carcinogénicos e inmunosupresores en la respuesta inmune adaptativa. Sus efectos en la respuesta inmune innata son poco explorados. El objetivo de este estudio fue identificar si el pentóxido de vanadio (V₂O₅) deteriora la función inmunoreguladora de células NK y determinar el posible mecanismo asociado con este efecto. Las células NK-92mi independientes de interleucina IL-2 fueron expuestas a diferentes concentraciones de V₂O₅ durante 6, 12 y 24 horas. La proliferación celular fue evaluada usando la tinción con CFSE, la apoptosis con la unión de anexina V y la necrosis con la tinción de 7-AAD. La liberación de varias citocinas clave, como por ejemplo IL-2, -4, -6, -10, -17A, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α fue evaluada usando el kit de CBA humano. La expresión de CD45, SOCS1, JAK3, pJAK3, STAT5, pSTAT5, IL-2R, IL-15R, Fas y FasL fue determinada por citometría de flujo. La expresión de JAK3 y pJAK3 también fue evaluada por microscopia confocal. Los resultados indican que V₂O₅ inhibe la proliferación de células NK-92mi e induce apoptosis de una manera dosis y tiempo dependiente. V₂O₅ también inhibe la secreción de IL-2, IL-10 e IFN- γ pero solo después de 24 horas de exposición y con concentraciones de 25 μ M o mayores. V₂O₅ no tiene efecto en la expresión de JAK3 y STAT5, pero provoca un incremento en pJAK3 y reduce los niveles de pSTAT5. V₂O₅ incrementa la expresión de IL-2R, IL-15R, Fas y FasL en concentraciones por arriba de 50-100 μ M. V₂O₅ no afecta la expresión de la fosfatasa de membrana CD45, pero causa un incremento en la expresión de SOCS1. Estos resultados indican que el efecto tóxico de V₂O₅ en las células NK-92mi es a través de la desregulación de las vías de señalización mediadas por IL-2. Estas alteraciones corroboran algunos efectos reportados previamente en la respuesta inmune innata del hospedero expuesto a V₂O₅ inhalado.

ABSTRAC

Vanadium is a major air pollutant with toxic and carcinogenic effects; it also exercises immunosuppressive effects on the adaptive immune response. Its effect on the innate immune response is poorly explored. The aim of this study was to identify if vanadium pentoxide (V₂O₅) impairs the function of immunoregulatory NK cells and to determine possible mechanisms associated with this effect. Interleukin-2-independent NK-92mi cells were exposed to different V₂O₅ concentrations for 6, 12, or 24 h periods. Cell proliferation was then evaluated using CFSE staining, apoptosis by Annexin V binding, and necrosis by 7-AAD staining. The release of IL-2, -4, -6, -10, -17A, interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α by the cells were assessed using a human CBA kit. Expression of CD45, SOCS1, JAK3, pJAK3, STAT5, pSTAT5, IL-2R, IL-15R, Fas, and FasL in/on the cells was determined by flow cytometry; JAK3 and pJAK3 expression were also evaluated via confocal microscopy. The results indicated that V₂O₅ could inhibit NK-92mi cell proliferation and induce cell apoptosis in a dose- and time-related manner. V₂O₅ also inhibited IL-2, IL-10, and IFN γ secretion but mostly only after 24 h of exposure and with primarily the higher doses tested. V₂O₅ had no effect on expression of JAK3 and STAT5, but did cause an increase in pJAK3 and appeared to lead (trend) to reductions in levels of phosphorylated STAT5. V₂O₅ increased the expression of IL-2R, IL-15R, Fas, and FasL at concentrations above the 50–100 mM range. V₂O₅ had no effect on expression of the CD45 membrane phosphatase, but it did cause an increase in the expression of SOCS1. These results indicate that a key toxic effect of V₂O₅ on NK cells is a dysregulation of signaling pathways mediated by IL-2. These effects could help to explain the previously-reported deleterious effects on innate immune responses of hosts exposed to inhaled V₂O₅.

I. INTRODUCCION

Algunos medicamentos o fármacos han sido diseñados para incrementar la inmunidad y reforzar las reacciones contra patógenos o células cancerosas, pero de manera constante también para suprimir la inmunidad y reducir el rechazo de trasplantes o procesos patológicos de enfermedades autoinmunes.

De manera similar a los medicamentos desarrollados para ciertos propósitos, los agentes ambientales pueden incrementar o suprimir la inmunidad. Los agentes ambientales tóxicos por ejemplo: cadmio y manganeso que son liberados del convertidor catalítico; níquel y dióxido de sulfuro provenientes de la combustión del diésel; mercurio, antimonio, arsénico y talio, que son liberados a la atmosfera por centrales eléctricas que queman carbón (Chukhlovi et al., 2001), son algunas veces referidos como inmunotoxinas o sustancias inmunotóxicas cuando estos ejercen un efecto modulador directo o indirecto en el sistema inmune, lo que puede resultar en una enfermedad.

El sistema inmune es principalmente afectado por mercurio, níquel, zinc, cadmio, arsénico, cromo y plomo (ATSDR, 1999), las enfermedades autoinmunes asociadas con metales tóxicos, especialmente mercurio, incluyen esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, dermatitis por contacto, escleroderma, asma, estomatitis, alergias, artritis reumatoide y fibromialgia.

Por otro lado, el termino inmunotoxina ha sido usado para conjugar toxinas con anticuerpos dirigidos a células tumorales (Vitetta and Uhr, 1985). En cuanto al sistema inmunológico, así como para otros sistemas de órganos, determinar los efectos positivos versus los negativos es especialmente difícil con algunos agentes ambientales. Por ejemplo, los rayos solares (radiación UV) pueden causar cáncer de piel o suprimir la inmunidad, pero la radiación UV también induce

la síntesis de vitamina D, la cual incrementa la inmunidad innata contra patógenos (Liu et al., 2007) y regula la autoinmunidad (Adorini and Penna, 2008). Los metales pesados tóxicos inducen un aumento de la inmunidad de tipo Th2, pero suprimen la inmunidad de tipo Th1 (Lawrence and McCabe, 2002). Por lo tanto, los efectos de cada compuesto en el sistema inmune deben ser evaluados cuidadosamente.

En este proyecto se evaluó el efecto del pentóxido de vanadio sobre la función inmunoreguladora de células NK (natural killers), utilizando como modelo la línea celular NK-92mi transfectada con el gen de IL-2, lo cual nos permite evaluar a nivel intracelular el efecto del vanadio en la vía de señalización inducida por esta citocina.

II. ANTECEDENTES

2.1 Vanadio

El vanadio (V) es un metal de transición que pertenece al grupo VB de la tabla periódica, fue descubierto originalmente por Andrés Manuel del Río, mineralogista hispanomexicano de origen español, en 1801, en la mina del cordonal en el municipio de Zimapán en el estado de Hidalgo, México. En 1831, el químico sueco Nils Gabriel Sefström, redescubrió el elemento. Lo llamó vanadio en honor a la diosa escandinava de la belleza y la fertilidad Vanadis, nombre que oficialmente mantiene hasta la fecha. Este elemento puede existir en múltiples valencias (0, +2, +3, +4, +5) tanto en formas aniónicas como catiónicas. No obstante las formas tetravalentes y pentavalentes son las más estables. Los iones de cada uno, no existen en la naturaleza. Por lo general, estos iones se unen al oxígeno como oxianiones poliméricos con carga negativa que fácilmente forman complejos con ligandos polarizables como azufre o fosfato. En la naturaleza, el vanadio pentavalente es comúnmente encontrado en forma de pentóxido de vanadio (V₂O₅), aunque ferrovandio, carburo de vanadio y otras formas de vanadatos pueden existir. El vanadato es un monómero pentavalente de óxido de vanadio que puede existir ya sea en forma -Meta u Orto- en función del número de ligandos de oxígeno (meta- si n = 3; orto- si n = 4) sobre el átomo de vanadio (fig.1).

Las conversiones o especiación, y por lo tanto, la distribución de las especies de vanadio en soluciones dependen del pH y de la concentración de vanadio. Como regla general, conforme el número de unidades de vanadato se incrementan en el polímero, la toxicidad disminuye; sin

embargo, incluso polímeros grandes como decavanatos pueden dar lugar a efectos tóxicos.

(Cohen, 2004, Cohen et al., 1997, Owusu-Yaw et al., 1990)

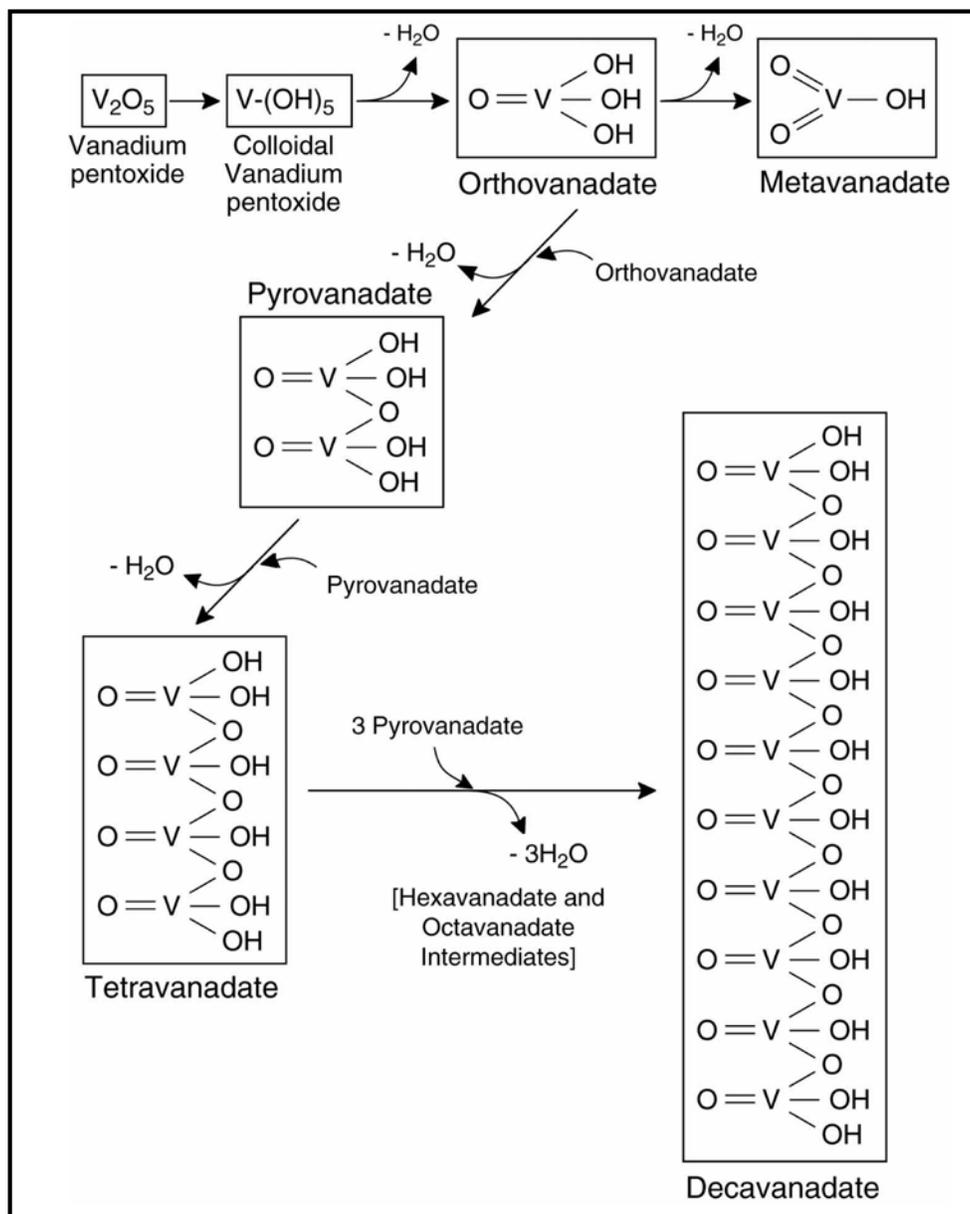


Figura 1. Formación de vanadatos y polímeros del pentóxido de vanadio.

Las primeras aplicaciones de los compuestos de vanadio remontan a Berzelius quien, alrededor de 1835, recomendaba la adición de vanadato de amonio a las decocciones de nuez de agalla para la preparación de tinta negra. Berzelius y, más tarde, Deville también consideraron el uso de óxidos de vanadio como aditivos de esmaltes y vidrios. Hoy en día, el pentóxido de vanadio (V₂O₅) es un aditivo común en el vidrio fundido para la elaboración de botellas transparentes de cerveza: el óxido de vanadio previene el contacto directo de la luz y el desagradable sabor asociado con la exposición de la cerveza a los rayos UV.

Otros usos de vanadatos y óxidos de vanadio son la producción de ácido sulfúrico, ya que este cataliza la oxidación de SO₂ a SO₃ y la oxidación de benceno u otros compuestos aromáticos, en anhídrido maleico para la fabricación de polyester. Desarrollos recientes, que se aproximan hacia aplicaciones más amplias y diversas incluyen acumuladores y/o baterías de energía basados en el óxido de vanadio, fabricación de macro-poros de óxidos de vanadio para su uso en procesos catalíticos y el empleo de nano-partículas de V₂O₅ como descontaminantes biológicos (Rehder, 2013a)

2.2 Distribución, beneficios y potencial toxico

El vanadio está ampliamente distribuido en la naturaleza, el vanadio no se encuentra en forma pura, por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos. Los principales estados de oxidación del vanadio bajo condiciones óxicas son oxidovanadio (+IV), o vanadil y (+V). El hidróxido de vanadil es poco soluble, pero es fácilmente movilizad con una gran variedad de ligandos presentes en materia orgánica en descomposición y sólidos.

En la naturaleza, sin embargo, su liberación en la atmósfera es principalmente ocasionada por la actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental. Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de petróleo y gasolinas, de carbón y de aceites pesados y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos (IPCS 2001).

El aceite crudo (petróleo) puede contener altas cantidades de vanadio (más del 0.12%) en forma de porfirinas de vanadil. En aguas subterráneas y otras fuentes de agua fresca el contenido de vanadio está presente en forma de H_2VO_4^- y es de aproximadamente 10 nano molar (nM) (Rehder, 2012). En áreas volcánicas, las concentraciones pueden subir 4 órdenes de magnitud. En el agua de mar, el promedio en la concentración de vanadato, presente en forma de pares de iones $\text{Na}^+\text{H}_2\text{VO}_4^-$, se calcula en 35 nM, convirtiendo al vanadio en el segundo metal de transición más abundante en el océano, superado solo por el molibdeno (100 nM MoO_4^{2-}). En los alimentos (grasas, frutas y vegetales) su contenido se encuentra entre 1 y 5 μg de vanadio, mientras que en la carne, mariscos, granos enteros y productos lácteos es de 5 a 30 μg por Kg de alimento.

En el agua para beber se describen valores por debajo de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, con un promedio de 4.3 $\mu\text{g}/\text{L}$. Cantidades altas, que van de 49.2 a 70 $\mu\text{g}/\text{L}$, se han encontrado en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales (Lagerkvist et al. 1986, IPCS 1988).

El desgaste de las rocas oceánicas y de los minerales terrestres libera vanadio en el agua y en el aire. Se considera que la concentración promedio de este metal en el suelo es alrededor

de 100 µg/g de peso seco, pero en suelos cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los 400 µg/g (Lagerkvist et al. 1986, IPCS 1988, 2001), (Aragon and Altamirano-Lozano, 2001).

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. En grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 µg/m³ y en áreas rurales cantidades menores a 0.024 µg/m³ (Lagerkvist et al. 1986, IPCS 1988). Para la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan 0.114 µg/m³ en aeropartículas de 10 µm y 0.093 µg/m³ en las de 2.5 µm (Gutiérrez-Castillo et al. 2006), datos que coinciden con las cantidades encontradas en otras localidades con intensa actividad industrial de Europa y Estados Unidos de América.

En zonas industriales con combustión de materiales fósiles y actividades de procesamiento de vanadio, los óxidos de vanadio en el aire pueden aumentar de manera dramática, en varios órdenes de magnitud, causando problemas pulmonares (Cohen et al., 2007) y daño al DNA en leucocitos (Ehrlich et al., 2008). La toxicidad potencial de óxidos de vanadio al inhalarse ha permitido fijar límites de exposición; la concentración máxima permisible de V₂O₅ en áreas de trabajo es de 0.05mg/m³.

2.3 Especiación y Biodisponibilidad

La mayoría de los compuestos de vanadio, una vez introducidos dentro del organismo vía tracto gastrointestinal, sistema pulmonar, o en el caso de aplicaciones médicas intravenosa o intraperitoneal, sufren una especiación en varios fluidos del cuerpo y compartimentos celulares (Fig.2).

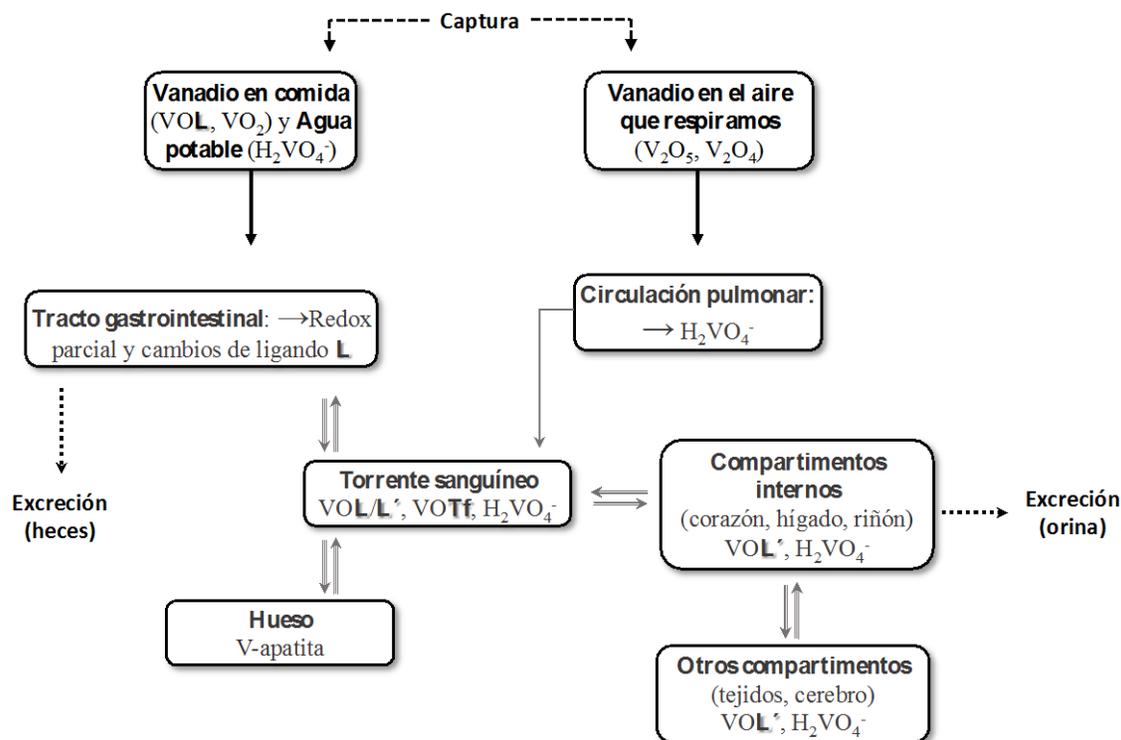


Figura 2. Farmacocinética y farmacodinamia del vanadio. L es cualquier ligando “externo” de un compuesto de vanadio aplicado oral o intravenosamente, o introducido en el curso de la especiación en el intestino, mientras L’ representa cualquier ligando dentro del cuerpo; TF= transferrina (Rehder, 2013a).

En soluciones acuosas y fluidos biológicos, la especiación del vanadio depende del pH, quelantes y proteínas. En soluciones ácidas el vanadio existe predominantemente en estados de valencia de +4 como vanadil (VO₂⁺), mientras que a pH alcalino la forma V (+5) es favorecida.

En sistemas biológicos a pH fisiológicos, las especies predominantes son monoméricas con valencia de +4 [VO(OH)₃], diméricas [(VO)₂(OH)₅] y con valencia de +5 H₂VO₄, las cuales son transportadas activamente dentro de las células (Crans et al., 2004).

En sangre, el vanadio puede circular como V(+4) y polivanadatos (ejm. Decavanadato: V₁₀ estructura formada por la agregación de VO₄³⁻ protonado) unido a proteínas, tales como transferrina o albumina (Valko et al., 2006). En tejidos, V(+5) puede ser reducido a vanadil V(+4)O₂₊ por agentes reductores como el glutatión (Pierce et al., 1996), mientras en soluciones a pH 7.4 el V(+4) puede ser oxidado a V (+5) (Li et al., 1996).

El metavanadato (VO₃⁻) es la forma más comúnmente encontrada en fluidos extracelulares, mientras que las formas cuadrivalentes predominan intracelularmente (Fortoul et al., 2002). El vanadato es generalmente considerado como un análogo del fosfato y es capaz de imitar alguna de las acciones biológicas del mismo, dado que puede adoptar una estructura similar al fosfato inorgánico (Fig. 3), así como también, una estructura triangular bipiramidal de 5 coordenadas que asemeja el estado de transición de muchas reacciones de transferencia de fosforilos o reacciones de hidrólisis de éster de fosfatos, catalizadas por las fosfatasas (Huyer et al., 1997).

Además, la inhibición de algunas fosfatasas por el vanadil, V(+4), puede ser explicada por la formación de un estado de transición análogo entre el anión [VO(OH)₃], el cual predomina a pH neutro, y los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (Crans et al., 2004). Asimismo, las especies de peroxovanadios o pervanadatos se pueden formar entre vanadato y el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) que también son considerados importantes en términos biológicos (Huyer et al., 1997, Valko et al., 2006).

De esta forma, la exposición del tejido blanco a vanadio depende de la biodisponibilidad, solubilidad y ruta de exposición. Por ejemplo, en células epiteliales alveolares humanas A549, se demostró que las nano-partículas de V(+3) como el V₂O₃ son más solubles y citotóxicas que el V₂O₅ disponible comercialmente (Worle-Knirsch et al., 2007).

Además, en ratas que fueron inyectadas intraperitonealmente con diferentes compuestos de V (+3), V (+4) o V (+5) se observaron diferentes patrones de absorción y distribución, no obstante solo los niveles de V(+4) fueron determinados (Sakurai, 1994). Ante esto, es necesario considerar que deben tomarse en cuenta las diferencias en biodisponibilidad, solubilidad y vía de exposición de los compuestos de vanadio cuando se intente extrapolar los resultados de estudios in vitro a las condiciones in vivo y de una sustancia a otra.

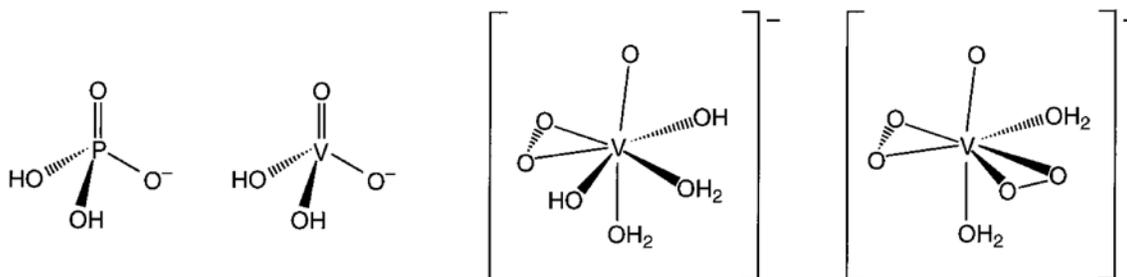


Figura 3. Estructura química del fosfato, vanadato y pervanadato (mono y diperoxo) (Huyer et al., 1997).

El vanadio muestra sus efectos farmacológicos a bajas concentraciones, alrededor de 10^{-5} a 10^{-7} M y su concentración en mamíferos y plantas se encuentra en el rango de 10^{-6} a 10^{-9} M (Rehder, 2003).

El vanadio es el único metal natural que se encuentra en cantidades trazas en todos los tejidos del cuerpo humano. De acuerdo a los cálculos, el cuerpo humano contiene alrededor de

100 a 200 µg de vanadio. En el cerebro, musculo, hígado, testículos y pulmones las concentraciones de vanadio son: 0.59 ± 0.16 , 1.18 ± 0.06 , 0.78 ± 0.2 , 3.92 ± 1.58 y 1.96 ± 0.39 µmol/kg, respectivamente. Las concentraciones de vanadio en sangre son menores a 0.9 µmol/L (Fedorova et al., 2013)

Los estudios dedicados a investigar el papel fisiológico del vanadio iniciaron en 1997, cuando se descubrió que este compuesto inhibía la actividad de ATPasas de Na⁺ y K⁺ (Strasia, 1971). Numerosos estudios han mostrado que el vanadio está involucrado en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos, en procesos de formación de huesos y dientes, también estimula el crecimiento y la reproducción de células.

Los primeros experimentos que demostraron el papel fundamental del vanadio en los organismos biológicos fueron llevados a cabo en ratas (Hopkins, 1971) y pollos (Hopkins, 1974). En las ratas, la deficiencia de vanadio durante 4 a 6 generaciones seguidas, originó una reducción de la fertilidad en hembras, redujo el número de embarazos por apareamiento e incremento la mortalidad de su descendencia (Golden, 1981).

En pollos, la deficiencia de vanadio (10 µg por Kg de comida) causó: retraso en el crecimiento, desarrollo anormal del esqueleto y retrasó la aparición de plumas en alas y cola. La inhibición de ATPasas de Na⁺ y K⁺ por el vanadio en el túbulo renal de ratas ocasiono un edema alimentario (Berceloux, 1999), mientras una dosis incrementada de vanadio consiguió inducir una diuresis y natriuresis (Soremark, 1962).

Altas concentraciones de vanadio también promueven una mayor mineralización activa de huesos y dientes y disminuye la frecuencia de caries en ratas (Akeru, 1983). Así mismo, el vana-

dato de amonio (20-500 $\mu\text{mol/L}$) aumento el efecto inotrópico positivo inducido por la estimulación eléctrica en el musculo miocárdico papilar de gatos (Nechay, 1984). No obstante, el efecto inotrópico del vanadio depende de la especie del animal en experimentación, tejido, concentración y forma química del vanadio, así como también de la presencia de otros iones y la actividad de la adenilato ciclasa.

Aunque esto sugiere que el vanadio es un elemento esencial para ciertos animales, incluyendo pollos y ratas, su función principal en los seres humanos y muchos otros animales superiores aún no ha sido demostrada (Rehder, 2013a).

Actualmente, los efectos tóxicos en la salud humana inducidos por compuestos inorgánicos de vanadio están ligados con problemas carcinogénicos, neurotóxicos e inmunotóxicos. Los compuestos de vanadio tienen propiedades carcinogénicas y estimulan el desarrollo tumoral. Cationes de vanadil y V₂O₅, compuestos encontrados en el aire contaminado, generan ROS que causan daño al DNA lo cual puede permitir mutaciones y, como consecuencia, el desarrollo de células tumorales (Ehrlich et al., 2008).

Con respecto al potencial carcinogénico, estudios basados en cultivos celulares han probado la habilidad del vanadio para inducir lesiones genotóxicas, transformación morfológica y efectos anti-apoptóticos en ciertos tipos celulares.

En células deficientes de p53 (células tumorales o células knock out para p53 no tumorales), los compuestos de vanadio inhiben el ciclo celular y de esta forma inducen apoptosis (Zhang et al., 2002). La activación de NF- κ B por el ROS, que a su vez es generado por compuestos de vanadio, realzan el efecto apoptótico (Parrondo et al., 2010). En contraste, en células con p53 funcional, la alteración de la fosforilación de p53 permiten la inhibición de apoptosis (Morita et

al., 2010). Además los compuestos de vanadio estimulan el ciclo celular, en consecuencia se inhibe la apoptosis, ya que ambos procesos están mutuamente conectados (Zhang et al., 2002).

También, la activación de NF κ B inhibe la apoptosis de células tumorales. Otro hecho importante es que los compuestos de vanadio causan mucho más daño al DNA en células tumorales comparado con células no tumorales en las mismas condiciones (Wozniak and Blasiak, 2004). El daño excesivo al DNA conduce a la apoptosis de células tumorales, mientras una menor intensidad del daño al DNA, evocado por compuestos de vanadio en células no tumorales, puede estimular la síntesis y activación de enzimas reparadoras, de esta forma se generaría una protección de estas células a la apoptosis.

Los procesos antes mencionados promueven el crecimiento de células tumorales en los estados tempranos de la enfermedad y tienen un efecto antitumoral en los estados avanzados de cáncer. Estudio con animales tratados con carcinógenos sugieren que los compuestos de vanadio usados a bajos niveles tienen efectos selectivos en las células tumorales (Chakraborty et al., 2007, Ray et al., 2007)

A nivel inmunológico, estudios en trabajadores en contacto con sales de vanadio y partículas suspendidas totales (TSP), así como en estudios *in vitro*, reportaron la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8, así como también de factores de crecimiento (TNF- α , IFN- γ), además de un incremento en el conteo de leucocitos. En aves, la modulación inmune por sales de vanadio indujo la activación y proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4+, CD8+, células B y macrófagos (Qureshi et al., 1999, Shen et al., 2001).

La activación de linfocitos por vanadio (Fig.4) es mediada a través de proteínas cinasas, fosfatasas, así como también por MAPK cinasas; como consecuencia pueden activarse factores de transcripción tales como: NF- κ B, c-Jun, ATF-2, AP-1, los cuales regulan la transcripción de

una amplia variedad de genes (ejm. IL-8, IL-6 Y TNF- α), los cuales están relacionados con la respuesta inmune (Jaspers et al., 2000). Además, el vanadio induce la activación de PLC- γ activada por N-FAT y el incremento de calcio intracelular, puede activar los linfocitos T (Huang et al., 2000).

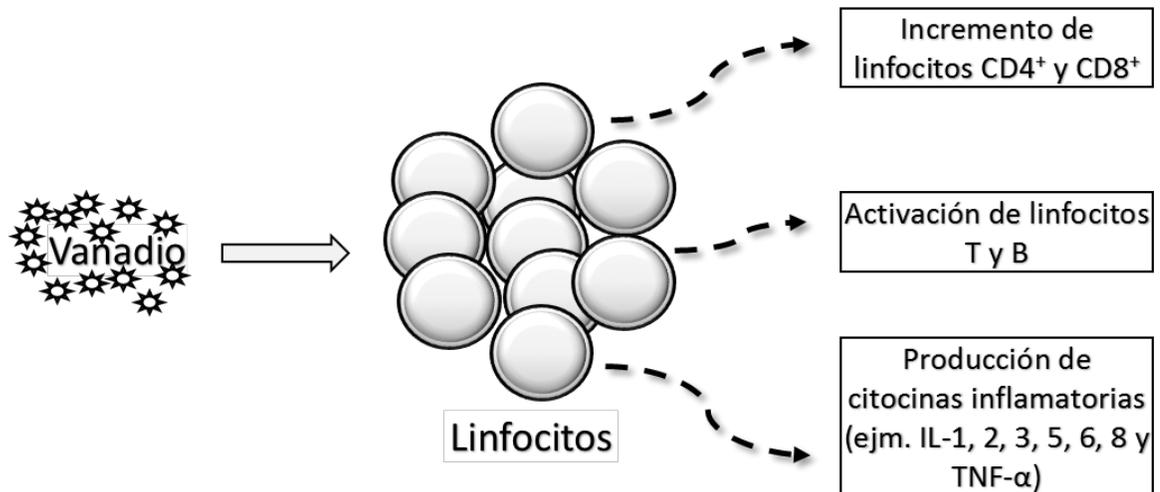


Figura 4. Efectos del vanadio en el Sistema Inmune.

3.1 CELULAS NK

La inducción de la respuesta inmune es el resultado de la interacción de varios componentes del sistema inmune innato y adaptativo; uno de los principales tipos celulares efectores de la respuesta innata son las células natural killers (NK), las cuales rápidamente reconocen y destruyen células transformadas o infectadas con virus. Se reconocen como mediadoras de la respuesta inflamatoria y reguladoras de funciones inmunes innatas y adaptativas vía la interacción con otras células inmunes (Andrews et al., 2003, Banchereau and Steinman, 1998).

Las células NK representan una de las primeras líneas de defensa inmune del hospedero contra virus y cáncer, así como también, son reguladores centrales de funciones inmunes. Las células NK tienen una marcada habilidad para potenciar el trasplante de células madre hematopoyéticas y para responder a citocinas tales como IL-2 para su activación, expansión e incremento en la actividad antiviral y antitumoral (Moretta, 2002, Moretta et al., 2003).

Dentro del sistema inmune, las células NK representan una población relativamente pequeña mezcladas con otras poblaciones de células inmunes y comprenden entre el 5-15 % de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana (PBMNL) y de 1 a 3 % en los esplenocitos murinos. Las células NK humanas son fenotípicamente definidas por la expresión en la superficie celular de CD56 (molécula de adhesión neural-celular N-CAM), CD161 (NKR-P1A), CD122 (cadena β del complejo IL-2/IL-15R), CD132 (cadena γ común del complejo IL-2R, γ c), CD16 (Fc γ RIII, receptor de baja afinidad para IgG), receptores de muerte tipo Ig o receptores inhibidores (KIR), receptores activadores de muerte celular (KAR) y por la ausencia de receptores antígeno específicos y marcadores de linaje de células T, células B o macrófagos/monocitos.

Además, las células NK contienen gránulos lisosomales en su citoplasma y tienen una morfología linfocítica granular (Moretta et al., 2003). Las células NK humanas son heterogéneas y consisten en dos subtipos principales. En cuanto a las células NK de sangre periférica humana, 90-95% son células citotóxicas **CD56^{low}, CD16⁺ IL-2R β γ ⁺** con poca capacidad proliferativa y producen citocinas inmunoreguladoras solo en presencia de altas concentraciones (6000 unidades internacionales [IU] o 22 nM) de IL-2. El resto de las células NK de sangre periférica humana son **CD56^{high}, CD16⁻ IL-2R β γ ⁺**, carecen de actividad citotóxica, son altamente proliferativas en presencia de bajas concentraciones (6-60IU, 0.2-2nM) de IL-2, y producen altas concentraciones

de citocinas inmunoregulatoras tal como IFN- γ , TNF y GM-CSF (Pilbeam et al., 2008). Un sub-tipo adicional de células NK de sangre periférica humana, denominadas células pre-A-NK, han sido definidas con base a la expresión selectiva de isoformas de N-CAM, estas son llamadas ANK-1 y presentan altos niveles de adhesividad y proliferación en respuesta a altas concentraciones de IL-2 (22 nM), con la habilidad de penetrar y eliminar células cancerosas en tejido de tumores sólidos. En contraste con las células NK humanas, las células NK de ratón son menos heterogéneas y no expresan CD56 y ANK-1 (Pilbeam et al., 2008).

3.2 Localización y migración

Las células NK se desarrollan en la médula ósea (MO) y no son estáticas, sino que habitan órganos linfoides primarios y secundarios. Una de las características de las células NK es la expresión de sus receptores activadores e inhibidores, los cuales les permiten responder cuando los ligandos para los receptores activadores están sobre expresados o cuando los ligandos para los receptores inhibidores están disminuidos, (Yokoyama and Plougastel, 2003). Dentro de cada tejido, las células NK a menudo adquieren una función única y un fenotipo que es regulado por el microambiente local, Tabla 1 (Vitetta and Uhr, 1985).

Tabla 1. Localización anatómica de células NK maduras		
Órgano	Localización específica	Características especiales
Nódulos linfoides	Medula y Zona T	CD56 ^{bright} en humanos CD27 ^{high} en ratones
Bazo	Pulpa roja (zona marginal)	Poblaciones mixtas migran a la pulpa blanca después de su activación
Intestino	Intraepitelial, lamina propia y criptoplasmas	Baja citotoxicidad e IFN γ Se parecen a LTi Algunas producen IL-22 y algunas pueden participar en respuestas Th2
Pulmones	Espacio broncoalveolar, intersticio pulmonar	Reguladas localmente por macrófagos alveolares
Hígado	Sinusoides	Expresan TRAIL CD16 ⁻ en humanos Bajo Umbral de activación Reguladas por células de Kupffer
Timo	Corteza y medula	IL7R α , GATA-3 ⁺ , CD16 ⁻ , CD11b/Ly49 ^{low} Baja citotoxicidad, elevado IFN γ
LTi, célula inductora de tejido linfoide.		

En pulmón, por citar un ejemplo, las investigaciones de citotoxicidad realizadas con preparaciones linfocíticas de extractos pulmonares murinos, indicaron la presencia de células NK (Puccetti et al., 1980). Posteriormente se demostró que la depleción de células NK con anticuerpos, disminuyó la citotoxicidad celular en pulmón, mientras la infección con influenza incrementó la citotoxicidad, proporcionando evidencia de la existencia de células NK residentes en pulmones de ratón (Stein-Streilein et al., 1983).

Experimentos adicionales con ratones, mostraron que las células NK de pulmón pueden presentar niveles elevados de actividad citotóxica en comparación con poblaciones de sangre periférica y bazo (Wiltrout et al., 1985), mientras que la depleción de células NK en pulmón incrementó la susceptibilidad y mortalidad de ratones infectados con el virus de la influenza (Stein-Streilein and Guffee, 1986). A la par, linfocitos de pulmones humanos mostraron actividad citotóxica, conjuntamente, las células NK de pulmón en reposo, sólo fueron capaces de eliminar a su blanco después de dicha estimulación, estos estudios sugieren que aunque las células NK están presentes en el pulmón normal, éstas son funcionalmente inactivas, debido al menos en parte, a la influencia local inhibitoria.

En presencia de IL-2, sin embargo, la actividad de las células NK de pulmón es inducida, lo cual sugiere que la actividad de las células NK en pulmón puede ser modulada (Robinson et al., 1984). También se demostró que macrófagos alveolares pueden potencialmente inhibir la actividad celular de NK en pulmón, la inhibición requiere contacto celular directo y es independiente de especies reactivas de oxígeno soluble, prostaglandinas o la activación por el humo del tabaco y tienen poco efecto sobre células NK de sangre periférica (Roth and Golub, 1989), sugiriendo que en el pulmón, las células NK pueden representar un subtipo diferente y que responde a diferentes mecanismos regulatorios.

Por otro lado, la localización de estas células es principalmente dirigida por la acción de quimiocinas y por lo tanto están en estrecha asociación con su estado de activación dentro del organismo. Cambios en la expresión de quimiocinas durante la enfermedad resulta en una mayor movilización de estas células y les permite proteger al hospedero de infecciones y alteraciones malignas.

3.3 Receptores

Las células NK derivadas de linfocitos de medula ósea, están bien equipadas para la destrucción de células infectadas con virus y células tumorales, sin la necesidad de una estimulación antigénica previa. Su maquinaria de eliminación es bastante compleja y es determinada por la integración de señales obtenidas de receptores activadores e inhibidores (fig. 5).

Los receptores inhibidores reconocen moléculas que son expresadas en células normales, como una manera para proteger células sanas del ataque de células NK. Los receptores inhibidores prototipos reconocen moléculas MHC de clase I, recientes estudios han identificado receptores inhibidores que tienen como ligando moléculas no MHC. Todos los receptores inhibidores de NK definidos, contienen en su tallo citoplasmático uno o más inmunoreceptores con dominios inhibidores basados en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) que incluyen la secuencia consenso: Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-X-X-Leu/Val (donde “X” representa cualquier aminoácido). Tras la ligación, el residuo de Tyr en el ITIM es fosforilado (probablemente por cinasas de la familia Src) y el reclutamiento de β -arrestina (Yu et al., 2008), la cual lleva a cabo la unión de tirosin fosfatasas. El reclutamiento de las fosfatasas se localiza próxima a la membrana lo cual obstaculiza o previene señales activadoras.

Por muchos años se pensó que las células NK eran controladas solo por mecanismos inhibitorios. La eliminación de células blanco fue considerado un hecho, como resultado de la ausencia de señales inhibitorias. Sin embargo, ahora es bien sabido que las células NK requieren señales de activación específica para eliminar a una célula blanco. Los receptores activadores (fig.5) son definidos por su habilidad para directamente eliminar un blanco. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la activación de algunos de los receptores activadores de NK, en células NK

en reposo, requiere la estimulación sinérgica de más de un receptor (Bryceson et al., 2006). Además, se cree que algunos receptores de NK sirven como receptores coestimuladores que reducen el umbral de activación pero estos no llevan a cabo la lisis directamente (Moretta et al., 2002).

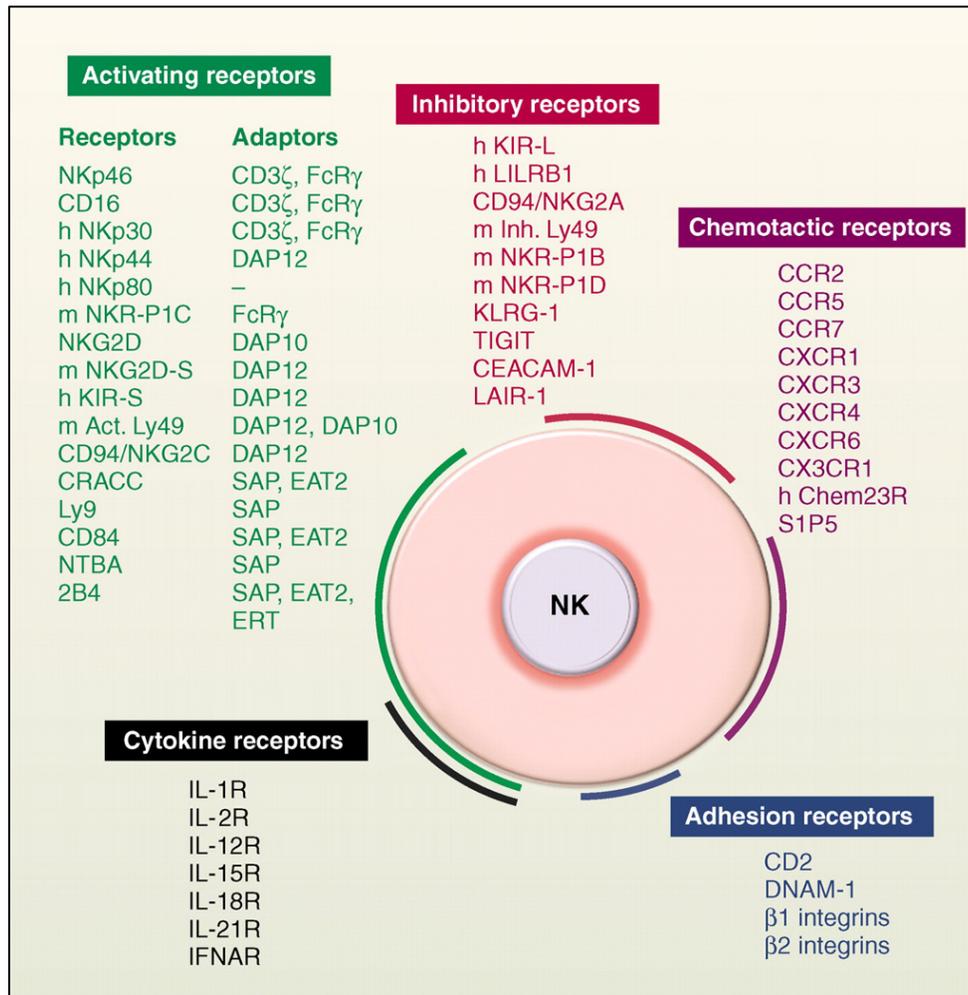


Figura 5. Receptores de células NK expresadas en la mayoría de las superficies de células NK (Vivier et al., 2011).

A diferencia de los receptores inhibidores que contienen un motivo inhibitorio en su tallo citoplasmático, la transducción de las señales activadoras es mediada por la asociación de los

receptores activadores con un motivo inmunodominante de activación basado en tirosina (ITAM) que contienen proteínas adaptadoras, tales como CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , DAP10 y DAP12 (Lanier, 2003). El hecho es que estos receptores no señalizan a través de su tallo citoplasmático, más bien están acoplados a diferentes proteínas adaptadoras que proveen una maquinaria más flexible para el control de la actividad de muerte en diversas condiciones fisiológicas (Horng et al., 2007).

3.4 Producción de citocinas por subtipos de NK

Las células NK representan una importante fuente de citocinas y quimiocinas inmunoregulatoras. Ellas se unen a otras células inmunes durante las fases tempranas de la respuesta inflamatoria y las interacciones funcionales resultantes dan forma tanto a la respuesta inmune innata dentro del tejido periférico inflamado y la respuesta inmune adaptativa localizada en órganos linfoides secundarios (Vivier et al., 2008).

Las funciones efectoras o inmunoregulatoras de las células NK se correlacionan con los niveles de expresión del marcador de superficie CD56. Células CD56^{dim} representan la mayoría de las células NK, las cuales expresan altos niveles de CD16 y funcionan como efectores de citotoxicidad natural y de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos. Por otro lado, las células CD56^{bright}, que representan una población menor del subtipo de NK en sangre (~10%), son CD16^{dim/neg} y muestran funciones inmunoregulatoras a través de la secreción de citocinas (Cooper et al., 2001).

La regulación del desarrollo de células NK humanas en subtipos de CD56^{bright} o CD56^{dim} parcialmente ha sido clarificado con la caracterización funcional de una nueva citocina, IL-21

(Parrish-Novak et al., 2000). En sinergia con IL-15, IL-21 y Flt3L promueven la expansión y diferenciación de células NK de progenitores de médula ósea *in vitro*. Mientras la combinación de estas tres citocinas soporta el desarrollo de CD56^{dim} y CD16^{bright}, células NK altamente líticas, en ausencia de IL-21 se favorece la generación de células NK CD56^{bright} que carecen de CD16 y KIRs (Sivori et al., 2003). Así, la diferenciación de células NK a CD56^{bright} o CD56^{dim} es probablemente dependiente de la presencia relativa y abundancia de factores de crecimiento tales como IL-15 e IL-21 dentro del microambiente de la médula ósea.

El interferón γ , la citocina más abundante producida por todas las células NK, es una citocina pleiotrópica que promueve la activación de macrófagos, media la inmunidad antibacterial y antiviral, promueve la autofagia e incrementa la presentación de antígeno, orquesta la activación del sistema inmune innato, coordina la interacción linfocito-endotelio, regula el balance Th1 y Th2 y controla la proliferación celular y la apoptosis (Schoenborn and Wilson, 2007).

Aunque otras citocinas derivadas de NK son producidas a bajos niveles en comparación con el INF- γ , esta citocina juega un papel importante en diferentes funciones regulatorias de células NK, incluyendo la modulación de respuestas alérgicas e inflamatorias, funciones de APC, diferenciación de células B y hematopoyesis extramedular. El subtipo de células NK CD56^{bright} es la fuente primaria de citocinas inmunoreguladoras derivadas de NK, además de INF- γ , las células NK CD56^{bright} también secretan TNF- α , TNF- β , GM-CSf, IL-10 y IL-13 en altos niveles comparado con el subtipo de células NK CD56^{dim} (Cooper et al., 2001).

La diferencia en la producción de citocinas entre los dos subtipos puede estar relacionada a la expresión diferencial y/o densidad de receptores para monoquinas, los cuales, en turno, inducen la secreción de citocinas por las células NK. Sin embargo, la estimulación de subtipos de células

NK con ésteres de forbol más inomincina, la cual es independiente de la activación de receptores a monoquina, resulta en una producción significativamente mayor de INF- γ , INF- β Y GM-CSF por células NK CD56^{bright} que por células CD56^{dim} (Cooper et al., 2001). Así el subtipo NK CD56^{bright} tiene significativamente mayor capacidad para la producción de citocinas que el subtipo CD56^{dim}.

3.5 Citocinas que afectan a células NK (IL-2)

En dosis supra-fisiológicas, la IL-2 causa activación y proliferación, incremento de citotoxicidad y producción de IFN- γ (Trinchieri et al., 1984). El receptor de IL-2 está compuesto de las subunidades α y β específicas de IL-2 en asociación a la cadena γ común (γ_c) del receptor a citocinas. Las células NK CD56+ (Bright) expresan un receptor de alta afinidad para IL-2, mientras que las células NK CD56+ (dim) expresan más un receptor de afinidad intermedia para IL-2.

La deficiencia de la cadena α del receptor a IL-2 no afecta el desarrollo de células T o B; sin embargo, ratones adultos deficientes de esta subunidad desarrollan una sobre expansión de poblaciones linfoides periféricas y enfermedades autoinmunes tales como anemia hemolítica y enfermedad intestinal inflamatoria (Willerford et al., 1995). La cadena β de IL-2 es compartida con el receptor de IL-15, y la deficiencia de la cadena β del receptor a IL-2 en ratones resulta en un número reducido de células NK circulantes e inhabilitación de capacidades citotóxicas (Suzuki et al., 1997).

La expresión forzada de bcl-2 en animales deficientes de la cadena β , restableció la proliferación, probablemente vía el efecto de IL-15, pero no mejoró la citotoxicidad (Minagawa et al.,

2002). La cadena γ común usada por los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 y IL-15. La deficiencia de esta subunidad en ratones resulta en la ausencia de células NK, nódulos linfoides periféricos y los asociados a mucosa intestinal, células dendríticas intraperitoneales (DCs) y linfocitos T γ - δ , así como también a las deficiencias en células T y poblaciones de células B y T (Cao et al., 1995). En humanos, una mutación homóloga de la cadena común está presente en el 75% de los niños con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (fig.6).

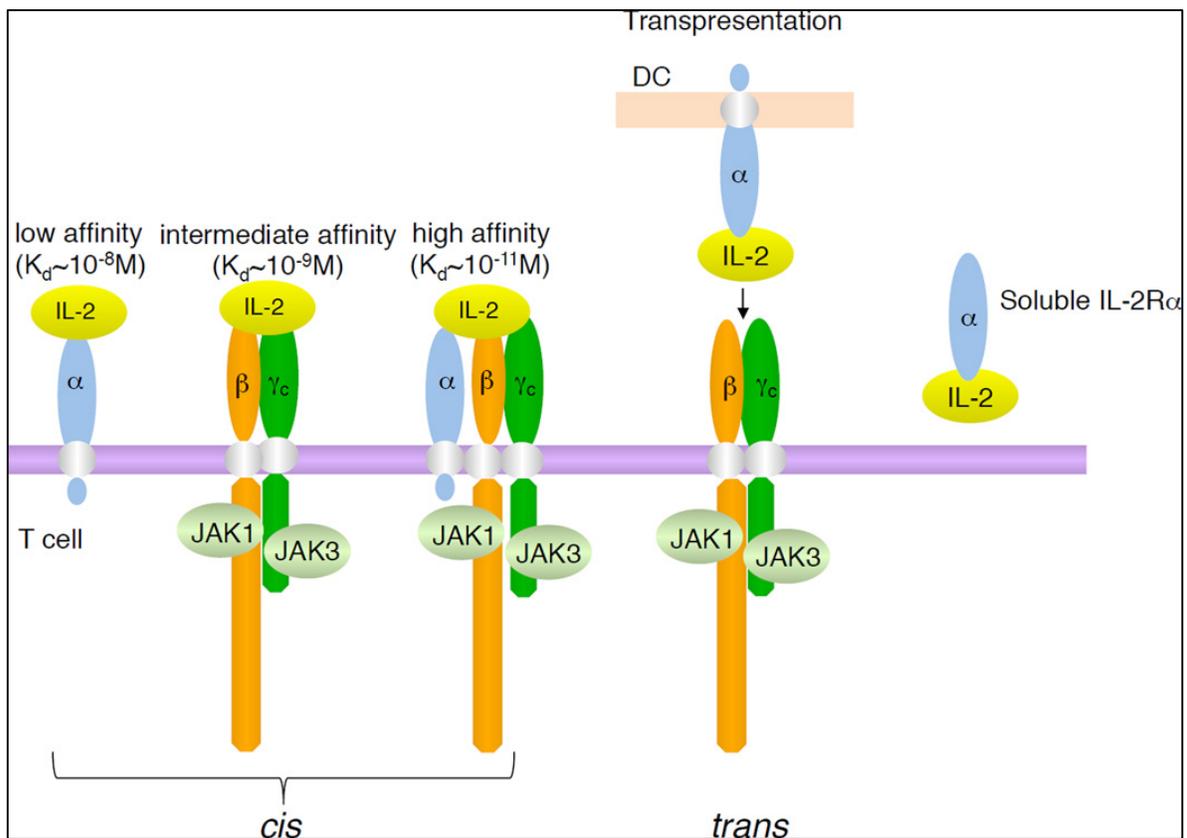


Figura 6. Tres clases del Receptor a IL-2 con diferentes afinidades (K_d), composición y cinasas Jak asociadas al receptor (Liao et al., 2013).

La IL-2 causa un incremento en la transcripción y la estabilización postranscripcional del mRNA para la síntesis de granzimas y en menor medida para el mRNA de perforinas.

La IL-2 también media una sobre-regulación del producto del gen SAP (proteína asociada a SLAM), la cual en conjunción con 2B4 y SLAM (molécula de activación de la señalización en linfocitos) en la superficie de células NK, son importantes para la respuesta de células NK a la infección por EBV (Virus de Epstein-Bar). Anormalidades en el producto de este gen son encontradas en el síndrome linfoproliferativo ligado a X (Sayos et al., 2000).

3.6 Desarrollo de líneas celulares NK

Sólo unas pocas líneas celulares de NK's "verdaderas" han sido establecidas y pueden ser mantenidas en cultivo. Las líneas celulares de NK legítimas son definidas por la expresión de CD56, negativas para la expresión de CD3 y el rearreglo de receptores de células T, con la excepción de la cadena TCDR β truncada observada en algunas células. La mayoría de las líneas celulares de NK fueron aisladas de pacientes con linfoma de NK's o con leucemia de linfocitos granulares gigantes (LGL) y la mayoría son positivas para el virus de Epstein-Barr (EBV), lo cual probablemente contribuye a su expansión clonal. La línea celular NK-92 fue inicialmente negativa a EBV, pero con el tiempo adquirió el virus, aunque no produce viriones activos.

Esta línea celular ha llegado a ser útil para los investigadores que estudian la biología de las células NK y leucemias/linfomas de NK. La línea NK-92 fue obtenida en 1992 de un paciente con linfoma de células NK, ha sido bien caracterizada y utilizada en tratamientos clínicos fase I en los Estados Unidos y Europa. La alta actividad citotóxica de las células NK-92 es debida a que no expresan ningún inhibidor KIR conocido actualmente. Cuando las células NK-92 son transfectadas con KIR, éstas pierden su actividad citolítica, fomentando la importancia de los KIR en la interacción de células tumorales blanco y las NK's (Lutz and Kurago, 1999, Suck, 2006).

Para permitir la proliferación y expansión de células NK-92 independientemente de IL-2 exógena, algunas variantes fueron creadas vía transfección del gen de IL-2, que las hace capaces de producir bajas (NK-92ci) o altas concentraciones de IL-2 (NK-92mi) (Tam et al., 1999). Ambas variantes no requieren IL-2 en el medio de cultivo para su expansión.

Datos preclínicos confirmaron que la transfección no impactó en su habilidad citotóxica y no las hizo más sensibles a la radiación ya que la citotoxicidad fue mantenida después de 1000 cGy de radiación gamma (Tam et al., 1999).

Otra línea celular que ha sido transfectada con un gen de citocinas es la NKL, una línea celular que sólo tiene una moderada y variable citotoxicidad. Después de la transfección con el gen de IL-15, la citotoxicidad contra algún blanco mejoró (línea celular de hepatoma) y la proliferación celular llegó a ser menos dependiente de IL-2 exógena (Jiang et al., 2008).

3.7 Vías de señalización efectora

Un número de vías individuales de señalización río abajo han mostrado ser importantes mediadoras de la señalización de citocinas en las células NK. En particular, varias de las vías; JAK/STAT, Fosfolipasa C- γ , p38 MAP cinasa, vías dependientes de ERK y proteína cinasa C- θ median la señalización de citocinas que son importantes para la activación y función de células NK.

Seguido de la unión al receptor, la IL-2 activa múltiples vías de señalización, la heterodimerización de los dominios citoplasmáticos permite la activación de tirosinas cinasas de la familia Janus, Jak1 y Jak3, con Jak1 asociada a IL-2R β y Jak3 con γ_c .

Las cinasas JAK se activa una a la otra y fosforilan residuos claves en IL-2R β . La fosforilación de tirosina (Y338) en humanos (Y341 en ratones), permite la asociación de la proteína adaptadora SHC, la cual provee una plataforma para la activación de cinasas Ras-MAP y promueve el crecimiento celular. La fosforilación de Y392 y Y510 en humanos (Y395 y Y498 en ratones) influyen en el reclutamiento de STAT1, STAT3, STAT5A y STAT5B, con una activación sostenida y más potente de proteínas STAT5.

La IL-2 también activa la vía de señalización de fosfoinositol 3-cinasa (PI 3-cinasa)-Akt-p70 S6 cinasa, la cual promueve el crecimiento celular y supervivencia. Esta vía es inhibida por rapamicina, la cual bloquea la función de una cinasa con actividad serina/treonina, mTOR (blanco mecanístico de rapamicina), que es activado por la vía PI-3K-AKT (Thomson et al., 2009).

STAT5A y STAT5B se anclan en IL-2R β , son fosforilados, dimerizados y translocados a núcleo, donde se unen a genes esenciales que participan en funciones celulares efectoras y crecimiento de células NK (Lin et al., 2012), así como también en su diferenciación. Generalmente, IL-2 es vista como un activador, porque induce la expresión de más genes de los que reprime (Lin et al., 2012). Análisis de expresión de genes y ChIP-Seq (Inmunoprecipitación de cromatina y Secuenciación de DNA) de células de ratones mutantes y silvestres han permitido la identificación de genes regulados por dímeros de STAT5 versus tetrámeros y la definición de sitios conceso de tetrámeros versus dímeros (Lin et al., 2012).

La expresión deficiente de ciertos genes, tal como *Il2ra* en los ratones deficientes de tetramerización, pudo ser rápidamente atribuida a sitios de unión de tetrámeros de STAT5 conocidos, estos ratones tienen una disminución de células NK, células T CD8⁺ y una expresión de genes deficiente en respuesta a IL-2 o IL-15. Además, estos animales exhibieron una disminución en

la expansión de células T CD8⁺, particularmente después de una infección temprana con el virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) o adenovirus 5, indicando que los tetrámeros de STAT5 son más importantes para una respuesta temprana que para el desarrollo y mantenimiento de memoria a largo plazo. De esta manera, la función de IL-2 requiere de tetrámeros así como dímeros de STAT5 (Liao et al., 2013).

A bajas concentraciones, IL-2 estimula la fosforilación de STAT-5 en subtipos de células NK humanas CD56⁺ (bright) (Wendt et al., 2007). Otras citocina, IL-12 incrementa la fosforilación de STAT1 y STAT4 (Zhang et al., 2008). IL-21 preferencialmente incrementa la fosforilación de STAT3 (Wendt et al., 2007). Seguido a la estimulación de los IFNAR, los complejos heterodímeros de STAT1/STAT2 con la proteína p48 conocido como factor 9 de respuesta a IFN (IRF9), forman el factor 3 de genes estimulados por IFN (ISGF-3). ISGF-3 induce la transcripción como resultado del reconocimiento de elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) en regiones promotoras de genes sensibles a IFN (Biron, 2001).

IL-2 es una citocina esencial que es requerida para la proliferación y activación de células NK, su efecto es mediado a través del receptor de IL-2 vía la señalización JAK/STAT. Un deterioro en la vía de señalización inducida por IL-2/IL-2R suprime la proliferación celular y otras funciones inmunes.

Aunque muchas de las vías de señalización de citocinas y la respuesta que estas generan tienen que ser elucidadas completamente, es claro que las funciones de células NK dependen en gran medida de estas vías de señalización.

4.1. VANADIO Y EL SISTEMA INMUNE

En células del sistema inmune (como en todos los tipos celulares), los iones de vanadato son capaces de entrar al citoplasma a través de canales utilizados por iones de crómato y fosfato; las formas insolubles de vanadio entran a través de pinocitosis. Una vez dentro de las células (Fig.7), el vanadato es rápidamente atacado por reductores celulares (tales como NAD(P)H, glutatión, ascorbato y catecol) y transformado en especies tetravalentes de vanadil (Heide et al., 1983, Bruech et al., 1984).

A diferencia de otros oxianiones de metales tóxicos (como el crómato), el vanadil puede unirse a proteínas o puede oxidarse fácilmente y volver al ion vanadato. Puesto que se cree que sólo la forma pentavalente del vanadio puede salir de la célula, esto representaría una vía de detoxificación. Sin embargo, este ir y venir entre estados de oxidación también representa una vía para la re-toxificación.

No sólo son los bajos niveles de agentes reductores dentro de la célula durante estos eventos de óxido/reducción, sino que hay otras alteraciones que son inducidas en la función celular, estas incluyen: incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en el balance fosforilativo de numerosas proteínas secundarias debido a la inhibición de fosfatasas celulares, modificaciones en la actividad de las enzimas involucradas en procesos nucleares y citoplasmáticos, incluyendo los utilizados para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y glicolisis (Fortoul et al., 2011, Klarlund, 1985, Rehder, 2013b).

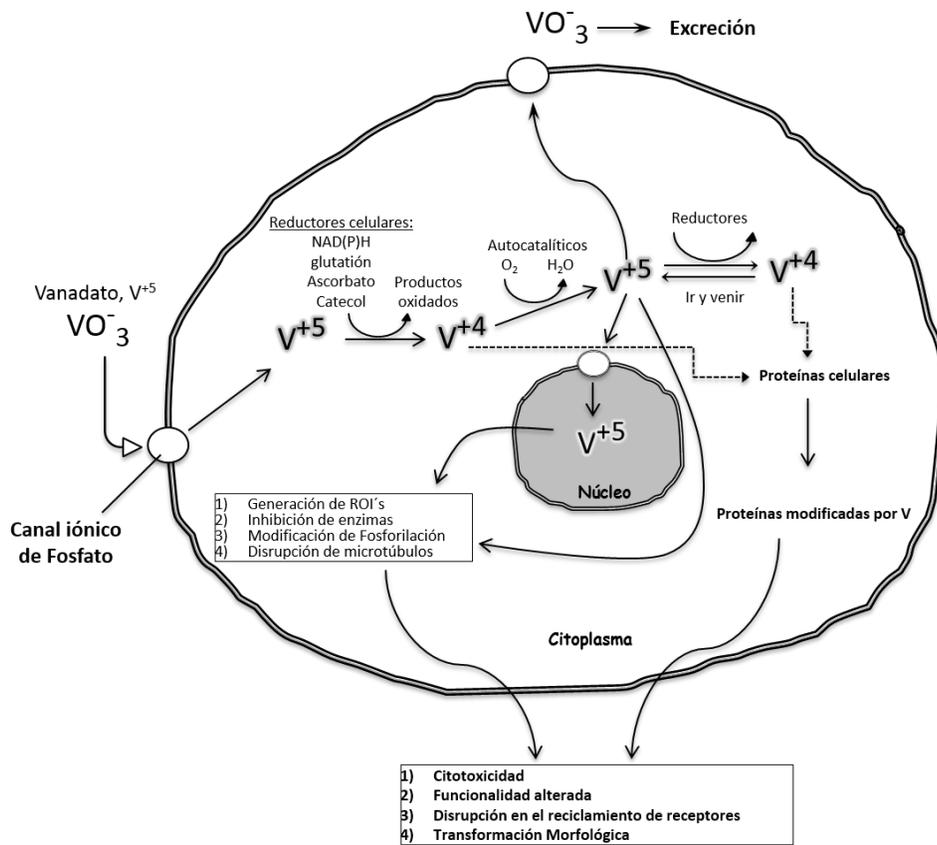


Figura 7. Metabolismo intracelular de vanadato y cambios toxicológicos selectivos. ROI's, Intermediarios reactivos del oxígeno.

Ya sea como pentóxido de vanadio o vanadato, el vanadio ha demostrado alterar la respuesta inmunológica en humanos y animales experimentales desde inicios de los años 90's (Crans et al., 2004). Sus efectos inmunosupresores se hicieron aparentes mucho después de su uso farmacológico inicial como un potenciador inmunológico. Muchos trabajadores expuestos a vanadio atmosférico han mostrado un incremento en los casos de ataques de tos, tuberculosis e irritación general del tracto respiratorio. Exámenes postmortem de estos trabajadores revelaron un extenso daño pulmonar, a menudo, la principal causa de la muerte fue una insuficiencia respiratoria, secundaria a la infección bacteriana.

Estudios epidemiológicos posteriores demostraron que la exposición aguda y/o exposición crónica a moderada de niveles de vanadio, producen una mayor incidencia de varias enfermedades pulmonares, como asma, rinitis, faringitis, neumonía y bronquitis (Levy et al., 1984). Estudios citológicos más detallados con células de trabajadores expuestos a este metal, demostraron alteraciones inducidas por el vanadio en células polimorfonucleares (neutrófilos) y en la producción de inmunoglobulinas de células plasmáticas, así como también, en la respuesta mitogénica de linfocitos (Marini et al., 1987).

4.2 Evidencia en animales

Los cambios inducidos por el vanadio en funciones inmunológicas son reproducibles en una variedad de modelos animales (Cohen et al., 1996a). La exposición aguda o subcrónica de roedores a compuestos pentavalentes de vanadio (vía diferentes rutas de exposición) han demostrado alterar: la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos, fagocitosis de macrófagos peritoneales/alveolares y la liberación/actividad de enzimas lisosomales, resistencia del hospedero a endotoxinas bacterianas (LPS) y microorganismos intactos. Además, de alteraciones en las poblaciones de células inmunes pulmonares, la inducción *in situ* de interferón (IFN-) e interleucina-6 (IL-6) por el ácido polinosínico:polycitidílico, la formación *ex vivo* del factor de necrosis tumoral (TNF) e intermediarios reactivos del oxígeno (anión superóxido y peróxido de hidrogeno) por macrófagos pulmonares, la liberación de histamina por mastocitos, inducción y/o expresión de moléculas presentadoras de antígeno de clase II por IFN- y el balance de iones de calcio en macrófagos alveolares (Cohen et al., 1996b, Cohen, 2004).

La exposición a vanadio también produce alteraciones patológicas en órganos linfoides secundarios y primarios (ejm. Placas de Peyer's, Bazo y Timo) (al-Bayati et al., 1992, Fortoul et al., 2011). Estudios con cultivos de líneas celulares de macrófagos o ratones expuestos a NH₄VO₃ han demostrado reducen los niveles de receptores Fc que se unen a diferentes subclases de inmunoglobulinas y aminoran la producción de TNF e IL-1 (Cohen et al., 1993), en este último estudio también se demostró que, en la ausencia de estímulo exógeno, los macrófagos expuestos a vanadio espontáneamente liberaban grandes cantidades de prostaglandina E2 inflamatoria que los controles no tratados.

Ensayos de resistencia a la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* después de la exposición aguda o subcrónica de vanadato al huésped, demostraron que la función de macrófagos peritoneales residentes, y consecuentemente la inmunidad mediada por células, fue negativamente afectada. En el sitio de la infección, el número de bacterias se incrementó rápidamente, pero no así el número de macrófagos o neutrófilos (Cohen et al., 1989). Macrófagos obtenidos de ratones tratados con vanadio revelaron una disminución en la capacidad de fagocitar *Listeria* opsonizada o eliminar los pocos microorganismos que fueron ingeridos. Estos defectos pudieran ser atribuidos a alteraciones ocasionadas por el vanadio en la formación de anión superóxido, la actividad del ciclo redox del glutatión y la derivación de activación del monofosfato de hexosa, eventos críticos para el mantenimiento energético en los procesos de fagocitosis y muerte intracelular (Cohen et al., 1986).

4.3 Evidencia a nivel Celular

Mientras que el mecanismo exacto de los efectos inmunomoduladores del vanadio aún no son claros, estudios *in vitro* e *in vivo* han comenzado a producir información que permiten sean

propuestos algunos mecanismos hipotéticos. En macrófagos, como en otros tipos celulares, los iones de vanadato han mostrado que: alteran la integridad estructural de microfilamentos y microtúbulos, inducen alteraciones en el pH local debido a la formación de polianiones de vanadato, modifican la actividad y liberación de enzima lisosomales, altera la fusión de vesículas secretoras a lisosomas e interrumpe el metabolismo de proteínas a nivel de síntesis y catabolismo. Además, modula la formación y liberación de intermediarios reactivos del oxígeno (Fig. 8) (Cohen et al., 1996a, Cohen et al., 2007).

Aparte de estas alteraciones estructurales y bioquímicas las cuales pueden trastornar la funcionalidad de los macrófagos y otros tipos celulares expuestos a vanadio, cambios en la capacidad de estas células para interactuar con, y responder a moléculas de señalización durante la respuesta inmune, también pueden explicar las inmunomodificaciones inducidas por el vanadio.

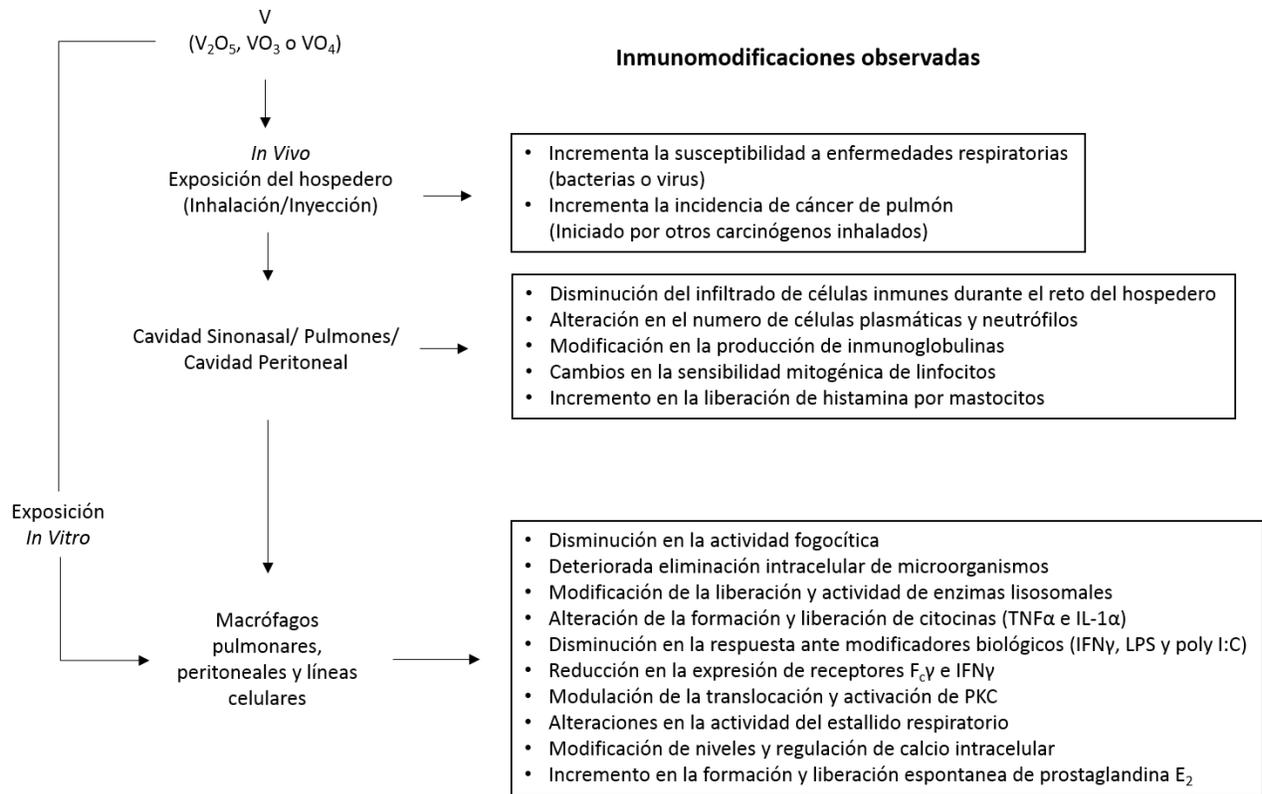


Figura 8. Immunomodificaciones observadas después de la exposición *in vivo* e *in vitro* a compuestos de vanadio.

Dos efectos contradictorios del vanadio sobre las funciones de células inmunes se han observado. El primero, involucra una reducción en la respuesta inmune celular, es decir, la inhibición de las funciones inducidas por citocinas, las cuales pueden revelar el mecanismo de inmunosupresión inducido por el vanadio. El segundo, involucra una estimulación de la actividad inmune, por ejemplo, un incremento en la producción de citocinas, las cuales pueden contribuir a procesos inflamatorios dependientes de vanadio (Zwolak, 2014).

Los efectos en los receptores de superficie son aparentemente una característica común de la toxicología del vanadio, en linfocitos (y otros tipos de células no inmunes) tratados *in vitro* con vanadato, han mostrado alteraciones de afinidad por hormonas (ejm. factor de crecimiento epidermal e insulina) o Citocinas (Evans et al., 1994)

En células HL-60, las respuestas modificadas de los receptores puede también estar relacionadas a cambios inducidos en la actividad de Proteínas cinasas y/o Fosfatasas (Trudel et al., 1991). Como fue en el caso de las células Jurkat (Células T leucémicas de origen humano), donde se observó una fosforilación prolongada (inducida por el vanadio) de proteínas acopladas a receptores y 2º mensajeros inducidos por citocinas, que pueden generar estados prolongados de activación celular modulando la expresión de los receptores a citocinas (Imbert et al., 1994).

Esta fosforilación prolongada de proteínas celulares también puede conducir a la derivación de las vías normales de transducción de señales y la subsecuente activación de elementos de respuesta a citocinas en el DNA de monocitos de sangre periférica (Igarashi et al., 1993) que en turno, permiten una baja regulación de la expresión de receptores a citocinas y su función. El efecto en la fosforilación también puede ser la base de algunos efectos observados con respecto a los estados de activación de los macrófagos así como la inducción de inflamación local después de la exposición a vanadio.

Los mecanismos de inactivación de fosfatasas de tirosina aún no son claros, al parecer estos procesos también pueden ser causados por radicales libres. Uno podía asumir que los compuestos de vanadio causan inhibición de PTP-1B vía ROS (Kaltschmidt et al., 2000).

Estudios con macrófagos alveolares (AM) y miofibroblastos de pulmón, mostraron una inhibición de fosfatasas de tirosina, la cual fue inducida por vanadio (en conjunción con el subse-

cuentemente incremento en la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno vía NADPH) (Grabowski et al., 1999), permitiendo la activación de tres miembros de la familia MAP cinasa (JNK, p38 y ERK (Torres and Forman, 2002).

Las implicaciones precisas de la activación prolongada de las cinasas JNK y p38 (mediadores de la señalización en respuesta a citocinas) o ERKs (transductores de cascadas de señalización celular en respuesta a factores de crecimiento y/o señales hormonales) en receptores de citocinas permanece incierto. Sin embargo, es claro que la activación de ERK está asociado con un incremento en la inducibilidad de óxido nítrico en macrófagos (que puede actuar como un supresor de la activación celular) y la formación de MIP-1 α y MIP-2 (Chan and Riches, 2001).

La activación de ERKs provee uno de los mejores mecanismos posibles para explicar los hallazgos encontrados in vivo e in vitro por Chong et al. (Chong et al., 2000), En donde evaluó el efecto del vanadio en la regulación de la expresión de la quimiocina MIP-2 y determino los mecanismos moleculares que controlan la expresión del gen MIP-2 en células RAW-264.7 tratadas con ortovanadato de sodio soluble (NaVO₃).

También se ha observado un incremento de la fosforilación de JAK2 y STAT3 en megacariocitos de ratones expuestos a pentóxido de vanadio (0.02 M) inhalado (Gonzalez-Villalva et al., 2014). Igualmente, se ha observado en fibroblastos un aumento en la fosforilación de STAT1 (inducida por V₂O₅), la cual es mediada por H₂O₂, causando un arresto en el crecimiento celular, apoptosis y un aumentó en los niveles de CXCL10, un factor antifibrótico potente (Antao-Menezes et al., 2008). Al parecer los efectos proapoptóticos o antiapoptóticos de los compuestos de vanadio dependen en gran medida del tipo celular.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desregulación de varias vías de transducción de señales está asociado con diversas patologías, por lo tanto una comprensión de cómo el V₂O₅ es capaz de inducir y/o modificar la respuesta inflamatoria (por ejemplo, la inducción de citocinas) en las células NK es un esfuerzo importante para ayudar a explicar los efectos de V₂O₅ en las células del sistema inmune innato.

Dado que el efecto de los compuestos de vanadio depende de muchos factores, principalmente del tipo de célula, del tipo de compuesto de vanadio y la dosis. Nos preguntamos si el pentóxido de vanadio modifica la función inmunoreguladora de las células NK^{bright} y si esta alteración pudiera estar asociada con la desregulación de la vía de señalización JAK/STAT inducida por IL-2?

IV. HIPÓTESIS

El pentóxido de vanadio modifica la función inmunoreguladora de las células NK^{bright} mediante una alteración en la vía de señalización de Jak/STAT.

V. OBJETIVO

Determinar si el vanadio modifica la vía de señalización JAK/STAT inducida por IL-2 en células NK-92mi.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar si el V₂O₅ induce proliferación o muerte celular de la línea NK-92mi a diferentes concentraciones.
- Cuantificar la secreción de citocinas Th1, Th2 y Th17 en respuesta a diferentes concentraciones de V₂O₅.
- Analizar los estados de fosforilación de Jak-3 y STAT-5 con diferentes concentraciones de V₂O₅.
- Evaluar la expresión del receptor a IL-2R α , IL-15R α , CD95, CD95L inducida con diferentes concentraciones de V₂O₅.
- Examinar los niveles de la fosfatasa CD45 y el inhibidor de la señalización de citocinas SOCS-1 a diferentes concentraciones de V₂O₅.

VI. METODOLOGIA

Cultivo y Línea Celular

La línea celular NK-92mi, es de origen linfoide y fue aislada de sangre periférica de un paciente con linfoma no-Hodgkin's, esta línea tumoral de células NK fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC[®] CRL-2408). Dicha línea es estable y fue transfectada con cDNA de IL-2 por lo cual es Independiente de Interleucina 2 (IL-2). El crecimiento de esta línea fue realizado en medio esencial mínimo (α -MEM) sin ribonucleosidos y desoxiribonucleosidos, suplementado con 12.5% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor a 50 °C por 30 minutos, 12.5% de suero de caballo, 100 UI/mL de penicilina y estreptomina, 2 mM L-glutamina, 0.2 mM de inositol, 20 mM de ácido fólico y 0.1 mM de 2-mercaptoetanol. El medio de cultivo y todos los reactivos fueron adquiridos de GIBCO (Life Technologies, Grand Island, NY) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La confluencia del crecimiento se mantuvo hasta un 90% en cajas de cultivo de 25 cm² (Corning Costar, Cambridge, MA) a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Las células fueron congeladas con 10% de dimetil sulfoxido y 90 % de SFB (v/v) y mantenidas en nitrógeno líquido hasta su uso. Células recién descongeladas fueron usadas para todos los experimentos.

Una solución stock 10 mM de pentóxido de vanadio (Sigma; 99.99%) fue preparada en 1 mL de Buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4). Esta solución stock fue usada para generar todas las concentraciones (μ M) del agente metálico usado en los experimentos.

Ensayos de Proliferación Celular

Los ensayos de proliferación fueron realizados utilizando un colorante vital que se une a membrana, CFSE (diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster). Las células fueron suspendidas en PBS + 5% FBS y teñidas con CFSE (Sigma 21888) a una concentración de 5 μ M durante 10 minutos a 4°C. La tinción se detuvo agregando 10 mL de PBS frío/5% FBS, posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS/5% FBS a 4°C. Las células marcadas fueron sembradas en placas de cultivo de seis pozos (Corning Costar) a una densidad de 5×10^5 células/ml y expuestas a diferentes concentraciones de V₂O₅ (25, 50, 100, 200, o 400 μ M). Después de 48 horas, las células fueron cosechadas y la intensidad de fluorescencia se cuantificó utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Cuantificación de apoptosis

La determinación de apoptosis se realizó por citometría de flujo usando Anexina V acoplada a APC (Allophycocyanin) y un colorante 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) (BD Pharmingen, San José, CA). La Anexina V se une a fosfatidilserina localizada en la cara externa de la membrana citoplasmática de células en procesos tempranos de apoptosis así como a células necróticas, mientras que el colorante 7-AAD se une al DNA de células apoptóticas tardías y células necróticas. Brevemente, las células NK-92mi (5×10^5 células/pozo) fueron expuestas a diferentes concentraciones de V₂O₅ (25, 50, 100, 200, o 400 μ M) durante 6, 12 y 24 horas. Las células tratadas fueron lavadas dos veces con PBS 1X frío y resuspendidas en Buffer de unión 1X [0.1M HEPES (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂ (BD Pharmingen)] a una densidad de 1×10^6 células/ml. 100 μ L de esta suspensión (1×10^5 células) fueron colocadas en tubos para citometría (

12x75mm Falcon) de 5ml a los cuales se les agrego 5µL de Anexina V-APC y 5µL de 7-AAD. Después de dar vórtex, las células fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posteriormente, se agregó 400µL de Buffer de unión 1X a cada tubo, finalmente las células fueron sometidas a análisis por citometría de flujo dentro de un lapso no mayor a una hora utilizando un citometro de enfoque acústico Attune™ Blue/Red (Life Technologies).

Determinación de citocinas.

Las células NK-92mi fueron sembradas en placas de cultivo de seis pozos a una densidad de 5×10^5 células/pozo. Después de la exposición a diferentes concentraciones de V₂O₅ por periodos de tiempo variables, las células fueron cosechadas y centrifugadas 1200 rpm. El sobrenadante se colectó y se congeló a -20°C hasta su análisis. La cuantificación del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IFN- γ e IL-2, -4, -6 y -17A, se realizó utilizando un kit de CBA (Cytometric Bead Array) Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience) para humano, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron analizadas usando el citometro FACS Calibur. El análisis de los datos se realizó utilizando el software FCAP Array 3.0.1 (Soft Flow, St. Louis Park, MN). Los límites de detección para cada citocina fueron: IL-2, 2.6 pg/ml; IL-4, 4.9 pg/ml; IL-6, 2.4 pg/ml; IL-10, 4.5 pg/ml; (TNF)- α , 3.8 pg/ml; IFN- γ , 3.7 pg/ml; e IL-17A, 18.9 pg/ml.

Citometría de flujo.

Al término del tratamiento con V₂O₅, las células se lavaron dos veces (5 minutos, 250 x g) con buffer FACS (PBS 1X con 0.09% de azida de sodio [p/v] suplementado con 1% FBS), después fijadas y permeabilizadas con Fix Buffer I y Perm Buffer III (BD Phosflow) respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron resuspendidas en buffer FACS e incubadas a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios en diluciones previamente determinadas por titulación. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces e incubadas una hora con el anticuerpo secundario (dilución 1:500). El análisis de las muestras se realizó utilizando el citómetro de flujo Attune™ Blue/Red. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: policlonal (Ab) anti-JAK3, monoclonal (mAb) anti-fosfo JAK3 (Tyr980/981) (D44E3), mAb anti-STAT5 (3H7), mAb anti-fosfo STAT5 (Tyr694) (C11C5) y Ab anti-SOCS1, todos los anteriores fueron hechos en conejo y adquiridos de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). El anti-conejo (IgG; H+L) de cabra conjugado con Cy5 fue adquirido por Life Technologies. Después de la adquisición en el citómetro, la estrategia de análisis se realizó sobre el “gating” de las células de acuerdo a las propiedades de dispersión frontal y lateral (FSC x SSC) seguido por un “gating” de células únicas o Single Cell (FSC-A x FSC-H).

Para la determinación de CD45 y SOCS1 una marca inicial con IgG1 de ratón anti- CD45 humano conjugado a Phicoritrina (PE) (en diluciones previamente determinadas por titulación) posteriormente, fueron fijadas y permeabilizadas usando una solución de fijación y permeabilización (BD Cyto-fix/Cytoperm™), seguido de un proceso de lavados con el Buffer de lavado y permeabilizado (BD Perm/Wash™) y finalmente marcadas con el anticuerpo IgG de conejo anti-SOCS1 humano no conjugado y detectado con el anticuerpo secundario arriba mencionado.

Para la determinación de CD25, CD95, CD95L e IL-15Ra, las células se combinaron primero con la dosis recomendada por el fabricante de los anticuerpos primarios; IgG de ratón anti-CD25 humano conjugado con FITC; (Biolegend Inc., San Diego, CA) e IgG de ratón anti-CD95 humano conjugado con APC (BD PharmingenTM, San Jose, CA), incubados durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron dos veces en buffer FACS y fueron analizados. La determinación de CD95L e IL-15Ra se realizó utilizando una IgG de ratón anti-CD95L humano no conjugado (Chemikion Biotek, Millipore Corp., Billerica, MA) e IgG de cabra anti-IL-15Ra humano no conjugado (Sistema R&D, Minneapolis, MN); los anticuerpos secundarios usados para la detección final fueron anti-ratón IgG1 de rata conjugado con APC (Biolegend) y anti-cabra IgG (H+L) de burro marcado con Alexa 488 (Abcam, Cambridge, MA).

Las células marcadas se colectaron en el citómetro AttuneTM Blue/Red o FACSCalibur usando el software Attune v2.1 y CellQuest Pro Versión 6.0 (BD Bioscience), respectivamente. Todos los análisis de citometría de flujo incluyen el apropiado control de isotipo del anticuerpo. Para cada muestra se colectaron 20,000 eventos de la región 1 (R1). Los datos fueron analizados en términos de intensidad de fluorescencia media (MFI) o en términos de porcentaje de células positivas

Microscopía confocal.

Después de la adquisición de las muestras en el centímetro de flujo, el resto de las células se centrifugaron 1200 rpm durante 5 min y el pellet fue resuspendido en un volumen de 100 µL de PBS a una concentración de 100nM del colorante verde SYTOX® (Life Technologies), se-

guido de una co-incubación por 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se centrifugaron 5 minutos a 700 rpm sobre un portaobjetos (Cytospin) usando un CitoSistema-Hettich (Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germany). A este césped de células se agregaron 10 μ L del medio de montaje para fluorescencia (DAKO #S3023) y fueron visualizadas bajo un objetivo 100X apocromático plano con aceite de inmersión (N. A. 1.4) en un sistema confocal Zeiss LSM 5 Pascal (Zeiss, Oberkochen, Germany) usando una longitud de onda de 488 y 633 nm con un pequeño orificio de abertura (Pinhold) < 1 Au (Air Unit).

Análisis estadístico.

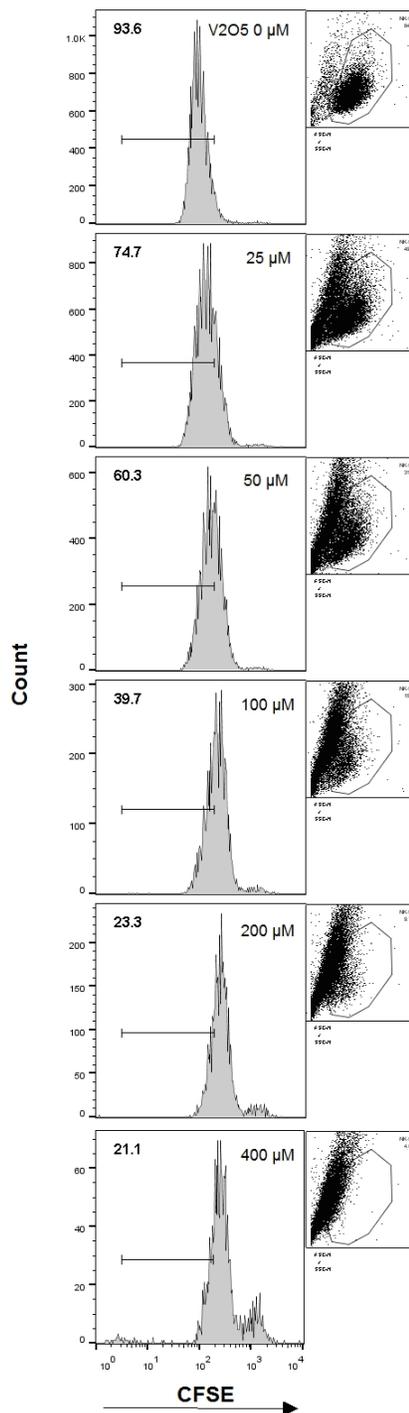
Los valores reportados son expresados como media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados usando un análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Para todos los procesos estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism v 6.1 para Windows (La Jolla, CA). Todos los datos obtenidos por citometría de flujo fueron analizados usando el software FlowJo v X.0.7 (Tree Star, Inc. Ashland, OR). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

VII. RESULTADOS

El pentóxido de Vanadio (V₂O₅) influye en la proliferación celular de la línea NK-92mi.

Las concentraciones crecientes de V₂O₅ inhiben la proliferación celular de la línea NK-92mi de manera dosis dependiente. Comparado con las células control (sin exposición a V₂O₅), la tasa de proliferación de células NK-92mi disminuye conforme al nivel de V₂O₅ aumenta. El efecto inhibitorio de V₂O₅ alcanzó un 78% a una concentración de 400 μ M (Fig. 9). Esta inhibición fue acompañada por una disminución en tamaño y un incremento en granularidad de las células, cambios característicos de procesos apoptóticos.

Figura 9. Efecto de V₂O₅ en la proliferación de células NK-92mi. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes (25-400 μ M) de V₂O₅ durante 48h. Las células fueron teñidas con CFSE y la proliferación celular fue determinada por citometría de flujo. Los datos son expresados en porcentajes y cada concentración de V₂O₅ está representada con un histograma, junto con su respectiva gráfica de puntos de tamaño y granularidad. Los resultados mostrados es un experimento representativo de tres realizados con cada una de las concentraciones de V₂O₅.



Influencia del V₂O₅ en la expresión de Anexina V y 7-AAD.

La presencia de V₂O₅ desencadenó la apoptosis en las células NK-92mi de manera relacionada a la dosis y tiempo dependiente (Fig. 10). El porcentaje de células que sufrieron apoptosis aumenta dramáticamente después de 12 horas de exposición (51.2 y 64.7% a las 12 y 24 horas, respectivamente).

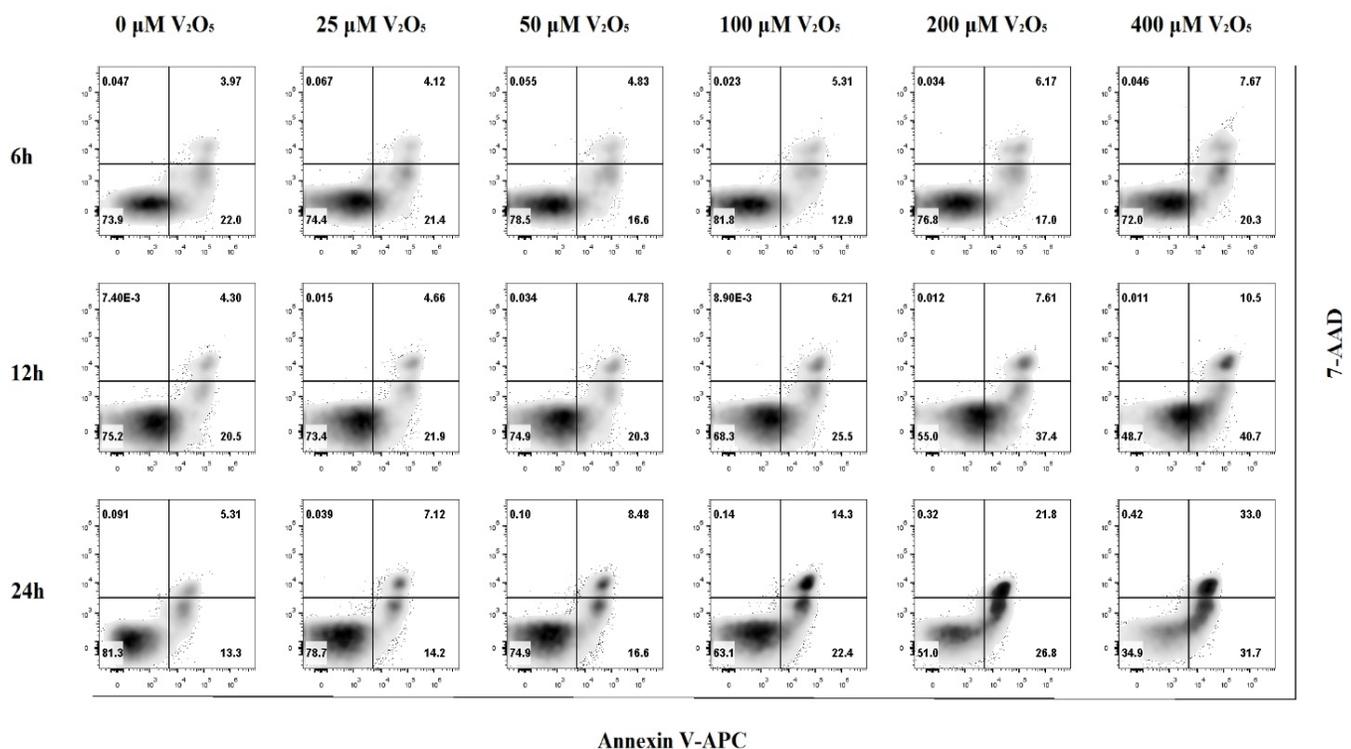


Figura 10. Externalización de fosfatidilserina inducida por V₂O₅ a diferentes tiempos 6, 12 y 24 h. El cuadrante inferior derecho (Anexina V⁺ / 7-AAD⁻) representan células apoptóticas tempranas; el cuadrante superior derecho (Anexina V⁺ / 7-AAD⁺) representan células apoptóticas tardías. El cuadrante inferior izquierdo (Anexina V⁻ / 7-AAD⁻) representan células vivas y el cuadrante superior izquierdo (Anexina V⁻ / 7-AAD⁺). Los resultados mostrados es un experimento representativo de tres realizados con cada una de las concentraciones de V₂O₅.

Las células apoptóticas fueron claramente distinguidas de las células control debido a su tamaño reducido (parámetro FSC bajo) y el aumento de la granularidad (parámetro SSC alto). Interesantemente, el porcentaje basal de células 7-AAD⁺ fue insignificante y se mantuvo después de que las células fueron expuestas a V₂O₅ por 6, 12 o 24 horas. El cuadrante inferior izquierdo de todas las gráficas de densidad que se muestran en la Figura 2 demuestra que la viabilidad de la célula disminuye conforme el nivel de V₂O₅ aumenta.

Efecto del V₂O₅ en la producción de citocinas.

Mientras las células NK-92mi secretan altas concentraciones de IL-2 (Tam et al., 1999), los niveles basales de IL-2 en cultivos de células sin tratamiento alcanzaron en última instancia (ultimately reached?) 2800pg/ml después de 24 horas (Fig. 11). Los cultivos tratados con concentraciones crecientes (25-400 μM) de V₂O₅ por 24 horas mostraron una disminución continua significativa (p<0.01) en la producción de IL-2, hasta casi 500 pg/ml para la dosis más alta utilizada. Se observó la misma disminución después de 12 horas, a pesar de que los niveles basales de IL-2 fueron inferiores a las de 24 horas; curiosamente, la producción de IL-2 nuevamente se acercó a los 500 pg/ml con la dosis más alta probada. No se observaron efectos parecidos con Vanadio después de 6 horas de incubación.

Con respecto a IL-10, aunque las concentraciones basales no fueron tan altas como las de IL-2, los efectos de V₂O₅ fueron inmediatamente evidentes aún en bajas dosis es decir, 25 μM durante 24 horas. La producción fue por otra parte casi totalmente abatida en concentraciones de

V₂O₅ >50 μ M. Los efectos en los períodos de incubación más cortos (6 y 12 horas) no eran evidentes ya que la producción basal ya era bastante baja. Los efectos sobre la liberación de IFN- γ fueron similares a los de la IL-10. Niveles basales de IL-4, IL-6, IL-17a y TNF- α estaban por debajo de los límites de detección para el kit de CBA en todas las muestras.

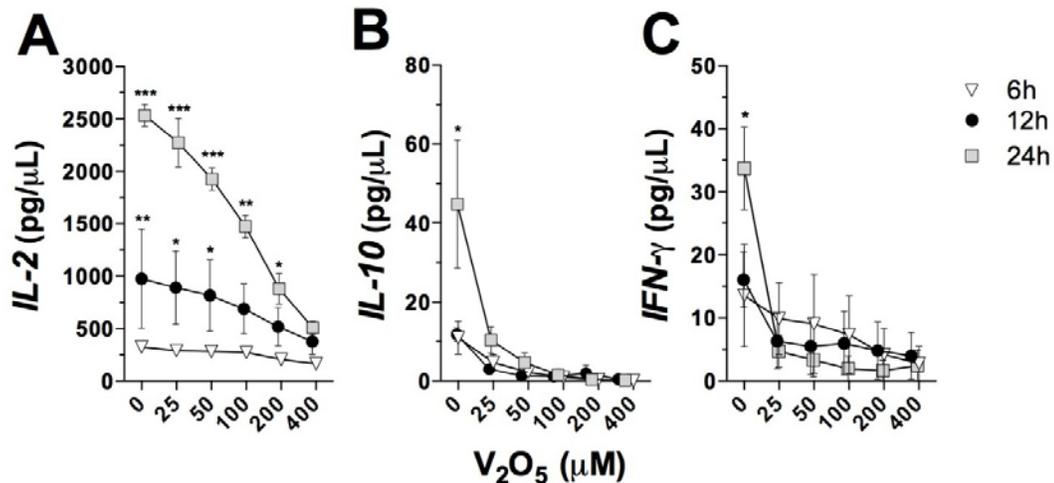


Figura 11. Producción de citocinas en células NK-92mi expuestas a V₂O₅. A) IL-2, B) IL-10 y C) IFN- γ . Estas fueron medidas en sobrenadantes de células tratadas con V₂O₅ a 6, 12 y 24 h usando un arreglo de perlas por citometría. Los resultados para IL-4, IL-6, IL-17A y TNF- α no se muestran, ya que los niveles de estas, fueron menores a los detectados por el kit.

V₂O₅ afecta la expresión de moléculas de superficie celular.

La expresión de CD25 (sub-unidad α del receptor a IL-2) comenzó a incrementar significativamente por encima de la concentración de 50 μ M de V₂O₅ y alcanzó un valor máximo de MFI a la mayor concentración probada de V₂O₅ (400 μ M) (Fig. 12a). Se observó un patrón similar para los cambios inducidos en la expresión de IL-15R α (sub-unidad α del receptor a IL-15) (Fig. 12b). La expresión de Fas y FasL se comporta de manera similar, pero la concentración de V₂O₅

donde se observó un aumento en la expresión de estas moléculas se observó a partir de 100 μ M para CD95 (Fas) y 50 μ M para CD95L (FasL) (Fig. 12c y d).

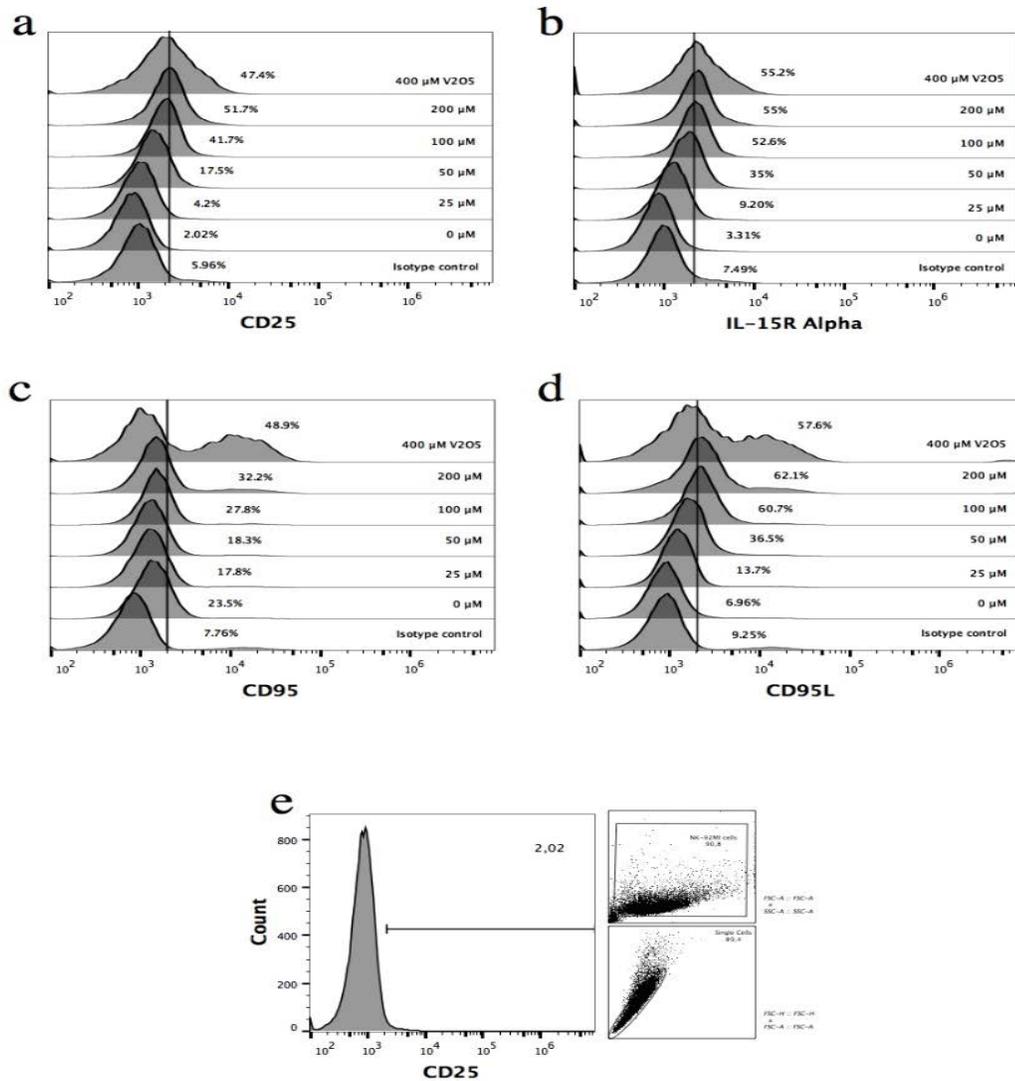


Figura 12. Modificaciones en la expresión de ligandos de membrana en células NK-92mi tratadas con V₂O₅. Niveles de expresión de (a) CD25; (b) IL-15R cadena α ; (c) Fas y (d) FasL. Los resultados muestran el porcentaje de células positivas en relación a los niveles de expresión en células que recibieron control de isotipo respectivo. (e) La estrategia de análisis de los datos de citometría; la imagen representa los datos (%) obtenidos cuando la expresión de CD25 fue evaluada en células NK-92mi no tratadas con V₂O₅. Todos los datos fueron analizados usando esta misma estrategia.

Curiosamente, el efecto sobre la expresión de FasL llega al máximo entre 100 y 200 μ M de V₂O₅, mientras que la de CD95 tiende a incrementarse conforme la dosis de V₂O₅ se duplica. Además, los patrones de expresión observados para Fas y FasL a 400 μ M V₂O₅ mostraron un inesperado pico de expresión alto en términos de tamaño y granularidad.

El efecto de V₂O₅ en la vía JAK3/STAT5.

Las células NK-92mi tratadas con concentraciones crecientes de V₂O₅ (25-400 μ M) por diferentes periodos de tiempo mostraron un incremento significativo en la fosforilación de JAK3 con las dosis de 200 y 400 μ M dependientes del tiempo de exposición ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente, comparado con el valor control) (Fig. 13).

La fosforilación de JAK3 en el cultivo de 6 horas fue nominal. La incubación de células con V₂O₅ resultó en una tendencia a la baja de la fosforilación de STAT5, pero los efectos observados no fueron estadísticamente significativos. El estado de JAK3 y STAT5 no se afectó en ninguno de los tratamientos con V₂O₅. En la Figura 14 (una imagen representativa de la tinción intracelular de células NK-92mi para JAK3 y pJAK3), vale la pena notar que hay una fuerte presencia de la fosforilación de JAK3 en la cara interna de la membrana de células tratadas con cantidades crecientes de V₂O₅.

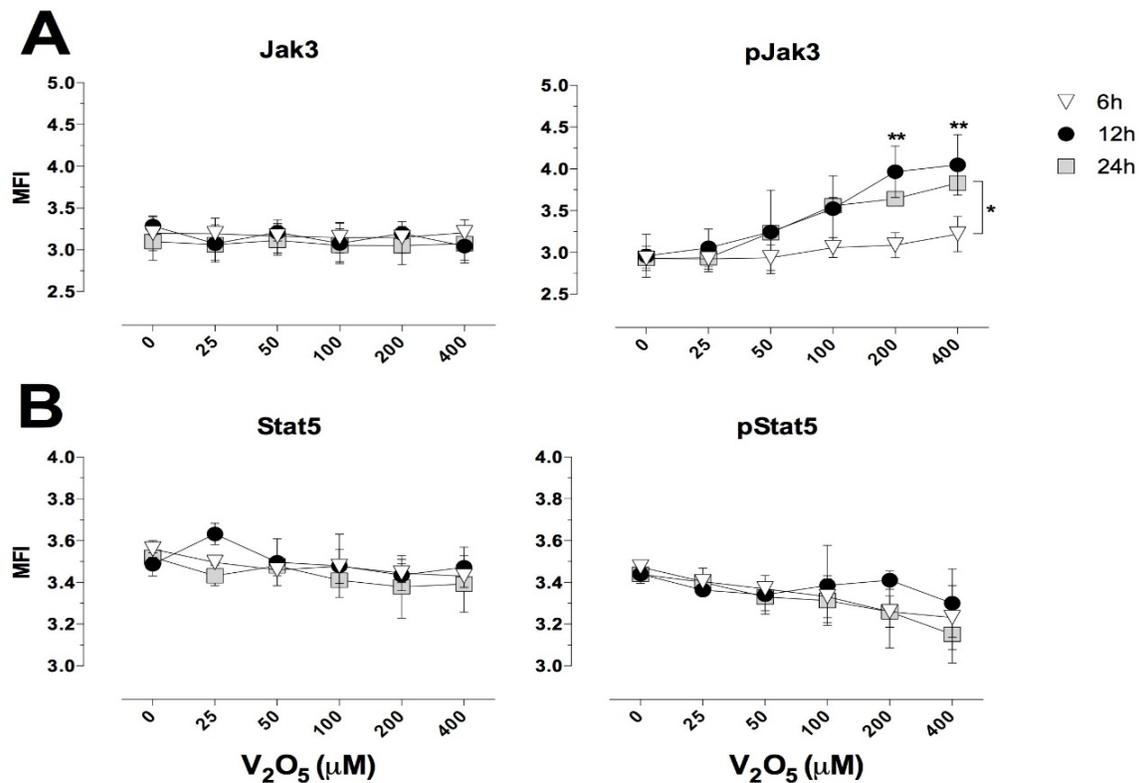


Figura 13. Efecto de V₂O₅ en la activación de JAK3/STAT5. Las células NK-92mi fueron tratadas con medio solo o 25, 50, 100, 200 y 400 μM de V₂O₅ a 37°C y luego teñidas intracelularmente para su análisis por citometría de flujo. Los niveles de proteína de JAK3, pJAK3, STAT5 y pSTAT5 fueron determinadas después de 6, 12 y 24 h de exposición. MFI= Intensidad Media de Fluorescencia. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes realizados con cada una de las concentraciones de V₂O₅. *p<0.01, **p<0.001 contra la misma dosis de V₂O₅ en los diferentes tiempos de exposición.

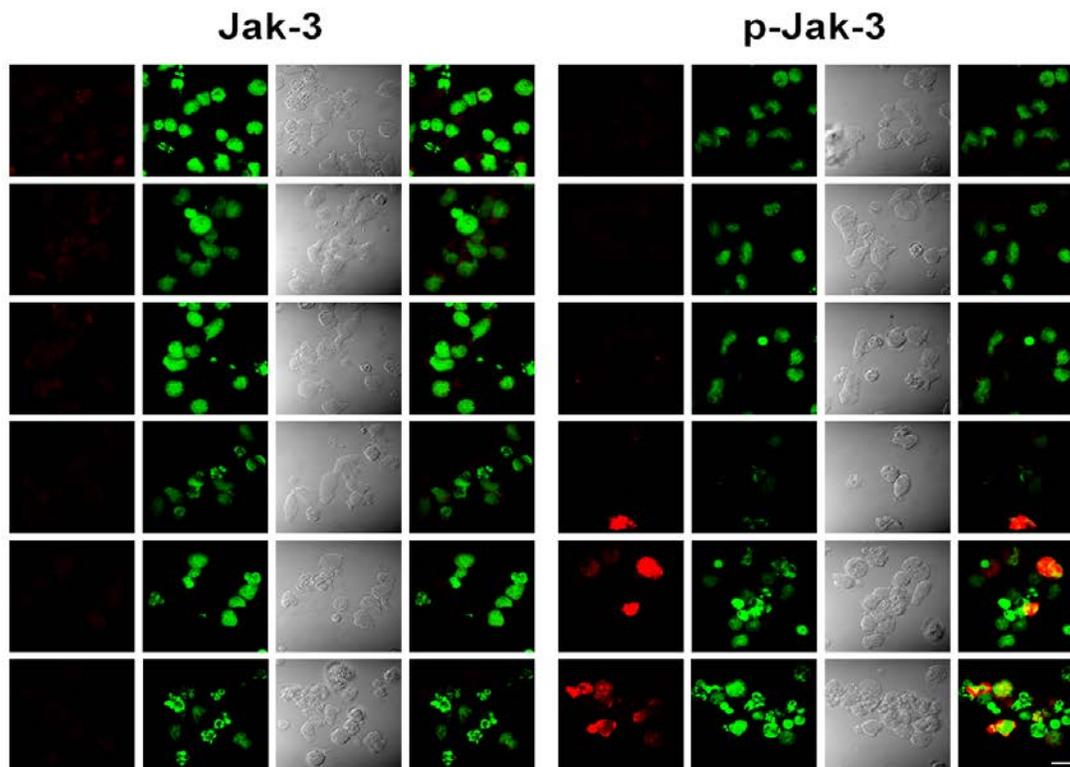


Figura 14. Imágenes de la fosforilación de JAK3 en células tratadas V₂O₅ durante 24 h. La figura muestra imágenes de microscopia confocal de células analizadas por citometría. Las imágenes del lado izquierdo de la figura muestran JAK3, mientras las imágenes del lado derecho muestran pJAK3. JAK3 y pJAK3 se muestran en rojo; la tinción de los ácidos nucleicos fue marcada con verde (SYTOX[®]). La primera y quinta columna muestran a JAK3 y pJAK3, respectivamente. La segunda y sexta columna muestran la contra tinción del núcleo celular. La tercera y séptima columna muestran imágenes de microscopía de luz. La cuarta y octava columna muestran la combinación de los canales rojo y verde. La barra blanca en la parte inferior de la sección derecha de la imagen representa una distancia de 20 μ m.

Efecto de V₂O₅ en la expresión de SOCS1 y CD45.

La expresión de CD45 en células NK-92mi expuestas a diferentes concentraciones de V₂O₅ durante 24 horas se mantiene sin cambios (Fig. 15). En contraste, la expresión de SOCS1 mostró un incremento gradual dependiente de la dosis de V₂O₅; el incremento con 200 y 400 μ M de V₂O₅ fue significativa con respecto a la expresión en los controles o con las dosis más bajas de V₂O₅.

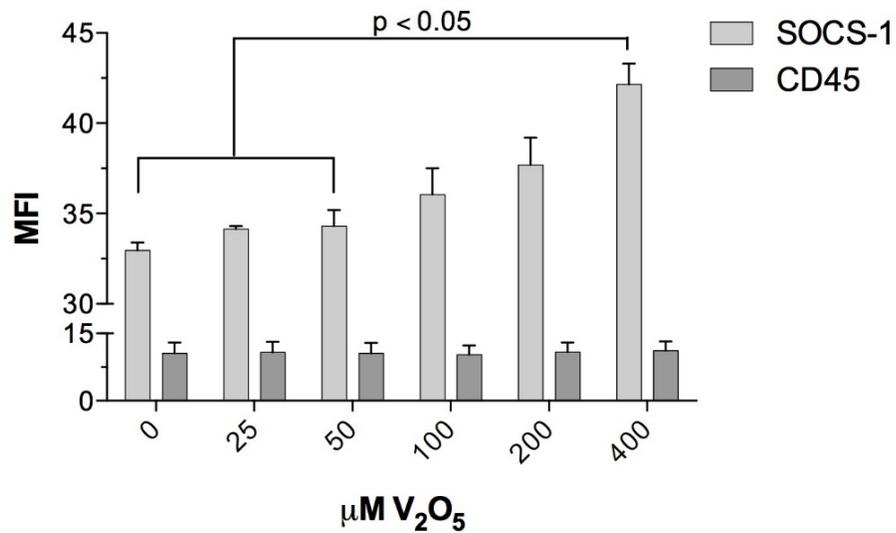


Figura 15. Expresión de CD45 y SOCS1 en células NK-92mi expuestas a V₂O₅. La grafica muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD45 y SOCS1 obtenida de los parámetros FSC-SSC correspondientes a la población de células NK-92mi.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el pentóxido de vanadio (V₂O₅) inhibe la proliferación de células NK-92mi vía inducción de apoptosis. El uso específico de esta línea celular se determinó por el hecho de que es una línea celular humana que conserva su fenotipo CD56^{bright} después del proceso de transfección con cDNA de IL-2, lo que la hace un prototipo válido de una célula natural killer activada (Maki et al., 2001, Sharma and Das, 2014). Las células NK son consideradas un importante efector de la respuesta inmune innata y juegan un papel importante en la resolución de inflamación pulmonar inducida por V₂O₅ (Turpin et al., 2010).

Las concentraciones de V₂O₅ usadas en los experimentos se encuentran dentro del rango reportado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en el aire (0.01-60mg/m³) y en suelos cercanos de plantas petroquímicas en México (Hernandez and Rodriguez, 2012) WHO, 2000). A diferencia de la inhalación de compuestos hidrosolubles de vanadio (V) que entran en las células pulmonares usando sistemas de transporte que utilizan otros aniones (como fosfatos o iones sulfato), las partículas insolubles como el V₂O₅ son ingeridos por macrófagos alveolares residentes. Una vez en los fagosomas de los macrófagos, las partículas de V₂O₅ experimentan una disolución lenta que genera iones libres que potencialmente pueden salir de las células, y luego entrar o cruzar a través de las células epiteliales y entrar en los eritrocitos cuando ellos están en los alvéolos y de esta forma llegar a ser parte de la circulación sanguínea (Cohen et al., 2010). Esta última forma solubilizada de Vanadio es a la que las células NK están más expuestas (Roberts et al., 2004).

Otros compuestos de V son conocidos por inducir apoptosis y han sido evaluados para el tratamiento contra el cáncer (Leon et al., 2014). El hecho de que la captación celular de 7-AAD

no se modificó por la exposición implícita a V₂O₅, refleja una intrascendente necrosis ya que este compuesto sólo puede penetrar en aquellas células con membranas comprometidas ((Darzynkiewicz et al., 1992, Schmid et al., 1992). Por lo tanto, los resultados en el presente estudio con la captación de 7-AAD confirman que las células NK no fueron dañadas pero, en cambio, las células NK fueron inducidas a entrar en procesos apoptóticos. La alta afinidad de anexina V por la fosfatidilserina la hace una prueba sensible para el análisis de células en apoptosis; sin embargo, el solo uso de anexina V no puede distinguir entre células apoptóticas tempranas, tardías o necróticas. Por lo tanto, los resultados sugieren que el principal efecto tóxico de la exposición al V₂O₅ en las células NK es la inducción de apoptosis. Esto corrobora observaciones anteriores de los efectos apoptóticos del V₂O₅ en células endoteliales (Montiel-Davalos et al., 2012).

La producción de IL-2 es resultado de la activación de un gran número de genes, incluyendo aquellos asociados con la proliferación celular. Recientemente, la gama de acciones reconocidas para IL-2 se ha expandido, con funciones que llegan a definir la promoción de la diferenciación de células T-cooperadoras (Th) 1 y Th2 (Dilworth-Anderson and Cohen, 2010); también la IL-2 causa la inhibición del desarrollo de células T cooperadoras foliculares (T_{fh}) y Th17, pero promueven de la expansión de células Th17 una vez que las células se desarrollan (Liao et al., 2013). Con esto como base, el presente estudio evaluó el perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17 de las células NK-92mi y cómo su liberación se ve afectada por la exposición a V₂O₅.

Varias citocinas importantes regulan la sobrevivencia, desarrollo y función de las células NK, incluyendo IL-2, -4, -7, -10, -12, -15, -18 y -21, factor de crecimiento transformante (TGF)- β e interferones de tipo I (Marcais et al., 2013, Nandagopal et al., 2014). Mientras las células NK secretan las citocinas antes mencionadas, también producen IFN- γ . El presente estudio mostró que el V₂O₅ causa la reducción de la secreción de IL-2, IL-10 e IFN- γ en la célula tratada debido a la

disminución en la viabilidad celular dependiente de procesos apoptóticos que fueron inducidos por V₂O₅. Sin embargo, la disminución de los niveles de IL-2 eran lo suficientemente altos para compensar y asegurar una proliferación celular.

Los mecanismos compensatorios han sido reportados en el sistema inmunológico (Di Caro et al., 2011). Es muy probable que dicho mecanismo esté presente en nuestros resultados, dado que la viabilidad celular fue disminuyendo, la expresión de IL-2R y IL-15R [probablemente de afinidad intermedia (Pillet et al., 2009)] fue en aumento, posiblemente como parte de algún mecanismo para mantener captación de IL-2 con el fin de mantener la viabilidad y/o activación celular. Sin embargo, estaba claro que las células experimentaban algún compromiso extremo para sobrevivir, tal como lo demuestran los patrones de expresión observados para Fas y FasL en la concentración más alta de V₂O₅ probada, lo cual llevo a un inesperado pico de expresión de estas moléculas, con cambios de tamaño y granularidad. Este patrón puede reflejar la activación de la vía apoptótica extracelular inducida por V₂O₅.

La subunidad β del receptor a IL-2 tiene un largo tallo citoplasmático que dimeriza con la cadena γ común del receptor de dicha citocina y activa la vía JAK/STAT. En contraste, en células NK la cadena α del receptor a IL-15R en la superficie de las células dendríticas presenta IL-15 (transpresentación) a células NK que expresan la cadena β y γ del receptor IL-2/IL-15R, permitiendo la señalización a través de estos complejos (Liao et al., 2013, Waldmann, 2006). JAK1, JAK3, y STAT5 son elementos de transducción de señales vinculadas al IL-2R y su vía JAK-STAT (Frank et al., 1995, Russell et al., 1994, Ross et al., 2010), pero la línea celular NK-92mi es conocida por una subexpresión de CD25 en comparación con la línea celular NK-92 (Maki et

al., 2001, Tam et al., 1999). Por lo tanto, una explicación más probable para los resultados presentados fue que el V₂O₅ altera la vía de señalización mediada por la sub-unidad β del receptor a IL-2/IL-15 que responde a IL-2 (Long et al., 2013).

La vía de señalización mediada por IL-2/IL-15 requiere la autofosforilación y activación de Janus cinasas (especialmente JAK1 y JAK3), que es esencial para la producción de IFN-γ e induce tres cascadas de señalización paralelas (por ejemplo Ras-Raf-MEK, PI3-AKT-mTOR y STAT5) (Kovanen and Leonard, 2004, Ma et al., 2006). El vanadato interfiere con la cascada de señalización PI3K/Akt/mTOR (Goncalves et al., 2011) y algunos resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el V₂O₅ también interfiere con la expresión de Akt y pAkt (datos no presentados). Debido a la inhibición de la vía de PI3-AKT-mTOR la producción de IFN-γ se reduce severamente (Nandagopal et al., 2014). La disminución de la producción observada de IFN-γ que se detectó en el presente estudio podría ser secundaria a un efecto inhibitor de V₂O₅ en la vía de señalización mediada por IL-2/IL-15.

El supresor de señalización de citocinas (SOCS) puede también regular la vía JAK/STAT pero por diferentes mecanismos (Haque and Sharma, 2006). Normalmente SOCS se une a los residuos de fosfotirosina en los receptores y bloquea la unión de STAT a los receptores; también se une directamente a JAKs específicas, inhibiendo de esta manera la actividad cinasa correspondiente a JAK (Furqan et al., 2013).

Los resultados indican que el V₂O₅ induce un incremento en la fosforilación de JAK3 y una tendencia no significativa en la disminución de la fosforilación de STAT5 en conjunto con el aumento de la expresión de SOCS1. Esto nos sugirió que V₂O₅, de una manera similar al vanadato (Rehder, 2013a), inhibe las proteínas tirosina fosfatasa, previniendo así la desfosforilación de

JAK y, por tanto, mantiene el estado de fosforilación de JAK3. El incremento observado en SOCS sería un intento de las células para apagar la vía JAK/STAT; la consecuencia de esto sería la inhibición de la fosforilación de STAT y la supresión de la señalización de citocinas. Del mismo modo es bien sabido que el exceso de actividad de receptores tirosina cinasa (RTK) bajo ciertas condiciones pueden conducir a la inducción de apoptosis (Kazi et al., 2014). El incremento de la expresión de IL-2R/IL-15R y Fas/FasL observado en las células tratadas puede interpretarse como un intento de las células para anular/compensar la retroalimentación negativa de la señalización a partir de los aumentos en SOCS y la disminución en la producción de IL-2. La fosforilación sostenida de la cinasa se ha observado con otros tipos de agentes de vanadio, incluyendo vanadatos (Huyer et al., 1997) y el oxovanadio (Vardatsikos et al., 2009).

IX. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el V₂O₅ puede inhibir, a través del incremento de SOCS la proliferación de células NK-92mi así como, la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y la pro-inflamatoria IFN- γ . Es posible que la exposición de células NK humanas a V₂O₅ pueda resultar en la inhibición de la secreción de esta y otras citocinas inmunorreguladoras a través de un mecanismo similar (Fig. 16). Estas evidencias podrían ayudar a explicar los efectos de V₂O₅ en las células del sistema inmune innato y la incidencia elevada de infecciones, alergias y otros padecimientos en trabajadores expuestos al V₂O₅/V y a residentes que viven en áreas altamente contaminadas conocidas por tener altos niveles de V en el aire y/o agua.

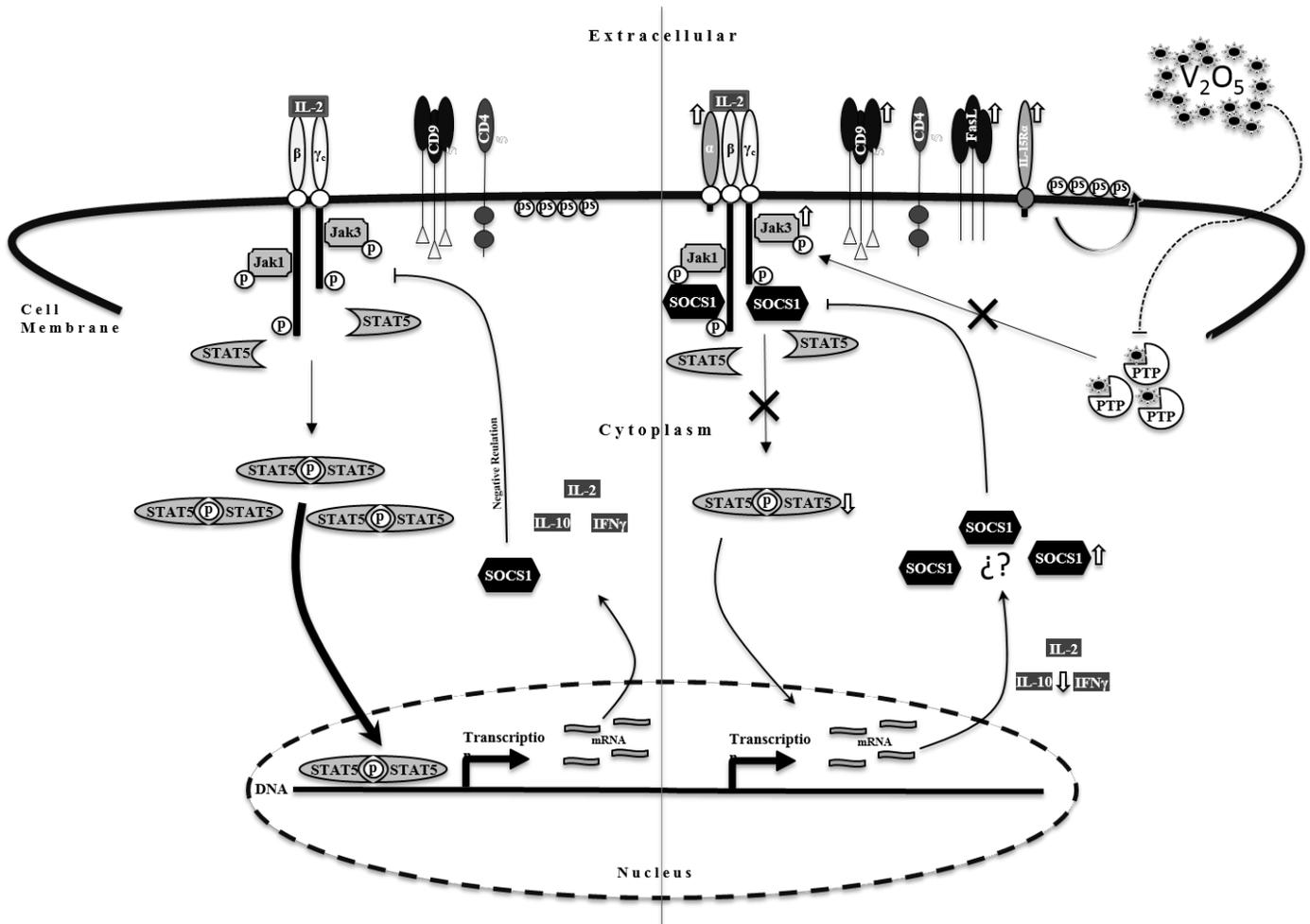


Figura 16. Representación esquemática del mecanismo de toxicidad inducido por V₂O₅. Del lado izquierdo de la figura se muestra la vía de señalización activada por IL-2 en células NK-92mi (en relación a los parámetros evaluados en este trabajo). En el lado derecho, la representación gráfica de los efectos de V₂O₅ en la vía de señalización inducida por IL-2. Los resultados demostraron que V₂O₅ incrementa la fosforilación de JAK3 vía una posible inhibición de proteínas tirosina fosfatasas (PTP), que resultó en un decremento en la fosforilación de STAT5. Este decremento fue también secundario a un incremento en la síntesis de SOCS1 (este último mecanismo necesita ser determinado). La disminución en la fosforilación de STAT5 implicó una reducción en la síntesis de citocinas inflamatorias. El incremento de receptores en la membrana celular tales como CD95, FasL y las dos subunidades α de los receptores IL-2R e IL-15R, pudiera ser un mecanismo compensatorio secundario para disminuir la actividad de señalización de la proliferación. La regulación negativa de la fosforilación de JAK3 mediada por CD45 permaneció inalterada. La translocación de la fosfatidilserina fue evidente.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ADORINI, L. & PENNA, G. 2008. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4, 404-12.
- AL-BAYATI, M. A., CULBERTSON, M. R., SCHREIDER, J. P., ROSENBLATT, L. S. & RAABE, O. G. 1992. The lymphotoxic action of vanadate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 11, 19-27.
- ANDREWS, D. M., SCALZO, A. A., YOKOYAMA, W. M., SMYTH, M. J. & DEGLIESPOSTI, M. A. 2003. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol*, 4, 175-81.
- ANTAO-MENEZES, A., TURPIN, E. A., BOST, P. C., RYMAN-RASMUSSEN, J. P. & BONNER, J. C. 2008. STAT-1 signaling in human lung fibroblasts is induced by vanadium pentoxide through an IFN-beta autocrine loop. *J Immunol*, 180, 4200-7.
- ARAGON, A. M. & ALTAMIRANO-LOZANO, M. 2001. Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 15, 145-51.
- ATSDR 1999. *Toxicological profile for arsenic*, Atlanta, G.A.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BIRON, C. A. 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity*, 14, 661-4.
- BRUECH, M., QUINTANILLA, M. E., LEGRUM, W., KOCH, J., NETTER, K. J. & FUHRMANN, G. F. 1984. Effects of vanadate on intracellular reduction equivalents in

- mouse liver and the fate of vanadium in plasma, erythrocytes and liver. *Toxicology*, 31, 283-95.
- BRYCESON, Y. T., MARCH, M. E., LJUNGGREN, H. G. & LONG, E. O. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107, 159-66.
- CAO, X., SHORES, E. W., HU-LI, J., ANVER, M. R., KELSALL, B. L., RUSSELL, S. M., DRAGO, J., NOGUCHI, M., GRINBERG, A., BLOOM, E. T. & ET AL. 1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 2, 223-38.
- COHEN, M. D. 2004. Pulmonary immunotoxicology of select metals: aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, manganese, nickel, vanadium, and zinc. *J Immunotoxicol*, 1, 39-69.
- COHEN, M. D., BECKER, S., DEVLIN, R., SCHLESINGER, R. B. & ZELIKOFF, J. T. 1997. Effects of vanadium upon polyl:C-induced responses in rat lung and alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health*, 51, 591-608.
- COHEN, M. D., CHEN, C. M. & WEI, C. I. 1989. Decreased resistance to *Listeria monocytogenes* in mice following vanadate exposure: effects upon the function of macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 11, 285-92.
- COHEN, M. D., MCMANUS, T. P., YANG, Z., QU, Q., SCHLESINGER, R. B. & ZELIKOFF, J. T. 1996a. Vanadium affects macrophage interferon-gamma-binding and -inducible responses. *Toxicol Appl Pharmacol*, 138, 110-20.
- COHEN, M. D., PARSONS, E., SCHLESINGER, R. B. & ZELIKOFF, J. T. 1993. Immunotoxicity of in vitro vanadium exposures: effects on interleukin-1, tumor necrosis

- factor-alpha, and prostaglandin E2 production by WEHI-3 macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 15, 437-46.
- COHEN, M. D., SISCO, M., PROPHETE, C., CHEN, L. C., ZELIKOFF, J. T., GHIO, A. J., STONEHUERNER, J. D., SMEE, J. J., HOLDER, A. A. & CRANS, D. C. 2007. Pulmonary immunotoxic potentials of metals are governed by select physicochemical properties: vanadium agents. *J Immunotoxicol*, 4, 49-60.
- COHEN, M. D., SISCO, M., PROPHETE, C., YOSHIDA, K., CHEN, L. C., ZELIKOFF, J. T., SMEE, J., HOLDER, A. A., STONEHUERNER, J., CRANS, D. C. & GHIO, A. J. 2010. Effects of metal compounds with distinct physicochemical properties on iron homeostasis and antibacterial activity in the lungs: chromium and vanadium. *Inhal Toxicol*, 22, 169-78.
- COHEN, M. D., WEI, C. I., TAN, H. & KAO, K. J. 1986. Effect of ammonium metavanadate on the murine immune response. *J Toxicol Environ Health*, 19, 279-98.
- COHEN, M. D., YANG, Z., ZELIKOFF, J. T. & SCHLESINGER, R. B. 1996b. Pulmonary immunotoxicity of inhaled ammonium metavanadate in Fisher 344 rats. *Fundam Appl Toxicol*, 33, 254-63.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A., TURNER, S. C., CHEN, K. S., GHAHERI, B. A., GHAYUR, T., CARSON, W. E. & CALIGIURI, M. A. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97, 3146-51.
- CRANS, D. C., SMEE, J. J., GAIDAMAUSKAS, E. & YANG, L. 2004. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev*, 104, 849-902.
- CHAKRABORTY, T., SWAMY, A. H., CHATTERJEE, A., RANA, B., SHYAMSUNDAR, A. & CHATTERJEE, M. 2007. Molecular basis of vanadium-mediated inhibition of

- hepatocellular preneoplasia during experimental hepatocarcinogenesis in rats. *J Cell Biochem*, 101, 244-58.
- CHAN, E. D. & RICHES, D. W. 2001. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C441-50.
- CHONG, I. W., LIN, S. R., HWANG, J. J., HUANG, M. S., WANG, T. H., TSAI, M. S., HOU, J. J. & PAULAUSKIS, J. D. 2000. Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene by vanadium in mouse macrophages. *Inflammation*, 24, 127-39.
- CHUKHLOVI, A. B., TOKALOV, S. V., YAGUNOV, A. S., WESTENDORF, J., REINCKE, H. & KARBE, L. 2001. In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Sci Total Environ*, 281, 153-63.
- DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P. & TRAGANOS, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13, 795-808.
- DI CARO, V., D'ANNEO, A., PHILLIPS, B., ENGMAN, C., HARNAHA, J., LAKOMY, R., STYCHE, A., TRUCCO, M. & GIANNOUKAKIS, N. 2011. Interleukin-7 matures suppressive CD127(+) forkhead box P3 (FoxP3)(+) T cells into CD127(-) CD25(high) FoxP3(+) regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*, 165, 60-76.
- DILWORTH-ANDERSON, P. & COHEN, M. D. 2010. Beyond diversity to inclusion: recruitment and retention of diverse groups in Alzheimer research. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 24 Suppl, S14-18.

- EHRlich, V. A., NERSESYAN, A. K., ATEFIE, K., HOELZL, C., FERK, F., BICHLER, J., VALIC, E., SCHAFFER, A., SCHULTE-HERMANN, R., FENECH, M., WAGNER, K. H. & KNASMULLER, S. 2008. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environ Health Perspect*, 116, 1689-93.
- FEDOROVA, E. V., BURYAKINA, A. V., VOROBIEVA, N. M. & BARANOVA, N. I. 2013. The vanadium compounds: Chemistry, synthesis, insulinomimetic properties. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 7, 259-270.
- FORTOUL, T. I., QUAN-TORRES, A., SANCHEZ, I., LOPEZ, I. E., BIZARRO, P., MENDOZA, M. L., OSORIO, L. S., ESPEJEL-MAYA, G., AVILA-CASADO MDEL, C., AVILA-COSTA, M. R., COLIN-BARENQUE, L., VILLANUEVA, D. N. & 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, 446-9.
- FORTOUL, T. I., RODRIGUEZ-LARA, V., GONZALEZ-VILLALVA, A., ROJAS-LEMUS, M., CANO-GUTIERREZ, G., USTARROZ-CANO, M., COLIN-BARENQUE, L., MONTANO, L. F., GARCIA-PELEZ, I., BIZARRO-NEVARES, P., LOPEZ-VALDEZ, N., FALCON-RODRIGUEZ, C. I., JIMENEZ-MARTINEZ, R. S., RUIZ-GUERRERO, M. L., LOPEZ-ZEPEDA, L. S., MORALES-RIVERO, A. & MUNIZ-RIVERA-CAMBAS, A. 2011. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 951043.

- FRANK, D. A., ROBERTSON, M. J., BONNI, A., RITZ, J. & GREENBERG, M. E. 1995. Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7779-83.
- FURQAN, M., MUKHI, N., LEE, B. & LIU, D. 2013. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*, 1, 5.
- GONCALVES, A. P., VIDEIRA, A., SOARES, P. & MAXIMO, 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, 371-7.
- GONZALEZ-VILLALVA, A., PINON-ZARATE, G., FALCON-RODRIGUEZ, C., LOPEZ-VALDEZ, N., BIZARRO-NEVARES, P., ROJAS-LEMUS, M., RENDON-HUERTA, E., COLIN-BARENQUE, L. & FORTOUL, T. I. 2014. Activation of Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway involved in megakaryocyte proliferation induced by vanadium resembles some aspects of essential thrombocythemia. *Toxicol Ind Health*.
- GRABOWSKI, G. M., PAULAUSKIS, J. D. & GODLESKI, J. J. 1999. Mediating phosphorylation events in the vanadium-induced respiratory burst of alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 156, 170-8.
- HAQUE, S. J. & SHARMA, P. 2006. Interleukins and STAT signaling. *Vitam Horm*, 74, 165-206.
- HEIDE, M., LEGRUM, W., NETTER, K. J. & FUHRMANN, G. F. 1983. Vanadium inhibits oxidative drug demethylation in vivo in mice. *Toxicology*, 26, 63-71.
- HERNANDEZ, H. & RODRIGUEZ, R. 2012. Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environ Monit Assess*, 184, 5327-42.

- HORNG, T., BEZBRADICA, J. S. & MEDZHITOV, R. 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol*, 8, 1345-52.
- HUANG, C., MATTJUS, P., MA, W. Y., RINCON, M., CHEN, N. Y., BROWN, R. E. & DONG, Z. 2000. Involvement of nuclear factor of activated T cells activation in UV response. Evidence from cell culture and transgenic mice. *J Biol Chem*, 275, 9143-9.
- HUYER, G., LIU, S., KELLY, J., MOFFAT, J., PAYETTE, P., KENNEDY, B., TSAPRAILIS, G., GRESSER, M. J. & RAMACHANDRAN, C. 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem*, 272, 843-51.
- IGARASHI, K., DAVID, M., LARNER, A. C. & FINBLOOM, D. S. 1993. In vitro activation of a transcription factor by gamma interferon requires a membrane-associated tyrosine kinase and is mimicked by vanadate. *Mol Cell Biol*, 13, 3984-9.
- IMBERT, V., PEYRON, J. F., FARAHI FAR, D., MARI, B., AUBERGER, P. & ROSSI, B. 1994. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *Biochem J*, 297 (Pt 1), 163-73.
- JASPERS, I., SAMET, J. M., ERZURUM, S. & REED, W. 2000. Vanadium-induced kappaB-dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of the p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23, 95-102.
- JIANG, W., ZHANG, J. & TIAN, Z. 2008. Functional characterization of interleukin-15 gene transduction into the human natural killer cell line NKL. *Cytotherapy*, 10, 265-74.
- KALTSCHMIDT, B., KALTSCHMIDT, C., HOFMANN, T. G., HEHNER, S. P., DROGE, W. & SCHMITZ, M. L. 2000. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*, 267, 3828-35.

- KAZI, J. U., KABIR, N. N., FLORES-MORALES, A. & RONNSTRAND, L. 2014. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci*, 71, 3297-310.
- KLARLUND, J. K. 1985. Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins. *Cell*, 41, 707-17.
- KOVANEN, P. E. & LEONARD, W. J. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*, 202, 67-83.
- LANIER, L. L. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*, 15, 308-14.
- LAWRENCE, D. A. & MCCABE, M. J., JR. 2002. Immunomodulation by metals. *Int Immunopharmacol*, 2, 293-302.
- LEON, I. E., BUTENKO, N., DI VIRGILIO, A. L., MUGLIA, C. I., BARAN, E. J., CAVACO, I. & ETCHEVERRY, S. B. 2014. Vanadium and cancer treatment: antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. *J Inorg Biochem*, 134, 106-17.
- LEVY, B. S., HOFFMAN, L. & GOTTSEGEN, S. 1984. Boilermakers' bronchitis. Respiratory tract irritation associated with vanadium pentoxide exposure during oil-to-coal conversion of a power plant. *J Occup Med*, 26, 567-70.
- LI, J., ELBERG, G., CRANS, D. C. & SHECHTER, Y. 1996. Evidence for the distinct vanadyl(+4)-dependent activating system for manifesting insulin-like effects. *Biochemistry*, 35, 8314-8.
- LIAO, W., LIN, J. X. & LEONARD, W. J. 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38, 13-25.

- LIN, J. X., LI, P., LIU, D., JIN, H. T., HE, J., ATA UR RASHEED, M., ROCHMAN, Y., WANG, L., CUI, K., LIU, C., KELSALL, B. L., AHMED, R. & LEONARD, W. J. 2012. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity*, 36, 586-99.
- LIU, P. T., KRUTZIK, S. R. & MODLIN, R. L. 2007. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends Mol Med*, 13, 117-24.
- LONG, E. O., KIM, H. S., LIU, D., PETERSON, M. E. & RAJAGOPALAN, S. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, 31, 227-58.
- LUTZ, C. T. & KURAGO, Z. B. 1999. Human leukocyte antigen class I expression on squamous cell carcinoma cells regulates natural killer cell activity. *Cancer Res*, 59, 5793-9.
- MA, A., KOKA, R. & BURKETT, P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 24, 657-79.
- MAKI, G., KLINGEMANN, H. G., MARTINSON, J. A. & TAM, Y. K. 2001. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*, 10, 369-83.
- MARCAIS, A., VIEL, S., GRAU, M., HENRY, T., MARVEL, J. & WALZER, T. 2013. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol*, 4, 450.
- MARINI, M., ZUNICA, G., BAGNARA, G. P. & FRANCESCHI, C. 1987. Effect of vanadate of PHA-induced proliferation of human lymphocytes from young and old subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 142, 836-42.

- MINAGAWA, M., WATANABE, H., MIYAJI, C., TOMIYAMA, K., SHIMURA, H., ITO, A., ITO, M., DOMEN, J., WEISSMAN, I. L. & KAWAI, K. 2002. Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. *J Immunol*, 169, 4153-60.
- MONTIEL-DAVALOS, A., GONZALEZ-VILLAVA, A., RODRIGUEZ-LARA, V., MONTANO, L. F., FORTOUL, T. I. & LOPEZ-MARURE, R. 2012. Vanadium pentoxide induces activation and death of endothelial cells. *J Appl Toxicol*, 32, 26-33.
- MORETTA, A. 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*, 2, 957-64.
- MORETTA, L., BOTTINO, C., FERLAZZO, G., PENDE, D., MELIOLI, G., MINGARI, M. C. & MORETTA, A. 2003. Surface receptors and functional interactions of human natural killer cells: from bench to the clinic. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2139-46.
- MORETTA, L., BOTTINO, C., PENDE, D., MINGARI, M. C., BIASSONI, R. & MORETTA, A. 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*, 32, 1205-11.
- MORITA, A., YAMAMOTO, S., WANG, B., TANAKA, K., SUZUKI, N., AOKI, S., ITO, A., NANA O, T., OHYA, S., YOSHINO, M., ZHU, J., ENOMOTO, A., MATSUMOTO, Y., FUNATSU, O., HOSOI, Y. & IKEKITA, M. 2010. Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res*, 70, 257-65.
- NANDAGOPAL, N., ALI, A. K., KOMAL, A. K. & LEE, S. H. 2014. The Critical Role of IL-15-PI3K-mTOR Pathway in Natural Killer Cell Effector Functions. *Front Immunol*, 5, 187.

- NECHAY, B. R. 1984. Mechanisms of action of vanadium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 24, 501-24.
- OWUSU-YAW, J., COHEN, M. D., FERNANDO, S. Y. & WEI, C. I. 1990. An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol Lett*, 50, 327-36.
- PARRISH-NOVAK, J., DILLON, S. R., NELSON, A., HAMMOND, A., SPRECHER, C., GROSS, J. A., JOHNSTON, J., MADDEN, K., XU, W., WEST, J., SCHRADER, S., BURKHEAD, S., HEIPEL, M., BRANDT, C., KUIJPER, J. L., KRAMER, J., CONKLIN, D., PRESNELL, S. R., BERRY, J., SHIOTA, F., BORT, S., HAMBLY, K., MUDRI, S., CLEGG, C., MOORE, M., GRANT, F. J., LOFTON-DAY, C., GILBERT, T., RAYOND, F., CHING, A., YAO, L., SMITH, D., WEBSTER, P., WHITMORE, T., MAURER, M., KAUSHANSKY, K., HOLLY, R. D. & FOSTER, D. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408, 57-63.
- PARRONDO, R., DE LAS POZAS, A., REINER, T., RAI, P. & PEREZ-STABLE, C. 2010. NF-kappaB activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. *Mol Cancer*, 9, 182.
- PIERCE, L. M., ALESSANDRINI, F., GODLESKI, J. J. & PAULAUSKIS, J. D. 1996. Vanadium-induced chemokine mRNA expression and pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 138, 1-11.
- PILBEAM, K., BASSE, P., BROSSAY, L., VUJANOVIC, N., GERSTEIN, R., VALLEJO, A. N. & BORGHESI, L. 2008. The ontogeny and fate of NK cells marked by permanent DNA rearrangements. *J Immunol*, 180, 1432-41.

- PILLET, A. H., BUGAULT, F., THEZE, J., CHAKRABARTI, L. A. & ROSE, T. 2009. A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells. *J Immunol*, 182, 6267-77.
- PUC CETTI, P., SANTONI, A., RICCARDI, C. & HERBERMAN, R. B. 1980. Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. *Int J Cancer*, 25, 153-8.
- QURESHI, M. A., HILL, C. H. & HEGGEN, C. L. 1999. Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Vet Immunol Immunopathol*, 68, 61-71.
- RAY, R. S., GHOSH, B., RANA, A. & CHATTERJEE, M. 2007. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer*, 120, 13-23.
- REHDER, D. 2003. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*, 6, 604-617.
- REHDER, D. 2012. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Med Chem*, 4, 1823-37.
- REHDER, D. 2013a. The future of/for vanadium. *Dalton Trans*, 42, 11749-61.
- REHDER, D. 2013b. Vanadium. Its role for humans. *Met Ions Life Sci*, 13, 139-69.
- ROBERTS, J. R., TAYLOR, M. D., CASTRANOVA, V., CLARKE, R. W. & ANTONINI, J. M. 2004. Soluble metals associated with residual oil fly ash increase morbidity and lung injury after bacterial infection in rats. *J Toxicol Environ Health A*, 67, 251-63.
- ROBINSON, B. W., PINKSTON, P. & CRYSTAL, R. G. 1984. Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent. *J Clin Invest*, 74, 942-50.

- ROSS, J. A., CHENG, H., NAGY, Z. S., FROST, J. A. & KIRKEN, R. A. 2010. Protein phosphatase 2A regulates interleukin-2 receptor complex formation and JAK3/STAT5 activation. *J Biol Chem*, 285, 3582-91.
- ROTH, M. D. & GOLUB, S. H. 1989. Inhibition of lymphokine-activated killer cell function by human alveolar macrophages. *Cancer Res*, 49, 4690-5.
- RUSSELL, S. M., JOHNSTON, J. A., NOGUCHI, M., KAWAMURA, M., BACON, C. M., FRIEDMANN, M., BERG, M., MCVICAR, D. W., WITTHUHN, B. A., SILVENNOINEN, O. & ET AL. 1994. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science*, 266, 1042-5.
- SAKURAI, H. 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 3, 35-6.
- SAYOS, J., NGUYEN, K. B., WU, C., STEPP, S. E., HOWIE, D., SCHATZLE, J. D., KUMAR, V., BIRON, C. A. & TERHORST, C. 2000. Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int Immunol*, 12, 1749-57.
- SCHMID, I., KRALL, W. J., UITTENBOGAART, C. H., BRAUN, J. & GIORGI, J. V. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 13, 204-8.
- SCHOENBORN, J. R. & WILSON, C. B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 96, 41-101.
- SHARMA, R. & DAS, A. 2014. Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. *Immunol Res*, 58, 125-31.

- SHEN, X., LEE, K. & KONIG, R. 2001. Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4(+) T cells. *Toxicology*, 169, 67-80.
- SIVORI, S., CANTONI, C., PAROLINI, S., MARCENARO, E., CONTE, R., MORETTA, L. & MORETTA, A. 2003. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol*, 33, 3439-47.
- STEIN-STREILEIN, J., BENNETT, M., MANN, D. & KUMAR, V. 1983. Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. *J Immunol*, 131, 2699-704.
- STEIN-STREILEIN, J. & GUFFEE, J. 1986. In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *J Immunol*, 136, 1435-41.
- SUCK, G. 2006. Novel approaches using natural killer cells in cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 16, 412-8.
- SUZUKI, H., DUNCAN, G. S., TAKIMOTO, H. & MAK, T. W. 1997. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med*, 185, 499-505.
- TAM, Y. K., MAKI, G., MIYAGAWA, B., HENNEMANN, B., TONN, T. & KLINGEMANN, H. G. 1999. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther*, 10, 1359-73.
- THOMSON, A. W., TURNQUIST, H. R. & RAIMONDI, G. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*, 9, 324-37.

- TORRES, M. & FORMAN, H. J. 2002. Vanadate inhibition of protein tyrosine phosphatases mimics hydrogen peroxide in the activation of the ERK pathway in alveolar macrophages. *Ann N Y Acad Sci*, 973, 345-8.
- TRINCHIERI, G., MATSUMOTO-KOBAYASHI, M., CLARK, S. C., SEEHRA, J., LONDON, L. & PERUSSIA, B. 1984. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med*, 160, 1147-69.
- TRUDEL, S., PAQUET, M. R. & GRINSTEIN, S. 1991. Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem J*, 276 (Pt 3), 611-9.
- TURPIN, E. A., ANTAO-MENEZES, A., CESTA, M. F., MANGUM, J. B., WALLACE, D. G., BERMUDEZ, E. & BONNER, J. C. 2010. Respiratory syncytial virus infection reduces lung inflammation and fibrosis in mice exposed to vanadium pentoxide. *Respir Res*, 11, 20.
- VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- VARDATSIKOS, G., MEHDI, M. Z. & SRIVASTAVA, A. K. 2009. Bis(maltolato)-oxovanadium (IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses (review). *Int J Mol Med*, 24, 303-9.
- VITETTA, E. S. & UHR, J. W. 1985. Immunotoxins. *Annu Rev Immunol*, 3, 197-212.
- VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science (New York, N.Y.)*, 331, 44-49.

- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. & UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9, 503-10.
- WALDMANN, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 6, 595-601.
- WENDT, K., WILK, E., BUYNY, S., SCHMIDT, R. E. & JACOBS, R. 2007. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology*, 122, 486-95.
- WILTROUT, R. H., HERBERMAN, R. B., ZHANG, S. R., CHIRIGOS, M. A., ORTALDO, J. R., GREEN, K. M., JR. & TALMADGE, J. E. 1985. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol*, 134, 4267-75.
- WILLERFORD, D. M., CHEN, J., FERRY, J. A., DAVIDSON, L., MA, A. & ALT, F. W. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3, 521-30.
- WORLE-KNIRSCH, J. M., KERN, K., SCHLEH, C., ADELHELM, C., FELDMANN, C. & KRUG, H. F. 2007. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environ Sci Technol*, 41, 331-6.
- WOZNIAK, K. & BLASIAK, J. 2004. Vanadyl sulfate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa cells. *Arch Toxicol*, 78, 7-15.
- YOKOYAMA, W. M. & PLOUGASTEL, B. F. 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*, 3, 304-16.
- YU, M. C., SU, L. L., ZOU, L., LIU, Y., WU, N., KONG, L., ZHUANG, Z. H., SUN, L., LIU, H. P., HU, J. H., LI, D., STROMINGER, J. L., ZANG, J. W., PEI, G. & GE, B. X. 2008. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9, 898-907.

ZHANG, C., ZHANG, J., NIU, J., ZHOU, Z., ZHANG, J. & TIAN, Z. 2008. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol*, 69, 490-500.

ZHANG, Z., CHEN, F., HUANG, C. & SHI, X. 2002. Vanadate induces G2/M phase arrest in p53-deficient mouse embryo fibroblasts. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 21, 223-31.

ZWOLAK, I. 2014. Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: a review of in vitro studies. *Toxicol Mech Methods*, 24, 1-12.