



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza

Carrera de Biología

Efecto del trióxido de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de linfocitos humanos tratados *in vitro*

TESIS

Que para obtener el título de:  
Biólogo

Presenta:  
Víctor Alán Alcántara Mejía

Director de Tesis: M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava



Ciudad de México, Junio de 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **ALCÁNTARA MEJÍA VÍCTOR ALÁN**, con número de cuenta **310016599**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de junio de 2017** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

**VOCAL** M. en C. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

**SECRETARIO** Dra. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

**SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

**SUPLENTE** Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

*Mario A. Lozano*  
*Rodrigo Anibal Mateos Nava*  
*María del Carmen García Rodríguez*  
*Hugo López Muñoz*  
*Yolanda Córdova Galaviz*

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del trióxido de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de linfocitos humanos tratados *in vitro*.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE** DE ESTUDIOS  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Ciudad de México, a 17 de mayo de 2017

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología Reproductiva de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, a cargo del Dr. Mario Altamirano Lozano, de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

El presente trabajo se desarrollo con el apoyo del proyecto DGAPA PAPIIT IN-224916

## **Agradecimientos**

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano por haberme aceptado como alumno y permitirme ingresar a la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la FES-Zaragoza.

Al Dr. Rodrigo Anibal Mateos Nava que me acepto como tesista, por sus enseñanzas, sus consejos, su tiempo, su paciencia, por la confianza que puso en mí y por ser un ejemplo a seguir, gracias.

A mis sinodales, Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Dra. María del Carmen García Rodríguez, Dr. Hugo López Muñoz y Dra. Yolanda Córdova Galaviz por las valiosas observaciones a este trabajo.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado y a la Dra. Lucila Álvarez Barrera por sus aportaciones y consejos.

Al C. a Dr. Arturo Valle Mendiola por su ayuda en la estandarización de la técnica del Western Blot

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

A Nydia Angelica Ocampo Aguilera que desde algunos años me permitió entrar a su vida brindándome su cariño, su confianza y su apoyo en los momentos difíciles, además, porque contigo como equipo desde el primer semestre esto fue más sencillo, gracias.

A todos mis compañeros de laboratorio L5PA

A compañeros universitarios Roberto Misael, Allan Michelle, Martin, Eduardo, Marcos, Luis Fernando, Raúl, Donaji, Javier, Alejandro, Sergio, Jaime y al Profesor Héctor Sánchez por compartir una gran amistad y momentos inolvidables.

A mi familia en especial

A mis padres Héctor Alcántara Barrera y María Guadalupe Mejía López por enseñarme con actos el significado del amor, por impulsarme a mejorar, por confiar en que lograré mis metas, por todo lo que me han dado aun si merecer y porque ni con dos vidas alcanzaría para agradecerles todo lo que soy, gracias, los amo.

A mi hermano y amigo Edgar Alcántara Mejía por todos los momentos divertidos y por siempre brindarme su apoyo cuando lo necesito.

A mis tíos, José Manuel Mejía, Cesar Oscar Mejía, Victor Mejía por ser como unos padres para mí, por sus cuidados y por todo su apoyo incondicional.

**Dedicada con todo el amor y cariño**

A la memoria de mi padre Héctor Alcántara Barrera

A mi madre María Guadalupe Mejía López

A mi hermano Edgar Alcántara Mejía

A mi novia Nydia Angelica Ocampo Aguilera

## Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1. VANADIO (V) .....	3
2.2. EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS AL VANADIO .....	4
2.3. EFECTOS DEL VANADIO EN LOS SERES VIVOS .....	6
2.4. CICLO CELULAR .....	7
2.4.1. Factores reguladores del ciclo celular .....	7
2.5. INTERACCIÓN DEL VANADIO CON LAS PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR .....	9
2.6. SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	10
2.6.1. Western-blot .....	10
2.7. LINFOCITOS COMO MODELO DE ESTUDIO .....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>5. OBJETIVO</b> .....	<b>15</b>
5.1 GENERAL .....	15
5.2 PARTICULARES .....	15
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
6.1. REACTIVOS .....	16
6.2. CULTIVO DE LINFOCITOS .....	16
6.3. TRATAMIENTOS .....	17
6.4. VIABILIDAD .....	17
6.5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ADN EN CADA FASE DEL CICLO CELULAR .....	17
6.6. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS .....	18
6.7. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	18
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	19
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
7.1. EFECTO DEL $V_2O_3$ SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS .....	20
7.2. EFECTO DEL $V_2O_3$ SOBRE LAS FASES DEL CICLO CELULAR .....	21
7.3. EFECTO DEL $V_2O_3$ SOBRE LAS PROTEÍNAS DE LA FASE $G_1$ .....	27
7.3.1. Ciclina D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4 expuestas durante 24 horas .....	27
7.3.2. Ciclina D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4 expuestas durante 48 horas .....	29
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
8.1. VIABILIDAD CELULAR .....	33
8.2. EFECTOS DEL VANADIO SOBRE EL CICLO CELULAR .....	34
8.3. MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS CICLINA Y CDK .....	35
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>38</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>12. ANEXOS:</b> .....	<b>47</b>



## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Br-Et	Bromuro de etidio
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
DE	Desviación Estándar
CFDA	Diacetato de carboxifluorosceina
E2F	Factor de transcripción E
MAPK	Proteína cinasa activadora de mitógenos
NaNO <sub>3</sub>	Metavanadato de sodio
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	Metavanadato de amonio
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salina
PHA	Fitohemaglutinina
pRB	Proteína del retinoblastoma
SDS	Dodecilsulfato de sodio
V	Vanadio
V <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de vanadio
V <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Tetraóxido de vanadio
VO(aca) <sub>2</sub>	Bisacetilacetato de vanadilo
VOSO <sub>4</sub>	Sulfato de vanadilo
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de vanadio

## 1. Resumen

El vanadio (V) se encuentra en el medio ambiente y los seres vivos están expuestos a él mediante los alimentos que consumen, por inhalación, además de sus aplicaciones tanto industriales como médicas. Su liberación a la atmósfera se ha incrementado por actividades antropogénicas; en diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* se ha mostrado que la exposición a los compuestos de éste metal induce efectos genotóxicos, citotóxicos y citostáticos. Especialmente los óxidos de vanadio afectan el proceso normal de división celular ya que aumenta el tiempo promedio de proliferación, disminuyen el índice mitótico y el índice de replicación, además, se sabe que tiene la capacidad de interactuar con biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos).

El trióxido de vanadio ( $V_2O_3$ ) es uno de los óxidos que está presente en el ambiente, el cual altera la proliferación celular, sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos por los cuales induce éste efecto. Por lo que en éste trabajo se evaluó si la exposición de los cultivos de linfocitos humanos a  $V_2O_3$  en diferentes concentraciones, 2, 4, 8, ó 16  $\mu\text{g/mL}$ , expuestos durante 24 y 48 horas modifica la proliferación, así como los niveles de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4, las cuales controlan la transición de la fase  $G_1$  a S del ciclo celular. Para esto, se evaluó la viabilidad de las células mediante fluorocromos CFDA-BrEt, a continuación se determinó el contenido de ADN por citometría de flujo para conocer si había cambios en las fases del ciclo y finalmente se analizaron los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 con la técnica de western blot.

La administración de  $V_2O_3$  no modificó la viabilidad. Con respecto al contenido del ADN, se observó un incremento en la fase  $G_1$  a las 24 horas en las concentraciones de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  aunado a la disminución de la fase S; a las 48 horas, solo la fase  $G_1$  disminuyó en la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$ . Los niveles de expresión de las proteínas ciclina D y E presentaron disminución en la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 horas, mientras que la Cdk4 en 2 y 16  $\mu\text{g/mL}$  y en Cdk2 en 2, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$ ; la ciclina D aumentó significativamente en la concentración de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ , así como, la ciclina E en 8  $\mu\text{g/mL}$  y Cdk2 en 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  en el tratamiento de 48 horas. Con base en lo anterior, la administración de  $V_2O_3$  a los cultivos de linfocitos humanos indujo retraso de la proliferación durante la fase  $G_1/S$  ya que tiene la capacidad de modificar los niveles de expresión de las proteínas de la fase  $G_1$ .

## 2. Introducción

La aplicación de los metales ha adquirido gran importancia para el ser humano en su desarrollo cultural y tecnológico (Altamirano-Lozano *et al.*, 2014), aunque no tienen una definición precisa, la mayoría pueden ser reconocidos por tener una densidad 5 veces mayor a la del agua (Cornelis y Nordberg, 2007). A diferencia del resto de los elementos de la tabla periódica, se caracterizan por ser buenos conductores de calor y electricidad, poseer alta densidad y tienen un aspecto sólido a temperaturas normales (excepto el mercurio), asimismo, sus sales en disolución forman cationes (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). En comparación con los no metales, tienen baja electronegatividad y energía de ionización por lo que también es más fácil que cedan electrones (Chang, 2007).

Están distribuidos de manera natural en la corteza terrestre a muy bajas concentraciones, no obstante, debido a la influencia del ser humano en las últimas décadas se han elevado sus niveles en la atmósfera (Mejía *et al.*, 2007; Hernández y Rodríguez, 2012). Su emisión al medio ambiente de manera natural ocurre mediante las erupciones volcánicas, erosión del suelo o el intemperismo de rocas y por actividad humana durante la quema de combustibles fósiles, al igual que la industria cementera y minero metalúrgica (Hernández y Rodríguez, 2012), el hecho de que no son biodegradables hace que tiendan a acumularse en el ambiente y en los organismos convirtiéndolos en contaminantes ambientales (Nriagu, 1990; Fu y Wang, 2011; Imtiaz *et al.*, 2015).

En los seres vivos algunos como calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel y zinc, son micronutrientes o incluso constituyentes esenciales, en cambio, cadmio, plomo, arsénico, talio, cromo, cobalto, son conocidos por sus efectos tóxicos o cancerígenos, en el caso del vanadio (V) puede tener efectos positivos a manera de micronutrientes esenciales si sus concentraciones son bajas pero con efectos tóxicos a niveles altos (EFSA, 2004; Cornelis y Nordberg, 2007; EPA, 2011; Fu y Wang, 2011).

## 2.1. Vanadio (V)

El V pertenece al grupo de los metales de transición ubicado en la familia 5 (VB) de la tabla periódica de los elementos, es de color grisáceo, con número atómico de 23, peso atómico 50.9415, densidad 6.09 g/cm<sup>3</sup>, punto de fusión y de ebullición de 1890 y 3380 °C respectivamente (IUPAC, 2013), debido a su utilidad el 80% de la producción es empleado en la industria (Imtiaz *et al.*, 2015) en aleaciones con el acero para mejorar la dureza, maleabilidad y resistencia a la corrosión, también se emplea en la fabricación de plástico y vidrio, en la producción de caucho sintético, de pigmentos, colorantes para fotografías, cerámica, fertilizantes, fungicidas, insecticidas, en materiales biomédicos como medicamentos, amalgamas y prótesis, o bien, en la construcción de maquinaria aérea y tecnología espacial (IPCS, 2001; Daley *et al.*, 2004; Gioka *et al.*, 2004; Narayan, 2005; Baroch, 2013).

La emisión del V a la atmósfera es principalmente ocasionada por la actividad humana, considerándolo un contaminante ambiental, se estima que del 2011 al 2015 la liberación al medio es alrededor de 45 a 95 mil toneladas, de las cuales de 6 a 12.8 son fuentes naturales: volcanes, polvos continentales, incendios forestales, pulverización de sales marinas y prácticas biogénicas (Imtiaz *et al.*, 2015; Vanitec, 2016). Además, se ha demostrado que este metal tiene la capacidad de permanecer en el aire, el agua y el suelo por largos períodos de tiempo (Miramand y Fowler, 1998; Fu y Wang, 2011).

El V no se encuentra de forma pura ya que por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos, siendo los óxidos los que se encuentran en mayor proporción en la atmósfera y como resultado los seres vivos están expuestos a ellos (Nriagu, 1990; Ringelband y Hehl, 2000; Mejía, *et al.*, 2007; Hernández y Rodríguez, 2012). Por lo que, su toxicidad puede diferir debido a la naturaleza del compuesto y de sus estados de oxidación, siendo el 5+ la forma más tóxica y móvil, ya que en estudios *in vivo* como *in vitro* induce daño al ADN y finalmente enfermedades crónicas degenerativas tales como el cáncer (IPCS, 2001; EPA, 2011; Zwolak, 2014).

## 2.2. Exposición de los organismos al vanadio

El V puede ingresar al organismo por el sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal y la piel, siendo los alimentos los que representan la mayor fuente de exposición, seguida de la vía aérea y posiblemente por la piel aunque en mínimas cantidades, de esta exposición sólo el 10% ingerido es absorbido en el tracto gastrointestinal y el 25% que es inhalado se absorbe por los pulmones (Elinder *et al.*, 1988; Nriagu, 1990, 1998; Mukherjee *et al.*, 2004; EPA, 2011).

Éste metal se encuentra en los alimentos principalmente en: la pimienta negra, las semillas de eneldo, las setas, el perejil, los mariscos, la lechuga, las espinacas y en la carne estimando su ingesta en promedio de 13 a 15 µg de V/día, pero algunos autores consideran que puede alcanzar hasta 60 µg/día (Byrne y Kosta, 1978; WHO, 1990; French y Jones, 1993; EFSA, 2004; Heinemann *et al.*, 2003).

En la atmósfera el V elemental reacciona fácilmente con el carbono, nitrógeno u oxígeno y alrededor de dos tercios del V está presente en forma de óxidos tales como el pentóxido ( $V_2O_5$ ), tetraóxido ( $V_2O_4$ ) o trióxido ( $V_2O_3$ ), de manera normal en promedio se encuentran  $0.011 \mu\text{g V/m}^3$  (Barceloux, 1999, Fortoul *et al.*, 2002). Aunque en las últimas décadas los niveles están en aumento, lo cual es alarmante en el futuro (Ringelband y Hehl, 2000; Fortoul *et al.*, 2002; Imtiaz *et al.*, 2015).

Estudios en la Ciudad de México donde se realizaron autopsias en el tejido pulmonar de cadáveres que vivieron en la década de los 60 ( $1.04 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$  en peso seco de pulmón) comparado con aquellos de los 90 ( $1.36 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$  en peso seco de pulmón) notaron un incremento, sugiriendo que debe llevarse a cabo su monitoreo en el aire por riesgos a la salud (Fortoul *et al.*, 2002).

Asimismo, está presente en la farmacología, el metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ) que se emplea en el tratamiento de anemia, la tuberculosis, la diabetes, y la sífilis; el sulfato de vanadilo ( $\text{VOSO}_4$ ) para mejorar el rendimiento de los atletas, también son usados en el tratamiento de obesidad, cáncer, enfermedades causadas por parásitos, en el uso de antivirales o antibacteriales (Korbecki *et al.*, 2012; Pessoa *et al.*, 2014).

Reportes de la cinética del V en el ser humano mostraron que su eliminación es mayor dentro de las primeras horas y conforme transcurre el tiempo disminuye sugiriendo la interacción con moléculas o acumulación en algunos órganos (Heinemann *et al.*, 2003).

Otros consideran un comportamiento bifásico, en las 20 primeras horas se excreta la mayor cantidad y de 40 a 50 días la otra parte aunque no en su totalidad (Elinder *et al.*, 1988).

Considerando la cantidad que ingresa y se elimina algunos autores estiman que el cuerpo humano contiene entre 100 y 200  $\mu\text{g}$  de V (Byrne y Kosta, 1978; Elinder *et al.*, 1988; Heinemann *et al.*, 2003; Kordowiak y Holko, 2009).

En el organismo el V se une a las proteínas transferrina y albúmina de la sangre las que tienen la capacidad de transportarlo en mayor cantidad y en menor por los citratos, los lactatos o los fosfatos, alcanzando los diferentes órganos y tejidos, e ingresando a las células por los mecanismos de transporte aniónicos, principalmente los canales de fosfato (Cantley *et al.*, 1978; Hansen *et al.*, 1982; Mukherjee *et al.*, 2004; Byrne y Kosta, 1978; Kiss *et al.*, 2000; Korbecki *et al.*, 2012). Se acumula en hígado, riñón, hueso, bazo, pulmones, testículos, corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea, dientes y tejido graso donde pueden permanecer por tiempo prolongado (Byrne y Kosta, 1978; Hansen *et al.*, 1982; Sharma *et al.* 1987; Elinder *et al.*, 1988; French y Jones, 1993).

### **2.3. Efectos del vanadio en los seres vivos**

En diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que la exposición a los compuestos de éste metal inducen daño al ADN, alteran el metabolismo o integridad de la célula, lo que puede alterar la proliferación, especialmente los óxidos (3+, 4+ y 5+) *in vitro* afectan el proceso normal de división celular ya que aumenta el tiempo promedio de proliferación, disminuyen los índices mitótico y el de replicación, los cuales son parámetros de toxicidad celular (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011; Altamirano-Lozano *et al.*, 2014; Mateos-Nava *et al.*, 2016). El pentóxido de V ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ) induce daño primario al ADN evidenciado por la ruptura de la cadena sencilla, evaluado por el ensayo de electroforesis unicelular en gel (Rojas *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1997). Además, en cultivos de leucocitos y células epiteliales humanas, el tetraóxido de V ( $\text{V}_2\text{O}_4$ ) induce aberraciones cromosómicas estructurales (Rodríguez-Mercado, 1996; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010, 2011).

Particularmente el  $V_2O_3$  induce aberraciones cromosómicas numéricas, separación prematura del centrómero, rompimiento sencillo de la cadena de ADN, aumento en el tiempo promedio de proliferación, disminución del índice mitótico e índice de replicación (Owusu-Yaw *et al.*, 1990; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2010, 2011; Mateos-Nava *et al.*, 2016).

Diversas pruebas bioquímicas demuestran que el V en estados de oxidación 4+ y 5+ interactúa con las diferentes moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (Crans *et al.* 1989; Baran, 2000), ya que tiene preferencia por los grupos fosfatos, carboxilos y aminos de las biomoléculas; se calcula que el 61% del total se une a los fosfatos, el 29% a las proteínas, el 1% queda libre y el resto a radicales sulfhidrilo y vitaminas, entre otras (Nechay *et al.*, 1986; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Li *et al.*, 2008).

#### **2.4. Ciclo celular**

En organismos eucariontes pluricelulares las células somáticas pasan por procesos de división celular conocido como ciclo celular, el cual es de vital importancia dado que tiene la función de formar nuevas células, evitando en lo posible errores, permitiéndole al organismo estar en equilibrio (Alberts *et al.*, 2009).

El ciclo normalmente se encuentra dividido en cuatro fases: la fase S en donde el material genético nuclear es replicado; la fase M, aquí el material genético sintetizado es segregado equitativamente hacia dos nuevas células y en medio de ambas existen fases de crecimiento y maduración conocidas como fase  $G_1$  y fase  $G_2$  (Paniagua, *et al.*, 2007; Wayne, *et al.*, 2007; Fortoul, 2013).

Algunas señales físicas, químicas o biológicas son integradas durante la fase  $G_1$  logrando su progreso, de modo que la célula aumenta su volumen, duplicando sus orgánulos, macromoléculas, sintetizando ARN y con ello los necesarios para la síntesis de ADN, proteínas histonas y no histonas, ADN polimerasa, entre otras (Fortoul, 2013).

### 2.4.1. Factores reguladores del ciclo celular

Las células eucariontes han desarrollado una compleja red de proteínas reguladoras, que gobiernan la progresión a través del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2009). Cada fase se encuentra regulada por los puntos de control o “Check points” verificando el estado correcto de los eventos previos de una fase a otra, evitando la progresión y la propagación de células mutadas o dañadas (Paniagua, *et al.*, 2007; Wayne, *et al.*, 2007; Fortoul, 2013).

El proceso de su regulación ya sea extracelular o intracelular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos; en éste último acontecimiento interviene el conjunto específico de proteínas cinasas heterodiméricas que contienen una subunidad reguladora (ciclina) y una catalizadora (cinasas dependientes de ciclina, Cdk). La expresión de las ciclinas es un factor limitante para la activación de las Cdk. En general, los niveles de ciclinas están determinados por control transcripcional y su proteólisis a través del sistema de ubiquitina-proteosoma (Escribano-Díaz, *et al.*, 2013; Rodríguez-Gómez y Frías-Vázquez, 2014).

La activación secuencial o inactivación de las Cdk, a través de la síntesis y destrucción periódicas de las ciclinas, proporciona la regulación mediante fosforilación de sitios específicos, de las cuales se han identificado nueve Cdk y 16 ciclinas en las células de los mamíferos, algunas regulando el ciclo celular en cambio otras codifican la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación o la apoptosis (Johnson y Walker, 1999; Malumbres y Barbacid, 2009).

La fase G<sub>1</sub> está gobernada por el factor de transcripción E2F el cual se encuentra unido a la proteína del retinoblastoma pRb, mientras estén unidos el ciclo se detiene en esta fase. Se requiere que pRb éste hiperfosforilada para liberar a E2F permitiendo la proliferación celular, sin embargo, cuando pRb no es fosforilada por los complejos ciclina/Cdk mantiene secuestrado al factor de transcripción E2F impidiendo que los genes necesarios para la síntesis de ADN y de ciclina E sean expresados. La asociación de la ciclina D a Cdk4/Cdk6 estimula la progresión ya que fosforilan a pRb ocasionando la disociación de pRb/E2F, en esta misma fase se requiere a la ciclina E para alcanzar la transición de G<sub>1</sub>/S, lo que la vuelve necesaria para entrar a la fase de síntesis dado que la ciclina E se asocia con Cdk2 manteniendo el estado



hiperfosforilado de pRb, además de fosforilar la histona H1 importante en la reorganización durante la replicación del genoma (Johnson y Walker, 1999; Malumbres y Barbacid, 2009; Rodríguez-Gómez y Frías-Vázquez, 2014).

En la fase S la ciclina A asociada a Cdk2 mantienen fosforilada a la proteína pRB y posteriormente al formar el complejo con Cdk1 contribuye con la salida de la fase G2 y entrada a mitosis participando activamente en la síntesis de ADN o en la regulación negativa de E2F. La mitosis está regulada por Cdk1 en asociación con ciclinas A, B1 y B2, para que las células abandonen la mitosis, las ciclinas A y B deben degradarse, sugiriendo que las ciclina B/Cdk1 participan en la regulación de éste proceso de degradación (Johnson y Walker, 1999; Rodríguez-Gómez y Frías-Vázquez, 2014).

Su regulación negativa de los complejos de proteínas es mediante las inhibidoras de las ciclinas dependientes de cinasa (CKI), que están constituida por dos familias la INK4 y CIP/KIP, la INK4 está conformada por las proteínas p14, p15, p16, p18 y p19 las cuales se unen e inhiben a Cdk4 y Cdk6, en cambio, la familia CIP/KIP comprende a p21, p27 y p57 teniendo la capacidad de inactivar a Cdk2, Cdk4 y Cdk6, además de otras proteínas que controlan el ciclo, por ejemplo, al agente nuclear de proliferación celular PCNA (Sherr y Roberts, 1999; Johnson y Walker, 1999; Blomen y Boonstra, 2007).

## **2.5. Interacción del vanadio con las proteínas del ciclo celular**

Se ha observado que los compuestos de V interactúan con las proteínas que controlan el ciclo celular, en especial aquellas que dependen del ion fosfato, presentando un comportamiento dual, por un lado puede inhibirlas o estimular su actividad, esto se ve reflejado en la modificación de la proliferación de las células. En estudios realizados en líneas celulares de la epidermis de ratón JB6 P+ (C141), se observó que la administración del metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ) promovía la entrada de las células a la fase S debido a la activación de la proteína cinasa Akt la cual fosforiló a la proteína pRB provocando la liberación del factor de transcripción E2F y de esta manera se incrementaron los niveles de las ciclinas E y A, necesarias para la entrada y progresión de la fase S (Zhang, *et al.*, 2002, 2004).

Por otra parte, los compuestos de V pueden detener la progresión del ciclo celular de manera dependiente de la concentración y tiempo. En cultivos de células de epitelio de pulmón humano A549, la administración de  $\text{NaVO}_3$  en concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  durante 6, 12, 24 y 48 horas produjo la formación de peróxido de hidrógeno lo que llevó a las células se detuvieran en la fase  $G_2/M$  debido a que se incrementaron los niveles de la proteína p21 y Chk1 que es un activador de p21, así como la inactivación del complejo ciclina B/Cdc2 (Zhang, *et al.*, 2001, 2002).

En estudios realizados en el laboratorio se demostró que la administración de  $\text{V}_2\text{O}_5$  por 24 horas a cultivos de linfocitos humanos disminuyó la expresión de las proteínas Cdk4 y de ciclina D1, además presento sobreexpresión de la ciclina E y Cdk2 haciendo suponer que el compuesto induce la detención del ciclo celular en la transición de la fase  $G_1$  a S (Mateos-Nava, 2012).

## **2.6. Separación y análisis de proteínas**

Considerando que el V tiene la capacidad de interactuar con moléculas orgánicas (proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares) (Crans, *et al.*, 1989; Baran, 2000), es importante separarlas para detectar los niveles de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4. Para el estudio de las biomoléculas es indispensable su purificación empezando por la extracción del interior celular rompiendo las membranas dando paso a la separación de los diferentes componentes (Alberts *et al.*, 2009).

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que permite separar biomoléculas, con base a su carga y bajo la acción de un campo eléctrico (García-Pérez, 2000; Lomonte, 2007) tomando las propiedades físicas y químicas de las macromoléculas (Stewart y Ebel, 2000).

La característica física más útil de las proteínas es su tamaño y carga, la técnica aplicada más común es la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Estos se forman por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de

poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que es regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros (Lomonte, 2007).

Las muestras son tratadas con el detergente duodecilsulfato de sodio (SDS) que se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas permitiendo su plegamiento quedando libres de otras moléculas, la adición  $\beta$  mercaptoetanol contribuye al rompimiento de enlaces disulfuros de forma que la proteína puede migrar con base a su carga y bajo la acción de un campo eléctrico (Lomonte, 2007; Alberts *et al.*, 2009).

### **2.6.1. Western-blot**

Después de la separación se puede visualizar una proteína en específico mediante la marcación de la misma, un método para detectarlas de manera particular en una mezcla compleja es el inmunoblotting o western blotting que mediante anticuerpos diferentes, uno específico a la proteína y el otro unido a una enzima (peroxidasa de rábano) permite su detección mediante una reacción que puede ser colorimétrica o luminosa, esta última utilizando una placa autoradiográfica para posteriormente revelarla con el fin de obtener solo las bandas de las proteínas de interés (Kurien y Scofield, 2006).

### **2.7. Linfocitos como modelo de estudio**

Los linfocitos son un tipo celular adecuado para la experimentación *in vitro*, ya que son células no transformadas (Tucker y Preston, 1996). En el caso de los mamíferos, se utilizan principalmente los linfocitos de sangre periférica por la facilidad de su obtención, las factibles condiciones de cultivo y su fácil manejo de la muestra (Tucker y Preston, 1996; López-Ortiz y Márquez-Fernández, 2002). Su proliferación es estimulada en cultivos utilizando una lectina de origen vegetal que induce la división celular (López-Ortiz y Márquez-Fernández, 2002; Cui *et al.*, 2017). Presentan la ventaja de circular por todo el cuerpo y por ello son idóneos para diversos estudios tanto clínicos como

científicos ya que proporcionan una estimación de la exposición a algún agente químico, físico o biológico (Tucker y Preston, 1996).

El ciclo celular ha sido estudiado en células hematopoyéticas debido a que estas células espontáneamente se detienen en la fase  $G_0$  durante el proceso de diferenciación. En el caso de los linfocitos T y B pueden ser inducidos a reentrar al ciclo celular en respuesta a antígenos específicos, como pueden ser las lectinas de origen vegetal, mientras que las células mieloides están terminalmente diferenciadas y permanecen en  $G_0/G_1$  (Cannistra y Griffin, 1988; Furukawa *et al.*, 1990).

Estas lectinas actúan como inmunomoduladores activando glicoproteínas de superficie celular que inducen la linfoproliferación por múltiples vías de señales intracelulares entre ellas la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) que incrementa la expresión de cúmulo de diferenciación 25 (CD25) y cúmulo de diferenciación 69 (CD69) que inducen la secreción de interleucina 2 (IL-2) (Tamma *et al.*, 2003; Suviolahti *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2017), Care *et al.*, (1994) demostraron que la fitohemaglutinina (PHA) estimula la división de los linfocitos logrando el reingreso de las células en el ciclo debido a la inducción de los genes Hox desde Hoxb1 hasta Hoxb9 los cuales no se expresan en células quiescentes.

Los linfocitos T humanos recién aislados regularmente se encuentran en fase  $G_0$  (por la bajas concentraciones del gen *cdc2* denominado  $p34^{cdc2}$  una proteína cinasa serina-treonina que controla la entrada de células eucariotas en mitosis) una vez estimulados con PHA inician la transición  $G_1$  a S (Furukawa *et al.*, 1990; Cui *et al.*, 2017).

### 3. Justificación

El V está presente en el medio ambiente, por lo que los seres humanos están expuestos a él, principalmente a los óxidos de éste metal. Asimismo, en estudios *in vitro* se ha demostrado que estos compuestos afectan los procesos normales de la división celular ya que daña al ADN, aumenta el tiempo promedio de proliferación, disminuye el índice mitótico, índice de replicación e interactúan con las proteínas reguladoras de la proliferación celular. En nuestro laboratorio se ha observado que el  $V_2O_5$  induce sobreexpresión de las proteínas ciclina E y Cdk2 y disminuye la expresión de la ciclina D1 y Cdk4 en cultivos de linfocitos humanos, sin embargo, existen pocos reportes de los efectos que tienen los otros óxidos ( $V_2O_3$  y  $V_2O_4$ ) sobre estas proteínas en cultivos primarios, por lo que resulta interesante conocer si el  $V_2O_3$  presenta efectos similares debido a que no hay reportes de éste óxido, además, en estudios previos en éste laboratorio se observó que retrasa la proliferación, y es importante reconocer si el retraso se encuentra vinculado a las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 presentes en la fase  $G_1$  del ciclo celular.

#### **4. Hipótesis**

Se sabe que los compuestos de vanadio inducen el retraso de la proliferación celular mediante la interacción con las proteínas que controlan el ciclo, en especial aquellas que dependen del ion fosfato, comportándose de dos maneras por una parte puede activarlas y por otra inhibirlas entonces si se administra  $V_2O_3$  a cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* éste podría inducir cambios en los niveles de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 lo que llevaría a retraso de la proliferación en la fase  $G_1$ .

## **5. Objetivo**

### **5.1 General**

Evaluar si la administración de  $V_2O_3$  modifica los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones (2, 4, 8 ó 16  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 y 48 horas, mediante la técnica de Western Blot.

### **5.2 Particulares**

Evaluar la viabilidad celular de los cultivos de linfocitos tratados con 2, 4, 8 ó 16  $\mu\text{g/mL}$  de  $V_2O_3$  a 24 y 48 horas de exposición, utilizando la tinción dual con fluorocromos.

Determinar mediante el contenido de ADN en qué fase del ciclo celular se encuentran los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  a concentraciones de 2, 4, 8 ó 16  $\mu\text{g/mL}$  expuestos a diferentes tiempos (24 y 48 horas) por citometría de flujo.

Analizar los niveles de expresión las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  *in vitro* a concentraciones de 2, 4, 8 ó 16  $\mu\text{g/mL}$  expuestos por 24 y 48 horas, usando la técnica de western blot.

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Reactivos

Para el desarrollo de los protocolos se utilizaron los siguientes reactivos: trióxido de vanadio ( $V_2O_3$ ) CAS 1314-34-7 pureza del 99.99%, Histopaque<sup>®</sup>-1077, fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ), fosfato de sodio difásico ( $Na_2HPO_4$ ), DTT (1,4-ditiotreitol), Solución Azul de Bromofenol B3269, Ortovanadato de sodio ( $NaVO_4$ ), fosfato de disodio ( $Na_2HPO_4$ ), bifosfato de sodio ( $NaH_2PO_4$ ), 5(6)-diacetato de carboxifluorosceína (CFDA), ácido etileno diamino tetracético (EDTA), todos de la marca Sigma-Aldrich, Inc., MO EUA, bromuro de etidio (Br-Et), solución amortiguadora de fosfato salina (PBS), medio de cultivo PB-MAX<sup>™</sup> Karyotyping Medium todos de GIBCO-Invitrogen Corporation (NY) EUA, acrilamida, N,N'-metileno-bis-acrilamida, glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), N,N,N,N-tetra-metil-etilenodiamina (TEMED), (hidroximetil)-aminometano (Tris), persulfato de amonio, Bio-Rad Protein Assay, todos de Bio-Rad Laboratories, CA EUA; inhibidores de proteasas aprotinina, leupeptina, PMSF, anticuerpos primarios anti-ciclina D1 (sc-246), anti-ciclina E (sc-248), anti-Cdk 2 (sc-6248), anti-Cdk 4 (sc-53636), actina (sc-8432), anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (goat anti-mouse IgG-HRP), Tween-20, Western Blotting Luminol Reagent sc-2048, adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA, BD Vacutainer<sup>®</sup> con heparina de sodio de la marca BD Diagnósticos México.

### 6.2. Cultivo de Linfocitos

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica de tres donadores aparentemente sanos por punción venosa con sistema vacutainer<sup>®</sup>, de la cual se adicionó en proporción 1:1 al reactivo de Histopaque<sup>™</sup> en un tubo de centrifuga cónico, teniendo dos fases, sin mezclarse, se centrifugo a 1800 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 min, trascurrido dicho tiempo se obtuvieron cuatro fases de ellas se recupero la zona opaca constituida por células mononucleares con rangos de 85 a 95% de linfocitos, de 5 a 13% de monocitos y <0.1% células dendríticas, eritrocitos y granulocitos (Hallab *et al.*, 2008). Estos fueron transferidos a un tubo limpio y fueron lavados con PBS en tres ocasiones, centrifugándolos a 1500 rpm por 10 min cada uno, al final se obtuvo la



densidad celular utilizando la cámara de Neubauer. Para cada tratamiento y tiempo de exposición se cultivaron aproximadamente ocho millones de células en 5 mL de medio PB-Max Karyotyping el cual contenía fitohemaglutinina (PHA), un agente mitógeno que estimula la proliferación de los linfocitos T en cultivos celulares y se incubaron a 37° C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (todo esto fue por triplicado para cada donador).

### **6.3. Tratamientos**

Transcurridas 24 horas de cultivo se les administro una de las diferentes concentraciones de V<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 2, 4, 8 ó 16 µg/mL y se incubaron por 24 y 48 horas más, cabe mencionar que estas concentraciones han sido utilizadas en los diferentes estudios citogenéticos desarrollados en el laboratorio (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011; Mateos-Nava *et al.*, 2016).

### **6.4. Viabilidad**

La viabilidad celular fue evaluada al inicio y al final de cada tratamiento de la siguiente manera: se preparó la solución de tinción (1:1) de Br-Et (0.125 µg/µL) y CFDA (0.025 µg/µL) para mezclar 10 µL de esta con 10 µL de suspensión celular (linfocitos) y se incubaron a 37° C por 15 min. Posteriormente se hicieron tres lavados con un mL de PBS entre cada uno de ellos se centrifugó a 4000 rpm por 3 min, el botón se colocó en un portaobjetos y analizarlos en microscopio de fluorescencia (Nikon HFX-DX) con un filtro de excitación de 515-560 nm. Se cuantificaron 100 células en total tomando en cuenta el número de células viables que presentaban fluorescencia verde por su actividad enzimática con la CFDA y las no viables con el núcleo rojo debido a que se intercala el Br-Et con la estructura del ADN (Strauss, 1991; Masson-Meyers *et al.*, 2016).

### **6.5. Análisis del contenido de ADN en cada fase del ciclo celular**

Al finalizar el tratamiento con  $V_2O_3$  además de viabilidad se realizó el análisis del ADN para determinar si las células se detienen en alguna fase del ciclo en específico, para ello las células fueron fijadas en alcohol etílico al 70% durante toda la noche en refrigeración, posteriormente se le retiró el alcohol y se le agregó la solución de tinción, 10  $\mu$ L (2 mg/mL) yoduro de propidio más 100  $\mu$ L (1 mg/mL) de RNasa A en 800 mL de PBS más triton 100X (0.1%) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para proceder a la lectura en el citómetro de flujo BD FACSAria II de BDBiosciences® se adquiriendo 10000 núcleos por muestra, de estos datos se obtuvieron los histogramas con el programa para computadora WinMDI desarrollado por Joseph Trotter y el porcentaje en cada fase se determinó con el programa CYLCHRED de Terry Hoy (Darzynkiewicz y Huang, 2004).

### **6.6. Obtención de proteínas**

Por otra parte, el botón celular se lavó con 5 mL de PBS frío y centrifugó a 1800 rpm por 8 min, se desechó el sobrenadante, y se le agregó 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis RIPA (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mM  $NaVO_4$ , 5 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM  $NaH_2PO_4$ ) fue resuspendido pasándolo varias veces a través de una aguja 21G con ayuda de una jeringa, y se traspasó a un tubo eppendorf el cual se dejó en refrigeración una hora para centrifugarlo a 12500 rpm por 12 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante con una pipeta y se determinó la concentración de proteínas presente en cada cultivo mediante el reactivo Protein Assay de Bio-Rad que nos permitió conocer la concentración y empleando un espectrofotómetro se comparó con una curva patrón de albumina de suero bovino en concentración de 1 mg/mL.

### **6.7. Separación y detección de proteínas**

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida mediante electroforesis, primero fueron desnaturalizadas mezclando 50  $\mu$ g con solución amortiguadora de muestra 6X que contiene SDS que se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas permitiendo

su plegamiento quedando libres de otras moléculas y la adición de  $\beta$  mercaptoetanol contribuyen al rompimiento de enlaces disulfuros de forma que la proteína puede migrar con base a su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, las muestras se pusieron a hervir a 92°C durante 5 minutos, y se cargaron en los pozos formados en el gel, la separación se llevó a cabo al aplicar corriente constante de 100 voltios, posteriormente se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Bio-Rad por electroblotting con corriente constante de 145 miliamperios (mA) por una hora y media. La membrana fue incubada en solución de bloqueo (7% de leche sin grasa con amortiguador tris salino más 1% de Tween-20 (TTBS)) por hora y media; a continuación se incubó con cada anticuerpo primario (anti-ciclina D1, anti-ciclina E, anti-Cdk2, anti-Cdk4 y actina como marcador de carga) 1:2500 durante la noche con agitación constante.

Transcurrido el tiempo, se hicieron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP (1:25000) por hora y media, al final se lavó la membrana 3 veces con TTBS para realizar la detección y determinación de la proteína de interés, mostrada como una banda, utilizando el sustrato Luminol de Santa Cruz Biotechnology sobre la membrana provocando una reacción luminiscente emitiendo un haz de luz que fue capturado en una placa autoradiográfica. La intensidad de las bandas fue analizada con el programa para computadora *ImageJ* 1.51d, del National Institutes of Health, E.U. de libre acceso (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Los valores de las intensidades de cada una de las bandas de los diferentes tratamientos se normalizaron con respecto al marcador de carga y se compararon contra el grupo sin tratamiento.

### **6.8. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de nueve experimentos independientes. Para conocer si existe alguna diferencia significativa entre los grupos tratados y sin tratamiento se realizó la prueba *t de Student* considerando un valor  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo, con el programa estadístico IBM SPSS versión 24.

## 7. Resultados

### 7.1. Efecto del V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre la viabilidad de los linfocitos.

Los datos del ensayo de viabilidad se obtuvieron cuantificando 100 células por experimento. En el Cuadro 1 se presenta el porcentaje de cada tratamiento, en donde se observa que la administración de V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a los cultivos de linfocitos humanos no induce cambios en el porcentaje en ninguna de los tiempos de tratamiento.

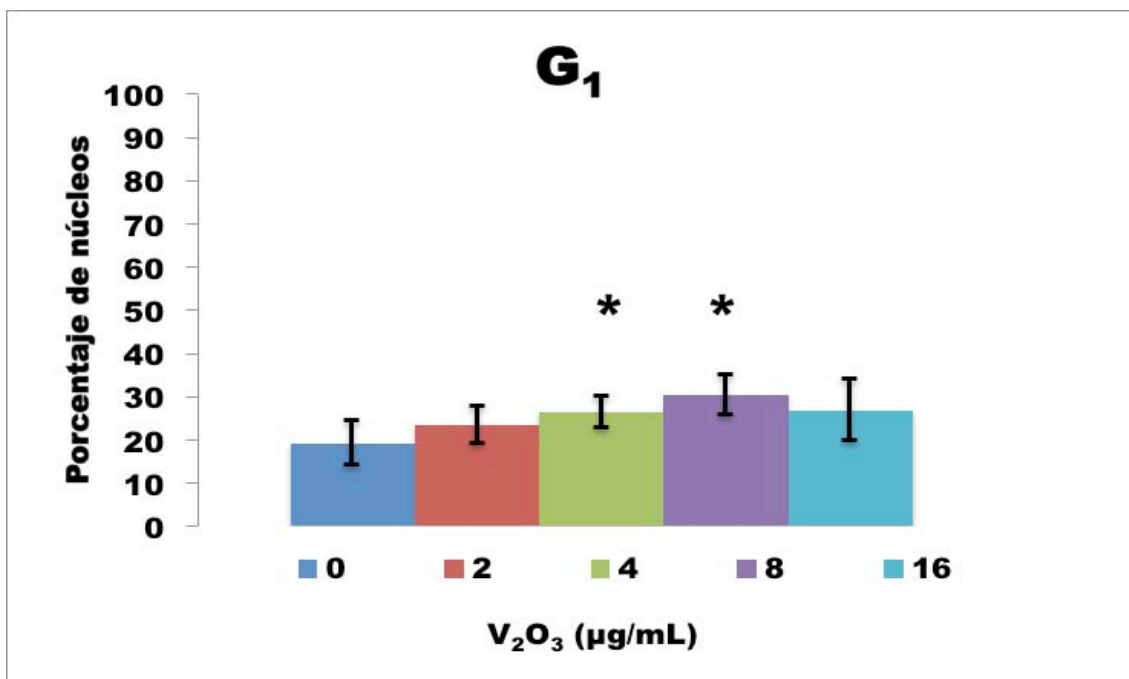
**Cuadro 1.** Porcentaje de Viabilidad de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 y 48 horas. Se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes.

Tratamiento	Tiempo		
	0 Horas	24 Horas	48 Horas
Experimento A			
0 µg/mL	99.3 ± 1.2	97.7 ± 1.5	93.3 ± 3.5
2 µg/mL	98.7 ± 2.3	96.3 ± 3.5	90.7 ± 1.1
4 µg/mL	98.3 ± 2.9	95.0 ± 2.0	91.7 ± 3.5
8 µg/mL	96.3 ± 2.9	95.0 ± 3.5	92.7 ± 2.5
16 µg/mL	96.0 ± 5.1	91.7 ± 6.6	89.7 ± 3.7
Experimento B			
0 µg/mL	98.0 ± 1.2	97.7 ± 1.7	93.7 ± 1.5
2 µg/mL	98.3 ± 2.0	97.0 ± 3.0	92.3 ± 1.2
4 µg/mL	97.7 ± 2.3	93.3 ± 2.0	94.0 ± 3.0
8 µg/mL	96.3 ± 2.9	94.3 ± 2.3	93.0 ± 3.0
16 µg/mL	95.0 ± 3.5	92.0 ± 5.6	91.0 ± 5.4
Experimento C			
0 µg/mL	99.0 ± 1.7	97.7 ± 1.2	93.0 ± 1.7
2 µg/mL	98.0 ± 2.0	95.7 ± 2.5	90.7 ± 2.1
4 µg/mL	98.0 ± 1.7	95.3 ± 3.0	93.3 ± 2.0
8 µg/mL	96.7 ± 3.0	93.0 ± 1.7	93.7 ± 2.3
16 µg/mL	96.0 ± 4.2	91.7 ± 4.7	89.0 ± 4.2
Promedio			
0 µg/mL	98.8 ± 1.5	97.7 ± 1.4	93.3 ± 2.1
2 µg/mL	98.3 ± 1.7	96.3 ± 2.4	91.2 ± 1.5
4 µg/mL	98.0 ± 2.6	94.5 ± 2.2	93.0 ± 2.6
8 µg/mL	96.4 ± 2.6	94.1 ± 2.4	93.1 ± 2.5
16 µg/mL	95.7 ± 3.8	91.8 ± 4.6	89.9 ± 3.8

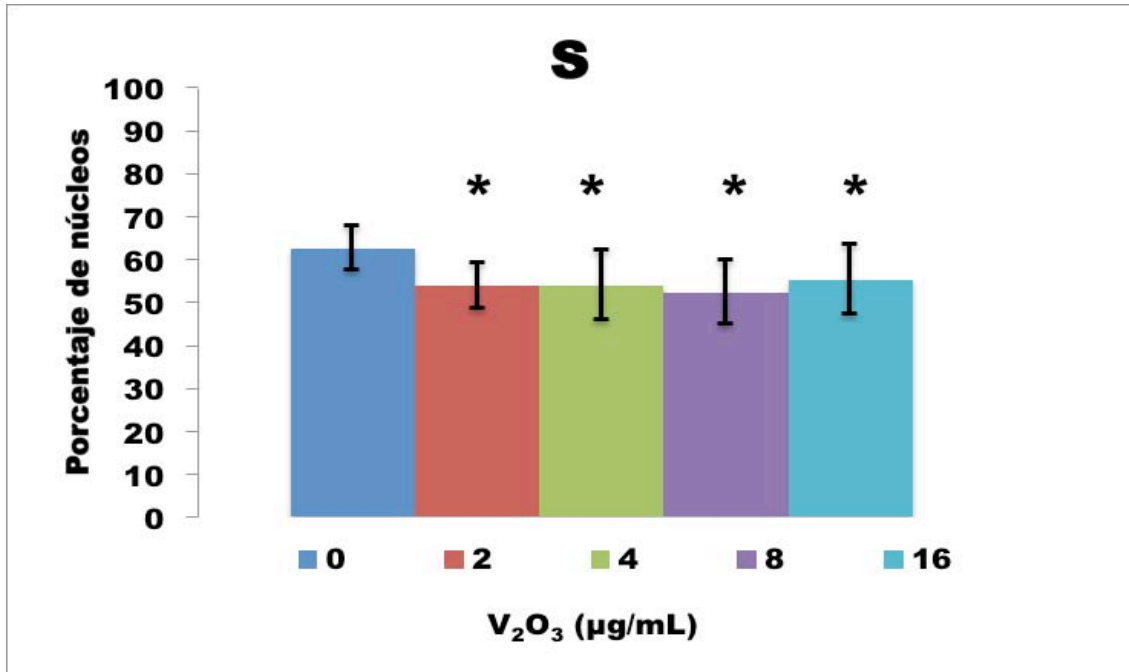
## 7.2. Efecto del $V_2O_3$ sobre las fases del ciclo celular

La determinación del ciclo celular mediante el contenido del ADN por citometría de flujo indicó que la exposición al  $V_2O_3$  durante 24 horas aumentó el porcentaje de núcleos en la fase  $G_1$ , con cambios significativos en las concentraciones de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  con respecto al grupo sin tratamiento, sin embargo, en la fase S todas las concentraciones presentan disminución significativa (Figura 1, 2, 3 y 4).

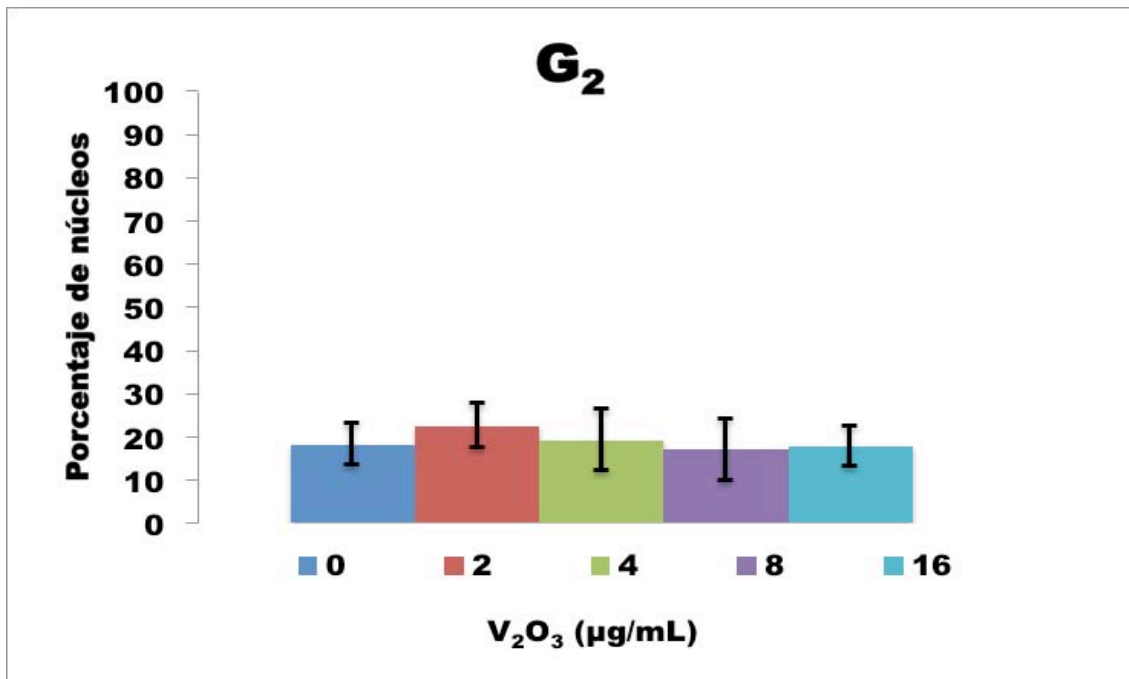
Asimismo, los linfocitos tratados durante 48 horas presentaron disminución en la fase  $G_1$  la cual es estadísticamente diferente en la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$  en relación al grupo sin tratamiento (Figura 5, 6, 7 y 8).



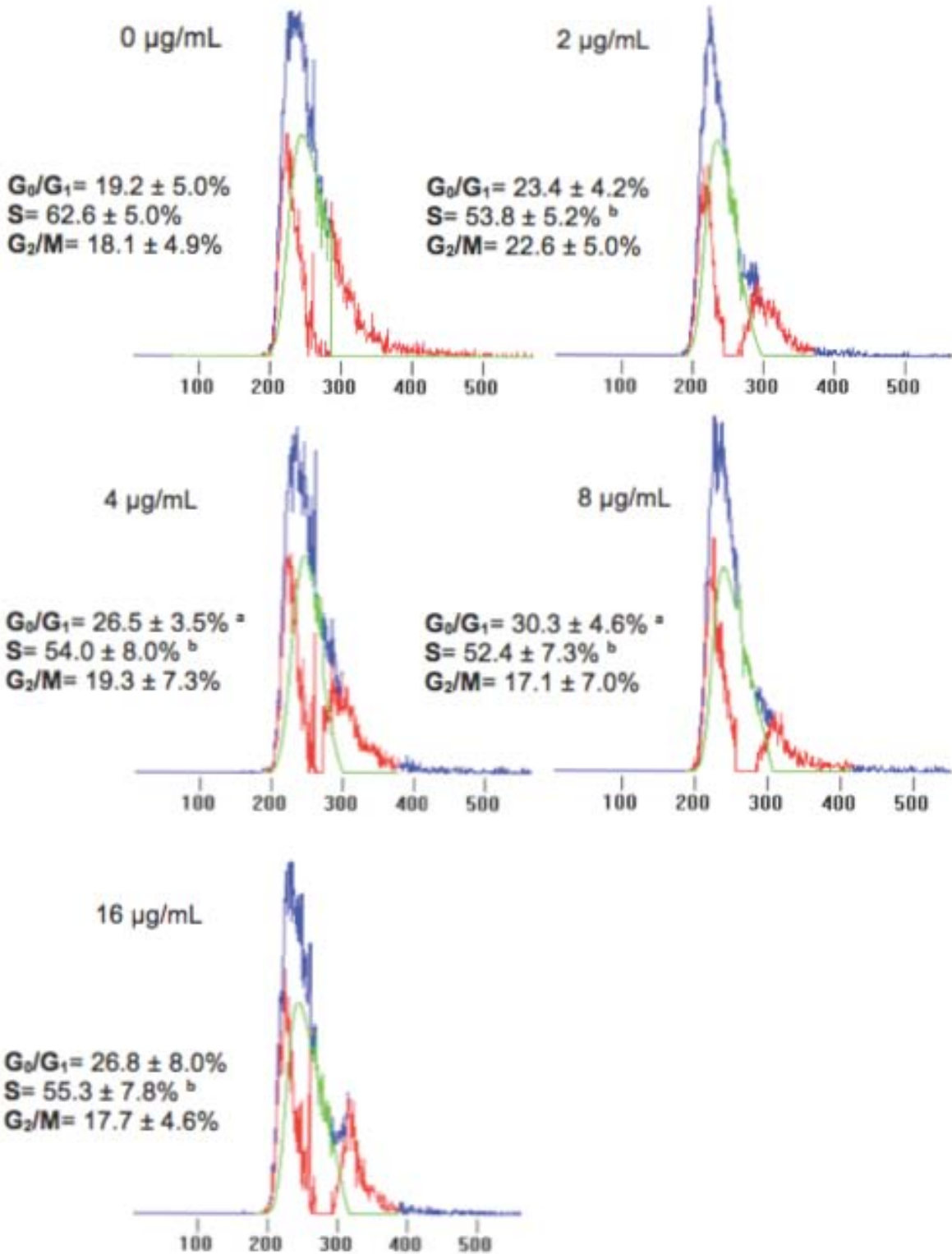
**Figura 1.** Porcentaje de núcleos en fase  $G_1$  de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  por 24 horas. se presenta la media  $\pm$  DE, de nueve experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



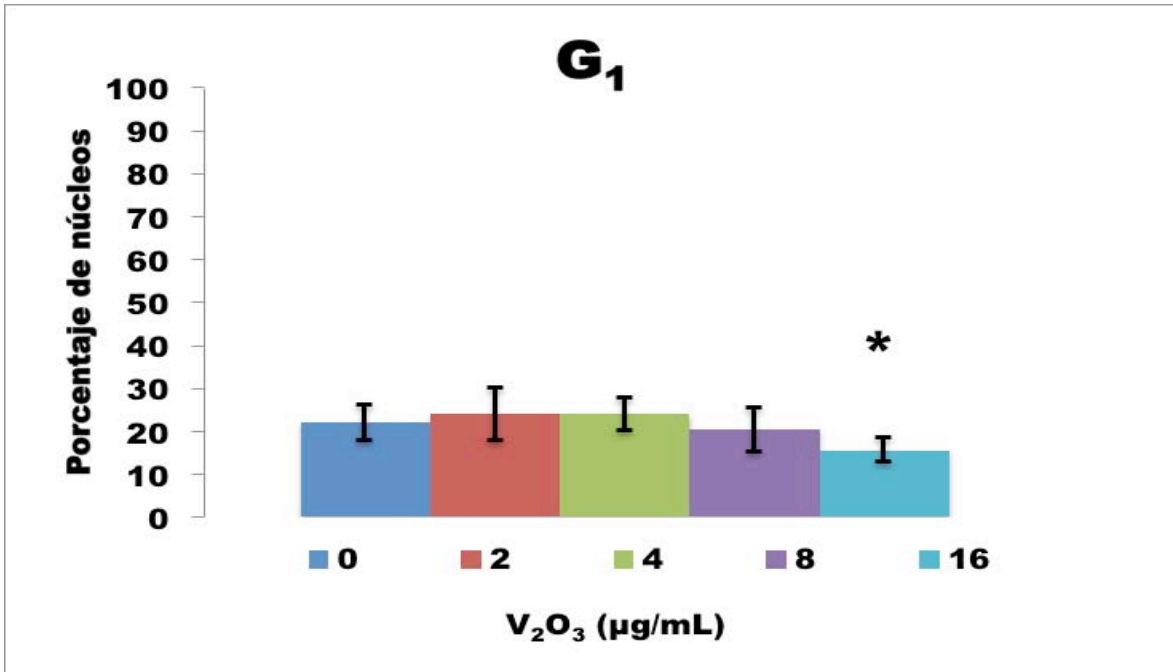
**Figura 2.** Porcentaje de núcleos en fase S de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



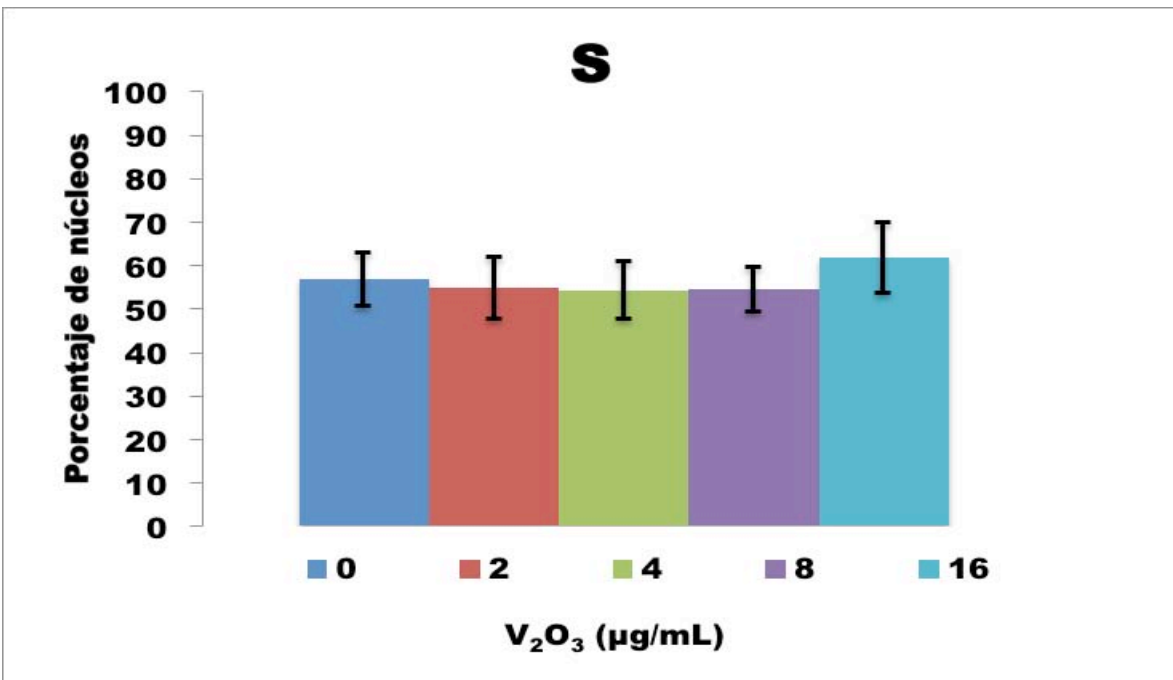
**Figura 3.** Porcentaje de núcleos en fase G<sub>2</sub> de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes.



**Figura 4.** Porcentaje de núcleos en fase  $G_0/G_1$ , S y  $G_2/M$  de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  por 24 horas. Se presenta la media  $\pm$  DE, de nueve experimentos independientes. a:  $p < 0.05$  vs. sin tratamiento; b:  $p < 0.05$  vs. sin tratamiento, en sus respectivas fases (t de Student).

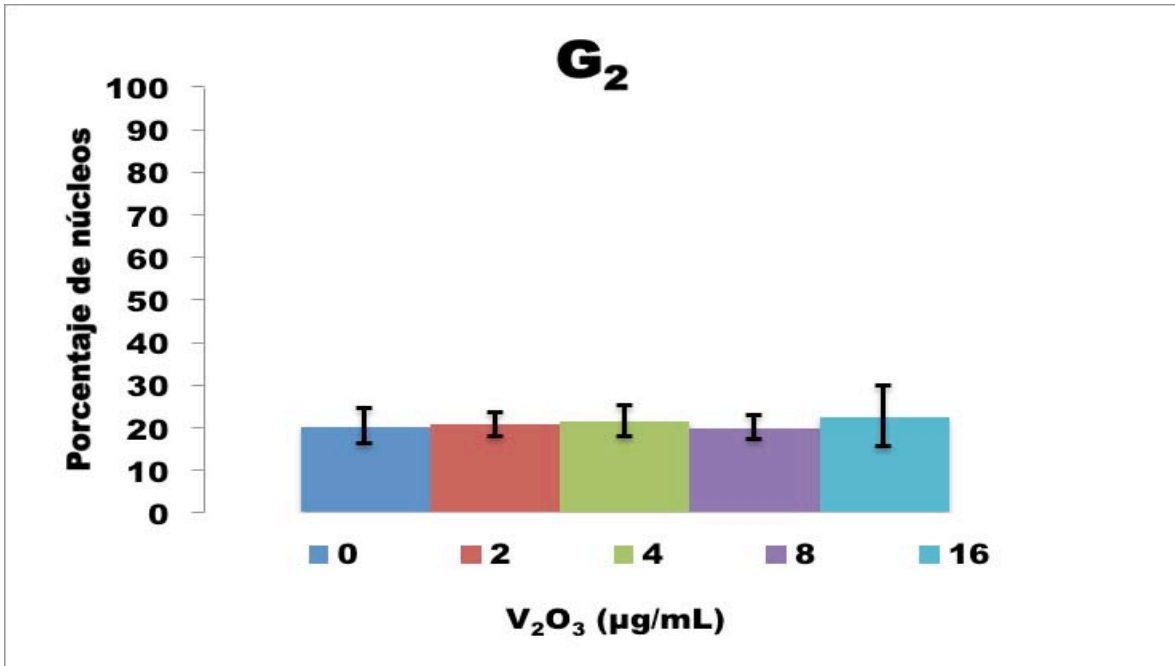


**Figura 5.** Porcentaje de núcleos en fase G<sub>1</sub> de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).

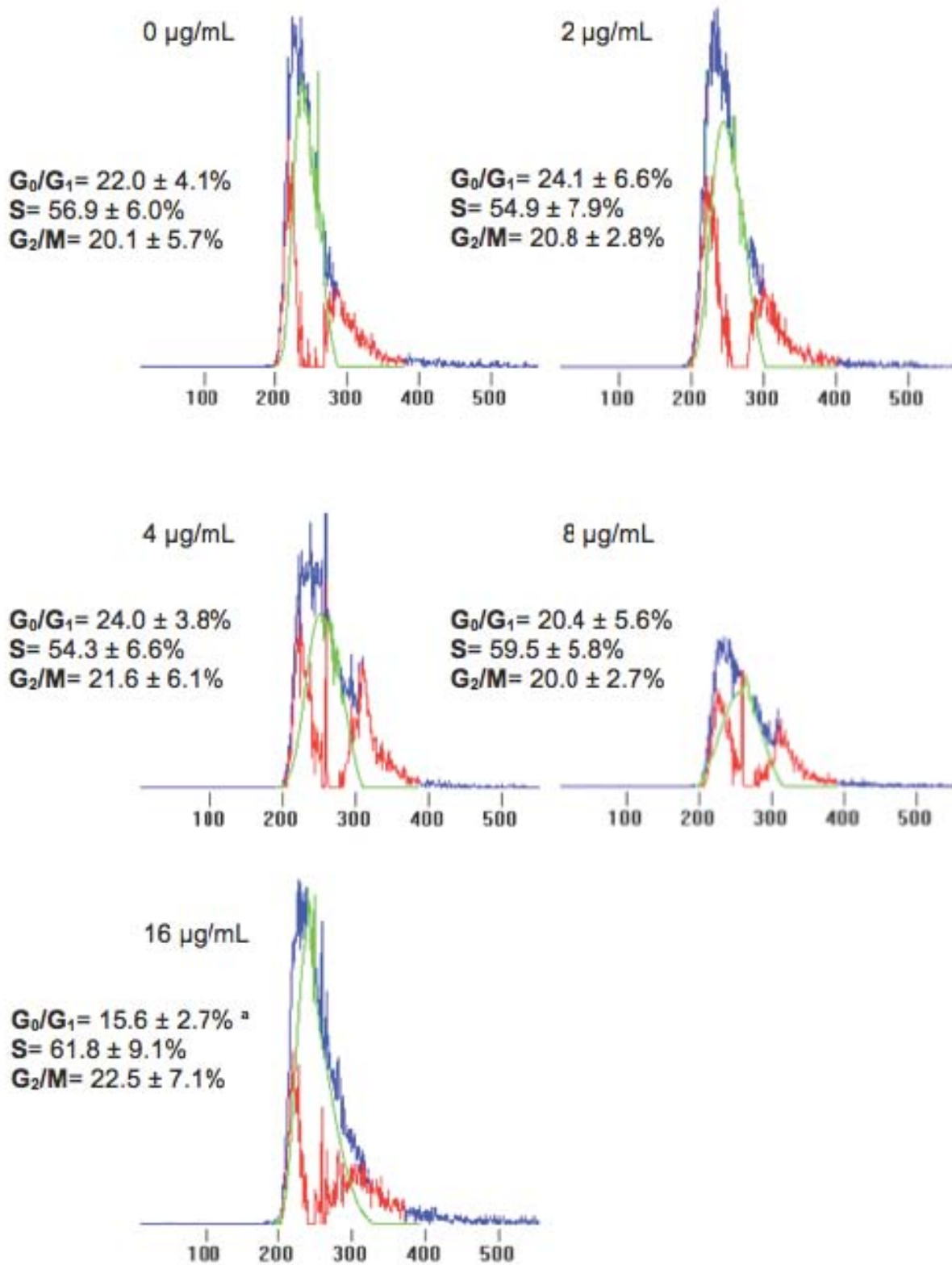


**Figura 6.** Porcentaje de núcleos en fase S de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes.





**Figura 7.** Porcentaje de núcleos en fase G<sub>2</sub> de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes.



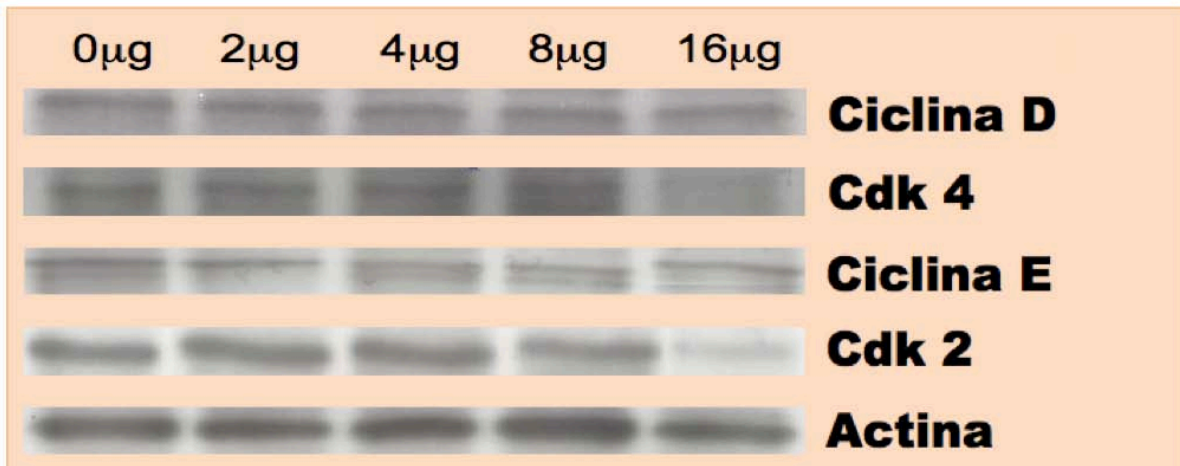
**Figura 8.** Porcentaje de núcleos en fase  $G_0/G_1$ , S y  $G_2/M$  de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_5$  por 48 horas. Se presenta la media  $\pm$  DE, de nueve experimentos independientes. a:  $p < 0.05$  vs. sin tratamiento, en su respectiva fase (t de Student).

### 7.3. Efecto del $V_2O_3$ sobre las proteínas de la fase $G_1$ .

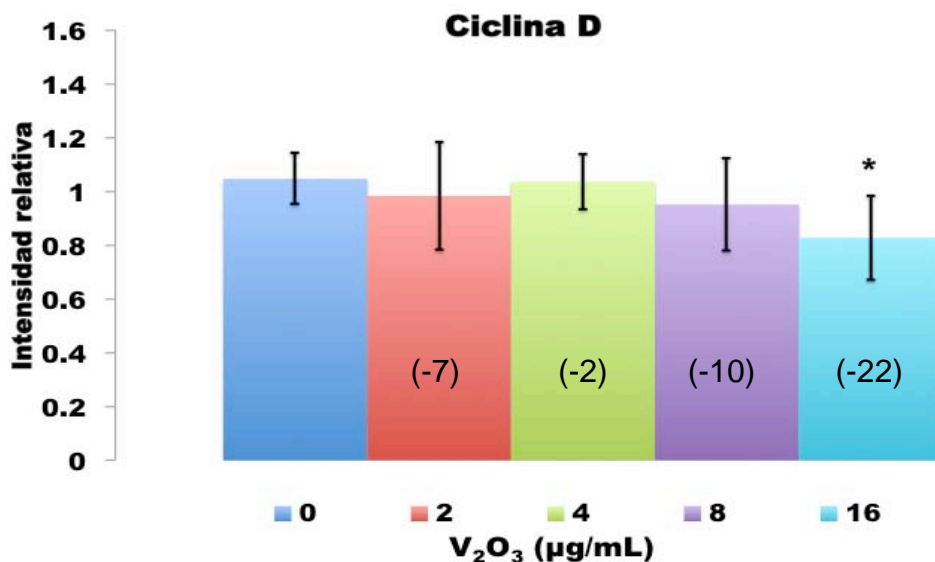
#### 7.3.1. Ciclina D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4 expuestas durante 24 horas.

La exposición del  $V_2O_3$  a los linfocitos humanos por 24 horas provocó disminución en los niveles de expresión de la proteínas ciclina D los cuales son significativos en la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$  en relación al grupo sin tratamiento como se muestra en la Figura 9 y 10, por otra parte Cdk4 presenta disminución conforme aumenta la concentración siendo significativa en las concentraciones de 2 y 16  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9 y 11).

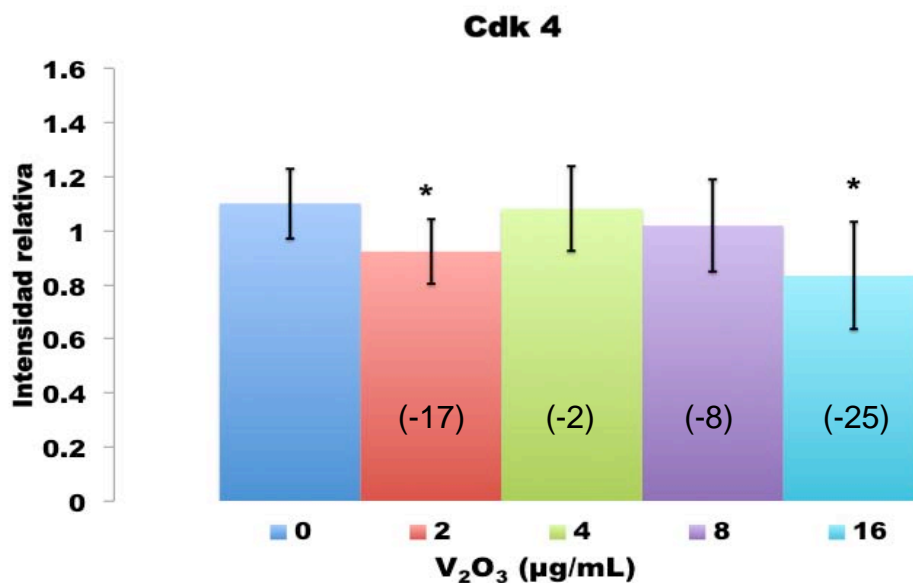
Como se puede observar en la Figura 9 y 12, la ciclina E presenta disminución en los niveles de expresión siendo representativo en la concentración 16  $\mu\text{g/mL}$  con respecto al grupo sin tratamiento, y en el caso de Cdk2 hay diferencia significativa en las concentraciones de 2, 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9 y 13).



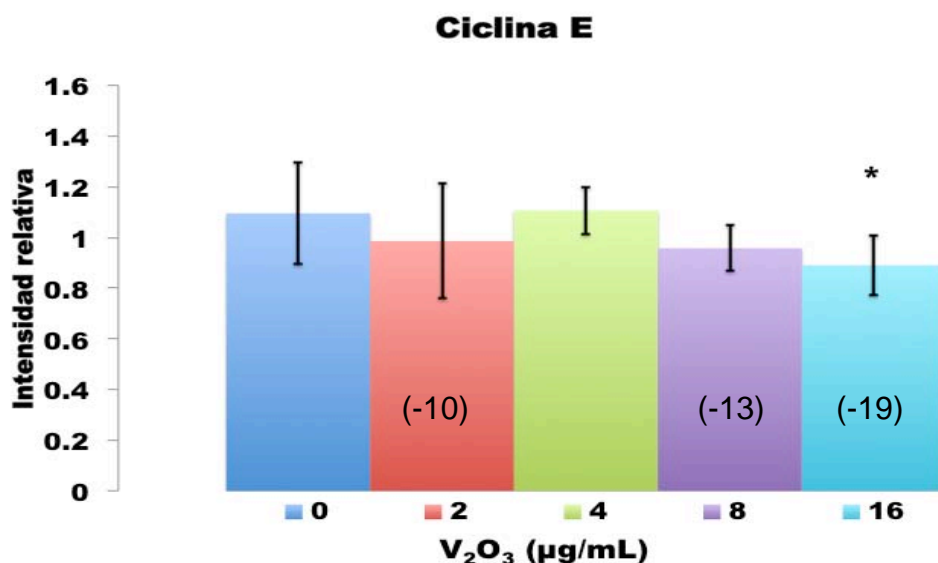
**Figura 9.** Niveles de las proteínas ciclina D, Cdk4, ciclina E, Cdk2 y actina de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  durante 24 horas, en todos los casos se presenta disminución en las concentraciones.



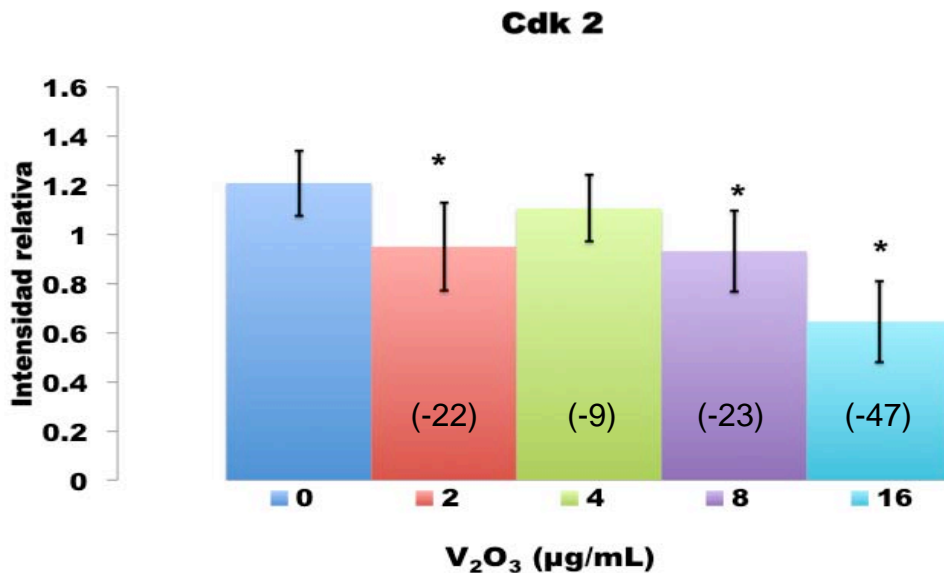
**Figura 10.** Intensidad relativa de la proteína ciclina D de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



**Figura 11.** Intensidad relativa de la proteína Cdk4 de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



**Figura 12.** Intensidad relativa de la proteína ciclina E de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  por 24 horas. se presenta la media  $\pm$  DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (t de Student).

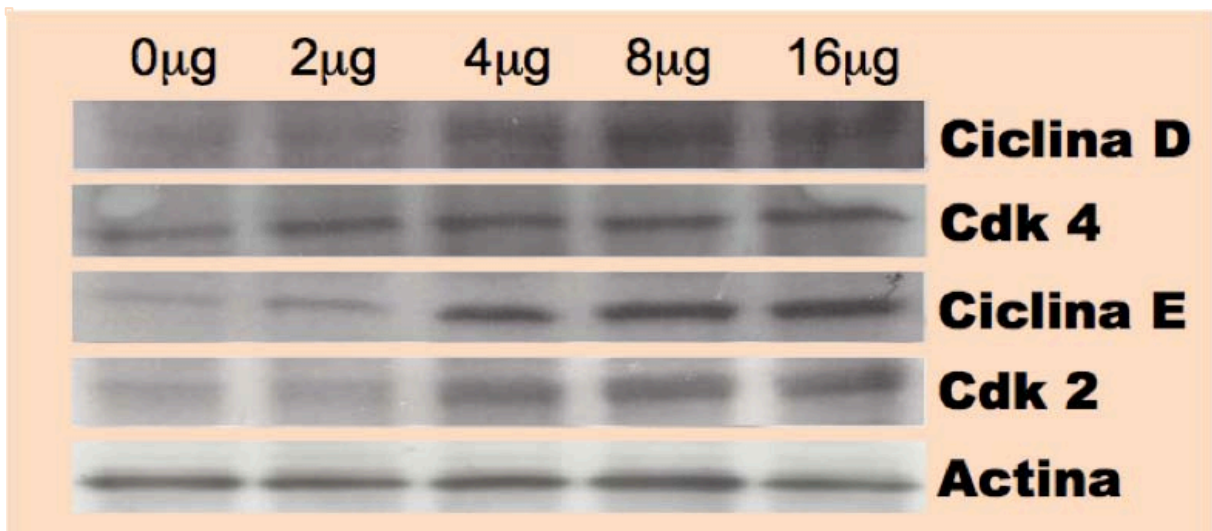


**Figura 13.** Intensidad relativa de la proteína Cdk2 de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  por 24 horas. se presenta la media  $\pm$  DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (t de Student).

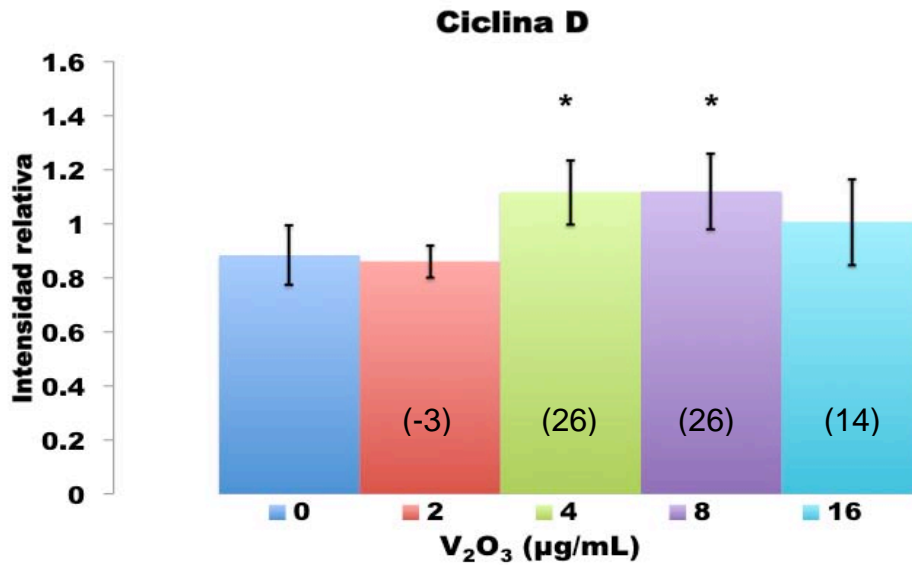
### 7.3.2. Ciclina D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4 expuestas durante 48 horas.

A diferencia de lo observado en los tratamientos de 24 horas, la administración de  $V_2O_3$  por 48 horas a los cultivos de linfocitos humanos incrementó los niveles de expresión de la ciclina D siendo significativo en la concentración de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 14 y 15). Los niveles de Cdk4 presentan disminución en las concentraciones de 2 y 16  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 14 y 16).

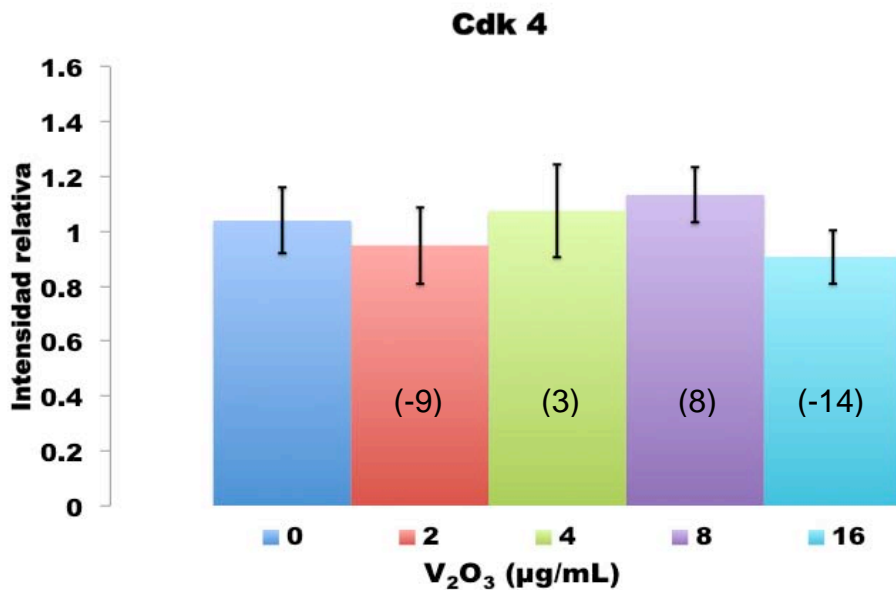
Al igual que la ciclina D, en la ciclina E aumentan los niveles de expresión siendo estadísticamente diferente en la concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 14 y 17). Para Cdk2, se observó aumento significativo en la concentración de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$  en comparación con el grupo sin tratamiento (Figura 14 y 18).



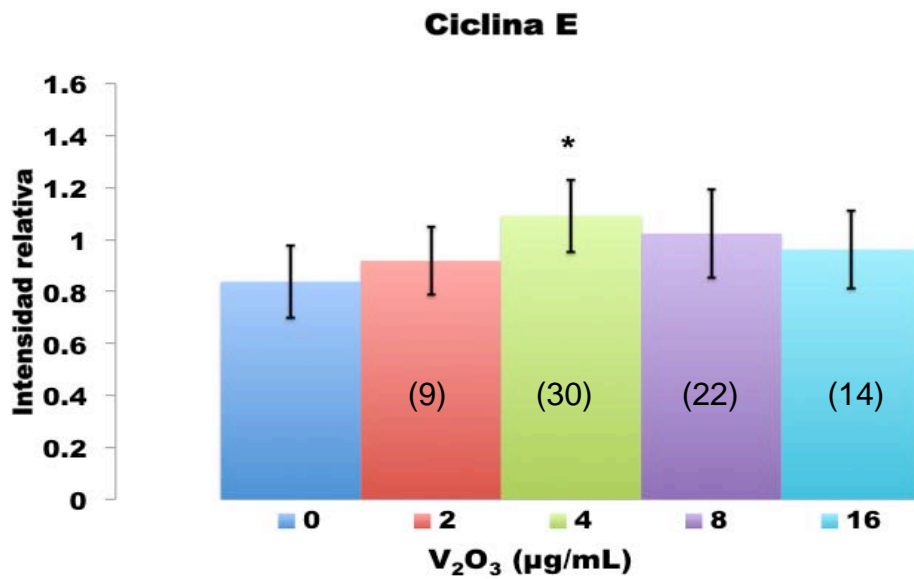
**Figura 14.** Niveles de las proteínas ciclina D, Cdk4, ciclina E, Cdk2 y actina de los cultivos de linfocitos humanos tratados con  $V_2O_3$  durante 48 horas, en todos los casos se presenta aumento en las concentraciones de 4, 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$ .



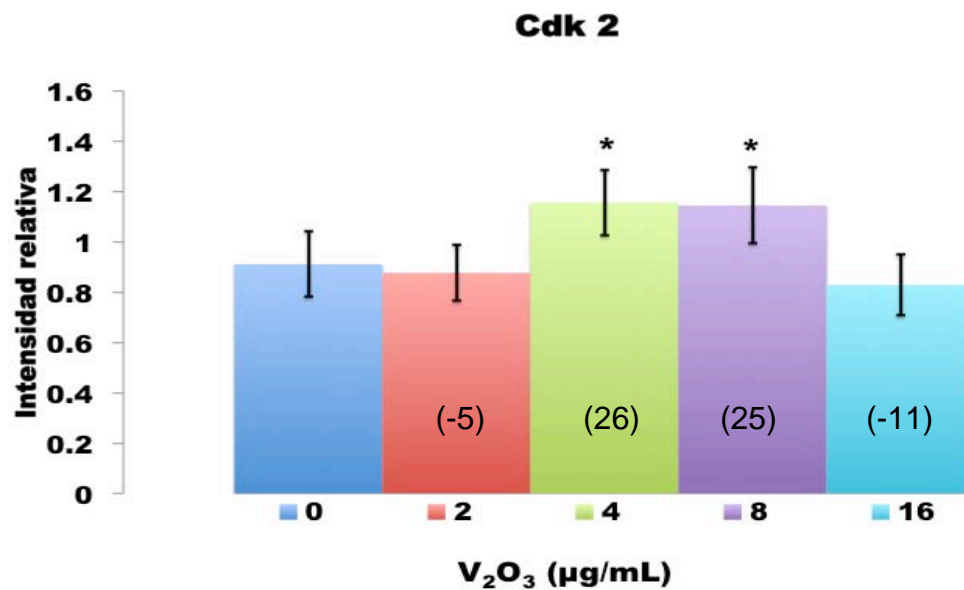
**Figura 15.** Intensidad relativa de la proteína ciclina D de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



**Figura 16.** Intensidad relativa de la proteína Cdk4 de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento.



**Figura 17.** Intensidad relativa de la proteína ciclina E de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



**Figura 18.** Intensidad relativa de la proteína Cdk2 de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 horas. se presenta la media ± DE, de nueve experimentos independientes. los datos entre paréntesis demuestran en porcentaje la diferencia en relación al grupo sin tratamiento. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (t de Student).



## 8. Discusión

En éste trabajo se observó que la administración de  $V_2O_3$  a los cultivos de linfocitos humanos durante 24 y 48 horas de exposición no afecta la viabilidad celular, sin embargo, éste fue capaz de modificar el contenido de ADN de la fase  $G_1$  y  $S$  a las 24 horas, así como, los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2, Cdk4 en ambos tiempos.

### 8.1. Viabilidad Celular

La prueba de viabilidad con dos fluorocromos (CFDA-BrEt) permite identificar la integridad de la membrana y la actividad enzimática celular, debido a que CFDA es permeable a la membrana y al interactuar con las esterasas en el citoplasma producen fluorescencia verde, mientras que Br-Et solo ingresa a la célula si la membrana está dañada logrando así intercalarse en los ácidos nucleicos dando fluorescencia de color rojo (Strauss, 1991; Masson-Meyers *et al.*, 2016). En el presente trabajo se observó que la administración del  $V_2O_3$  no modifica la viabilidad celular ya que el porcentaje en todos los tratamientos fue superior al 90% en los diferentes tiempos de exposición, éste efecto ha sido observado en cultivos de leucocitos humanos que fueron tratados con  $V_2O_3$  y las mismas concentraciones por 24 horas (Mateos-Nava *et al.*, 2016), asimismo, cuando administraron  $V_2O_3$ ,  $V_2O_4$  o  $V_2O_5$  a cultivos de leucocitos humanos en concentraciones de 1, 2, 4 ó 8  $\mu\text{g/mL}$  por lapsos de 2, 4 ó 6 horas de tratamiento no indujo cambios en la viabilidad (Rodríguez-Mercado, 2006; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011).

De igual manera, Rojas *et al.*, (1996) observaron que la administración de  $V_2O_5$  en concentraciones de 0.3, 30 ó 3000  $\mu\text{M}$  por 2 horas a leucocitos y por 24 horas a linfocitos humanos la viabilidad superaba el 95% evaluada mediante la técnica con azul de tripano. Mateos-Nava (2012) con el mismo modelo de linfocitos humanos y la misma técnica de fluorocromos administró  $V_2O_5$  a diferentes concentraciones el porcentaje de viabilidad rebasa el 90%, indicando que la acción de los óxidos dependen de la concentración y el tiempo de exposición.

Si bien en éste trabajo se demostró que el  $V_2O_3$  no afecta la viabilidad, existen estudios en donde mencionan que tiene comportamiento citostático, es decir modifica la proliferación por lo que se realizó la determinación del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo para conocer si en alguna en específico la retrasa (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011; Mateos-Nava *et al.*, 2016).

## **8.2. Efectos del vanadio sobre el ciclo celular.**

El análisis del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo demostró que la administración de  $V_2O_3$  por 24 horas a cultivos de linfocitos humanos aumenta el número de núcleos que se encuentran en la fase  $G_1$  a las concentraciones de 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ , en cambio, en la fase S todas las concentraciones presentaron disminución; a las 48 horas de tratamiento solo en la concentración de 16  $\mu\text{g/ml}$  en la fase  $G_1$  presentó reducción. Estos efectos causados por el V, además, pueden estar relacionados con la expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 responsables de la transición de la fase  $G_1/S$ .

Rodríguez-Mercado (2006) demostró que los linfocitos tratados con óxidos de vanadio ( $V_2O_3$ ,  $V_2O_4$  y  $V_2O_5$ ) en concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  durante 4 horas de exposición no presentaron diferencias en relación al grupo sin tratamiento, aunque se redujo el número de núcleos que entraban en la fase S.

El retraso en la proliferación inducido por los compuestos de V ha sido estudiado en líneas celulares en donde se presentan resultados distintos, por ejemplo, en células humanas de adenocarcinoma de mama (MCF7) tratadas con metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) en concentraciones de 100, 175 y 250  $\mu\text{M}$  por 48 horas el retraso se presenta en la transición de  $G_1$  a S (Ray *et al.*, 2006). Pero cuando se trataron a las de epidermis de ratón (C141) con 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaVO}_3$  por 6, 12, 24 y 48 horas se observó que se detenían en la fase S (Zhang *et al.*, 2002, 2004), lo mismo observó Yang *et al.*, (2016) en células carcinoma escamoso de esófago (EC109) con éste compuesto, que el retraso se presentaba en la fase S.

Por otra parte, en células de adenocarcinoma humano (AsPC-1) tratadas con  $\text{NaVO}_3$  y bisacetilacetato de vanadilo  $\text{VO}(\text{acac})_2$  con 100 y 200  $\mu\text{M}$  por 16 horas causaron

detención en la fase G<sub>2</sub>/M presentando mayor número de células en dicha fase (Wu *et al.*, 2016). Por otra parte en células de hepatocitos humanos (HepG2) tratadas con VO(acac)<sub>2</sub> en concentraciones de 62.5, 125 y 250 µM durante 24 horas de exposición el porcentaje de células en la fase G<sub>1</sub> fue superior con respecto al grupo sin tratamiento (Fu *et al.*, 2008).

Lo anterior sugiere que el retraso en la proliferación inducido por el V depende del compuesto, la concentración, el tiempo de exposición y el tipo de células, además, se realizó el análisis de los niveles de las proteínas que regulan el ciclo celular, por lo que en éste trabajo se continuó con la evaluación de los niveles de expresión de las proteínas en específico con las que controlan la fase G<sub>1</sub> y transición a la fase S.

### **8.3. Modificación de los niveles de las proteínas ciclina y CDK**

Como se mencionó anteriormente las ciclinas y Cdk forman complejos para realizar su función, sin embargo, las ciclinas se presentan periódicamente a lo largo del ciclo celular a diferencia de las Cdk que son constantes y los resultados de éste trabajo muestran que los niveles de las Cdk2 y Cdk4 son menores en comparación de su ciclina respectiva, esto podría deberse a la interacción que presentan las Cdk con otras proteínas. Blomen y Boonstra (2007) mencionan que para la fosforilación de pRb se necesita cierto umbral de concentración específico el cual posiblemente no es alcanzado por los niveles bajos de las proteínas analizadas en éste trabajo, de manera que las células no progresan a la fase S de forma normal.

El presente estudio se demostró que los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 disminuyen con 24 horas de exposición al V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pero con 48 horas se incrementan esto con respecto al grupo sin tratamiento.

En estudios realizados con células EC109 tratadas con NaVO<sub>3</sub> presentaron bajos niveles de expresión de la ciclina D y niveles altos de caspasa 3 causados por los compuestos del V (Yang *et al.*, 2016). Fu *et al.*, (2008) demostró que las células HepG2 tratadas con VO(acac)<sub>2</sub> disminuyen los niveles de expresión de la ciclina D, E y A.

Además, la administración de  $V_2O_5$  a cultivos de linfocitos humanos disminuye los niveles de expresión de las proteínas ciclina D y Cdk4, e incrementa a la ciclina E y Cdk2 (Mateos-Nava, 2012).

También se ha visto que la Cdk4 comienza a proteolizarse cuando termina su función, al contrario de la ciclina D1 la cual no lo hace por completo, ya que puede ser requerida más adelante si es que la célula llega a ser quiescente e intenta reiniciar la proliferación (Malumbres y Barbacid, 2009).

Es importante destacar que si la ciclina D estuviera ausente, la ciclina E tendría la capacidad suficiente para promover el inicio del ciclo celular, ya que la fosfatasa cdc25A remueve grupos fosfatos inhibidores de Cdk2 y permitiendo la formación del complejo ciclina E/Cdk2, que culmina la inactivación de la proteína pRb y también ejerce una acción cinasa sobre p107 y p130 (los otros dos miembros de la familia Rb) además de fosforilar parte de la maquinaria de replicación como la proteína cdc6, la ciclina E/cdk2 ha desarrollado un modelo cinético para explicar cómo p27 puede ser tanto un inhibidor y un sustrato de la ciclina D/Cdk4, Cdk6 (Quezada-Ramírez, 2007).

Algunos autores observaron sobreexpresión de p21 en células C141, EC109 y AsPC-1 tratadas con  $NaVO_3$  y  $VO(acac)_2$  esto podría estar relacionado con el daño al ADN que a su vez éste activando el punto de control de  $G_1/S$  (Zhang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016).

Las proteínas evaluadas indican disminución en el tratamiento de 24 horas y sobreexpresión en el tratamiento de 48 horas, por lo que la proliferación puede estar tardando el doble del tiempo necesario para cumplir un ciclo, además, se observó que los núcleos que entraban en fase S eran pocos en relación al grupo sin tratamiento en los cultivos tratados durante 24 horas y los expuestos por 48 horas no presentan cambios, lo que podría confirmar que hasta las 48 horas las células son capaces de proliferar. En estudios donde evaluaron el tiempo promedio de proliferación celular se observa que las células tratadas con  $V_2O_3$  en promedio tardan más de 30 horas para completar un ciclo (Mateos-Nava *et al.*, 2016).

## 9. Conclusiones

- Se observó que la administración de  $V_2O_3$  a los diferentes tiempos no afecta la viabilidad celular.
- El  $V_2O_3$  induce cambios en el porcentaje de núcleos encontrados en fase S tratadas durante 24 horas.
- El  $V_2O_3$  tiene la capacidad de disminuir los niveles de las proteínas ciclina D y E y sus respectivas compañeras Cdk2 y Cdk4, lo cual sugiere que la modificación está implicada en el retraso de la proliferación celular.
- Es probable que el  $V_2O_3$  no solo interactúe con las proteínas de la fase  $G_1$ , por lo que sería interesante analizar los niveles de expresión de las siguientes fases del ciclo celular.

## 10. Perspectivas

Sería importante evaluar la actividad cinasa de los complejos ciclina/Cdk para saber si el  $V_2O_3$  interactúa con estas proteínas, ya que como se menciona tiene afinidad por aquellas que dependen del ion fosfato como son las cinasas.

Finalmente resultaría interesante conocer si el  $V_2O_3$  es capaz de interactuar con las proteínas de las fases subsecuentes como es la ciclina A, B, Cdk1, así como, reguladores del ciclo como p27 que tiene la capacidad de inhibir al complejo ciclina/cdk u otros mecanismos por los que retrasen el ciclo como puede ser la transcripción genética.

## 11. Referencias Bibliográficas

- Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K y Walter P. (2009). *Biología Molecular de la Célula*. 5ª Ed. Omega. Barcelona, p. 1054-10101.
- Altamirano-Lozano M.A., Álvarez-Barrera L., Mateos-Nava R.A., Fortoul T.I. y Rodríguez-Mercado J.J. (2014). Potential for genotoxic and reprotoxic effects of vanadium compounds due to occupational and environmental exposures: An article based on a presentation at the 8yh International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15-18, 2012. *J. Immunotoxicol.* 11:19-27.
- Baran E.J. (2000). Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *J. Inorg. Biochem.* 80:1-10.
- Barceloux D.G. (1999). Vanadium. *Clin. Toxicol.* 37:265–278.
- Baroch E.F. (2013). Vanadium and vanadium alloys. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology*. 1-18. DOI: 10.1002/0471238961.22011401.a01.pub3.
- Blomen V.A. y Boonstra J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64:3084-3104.
- Byrne A.R. y Kosta L. (1978). Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci. Total. Environ.* 10:17-30.
- Cantley L.C., Cantley L.G. y Josephson L. (1978). Vanadate inhibits the red cell (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature.* 272:552-4.
- Cannistra S.A. y Griffin J.D. (1988). Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Semin. Hematol.* 25:173-188.
- Chang R. (2007). *Metalurgia y la química de los metales*. En: *Química*. Novena edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. 894-933.
- Care A., Testa U., Bassani A., Tritarelli E., Montesoro E., Samaggia P., Cianetti L. y Peschle C. (1994). Coordinate Expression and Proliferative Role of HOXB Genes in Activated Adult T Lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 14:4872-4877.
- Cornelis R. y Nordberg M. (2007). *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier. Belgic. 29-35.
- Cui B., Li L., Zeng Q., Lin F., Yin L., Liao L., Huang M. y Wang J. (2017). A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine

- secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *J. Nat. Med.* 71:409-421.
- Crans D.C., Robin I. y Theisen L.A. (1989). Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111:7597-7607.
- Daley B., Doherty A.T., Fairman B. y Case C.P. (2004). Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* 86:598-606.
- Darzynkiewicz Z. y Huang X. (2004). Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 5.7.1-5.7.18.
- EFSA. European Food Safety Authority. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA J.* 33:1-22.
- EPA. Environmental Protection Agency. (2011). Toxicological Review of Vanadium Pentoxide ( $V_2O_5$ ). Washington, DC. 1-103.
- Elinder C.G., Gerhardsson L. y Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. En: *Biological monitoring of toxic metals* (W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 1-71.
- Escribano-Diaz C., Orthwein A., Fradet-Turcotte A., Xing M., Young J.T., Tkac J., Cook M.A., Rosebrock A.P., Munro M., Canny M.D., Xu D. y Durocher D. (2013). A cell cycle dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell.* 49:872–883.
- Fortoul T.I. (2013). *Histología y Biología Celular*. McGraw Hill. Mexico. 359.
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sanchez I., Lopez I.E., Bizarro P., Mendoza M.L., Osorio L.S., Espejel-Maya G., Avila-Casado M. del C., Avila-Costa M.R., Colin-Barenque L., Villanueva D.N. y Olaiz-Fernandez G. (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health.* 57:446-449.
- French R.J. y Jones J.H. (1993). Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif. Sci.* 52:339-346.



- Fu Y., Wang Q., Yang X.G., Yang X.D. y Wang K. (2008). Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:1001-1009.
- Fu F. y Wang Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92:407-418.
- Furukawa Y., Piwnica-Worms H., Ernst T.J., Kanakura Y. y Griffin J.D. (1990). cdc2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science.* 250:805-8008.
- García-Pérez H.M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico.* 1:31-41.
- Gioka C., Bourauel C., Zinelis S., Eliades T., Silikas N. y Eliades G. (2004). Titanium orthodontic brackets: structure, composition, hardness and ionic release. *Dent. Mater.* 20:693-700.
- Hallab N.J., Caicedo M., Finnegan A. y Jacobs J.J. (2008). Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J. Orthop. Surg. Res.* 3:1-11.
- Hansen T.V., Aaseth J. y Alexander J. (1982). Chelating Agents on Vanadium Distribution in the Rat Body and on Uptake by Human Erythrocytes. *Arch. Toxicol.* 50:195-202.
- Heinemann G., Fichtl B. y Vogt W. (2003). Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *J. Clin. Pharmacol.* 55:241-245.
- Hernández H. y Rodríguez R. (2012). Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environ. Monit. Assess.* 184:5327-5342.
- Imtiaz M., Rizwan M.S., Xiong S., Li H., Ashraf M., Shahzad S.M., Shahzad M., Rizwan M. y Tu S. (2015). Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. *Environ. Intern.* 80:79–88.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organisation, Ginebra, No. 29.

- IUPAC. International Union of Pure Applied Chemistry. (2013). Atomic weights of the elements 2011 (IUPAC Technical Report). *Química Pura y Aplicada*. 85:78-1047.
- Johnson D.G. y Walker C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295-312.
- Kiss T., Kiss E., Garribba E. y Sakurai H. (2000). Speciation of insulin-mimetic VO (IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.* 80:65-73.
- Korbecki J., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I. y Chlubek D. (2012). Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim. Pol.* 59:195-200.
- Kordowiak A.M. y Holko P. (2009). Vanadium Derivatives as Compounds of High Biological Significance. Part I. *Postepy. Biol. Komorki.* 3:362-376.
- Kurien T. y Scofield R. (2006). Western blotting. *Methods.* 38:283-293.
- Li M., Ding W., Baruah B., Crans D.C. y Wang R. (2008). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 102:1846-1853.
- Lomonte B. (2007). Electroforesis en gel de poliacrilamida. En: *Manual de métodos inmunológicos*. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 138.
- López-Ortiz J.B. y Márquez-Fernández M.E. (2002). *Modelo Experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 140.
- Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A. (2016). Premature chromatid separation and altered proliferation of human leukocytes treated with vanadium (III) oxide. *Drug. Chem. Toxicol.* DOI: 10.1080/01480545.2016.1260582.
- Mateos-Nava R.A. (2012). Efectos del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y CDK de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de Maestría. UNAM FES Zaragoza. México. 78.
- Malumbres M. y Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature. Rev.* 9:153-167.
- Masson-Meyers D.S., Bumah V.V. y Enwemeka C.S. (2016). A comparison of four methods for determining viability in human dermal fibroblasts irradiated with blue light. *J. Pharmacol. Métodos. Toxicol.* 79:15-22.

- Mejía J.A., Rodríguez R., Armienta A., Mata E. y Fiorucci A. (2007). Aquifer Vulnerability Zoning, an Indicator of Atmospheric Pollutants Input? Vanadium in the Salamanca Aquifer, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* 185:95-100.
- Miramand P. y Fowler S. (1998). Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organism. En: *Vanadium in the environmental. Parte I y II* (J.O. Nriagu, Ed.). Wiley, Nueva York.
- Moreno-Sánchez R. y Devars S. (1999). Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En: Cervantes C y Moreno-Sanchez R (Eds). *Contaminacion ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos*, AGT Editor. Mexico. 1-10.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. y Chatterjee M. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 21:135-143.
- Narayan R.J. (2005). Nanostructured diamondlike carbon thin films medical applications. *Materials. Sci. Engin. C.* 25:405-416.
- Nechay N.R., Nanninga L.B. y Nechay S.E. (1986). Vanadyl (VI) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligand; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:128-138.
- Nriagu J. (1990). Global metal pollution: poisoning the biosphere. *Environment.* 32:7-11.
- Nriagu J. (1998). *Vanadium In The Environment Part Two*. John Wiley & Sons. EUA. 403.
- Owusu-Yaw J., Cohen M.D., Fernando S.Y. y Wei C.I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327–336.
- Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Álvarez-Uría M., Fraile B., Anadón R. y Sáez F. (2007). Ciclo vital de la célula En: *Biología Celular*. Mc Graw Hill Interamericana. España. 346-347.
- Pessoa J.C., Etcheverry S. y Gambino D. (2014). Vanadium compounds in medicine. *Coord. Chem. Rev.* 301:24-48.
- Quezada-Ramírez M.A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Contactos.* 65:5-12.

- Ramírez P., Easstmond D.A., Laclette J.P. y Ostrosky- Wegman P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386:291-298.
- Ray R.S., Rana B., Swami B., Venu V. y Chatterjee M. (2006). Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chem. Biol. Interact.* 163:239-247.
- Ringelband U. y Hehl O. (2000). Kinetics of Vanadium Bioaccumulation by the Brackish Water Hydroid *Cordylophora caspia* (pallas). *Bull. Environ. Toxicol.* 65:486-493.
- Rodríguez-Gómez A.J. y Frías-Vásquez S. (2014). La mitosis y su regulación. *Acta. Pediatr. Mex.* 35:55-86.
- Rodríguez-Mercado J.J. (1996). Genotoxicidad inducida *in vitro* por sales de vanadio en cromosomas de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura. UNAM FES-Zaragoza. México. 58.
- Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A. (2006). VANADIO: CONTAMINACIÓN, METABOLISMO Y GENOTOXICIDAD. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J. (2006). Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Tesis de Doctorado. UNAM FES-Zaragoza. México. 99.
- Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L. y Altamirano-Lozano M.A. (2010). Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug. Chem. Toxicol.* 33:97-102.
- Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A. y Altamirano-Lozano M.A. (2011). DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol. Vitro.* 25:1996-2002.
- Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M. y Ostrosky-Wegman P. (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 359:77-84.

- Sharma R.P., Flora J.S., Drown D.B. y Oberg S.G. (1987). Persistence of vanadium compounds in lungs after intracheal instillation in rats. *Toxicol. Ind. Health.* 3:321-329.
- Sherr C.J. y Roberts J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
- Stewart K.K. y Ebel R.E. (2000). Electrophoresis and other electrokinetic separations. En: *Techniques in Analytical Chemistry. Chemical Measurements in Biological Systems.* John Wiley and Sons, Inc., Publication. USA. 259.
- Strauss G.H.S. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic. and immunotoxic. effects. *Mutat. Res.* 252:1-15.
- Suviolahti E., Petrosyan A., Mirocha J., Ge S., Karasyov A., Thomas D., Galera O., Lim W., Jimenez A.M., Czer L.S., Chaux G., De Leon J., Pao A., Jordan S.C. y Toyoda M. (2012). Significant reduction of ATP production in PHA-activated CD4<sup>+</sup> cells in 1-day-old blood from transplant patients. *Transplantation.* 94:1243-1249.
- Tamma S.M., Kalyanaraman V.S., Pahwa S., Dominguez P. y Modesto R.R. (2003). The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Leukoc. Biol.* 73:682-688.
- Tucker J.D. y Preston R.J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.
- Vanitec (2016). <http://vanitec.org/>. En línea 23/12/2016 1:12 pm
- Wayne M., Lewis J. y Jeff H. (2007). *El mundo de la célula.* Pearson Education. México. 970.
- WHO. World Health Organization. (1990). Vanadium and some vanadium salts. International Programme on chemical safety (IPCS). *Environmental. Health. Criteria.* 42.
- Wu J.X., Hong Y.H. y Yang X.G. (2016). Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained

- MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8:919-929.
- Yang J., Zhang Z., Jiang S., Zhang M., Lu J., Huang L., Zhang T., Gong K., Yan S., Yang Z., y Shao G. (2016). Vanadate-induced antiproliferative and apoptotic response in esophageal squamous carcinoma cell line EC109. *J. Toxicol. Env. Health. Part. A.* 79:864-868.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L. y Shi X. (2001). Vanadate- induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen especies. *Arch. Biochem. Biophys.* 392:311-320.
- Zhang Z., Huang C., Li J. y Shi X. (2002). Vanadate- induce cell growth arrest is p53- dependent through activation of p21 in C141 cells. *J. Inorg. Biochem.* 89:142-148.
- Zhang Z., Gao N., He H., Huang C., Luo J. y Shi X. (2004). Vanadate active Akt and promoted S phase entry. *Mol. Cell. Biochem.* 255:2227-237.
- Zwolak I. (2014). Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: a review of in vitro studies. *Métodos. Mech. Toxicol.* 24:1-12.

## 12. Anexos:

Éste trabajo fue presentado parcialmente en:

**Evento:** XII Congreso de Investigación de la Fes Zaragoza

**Título de ponencia:** Evaluación de los niveles de las proteínas ciclina D, E, Cdk 2 y Cdk 4 de linfocitos humanos tratados *in vitro* con trióxido de vanadio

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

ISSN 2395-8723

# *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*

Suplemento del Vol. 19, No. 2, 2016

## 12<sup>o</sup> CONGRESO de INVESTIGACIÓN

Del 17 al 21 de Octubre de 2016



REUNIÓN CIENTÍFICA DEL  
GRUPO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN EN SECCION  
EDULE EN MÉXICO, A.C.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
División de Estudios de Posgrado e Investigación, Coordinación  
de Trayectoria Escolar de las Ciencias Químico-Biológicas  
y de las Ciencias de la Salud y del Comportamiento



40 años  
aniversario  
1976-2016