



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

Efecto del pentóxido de vanadio sobre los niveles de la proteína Cdc25C de linfocitos humanos tratados *in vitro*

Tesis

Que para obtener el título de
Biólogo

Presenta

Esaú Frías Jiménez

Director de tesis

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Ciudad de México, Octubre 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.

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo del proyecto UNAM DGAPA PAPIIT IN224916, bajo la dirección del Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, jefe de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza y con la asesoría del Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava.

Agradecimientos

Primeramente, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme la oportunidad de poder crecer académica, intelectual y personalmente.

A los miembros del jurado

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

M. en B.R.A. María Judith Villavicencio Macías

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Por sus observaciones que permitieron mejorar este trabajo.

Al Dr. Mario Altamirano, jefe de la Unidad de Investigación en Genética y toxicología Ambiental (UNIGEN) de la Fes Zaragoza, por los consejos, paciencia, apoyo y permitirme formar parte de esta Unidad, gracias.

A los Doctores Juan José y Lucila por sus comentarios en la realización de este trabajo y por su disposición que siempre han mostrado para resolver las dudas surgidas.

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

Al Dr. Arturo Valle Mendiola por el apoyo en la estandarización de la técnica Western Blot.

A la Biól. Guadalupe Gómez García por su asistencia técnica en la adquisición de datos del Citómetro de Flujo.

Dedicatorias

A mis padres (Tomas y Ana Lilia) por siempre estar conmigo y apoyarme en todas mis decisiones pero en especial a mi madre porque sin ella nunca podría haber logrado esto, y aunque nunca lo digo, te quiero mucho mama.

A mis hermanos, Rodrigo, Ulises, Paulette y Gabriela, por sus consejos, compañía y comprensión.

A la Dra. Patricia Rivera, porque más que mi profesora se convirtió en una gran amiga. Muchas gracias por todo su apoyo y comprensión.

Al Dr. Aníbal, por su amabilidad, consejos, disponibilidad y apoyo para este trabajo.

A mi querido amigo Cesar, por su gran amistad y sinceridad.

A Gorka, Kathya, Iván, Mario y Daniela, por ser los mejores amigos que pude tener en mi etapa preparatoria.

A todos los que forman el grupo Kannabis, por ser grandes compañeros y amigos y regalarme gratas tardes de Fútbol.

A Alexandre, por siempre escucharme; muchas gracias por todos tus consejos que aunque nunca los siga siempre los tengo presente.

Lista de Abreviaturas

V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
NaVO ₃	metavanadato de Sodio
Cdc25C	Ciclo de división celular 25 isoforma C
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
E2F	Factor de transcripción que se une al gen <i>E2</i>
MAPK	Proteína Cinasa Activadora de Mitógenos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
(VO(aca) ₂)	Bisacetilacetato de vanadilo
pRB	Proteína del Retinoblastoma
MN	Micronúcleos
p-Cdc25C	Ciclo de división celular 25 isoforma C fosforilada en la serina 216

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Metales	3
2.1.1. Vanadio (V)	3
2.1.2. Vías de exposición de los organismos al V	4
2.1.3. Toxicidad	5
2.1.4. Pentóxido de vanadio (V_2O_5)	6
2.2. Ciclo celular	7
2.2.1. Puntos de control de las fases del ciclo celular	9
2.2.2. Cdc25C	9
2.3. Efectos del vanadio en el ciclo celular	10
2.4. Separación y detención de proteínas	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	15
5.1. General	15
5.2. Particulares	15
6. Material y Métodos	16
6.1. Reactivos	16
6.2. Separación y cultivo de linfocitos	16
6.3. Viabilidad	17
6.4. Contenido de ADN por citometría de flujo	18
6.5. Obtención y análisis de proteínas	18
6.6. Detección de proteínas	18
6.7. Análisis estadístico	19
7. Resultados	18
7.1. Efecto del V_2O_5 sobre la viabilidad celular	20
7.2. Efecto del V_2O_5 sobre el contenido de ADN	21
7.3. Efecto del V_2O_5 sobre las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C	23

8. Discusión	27
8.1. Efecto del V ₂ O ₅ sobre la viabilidad celular de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i>	27
8.2. Efecto del V ₂ O ₅ sobre el contenido de ADN de linfocitos humanos tratados <i>in vitro</i>	28
8.3. Efecto del V ₂ O ₅ sobre los niveles de Cdc25C p-Cdc25C de linfocito humanos tratados <i>in vitro</i>	29
9. Conclusiones	32
10. Referencias Bibliográficas	33

1. Resumen

El vanadio (V) es un metal que se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra y es liberado al ambiente a través de procesos naturales y antropogénicos, los seres humanos están expuestos a él principalmente por los alimentos que consume y de manera natural a través del aire, y se sabe que la exposición prolongada a este puede inducir al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Dentro de los compuestos que se liberan a la atmósfera se encuentra el pentóxido (V_2O_5), el cual es considerado un agente tóxico y posible cancerígeno para el ser humano.

En cultivos *in vitro* se ha demostrado que el V_2O_5 retrasa la proliferación evidenciado de manera citogenética por la disminución de los índices mitótico y de replicación.

El V interactúa con las diferentes moléculas biológicas y sus compuestos son potentes inhibidores de algunas enzimas como las cinasas y las fosfatasa por su parecido al ion fosfato, en especial con proteínas que regulan el ciclo celular como lo es la fosfatasa Cdc25C, no obstante, existe poca información sobre esta interacción empleando cultivos primarios por lo que en este trabajo se evaluó si la administración de V_2O_5 en concentraciones de 8, 16 ó 32 $\mu\text{g/mL}$ era capaz de modificar la proliferación de linfocitos humanos y los niveles de expresión de Cdc25C, a diferentes tiempos (3, 24 y 48 horas), para ello se obtuvieron muestras de sangre de tres donadores de la que se separaron los linfocitos y se realizaron los cultivos.

Primero, se determinó la viabilidad celular mediante fluorocromos, a continuación se evaluó 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 Cdc25C y p-Cdc25C con la técnica de western blot.

Los resultados mostraron que la administración de V_2O_5 no modificó la viabilidad de las células. Con respecto al contenido de ADN, se observó incremento en la fase G_1 y disminución en S para las 3 horas en la concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$. A las 24 horas se encontró disminución en 8 $\mu\text{g/mL}$ con respecto a S. Finalmente, en 48 horas no hubo cambios en ninguna fase.

Los niveles de expresión de cdc25C aumentaron en los cultivos de 3 horas sin ser

significativo, en cambio p-Cdc25C disminuyo en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En 24 y 48 horas Cdc25C sufrió disminución pero no fue significativa y p-Cdc25C disminuyo en 8, 16 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con base en lo anterior, se puede mencionar que la administración de V_2O_5 a linfocitos humanos no induce cambios en la viabilidad celular y tampoco sobre el contenido de ADN, pero disminuye los niveles de las proteínas Cdc25C y fosforilada (p-Cdc25C) en todos los tiempos de exposición, mientras que la relación entre Cdc25C y p-Cdc25C después del tratamiento con V_2O_5 demostró que Cdc25C se encuentra activa.

2. Introducción

2.1. Metales

La exposición de los seres vivos a metales y metaloides se ha incrementado resultado de las actividades antropogénicas principalmente por el procesamiento de minerales o el uso de combustibles fósiles, lo que ha llevado a observar correlación entre la presencia de sus partículas en el aire con la incidencia de enfermedades crónico degenerativas en residentes de áreas metropolitanas tal es el caso del V (Ramírez *et al.*, 1997). Ya sea por procesos naturales o causados por el hombre su emisión a la atmosfera ha incrementado la contaminación ambiental, induciendo alteraciones en esta y la salud humana. El problema radica en que estos no son degradados por los seres vivos tendiendo a acumularse (Duruibe *et al.*, 2007; Mateos-Nava 2012),

Dentro de la corteza terrestre se encuentran ampliamente distribuidos y algunos son micronutrientes esenciales como el calcio (Ca), el níquel (Ni), el zinc (Zn), el magnesio (Mg), el cobre (Cu), debido a que participan en el metabolismo celular, sin embargo, el arsénico (As), el cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el vanadio (V) y el plomo (Pb) se sabe que no son esenciales para el humano y su consumo, no importando que sea a muy bajas concentraciones puede resultar tóxico (Duruibe *et al.*, 2007; Nagajyoti *et al.*, 2010).

2.1.1. Vanadio (V)

El V es el elemento químico situado en el grupo 5 de la tabla periódica de los elementos (VB) con el símbolo (V), de número atómico 23, peso atómico 50.95, puntos de fusión 1950 °C y ebullición 3600 °C, con densidad de 6.11 g/m³, es caracterizado por ser dúctil y blando (Guevara-García, 1996; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Contreras-Cadena *et al.*, 2014), presenta estados de oxidación que van desde 3- a 5+, siendo los de 3+, 4+ y 5+ los más estudiados (Contreras-Cadena *et al.*, 2014). Es ampliamente utilizado en la minería, fabricación de aleaciones de acero, industria química, preparación de vidrio,

pinturas, colorantes fotográficos y de cinematografía, fungicidas e insecticidas y actualmente se le han encontrado aplicaciones en la medicina ya que disminuye los niveles de glucosa (Zhang *et al.*, 2002; Imtiaz *et al.*, 2015).

El V se distribuye ampliamente en la Tierra, con abundancia de 0.02% en la corteza terrestre, siendo el vigésimo segundo elemento más abundante ya que se puede encontrar en 68 minerales diferentes y es extraído principalmente en los países de Sudáfrica, Rusia y China, en el agua de mar su concentración oscila en los 35 nM. Se ha demostrado que la liberación del V al ambiente se debe a procesos naturales como las erupciones volcánicas, los aerosoles marinos e intemperismo de rocas, además de manera antropogénica con la quema de combustibles fósiles (Graciela-García, 2006; Imtiaz *et al.*, 2015), observándose altas concentraciones en la atmósfera de ciudades industrializadas en comparación con algunas zonas rurales, siendo los óxidos de éste metal los que están presentes (Tzu-Hsuen *et al.*, 2016).

En la biosfera la mayor proporción está en la flora y fauna marina aunque alcanza una importante concentración en hongos y otras especies terrestres menores, también aparece en bajas concentraciones en los alimentos: de 0.005 a 10.03 mg/kg en granos, carnes, productos lácteos y mariscos, 0.431 a 0.987 mg/kg para pimienta negra y semillas de eneldo. Algunos frutos, verduras y pescados pueden tener concentraciones mayores a 40 mg/kg y presentarse 400 veces más en hongos (Imtiaz *et al.*, 2015). Sin embargo, para los humanos no es un elemento esencial a diferencia de otros organismos, tal es el caso de las ratas y los pollos en donde es necesario para su crecimiento (Guevara-García, 1996).

Es por ello que se estima que tan solo para Reino Unido la ingesta diaria está en los 13 µg/día y de 6 a 18 µg/día para Estados Unidos. Su consumo puede variar entre género como es el caso de México y Alemania, estando para las mujeres entre 10 y 20 µg/día y >20 µg para los hombres (WHO, 2001).

2.1.2. Vías de exposición de los organismos al V

Con base en lo anterior, la entrada de este elemento al organismo es principalmente por los alimentos que se consumen, el aire que se respira y en menor cantidad por la piel. Se distribuye en el cuerpo a través de la sangre unido a la proteína transferrina y es capaz de acumularse en el hígado, los riñones, los huesos, los pulmones, el bazo, entre otros, su eliminación se da por la orina y muy poco en las heces (Heinemann *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004; Rehder, 2013). En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se ha observado que el V ingresa a la célula por medio de mecanismos de transporte aniónicos y en el citoplasma sufre procesos de óxido reducción por el glutatión y otros sustratos a los que se mantiene unido (Sabbioni *et al.*, 1991; Shi y Dalal, 1993; Sakurai, 1994). En estado fisiológico las especies de V más predominantes son el vanadilo (VO^{2+}) y vanadato (VO_4^{3-}), siendo este último estructuralmente análogo al anión fosfato, razón por la cual, diversas enzimas lo reconocen como tal y lo introducen en procesos metabólicos (Crans *et al.*, 2004).

2.1.3. Toxicidad

La toxicidad del vanadio está estrechamente relacionada a su forma química, la solubilidad y la biotransformación que ocurra por el metabolismo de los seres vivos, la cual aumenta a medida que incrementa el estado de oxidación siendo los compuestos con el estado 5+ los más tóxicos para los mamíferos. Se ha observado que personas laboralmente expuestas e intoxicadas con V presentan coloración verde en la lengua, irritación del tracto respiratorio y garganta, tos, conjuntivitis, dermatitis, congestión pulmonar, daño al epitelio alveolar, bronquitis, rinitis, faringitis, y que la exposición prolongada puede inducir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). La administración de los compuestos de V causan una amplia gama de efectos tóxicos, entre los que se encuentran, alteraciones bioquímicas y hematológicas, aumento de los niveles séricos de urea y alanina amino transferasa, cambios en la respuesta fagocítica y bacteriana por parte del

sistema inmune, remodelación de las neuronas piramidales del bulbo olfatorio, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad (Domingo, 1996; NTP, 2002; Li *et al.*, 2013; Sumanta *et al.*, 2015; Ahmadi *et al.*, 2016).

Dentro de las células puede alterar las actividades de diferentes ATPasas, proteínas cinasas, ribonucleasas y fosfatasas y enzimas que interactúan con los ácidos nucleicos (Roldán y Altamirano, 1990; Mukherjee *et al.*, 2004; Goc, 2006; Rehder, 2016).

Los compuestos de V en estado 5⁺ como el V₂O₅ producen rupturas de hebra sencilla, aumentan la presencia de micronúcleos y células poliploides e inducen disminución del índice mitótico y de replicación (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011).

2.1.4. Pentóxido de Vanadio

El pentóxido de vanadio (V₂O₅) es la forma comercial más común de vanadio, sal de color amarillo-rojizo, con puntos de ebullición y fusión de 690 y 1750 °C, se disuelve en el agua para formar soluciones ácidas, reacciona con las bases y forma vanadatos (WHO, 1990).

Las aleaciones que forma con diversos metales como el hierro, son usadas para la fabricación de autopartes, motores y aeronaves. También son usadas en diversas industrias como la electrónica, metalúrgica, vidriera, pintura y esmalte. Así mismo es usado como agente catalítico para la obtención de ácido sulfúrico, ftálico, acetaldehído y antraquinona (IARC, 2006; Fortoul *et al.*, 2014).

Sus numerosas aplicaciones y su amplia presencia ambiental han hecho que el ser humano este constantemente en interacción con él, razón por la cual el Programa Nacional de Toxicología (NTP) en 2002 evaluó los efectos carcinogénicos del V₂O₅ sobre ratones y ratas de las cepas B6C3F₁ y F344/N encontrando aumento mayor al 50% en la incidencia de neoplasias alveolares y bronquiales tanto en ratones machos como hembras y solo en ratas macho. A partir de estos resultados, la Asociación Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2006) lo agrupo dentro del grupo 2B (posible carcinógeno para el

humano).

En otro estudio llevado a cabo sobre ratones de las cepas BALB y B6 se encontró que promueve la aparición de tumores pulmonares activando vías de señalización dependientes del estrés oxidativo (Rondini *et al.*, 2010).

Este óxido puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno e interferir con la síntesis y reparación del ADN (Zhang *et al.*, 2001; IARC, 2006), inducir rupturas de hebra sencilla y producir efectos citostáticos y citotóxicos (Rojas *et al.*, 1996; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996), causar oxidación de bases, así como aumentar la presencia de MN en células sanguíneas (Ehrlich *et al.*, 2008). Asimismo puede afectar la división celular evidenciado por la disminución del índice mitótico y de replicación, sin embargo los mecanismos por los cuales ejerce esta disminución aun no son bien comprendidos (Roldan y Altamirano, 1990)

2.2. Ciclo celular

Las células somáticas pasan por un proceso de crecimiento y maduración denominado ciclo celular, el cual se divide en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M, las tres primeras comprenden la interfase y la última la división mitótica o nuclear. El tiempo que necesita la célula para llevar a cabo un ciclo puede estar determinado por diferentes factores, temperatura, nutrientes o el tipo celular (Alberts *et al.*, 2002).

En la fase G₁, los cromosomas están constituidos por una cromátida, en esta se presenta alta actividad química donde hay incremento del tamaño celular con la síntesis de ARN y proteínas; orgánulos como la mitocondria, los centriolos y los cloroplastos se duplican. En la fase S se lleva a cabo la duplicación del ADN, síntesis de histonas y de proteínas que se asocian al ADN, al final de esta fase el núcleo cuenta con el doble de ADN, es decir, cada cromosoma con dos cromátidas y proteínas nucleares. La fase G₂ proporciona el tiempo necesario para garantizar que la replicación del ADN se haya llevado correctamente, además del término de la duplicación de los centriolos y finalmente en la fase M los

cromosomas duplicados son segregados hacia núcleos diferentes y ocurre la citocinesis originándose dos células nuevas (Alberts *et al.*, 2002).

Este ciclo es regulado por proteínas cinasas y fosfatasas que aseguran la correcta transición de una fase a otra (Malumbres, 2011). Las primeras forman complejos catalíticos-reguladores de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk de sus siglas en inglés); las ciclinas se sintetizan y degradan en una fase específica, están encargadas de unirse y activar a las Cdk y la unión se le conoce con el nombre de ciclina-Cdk.

En células de mamíferos las ciclinas D y E se unen con Cdk 2, 4 y 6, estos complejos son indispensables para el paso de la fase G_1 a S. Las D son las primeras en sintetizarse (dentro de G_1) en presencia de un factor de crecimiento o mitógeno razón por la cual su síntesis no es oscilante a diferencia de las demás si no controlada. Los complejos así formados fosforilán diferentes a intervalos específicos dentro del ciclo llevando su progresión de forma ordenada. Un ejemplo de estos sustratos es pRB (proteína del retinoblastoma) el cual es indispensable en el punto de restricción dentro de G_1 cuando se presenta daño al ADN. En estado hipofosforilado pRB se encuentra unido a E2F (familia de factores transcripcionales llamados así por la capacidad de unirse al promotor del gen E2 en adenovirus) inhibiendo la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ADN y ciclina E. Este mecanismo de bloqueo se interrumpe primero por la fosforilación de ciclina D-Cdk 4/6 y después por ciclina E-Cdk 2 como respuesta a una señal para que el ciclo continúe (Shackelford *et al.*, 1999, 2000).

Con E2F libre, la síntesis de ciclina E inicia durante la progresión en G_1 , sintetizada se une a Cdk 2 manteniendo a pRB fosforilada y asegurando que E2F este activo. Durante la transición de S nuevamente E2F comienza la transcripción de ciclina A que junto a Cdk 2 favorece este paso (Morgan, 1995; Cmielová y Rezacová, 2011).

El último complejo en aparecer es el formado por la ciclina B-Cdk1 el cual contribuye a que las células puedan pasar la transición G_2/M y media la entrada a mitosis (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

2.2.1. Puntos de control del ciclo celular

La función de los puntos de control es revisar si existen las condiciones favorables para que se lleve a cabo la división celular, verificando algunas condiciones como lo son: disponibilidad de nutrientes, presencia de factores de crecimiento, adecuado tamaño, replicación e integridad del ADN y correcto acoplamiento de los cromosomas al huso. De esta forma, si llegaran a presentarse alteraciones que no favorezcan la división esta se interrumpiría por la acción de diversas proteínas, evitando que posibles daños se segreguen a otras generaciones (Jiménez y Merchant, 2003; Schönthal, 2004).

Dentro de la transición G_1/S , p21 se une e inhibe a los complejos formados por Cdk 2, de esta manera se impide la acción fosforilante de estos sobre pRB y se evita la expresión de los genes necesarios para el paso de G_1 a S. La expresión del gen p21 está estrechamente controlado por p53. Esta proteína en respuesta a gran variedad de estímulos se activa y media la transición en G_1 (Jiménez y Merchant, 2003; Schönthal, 2004)

En punto de control G_2/M se activa antes de la mitosis después de un daño ocurrido durante G_1 , S o G_2 . Las proteínas ATM (ataxia-telangiectasia-mutada) y ATR (ataxia-telangiectasia-relacionada con Rad₃), conducen a la fosforilación de Chk1 y Chk2, las cuales bloquean a Cdc25C con lo cual la mitosis se interrumpe (Veronique y Medema, . 2001).

El complejo ATM/ATR también activa a p53 y de esta manera se mantienen las células dentro de G_2 , al mantener a Cdk 1 fuera del núcleo por su unión a proteínas 14-3-3. p21 también se puede unir al complejo ciclina B-Cdk 1 inhibiendo su función en la mitosis (Jiménez y Merchant, 2003; Veronique y Medema, . 2001).

2.2.2. Cdc25C

Dentro de la regulación del ciclo se encuentran las proteínas fosfatasas Cdc25 (ciclo de división celular 25), que se sitúan en el grupo de las tirosinas fosfatasas, las cuales están involucradas en la transición de las fases y los puntos de control

(Sur y Agrawal, 2016). En los humanos, la familia comprende tres isoformas designadas como Cdc25A, B y C que participan en periodos distintos del ciclo, activando los complejos ciclina-Cdk. Su función es desfosforilar a las Cdk lo que a su vez genera una vía de retroalimentación positiva que es necesaria durante la transición de una fase a otra. Cdc25A contribuye en el paso G₁/S, G₂/M; en conjunto Cdc25B y Cdc25C se encarga del paso G₂/M (Boutros *et al.*, 2007; Bouldin y Kimelman, 2014).

Cdc25C es una proteína nuclear clave en la regulación de la división celular, en la interfase, tiene baja actividad por su fosforilación sobre la Ser 216, de esta forma se promueve su salida y retención en el citoplasma por la asociación con proteínas 14-3-3. En la transición G₂/M, la activación de esta proteína se produce por su disociación de las proteínas 14-3-3, junto con su fosforilación en múltiples sitios dentro de su dominio N-terminal (Sur y Agrawal, 2016). Durante la entrada a la fase M se encarga de desfosforilar a Cdk1 del complejo ciclina B-Cdk1 induciendo la activación de sus sustratos correspondientes (Sur y Agrawal, 2016).

En el caso de que se produzca algún daño a la molécula de ADN se inicia el punto de control a través de ATM y ATR, las cuales promueven la acción de las proteínas Chk1/Chk2, estas fosforilan a Cdc25C en el residuo de serina 216 para que sea reconocida por la proteína 14-3-3 y así salga del núcleo, deteniendo la entrada a M (Wolfe y Gould, 2004; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

2.3. Efectos del vanadio en el ciclo celular

En estudios realizados en líneas celulares a los cuales se les administró compuestos de V se ha demostrado que alteran la proliferación celular al modificar la función o los niveles de las proteínas que se encargan de su regulación. Por ejemplo, en células de la epidermis de ratón JB6+ (C141) la administración de metavanadato de sodio (NaVO₃) en concentraciones de 10 a 100 µM induce la activación de p53 y aumentó la expresión de p21 lo que llevó al retraso de estas en la fase S; este mismo compuesto en la línea celular epitelial de alveolos humanos tipo II A549 en concentraciones de 10 a 200 µM produjo la formación de

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) lo cual provocó la detención del ciclo en la fase G2/M por el incremento de p21 y Chk1 y la disminución de Cdc25C, así como el bloqueo de ciclina B-Cdk1 (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Asimismo, Huang *et al.*, (2000) en células JB6+ observaron que el $NaVO_3$ en concentraciones de 50 a 400 μM producía H_2O_2 lo que incrementa los niveles de p53 aunado a la muerte de estas células por apoptosis. En otro estudio utilizando células A549 tratadas con 10 a 200 μM induce la fosforilación de p53 (serina 15) dependiente de ATM causando arresto en G2/M y la fragmentación del ADN; además, en células de cáncer de próstata PC-1 detiene la proliferación en la transición de G2/M mediante la degradación de Cdc25C en concentraciones de 50 a 200 μM (Suzuki *et al.*, 2007; Tong-Tong *et al.*, 2012).

2.4. Separación y detección de proteínas

Cualquier molécula biológica ya sea proteína, carbohidrato o ácido nucleico puede ser separada de otra utilizando sus propiedades fisicoquímicas, para el caso de las proteínas las dos mayormente empleadas son el tamaño y la afinidad de unión a ligandos (Lodish *et al.*, 2004). Hoy en día las técnicas que se emplean aprovechan el tamaño, forma y carga de las macromoléculas denominándose separaciones electrocinéticas, entre las más utilizadas esta la electroforesis en geles particularmente los de poliacrilamida y agarosa. Es un método en el que se separan biomoléculas en dependencia de su carga eléctrica cuando migran a través de un campo eléctrico, en el caso de las proteínas, muchas de ellas tienen relaciones carga:masa similares por lo que su separación se dificulta, es así que la utilización de geles de poliacrilamida con el detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) resolvió este problema debido a que la relación carga:masa de las proteínas después de ser solubilizadas por el detergente queda constante, siendo separadas por sus diferentes pesos moleculares (Kent *et al.*, 2000; García-Pérez, 2000; Lomonte, 2007).

Al utilizarla en conjunto con el ensayo de inmunoelectro-transferencia (mejor conocida como Western blot), permiten detectar a una proteína en particular, para

lo cual se requiere de un anticuerpo primario específico que la reconozca, a este se acopla el anticuerpo secundario unido a una enzima que en presencia del sustrato adecuado genera una respuesta lumínica la cual se puede evaluar visualmente o mediante quimioluminiscencia (Alegria-Schaffer *et al.*, 2009).

3. Justificación

En estudios *in vitro* se ha observado que los compuestos de V pueden interactuar con las moléculas biológicas, principalmente con aquellas que dependen del ión fosfato como las fosfatasas y cinasas, lo que induce cambios en la proliferación de las células. Una de las proteínas que se ve afectada por los compuestos de este metal es la Cdc25C, quien actúa dentro del control del ciclo celular. Cabe hacer notar que estos trabajos se han llevado a cabo en líneas celulares, sin embargo, existen pocos reportes en cultivos primarios como son los de linfocitos. Por otro lado, en ensayos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que este compuesto retrasa la proliferación de los linfocitos humanos, por lo anterior es importante evaluar los efectos que tiene el pentóxido de vanadio sobre los niveles de la proteína Cdc25C y establecer este mecanismo como una vía por la cual este induciendo retraso en la proliferación.

4. Hipótesis

En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha observado que los compuestos de vanadio interactúan con las proteínas que controlan la proliferación celular induciendo que se retrase, por lo tanto si se administra pentóxido de vanadio a linfocitos humanos tratados *in vitro* este será capaz de modificar los niveles de la proteína fosfatasa Cdc25C, lo cual puede causar cambios en la proliferación.

5. Objetivos

5.1. General

Evaluar el efecto del pentóxido de vanadio sobre los niveles de proteína Cdc25C de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

5.2. Particulares

- Evaluar la viabilidad celular después de la administración de pentóxido de vanadio a concentraciones de 8, 16 ó 32 $\mu\text{g/mL}$ y tiempos de exposición de 3, 24 y 48 horas en cultivos de linfocitos humanos usando la tinción dual de diacetato de carboxifluoresceína y bromuro de etidio (CFDA/BrEt).
- Determinar el contenido de ADN de las fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio a concentraciones de 8, 16 ó 32 $\mu\text{g/mL}$ expuestos a diferentes tiempos (3, 24 y 48 horas) por citometría de flujo.
- Evaluar los niveles de Cdc25C de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio a concentraciones de 8, 16 ó 32 $\mu\text{g/mL}$ expuestos a diferentes tiempos (3, 24 y 48 horas) mediante la técnica de western blot.
- Evaluar el estado fosforilado de Cdc25C mediante los niveles de p-Cdc25C de linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio a concentraciones de 8, 16 o 32 μg con diferentes tiempos de exposición (3, 24 y 48 horas) mediante la técnica de western blot.

6. Material y métodos

6.1. Reactivos

Para el desarrollo de los diferentes métodos se utilizaron los siguientes reactivos: Histopaque® -1077, pentóxido de vanadio (V_2O_5) CAS No. 1314-62-1, 5(6)-diacetato de carboxifluorosceína (CFDA) mezcla de isómeros, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), ácido etileno diamino tetracético (EDTA por sus siglas en inglés), nonidet P-40, vanadato de sodio ($NaVO_4$), de la marca Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis MO EUA; medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), bromuro de etidio (Br-Et) de GIBCO, Invitrogen Corporation, NY EUA; acrilamida, duodecilsulfato de sodio, N,N'-metileno-bis-acrilamida, N,N,N,N-tetra-metil-etilenodiamina (TEMED), tris (hidroximetil)-aminometano (tris), persulfato de amonio, de la marca Bio-Rad Laboratories, CA EUA; albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) inhibidores de proteasas, aprotinina y leupeptina, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-Cdc25C (sc-55513), anti p-Cdc25C (sc-12354) y Tween-20 adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA.

6.2. Separación y cultivo de linfocitos

Se obtuvieron 10 mL de sangre de tres donadores por punción venosa utilizando el sistema Vacutainer® con heparina de sodio y se separaron los linfocitos con ayuda de Histopaque en una proporción 1:1 centrifugando a 1800 rpm por 32 minutos, se realizaron tres lavados con 10 mL de PBS entre cada uno de ellos se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, el botón celular se resuspendió con un mL de PBS y se determinó la densidad celular utilizando una cámara de Neubauer.

Se sembraron alrededor de ocho millones de células en cinco mL de medio de cultivo PB-Max Karyotyping (el cual contiene fitohemaglutinina que estimula la proliferación) por cada tratamiento y tiempo de exposición, estos se incubaron a 37 °C. Veinticuatro horas después de haber iniciado el cultivo se les administró

una de las siguientes concentraciones de V_2O_5 : 8, 16 ó 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se tuvo también un grupo sin tratamiento, y se dejaron incubar a los diferentes tiempos de exposición: 3, 24 o 48 horas, esto se hizo por duplicado. Cabe mencionar que las concentraciones y los tiempos de exposición fueron determinados en estudios realizados en el laboratorio.

6.3. Viabilidad

Al final de cada tiempo de incubación, se realizó el análisis de viabilidad para cada tratamiento siguiendo la técnica de Strauss 1991, con modificaciones. Se tomaron 10 μL de muestra y se mezcló con 10 μL de mezcla de colorantes 1:1 (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CFDA más 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Br-Et) incubándose en la oscuridad a 37 °C por 15 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y al final se colocó la muestra en un portaobjetos para evaluarse en el microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2). La viabilidad se obtuvo clasificando 100 células considerando como viables aquellas que presentaron su citoplasma con fluorescencias verdes y no viables las que mostraron su núcleo de color rojo (Figura 1).

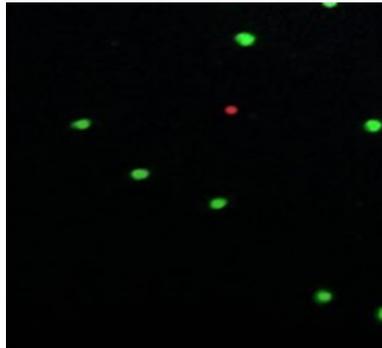


Figura 1. Fotografía que muestra cómo se evalúa la viabilidad celular. Las células viables se distinguen de las no viables por su coloración, donde las viables presentan fluorescencia verde y las no viables roja

6.4. Contenido de ADN por citometría de flujo

Para llevar a cabo la determinación, una vez concluido el tiempo de exposición, las células se fijaron con alcohol etílico al 70% frío por toda la noche. Al siguiente día se retiró el alcohol y se les adicionó la solución de tinción (0.1% Tritón X-100, 200 µg/mL RNAsa A, 20 µg/mL de ioduro de propidio en PBS) incubándose durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Posteriormente se realizó el análisis por citometría de flujo adquiriendo al menos 10 000 células por muestra usando el citómetro BD FACSAria™ II (Becton Dickinson and Company, San José CA EUA). Los respectivos histogramas se obtuvieron con el programa para computadora WIN MDI versión 2.9 desarrollado por J. Trotter y para calcular el porcentaje de células en cada fase (G₁, S, G₂/M) se utilizó el programa CYLCHRED desarrollado por la Universidad de Cardiff, ambos de libre acceso.

6.5. Obtención de las proteínas

Las proteínas de los linfocitos se obtuvieron de la siguiente manera, los cultivos se centrifugaron a 1800 rpm durante 8 minutos, el botón celular se lavó con PBS centrifugándolo nuevamente. Se retiró el sobrenadante y el botón fue resuspendido con 120 µL de solución amortiguadora de lisis (1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato de sodio, más inhibidores de proteasas en PBS pH 7.4) y se pasó a tubos eppendorf dejándose en refrigeración a 4 °C por una hora y media, al finalizar se centrifugaron los tubos a 12500 revoluciones por 12 minutos a 4 °C para obtener las proteínas, y se determinó su concentración de acuerdo al método de Bradford (1970) con la ayuda del reactivo "Protein Assay" (Bio-Rad) empleando una curva patrón de 1 mg/mL de BSA como parámetro.

6.6. Detección de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C

Para conocer los niveles de expresión de Cdc25C se separaron las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, colocando 50 µg de muestra mezclada con solución amortiguadora de muestra 6x (30% glicerol, 10% SDS,

0.012% azul de bromofenol, 0.6% de 2-betamerceptoetanol) a 100 voltios, posteriormente fueron transferidas a una membrana sólida de fluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) marca Bio-Rad por hora y media a 145 miliamperios.

A continuación la membrana se lavó con solución amortiguadora tris salina (TBS) y se incubó por hora y media con solución amortiguadora de bloqueo (TBS más 0.5% Tween-20 (TTBS) con 7% de leche sin grasa) para que posteriormente se incubara con el respectivo anticuerpo primario, anti-cdc25C, anti-p-Cdc25C (1:2500) o el marcador de carga actina (1:2500) en TTBS, toda la noche a 4 °C con agitación.

Transcurrido este tiempo la membrana se lavó tres veces con TTBS para incubarse con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-HRP (0.3:10000) por hora y media y al terminar este lapso se realizaron tres lavados con TTBS.

Para el revelado de las bandas correspondientes a cada proteína se utilizó el kit Wester blotting Luminol Reagent de la marca Santa Cruz Biotechnology. La proteína de interés fue detectada por autoradiografía como una banda, la intensidad relativa de estas fueron analizadas utilizando el programa para computadora *ImageJ 1.45s* del National Institutes of Health de Estados Unidos, que es de libre acceso.

6.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el paquete estadístico spss versión 2.5 a partir del cual en cada ensayo realizado se utilizó la prueba *t* de Student con $p < 0.005$ para conocer si hubo diferencias entre cada grupo tratado contra el grupo sin tratamiento. Los datos presentados en los cuadros y las figuras están representados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

7. Resultados

7.1. Efecto del pentóxido de vanadio sobre la viabilidad celular

En el Cuadro 1 se muestra los promedios para cada uno de los donadores más el promedio general. A las 24 y 48 horas se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo sin tratamiento.

Cuadro 1. Viabilidad celular de los cultivos de linfocitos humanos tratados con V_2O_5 por 3, 24 y 48 horas.

donador	3 horas	24 horas	48 horas
Prueba A			
<i>0 μg</i>	96 \pm 1.0	97 \pm 0.7	93 \pm 0.3
<i>8 μg</i>	96 \pm 0.9	94 \pm 0.3	88 \pm 1.7
<i>16 μg</i>	96 \pm 1.0	95 \pm 0.3	91 \pm 1.0
<i>32 μg</i>	95 \pm 0.3	95 \pm 0.9	89 \pm 1.5
Prueba B			
<i>0 μg</i>	95 \pm 0.9	96 \pm 0.7	95 \pm 1.2
<i>8 μg</i>	94 \pm 0.3	93 \pm 1.5	89 \pm 2.3
<i>16 μg</i>	94 \pm 0.7	91 \pm 0.6	88 \pm 2.1
<i>32 μg</i>	94 \pm 0.7	94 \pm 1.8	88 \pm 3.9
Prueba C			
<i>0 μg</i>	96 \pm 0.7	97 \pm 0.6	95 \pm 0.6
<i>8 μg</i>	95 \pm 0.6	94 \pm 0.9	92 \pm 0.6*
<i>16 μg</i>	93 \pm 0.9	92 \pm 1.3	91 \pm 1.0*
<i>32 μg</i>	94 \pm 0.7	93 \pm 0.9	90 \pm 1.5*
Promedio			
<i>0 μg</i>	96 \pm 0.5	96 \pm 0.4	95 \pm 0.5
<i>8 μg</i>	95 \pm 0.4	94 \pm 0.6	90 \pm 1.0 ^a
<i>16 μg</i>	94 \pm 0.6	93 \pm 0.7	90 \pm 0.9 ^a
<i>32 μg</i>	95 \pm 0.9	94 \pm 0.7	89 \pm 1.3 ^a

*: $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento a su respectiva hora; ^a: $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento en el promedio

7.2. Efecto del pentóxido de vanadio sobre el contenido de ADN

Con respecto al contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo los resultados se muestran en las Figuras 1, 2 y 3. A las 3 horas se observó incremento significativo en la concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ en la fase G_1 , el cual es consistente con la disminución en la fase S en esta misma concentración, la fase G_2 no muestra cambios (Figura 2).

Para 24 horas en la fase G_1 se presentó aumento en todas las concentraciones comparado con el grupo sin tratamiento sin ser significativo, en la fase S hay disminución en los diferentes tratamientos siendo significativa en 8 $\mu\text{g/mL}$, al igual que en los experimentos de las tres horas la fase G_2 no presenta modificaciones (Figura 3). En el caso de las 48 horas hubo incremento en todas las concentraciones en G_1 y disminución para S y G_2 , estos cambios sin presentar diferencias significativas (Figura 4).

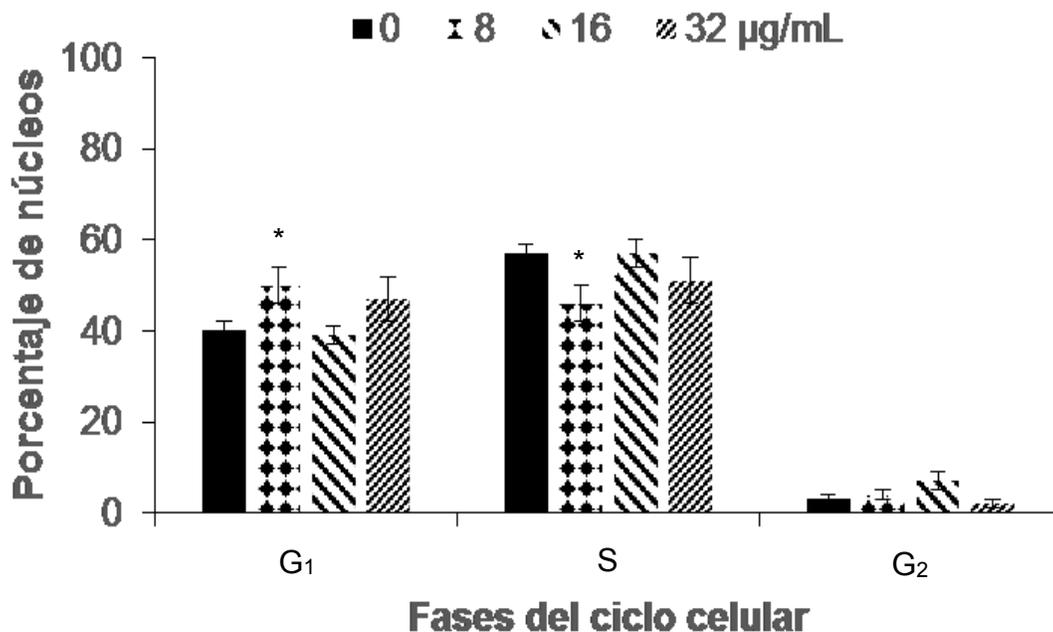


Figura 2. Porcentaje del contenido de ADN de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_5 por 3 horas, se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes cada uno por duplicado. *: $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento (t de Student).

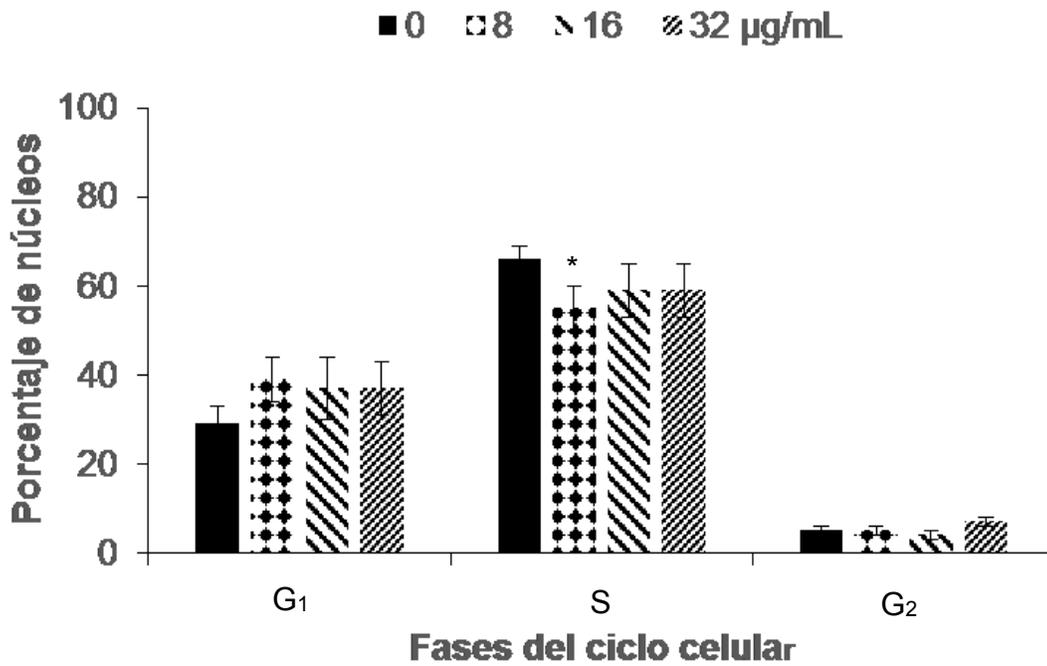


Figura 3. Porcentaje del contenido de ADN de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_5 por 24 horas, se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes cada uno por duplicado. *: $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento (*t* de Student).

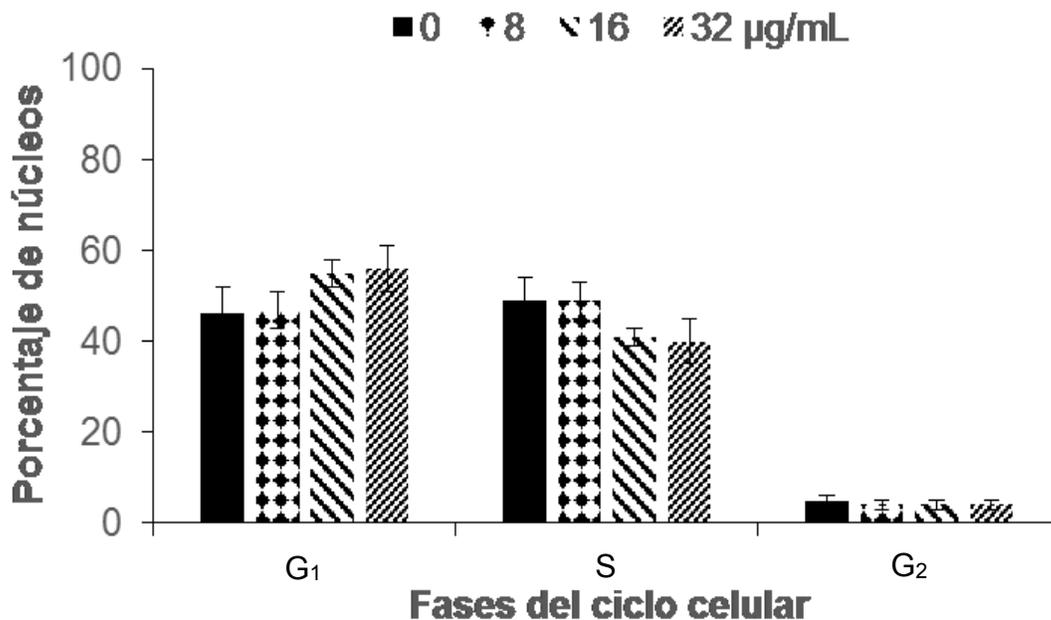


Figura 4. Porcentaje del contenido de ADN de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_5 por 48 horas, se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes cada uno por duplicado.

7.3. Efecto del pentóxido de vanadio sobre los niveles de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C

En la Figura 5, 7 y 9 se presentan las imágenes de las bandas de proteínas obtenidas en los diferentes tratamientos a las 3, 24 y 48 horas, respectivamente, y en las Figuras 6, 8 y 10 las intensidades relativas de los niveles de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C (fosforilada), los datos fueron normalizados con respecto al control.

En los resultados podemos ver que a las 3 horas de exposición se presentó aumento en Cdc25C en todas las concentraciones el cual no es significativo, y para p-Cdc25C disminución el cual es significativo en la concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con el grupo sin tratamiento (Figura 6). A las 24 horas Cdc25C tuvo disminución en 8 y 32 $\mu\text{g/mL}$, asimismo p-Cdc25C disminuye en

todas las concentraciones siendo significativo para 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). Finalmente, en el tiempo de exposiicion de 48 horas, Cdc25C disminuye en todas las concentraciones asi como p-Cdc25C siendo significativa en las concentraciones de 8 y 16 μg con respecto al grupo sin tratamiento (Figura 10).

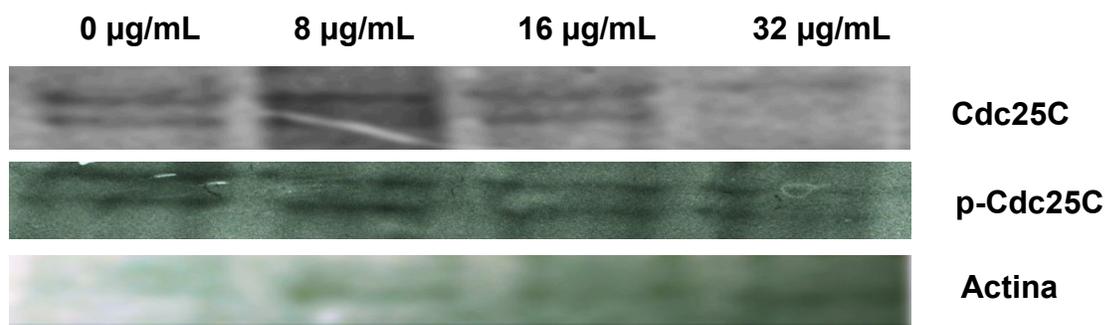


Figura 5. Fotografías de las bandas de las proteínas Cdc25C, p-Cdc25C y actina de los cultivos de linfocitos tratados con V_2O_5 por 3 horas.

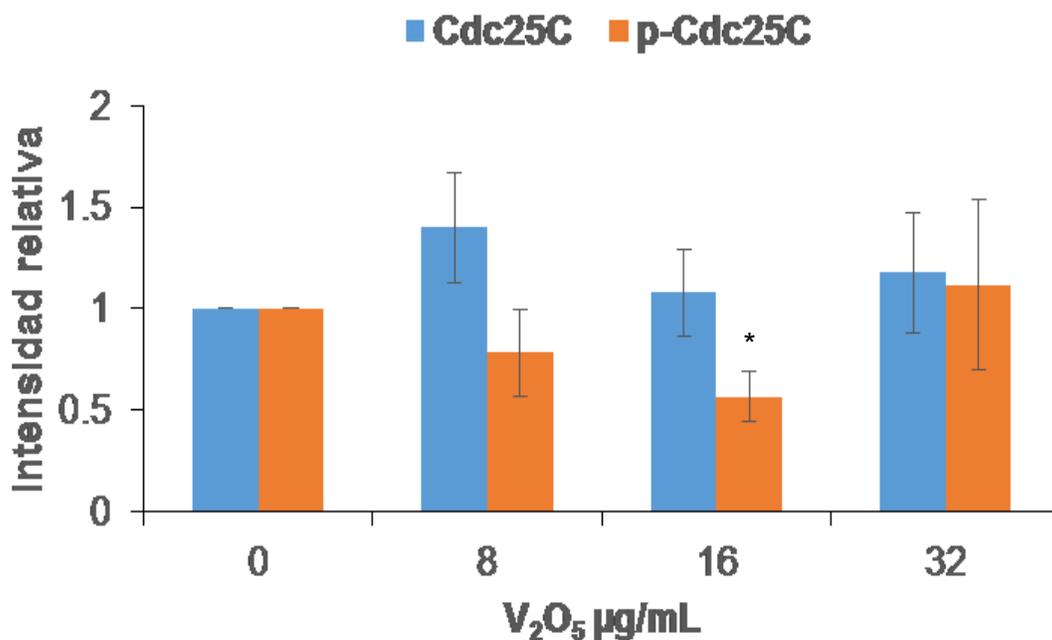


Figura 6. Intensidad relativa de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_5 por 3 horas. Se muestra la media \pm E.E.M de tres experimentos independientes por duplicado. *: $P < 0.05$ vs sin tratamiento (*t* de Studen)

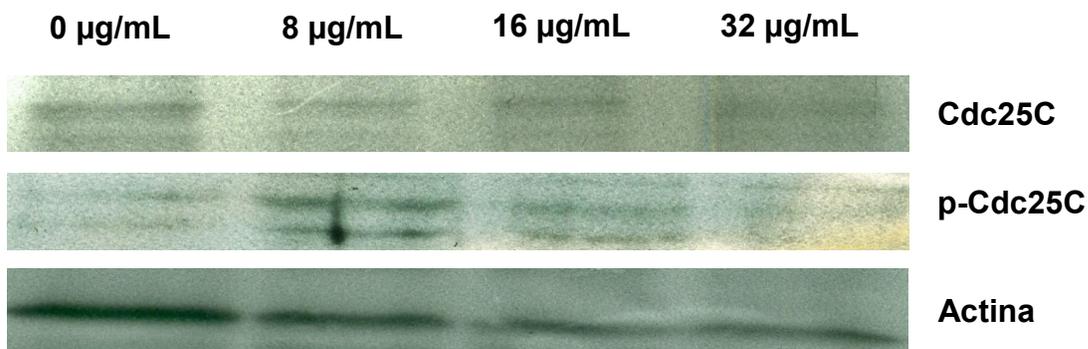


Figura 7. Fotografías de las bandas de las proteínas Cdc25C, p-Cdc25C y actina de los cultivos de linfocitos tratados con V₂O₅ por 24 horas.

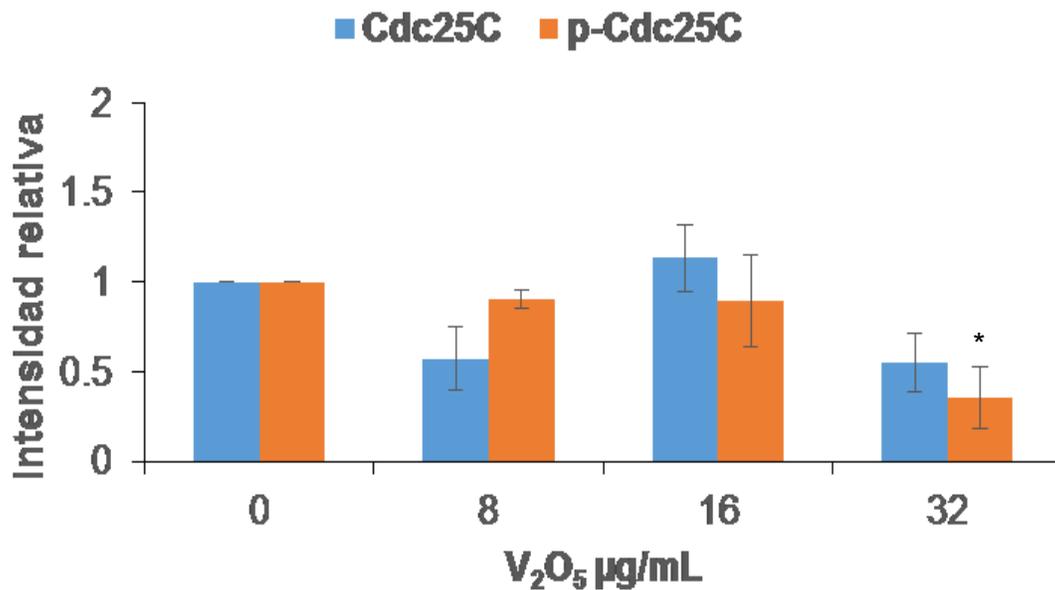


Figura 8 Intensidad relativa de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de V₂O₅ por 24 horas. Se muestra la media ± E.E.M de tres experimentos independientes por duplicado. *: P < 0.05 vs sin tratamiento (*t* de Student)

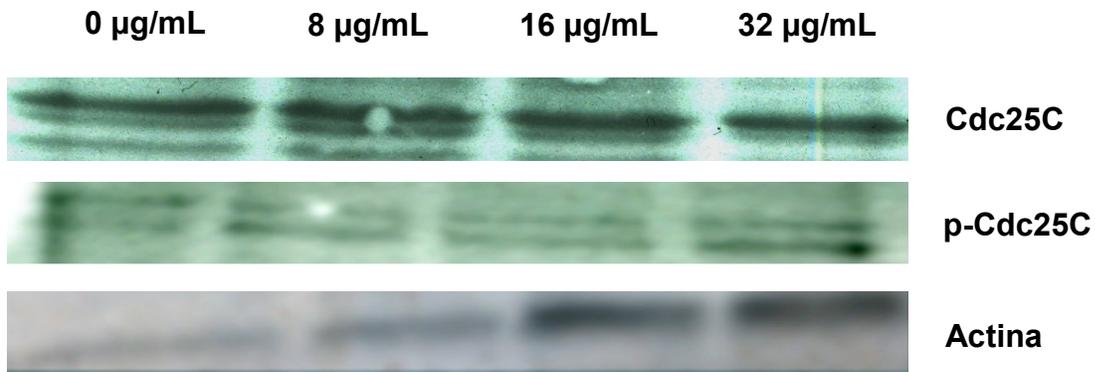


Figura 9. Fotografías de las bandas de las proteínas Cdc25C, p-Cdc25C y actina de los cultivos de linfocitos tratados con V₂O₅ por 48 horas.

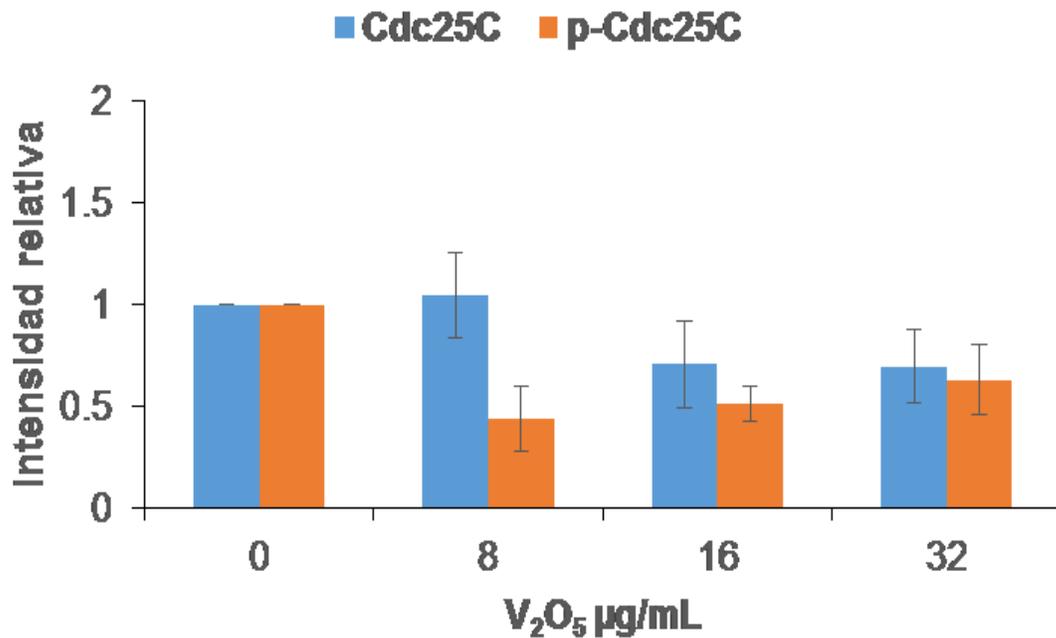


Figura10. Intensidad relativa de las proteínas Cdc25C y p-Cdc25C de linfocitos humanos tratados con diferentes dosis de V₂O₅ por 48 horas. Se muestra la media ± E.E.M de tres experimentos independientes por duplicado. *: P < 0.05 vs sin tratamiento (*t* de Student)

8. Discusión

En este trabajo se observó que la administración del V_2O_5 a los cultivos de linfocitos humanos no induce cambios en la viabilidad celular y tampoco sobre el contenido de ADN, pero disminuye los niveles de las proteínas Cdc25C y fosforilada (p-Cdc25C) en todos los tiempos de exposición.

8.1. Efecto del V_2O_5 sobre la viabilidad de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

La viabilidad celular determinada por la adición de los fluorocromos CFDA y BrEt permite distinguir entre las células viables de las no viables debido a que la CFDA es permeable en la membrana celular y puede reaccionar con esterasas citoplasmáticas generando una fluorescencia de color verde, mientras que el BrEt solo ingresa a la célula si la membrana se encuentra dañada logrando así intercalarse con los ácidos nucleicos generando fluorescencia roja (Strauss, 1991). Los resultados de este trabajo no mostraron cambios en la viabilidad de los cultivos. Lo mismo sucede cuando administraron este compuesto a cultivos de leucocitos humanos en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$ con diferentes tiempos de exposición 2, 4 y 6 horas (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011), de igual manera el tratamiento en linfocitos con las mismas concentraciones por 48 horas (Mateos Nava, 2012). Asimismo, Rojas *et al.*, (1996) observaron que fue superior al 95% al tratar a leucocitos y linfocitos humanos por 2 y 24 horas en concentraciones de 0.3, 30 y 3000 μM utilizando el ensayo azul de tripano, cabe destacar que las concentraciones administradas en este trabajo están entre los 44 a 176 μM .

Lo anterior indica que el V_2O_5 no modifica la viabilidad de células sanguíneas humanas, sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado que altera la proliferación, evidenciado por la disminución de los índices mitótico y de replicación, incrementando el tiempo promedio de proliferación. Es por ello que en este trabajo se estudió sus efectos sobre el contenido de ADN así como en los niveles de las proteínas que la controlan (Roldan y Altamirano, 1990; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011).

8.2. Efecto del V_2O_5 sobre el contenido de ADN de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

En los resultados se observó que el contenido de ADN presento acumulación de núcleos en la fase G_1 solo a las tres horas de exposición, sin que haya cambios en las demás horas. Existen pocos trabajos que hablan del efecto del V_2O_5 sobre el contenido de ADN en cultivos primarios, en un estudio se determinó que al administrar 8 $\mu\text{g/mL}$ de tres óxidos de vanadio (trióxido, tetraóxido y pentóxido) a linfocitos humanos, estos no inducen cambios significativos sobre alguna fase en específico del ciclo (Rodríguez-Mercado, 2006). Otros ensayos con sales de vanadio reportan que el metavanadato de amonio (NH_4VO_3) en celulares de cáncer de pecho humano MCF7 indujo retraso del ciclo en la transición G_1/S acompañado de incremento en la apoptosis a concentraciones de 250 μM por 36 horas (Ray *et al.*, 2006), esto sucede al administrar bisacetilacetato de vanadilo [$\text{VO}(\text{acac})_2$], en estado de oxidación IV, de manera concentración, 100 a 800 μM , y tiempo, 8 a 24 horas, dependiente en células de cáncer de hígado HepG2 (Fu *et al.*, 2008).

Este efecto podría deberse por algún daño causado en el ADN durante la exposición de los cultivos al V_2O_5 y con esto proteínas reguladoras del ciclo como p53 y p21 inhiban la función de los complejos Ciclina-Cdk que intervienen en las fases G_1 y S y propicien el retraso a esa hora ya que se sabe que el V_2O_5 induce daño primario a la molécula del ADN en concentraciones de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ durante tiempos de exposición que van de 2 hasta 6 horas en linfocitos humanos el cual se ve disminuido si se retira el compuesto del medio, tardando en promedio 120 minutos en recuperarse los cultivos (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Además, se ha observado que induce la sobreexpresión de ciclina E y Cdk2, disminución de ciclina D1 y Cdk4 y aumento en p53 y p21 en concentraciones de 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$ de este compuesto en el mismo modelo de prueba, expuestas por 24 horas (Mateos-Nava, 2012).

Resultados parecidos se observaron en líneas celulares con otros compuestos de vanadio donde el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) causo decremento del porcentaje de células en fase G_1 por la disminución de expresión de ciclina D1 y

aumento en p21, todo esto llevado a cabo en células de carcinoma papilar de tiroides (TPC-1) (Gonçalves *et al.*, 2011), efectos similares se observan sobre células de epidermis de ratón C141 donde el tratamiento con metavanadato de sodio (NaVO_3) produce aumento del porcentaje de células en fase S e incremento de expresión de ciclinas E y A de manera concentración, 0 a 50 μM , y tiempo, 0 a 24 horas, dependiente, efecto que se debe al aumento en la actividad de la cinasa Akt (Zhang *et al.*, 2004). También la capacidad de producir especies reactivas de oxígenos (ERO) por parte de los compuestos de vanadio tiene efectos moduladores sobre el ciclo celular, ya sea por la activación de p53 y p21 o la inhibición de proteínas tirosina fosfatasas como Cdc25C, estimulando o inhibiendo la función de estas proteínas reguladoras promoviendo cambios en la proliferación (Zhang *et al.*, 2000, 2001; Yan y Wenner, 2001; Suzuki *et al.*, 2007).

Mecanismos de detención del ciclo celular a nivel de la inactivación de Cdc25C o inducción de un paro momentáneo afectando a Cdc25A para dar tiempo a la activación de p53 y p21 causando un bloqueo sostenido (Bartek y Lukas, 2001) son rutas que pueden estar siendo activadas por este metal como se ve en diversos estudios reportándose que este y sus compuestos causan la inhibición de Cdc25A, inactivación de Cdk2, hipofosforilación de RB, dando lugar a la detención del ciclo en la transición G_1/S y la inducción de apoptosis independiente de p53 (Scrivens *et al.*, 2003).

Finalmente, los resultados mostrados no muestran claro efecto por parte del V_2O_5 en alguna fase específica comparándolos con otros trabajos, por lo tanto, resulta interesante seguir investigando los mecanismos que produce el V_2O_5 que modifiquen las funciones de las proteínas reguladoras del ciclo como es el caso de Cdc25C en cultivos primarios.

8.3. Efecto del V_2O_5 sobre los niveles de Cdc25C y p-Cdc25C de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Dentro de las proteínas que regulan la transición de una fase a otra se encuentran las fosfatasas Cdc25 (ciclo de división celular 25) que se encargan de

desfosforilar residuos de treonina y tirosina presentes en las Cdk activando a los complejos Ciclina-Cdk (Sur y Agrawal, 2016). En las células de mamíferos se presentan tres isoformas llamadas Cdc25A, B y C, Cdc25A se encarga de la transición G₁/S y tanto Cdc25B y C en la G₂/M aunque a falta de estas dos Cdc25A puede realizar la progresión de todo el ciclo. En el caso de Cdc25C es una proteína nuclear cuyos niveles se mantienen constantes en el transcurso del ciclo celular. Durante la interfase se mantiene fosforilada y unida a la familia de proteínas 14-3-3 que la mantienen en el citoplasma. Sin embargo, en el núcleo, en el caso que se produzca daño a la molécula de ADN es fosforilada y exportada al citoplasma para bloquear la activación de Ciclina B-Cdk1 induciendo retraso en la proliferación (Sur y Agrawal, 2016).

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio evaluando el efecto del V₂O₅ sobre los niveles de Cdc25C en linfocitos mostraron que provocaba aumento sobre esta proteína pero no se sabía si se encontraba activa o no (Mateos-Nava, 2017) por lo que se decidió determinar su estado fosforilado, ya que se sabe que los compuestos de V inhiben a Cdc25C por su analogía al fosfato (Scrivens, 2003).

En el presente trabajo se encontró que el V₂O₅ causa disminución a las 24 y 48 horas en Cdc25C. Trabajos en líneas celulares reportan que la administración de NaVO₃ a cultivos de células A549 a concentraciones de 10 a 200 µM y tiempos de 0 a 48 horas inducen la disminución de los niveles de Cdc25C de manera dosis y tiempo dependiente acompañado de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhang *et al.*, 2001, 2003). Efectos similares produce este mismo compuesto sobre cultivos de células PC-3 sin alguna modificación sobre la otra isoforma Cdc25A (Liu *et al.*, 2012)

Esta misma disminución se presentó al administrar [VO(aca)₂] y NaVO₃ en líneas celulares tumorales pancreáticas AsPC-1 a concentraciones de 50, 100 y 200 µM por 16 horas induciendo el retraso del ciclo celular en la fase G₂/M (Wu *et al.*, 2016).

En cuanto a la relación de Cdc25C y su contraparte fosforilada se observó que Cdc25C se encuentra activa después de la administración del metal evidenciado

por la disminución de p-Cdc25C y a pesar de que Cdc25C presento disminución este efecto pudo ser causado por algún mecanismo que induzca retraso en su entrada al núcleo o bien en alguna fase del ciclo celular que no esté relacionada con G₂. Sobre esto último se sabe que el estrés hiperosmótico o la disrupción de los microtúbulos provocan modificaciones sobre Cdc25C vía p38 MAPK (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006). Estudios realizados sobre células A549 usando NaVO₃ demuestran que esta sal de V produce un aumento dosis dependiente, 10 a 200 µM, en p38. A sí mismo el V₂O₅ a concentraciones de 0.001-0.1 µM en linfocitos humanos inhibe la formación de los microtúbulos impidiendo su función (Ramírez et al., 1997, Zhang *et al.*, 2003).

También, se ha demostrado en células de cáncer de próstata que la administración de metavanadato de sodio (NaVO₃) detiene la proliferación en la transición G₂/M mediante la degradación de Cdc25C en concentraciones de 50 a 200 µM a través de la formación de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Tong-Tong *et al.*, 2012) y sobre la línea celular epitelial de alveolos humanos tipo II A549 en concentraciones de 10 a 200 µM produjo la formación de H₂O₂ lo cual provocó la detención del ciclo en la fase G₂/M por el incremento de p21 y Chk1 y la disminución de Cdc25C, así como el bloqueo de Ciclina B-Cdk1 (Zhang *et al.*, 2003).

Finalmente a partir de estos resultados se podrían realizar experimentos sobre las demás isoformas de Cdc25 y en algún momento estudiar el comportamiento a nivel de ARN mensajero de Cdc25C para ver los efectos de este óxido sobre la expresión del gen que codifica para esta proteína mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real RT-PCR por sus siglas en ingles.

9. Conclusiones

- El V_2O_5 no es citotóxico ya que no induce cambios sobre la viabilidad celular de los cultivos en ningún tiempo de exposición.
- La administración de V_2O_5 induce retraso sobre el ciclo celular posiblemente en las fases G_1 o S debido a que a las 3 y 24 horas se obtuvieron diferencias considerables en la concentración de 8 μg . Por otra parte, el V_2O_5 incrementa los niveles de p53 y p21, lo que contribuye con esta detención.
- El V_2O_5 disminuye los niveles de la fosfatasa Cdc25C a las 24 y 48 horas, efecto que se ha visto en otros compuestos de vanadio. Por otra parte, puede ser que esta disminución esté relacionada con la activación de otras proteínas que controlan la división celular.
- La relación entre Cdc25C y p-Cdc25C después del tratamiento con V_2O_5 demostró que Cdc25C se encuentra activa, debido a que en todos los tratamientos la contraparte fosforilada e inactiva se mantiene por debajo de los niveles de Cdc25C.

10. Referencias Bibliográficas

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.** (2002) *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona. 1387 p.
- Ahmadi F., Nematbakhsh M., Kargarfard M., Eshraghi-Jazi F., Talebi A., Shirdavani S.** (2016) Effect of aerobic exercise against vanadyl sulphate-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Renal Inj Prev.* 5(4): 183-187.
- Alegria-Schaffer A., Lodge A., Vattem K.** (2009) Performing and optimizing Western Blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol.* 463:574-593
- Altamirano-Lozano M., Alvarez-Barrera L., Basurto-Alcantara F., Valverde M., Rojas E.** (1996) Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog. Teratog Carcinog Mutagen.* 16:7-17.
- Bartek J., Lukas J.** (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 490:117-122.
- Boutros R., Lobjois V., Ducommun B.** (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature.* 7:495-507.
- Bouldin C. M., Kimelman D.** (2014) Cdc25 and the importance of G₂ control. *Cell Cycle*, 13:2165–2171.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Contreras-Cadena D. A., Gómez-Pech C., Rangel-García M., Ruiz-Hernández A., Martínez-Bulit P., Barba-Behrens N.** (2014) La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química.* 25:245-253.
- Cmielova J., Rezacova M.** (2011) p21Cip1/Waf1 protein and its Function Based on a Subcellular Localization. *J Cell Biochem.* 112:3502–3506.

- Crans C. D., Smee J. J., Gaidamauskas E., Luqin Yang.** (2004) The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem Review.* 104:849–902.
- Domingo J. L.** (1996) Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 10:175-182.
- Duruibe J. O., Ogwuegbu M. O. C., Egwurugwu J. N.** (2007) Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Scien.* 2:112-118.
- Ehrlich V. A., Nersesyan A. K., Atefiel K., Hoelzl C., Ferk F., Bichler J., Valic E., Schaffer A., Schulte-Hermann R., Fenech M., Wagner K. H., Knasmüller 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.
- Fortoul T.I., Rojas-Lemus M., Rodriguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Ustarroz-Cano M., Cano-Gutierrez G., Gonzalez-Rendon S.E., Montaña L.F., Altamirano-Lozano M.A.** (2014) Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: An article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15–18, 2012. *J Immunotoxicol.* 11(1):13-18.
- Fu Y., Wang Q., Yang X. G., Yang X. D., 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.
- Guevara-García J.A.** (1996) Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio. *Educación Química.* 7:185-189.
- García-Pérez H. M.** (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *University Diagnostics.* 1:31-41.
- Goc A.** (2006) Biological activity of vanadium compounds. *Centr Europ J Biol.* 1:314-332.

- Gonçalves A.P., Videira A., Soares P., Maximo V.** (2011) Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cell involves the action of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sci.*89:371-377.
- Graciela-García B.** (2006) El vanadio un elemento ambiguo. *Acta Toxicol Arg.* 14:32-36.
- Heinemann G., Fichtl B., Vogt W.** (2003) Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *J Clin Pharmacol.* 55:241-245.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S.S., Shen H.M., Butterworth M., Lu Y., Costa M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Shi X.** (2000) Vanadate Induces p53 Transactivation through Hydrogen Peroxide and Causes Apoptosis. *J Biol Chem.* 42: 32516-32522.
- (IARC) International Agency for Research on Cancer.** (2006) Monograph Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide Series. Lyon, France, Vol.86, 227-292.
- Imtiaz M., Rizwan M.S., Xiong S., Li H., Ashraf M., Shahzad S.H., Shahzad M., Rizwan M., Tu S.** (2015) Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. *Environ Int.* 80:79-88.
- Jiménez L.F., Merchant H.L.** (2003) *Biología Celular y Molecular.* Editorial Pearson. México. 853 p.
- Karlsson-Rosenthal C., Millar J.B.A.** (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* 16:285-296.
- Kent K.S., Ebel R.E.** (2000) *Techniques in Analytical Chemistry: Chemical Measurements in Biological Systems.* Wiley-Interscience. USA, pp. 147-159.
- Li H., Zhou D., Zhang Q., Feng C., Zheng W., He K., Lan Y.** (2013) Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers. *Neurotoxicology.* 36: 49-54.

- Liu T., Liu Y., Wang Q., Yan X., Wang K.** (2012) Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. *J Biol Inorg Chem.* 17:311-320.
- Lodish H., Kaiser C.A., Berk A., Krieger M., Matsudaira P., Scott M.P.** (2004) *Biología Celular y Molecular.* 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. pp. 87-90.
- Lomonte B.** (2007) Manual de métodos inmunológicos. Universidad de Costa Rica, pp. 92-101.
- Malumbres M.** (2011) Physiological relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol Rev.* 91: 973–1007.
- Mateos-Nava R.A.** (2012) Tesis de Maestría. Efecto del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1-70.
- Mateos-Nava R.A.** (2017). Tesis Doctoral. Estudio del efecto de 3 óxidos de vanadio sobre la progresión del ciclo celular: ¿Mecanismo directo o indirecto?. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1-74.
- Morgan O.D.** (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-134.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M.** (2004) Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett.* 150:135–143
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M.** (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 8:199–216.
- (NTP) National Toxicology Program.** (2002) Toxicology and Carcinogenesis Studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser (507):*1-343.
- Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegman P.** (1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res.* 386:291-298.

- Ray R.S., Ghosh B., Rana A., Chatterjee M.** (2006) Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium *in vivo* and *in vitro*. *Int J Cancer*. 120:13-23.
- Rehder D.** (2013). The future of/for vanadium. *Dalton Trans*. 42: 11749-11761.
- Rehder D.** (2016) Perspectives for vanadium in health issues. *Future Med Chem*. 3:325-338.
- Rodríguez-Mercado J.J., Altamirano-Lozano M.A.** (2006) Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. Review. *Rev Internat Contam Ambient*. 22:173-186.
- Rodríguez-Mercado J.J.** (2006) Tesis Doctoral. Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1-99.
- Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A., Altamirano-Lozano M.A.** (2011) DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol in Vitro*. 25:1996-2002.
- Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M., Ostrosky-Wegman P.** (1996) Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res*. 359:77-84.
- Roldán R.E., Altamirano L.M.A.** (1990) Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat Res*. 245:61-65.
- Rondini E.A., Walters D.M., Bauer A.K.** (2010) Research Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner. *Part Fibre Toxicol*. 7:1-13.
- Sabbioni E., Pozzi G., Pintar A., Casella L., Garattini S.** (1991) Cellular retention, cytotoxicity and morphological transformation by vanadium (IV) and vanadium (V) in BALB/3T3 cell lines. *Carcinogenesis*. 12:47-52.
- Sakurai H.** (1994). Vanadium Distribution in Rats and DNA Cleavage by Vanadyl Complex: Implication for Vanadium Toxicity and Biological Effects. *Environ Health Perspect*. 3:35-36.

- Schönthal A.H.** (2004) Checkpoint Controls and Cancer. Volume 1 Reviews and Model Systems. Methods in Molecular Biology. Human Press Inc. Los Angeles. 327 p.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S.** (1999) Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. Environ Health Perspect. 1:5-24.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S.** (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. Free Radic Biol Med. 28:1387-1404.
- Shi X., Dalal N.S.** (1993) Vanadate-Mediated Hydroxyl Radical Generation from Superoxide Radical in the Presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton Mechanisms. Arch Biochem Biophys. 307: 336-341.
- Sumanta K.G., Rumpa S., Bidyut S.** (2015) Toxicity of inorganic vanadium compounds. Res Chem Intermed. 41:4873–4897.
- Sur S., Agrawal D.K.** (2016) Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. Mol Cell Biochem. 416:33-46.
- Suzuki K., Inageda K., Nishitai G., Matsuoka M.** (2007) Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: Involvement of ATM pathway. Toxicol Appl Pharmacol. 220:83–91.
- Scrivens P.J., Alaoui-Jamali M.A., Giannini G., Wang T., Loignon T., Batist G., Sandor V.A.** (2003) Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. Mol Cancer Ther. 2:1053–1059.
- 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.
- Tong-Tong L., Yan-Jun L., Qin W., Xiao-Gai Y., Kui W.** (2012) Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. J Biol Inorg Chem. 17:311–320.

- Tzu-Hsuen Y., Chia-Pin C., Ruei-Hao S., Wei-Hsu P., Chang-Chuan S.** (2016) The distance-to-source trend in vanadium and arsenic exposures for residents living near a petrochemical complex. *J Exp Sci Environ Epidemiol.* 26:270–276.
- Veronique A.J., Medema R.H.** (2001) Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 1-12.
- WHO, World Health Organization.** (1990) Vanadium. Health and Safety Guide. Geneva.
- WHO, World Health Organization.** (2001) Vanadium Pentoxide and Other Inorganic Vanadium Compounds. Geneva.
- Wolfe B.A., Gould K.L.** (2004) Inactivating Cdc25, Mitotic Style. *Cell Cycle.* 3:601-603.
- Wu J.X., Hong Y.H., 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.* 21:919-929.
- Yan S., Wenner C.E.** (2001) Modulation of Cyclin D1 and Its Signaling Components by the Phorbol Ester TPA and the Tyrosine Phosphatase Inhibitor Vanadate. *J Cell Physiol.* 186:338-349.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X.** (2001) Vanadate-Induced Cell Growth Regulation and the Role of Reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 392:311-320.
- Zhang Z., He H., Chen F., Huang C., Shi X** (2002) MAPKs Mediate S Phase Arrest Induced by Vanadate through a p53-Dependent Pathway in Mouse Epidermal C141 Cells. *Chem Res Toxicol.* 15, 950-956.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Shi X.** (2002) Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg Biochem.* 89:142-148.
- Zhang Z., Leonard S.S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V., Shi X.** (2003) Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate induced G2/M phase arrest. *Free Radic Biol Med.* 34:1333-1342.

Zhang Z., Gao N., He H., Huang C., Luo J., Shi X. (2004) Vanadate activated Akt and promoted S phase entry. *Mol Cell Biochem.* 255: 227–237.