



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efecto del tricloruro de vanadio sobre los niveles de
expresión de las proteínas p21 y p53 en linfocitos
humanos tratados *in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Brenda Abigaíl García Sosa

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

ASESOR:

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

ASESORA:

Dra. Lucila Álvarez Barrera



Ciudad de México, marzo 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Toxicología de Metales de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, a cargo del Dr. Juan José Rodríguez Mercado, de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

Este trabajo se desarrolló gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM-PAPIIT proyecto IN-229220.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno **GARCIA SOSA BRENDA ABIGAIL** con número de cuenta **314117447** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **24 de Marzo de 2023** a las **09:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MTRA. ALVARADO DOMINGUEZ MARIA CRISTINA	
VOCAL	DR. MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL	
SECRETARIO	DRA. ALVAREZ BARRERA LUCILA	
SUPLENTE	DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	
SUPLENTE	MTRO. ALCANTARA MEJIA VICTOR ALAN	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Efecto del tricloruro de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

En la modalidad de **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 21 de Febrero de 2023

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

AGRADECIMIENTOS

Estoy agradecida por haber tenido la oportunidad de estar acompañada de profesores y compañeros que brindaron todo su apoyo durante esta etapa.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava que me aceptó como alumna y tesista, por todas sus enseñanzas desde el día uno de la carrera, por el conocimiento que he adquirido, su paciencia, amistad y confianza que ha tenido en mi hasta el momento.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado y a la Dra. Lucila Álvarez Barrera por sus aportaciones a este trabajo, así como sus atenciones y amabilidad que hicieron ameno el trabajo en el laboratorio.

Al mis sinodales, Mtro. Víctor Alan Alcántara Mejía y Mtra. María Cristina Alvarado Domínguez por sus observaciones y consejos.

A los miembros del laboratorio 9-PB de la UMIEZ, la Dra. Isabel Soto Cruz, al Dr. Arturo Valle Mendiola y al Mtro. Octavio Alberto Zerecero Carreón, por su ayuda 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.

A todos mis compañeros del laboratorio 5-PA de la UMIEZ por los buenos ratos, y ánimos para continuar, en especial a Paulina, por su apoyo y compañía en las jornadas de trabajo en labo. Gracias por tu amistad y ayuda en todo este proceso.

Le doy las gracias a mis padres, que fueron el pilar en todo lo que he hecho y me han apoyado en todo. Quiero compartir este logro con ustedes porque también ha sido fruto de su esfuerzo.

A mi mamá, Antonia Sosa Torres, porque desde que me das tu bendición cada día me convengo a mí misma de que puedo con todo. Gracias por enseñarme a dar lo mejor de mí para ser una buena profesionalista y nunca olvidar mis valores.

A mi papá, Ricardo García Hernández, por siempre sentirte orgulloso de mí, cuidarme en todo momento y confiar en que puedo lograr lo que sea.

A mi hermano Juan Carlos, porque siempre has estado pendiente de mí, por el amor que me das y nunca dejarme sola. A mi hermana Karen Magali, que me ha ayudado mucho para que salga adelante.

Le dedico este trabajo a mis hermanas Nayeli Alejandra y a Erika Julissa, que siempre me desean lo mejor y quieren verme siempre bien. Igualmente están presentes mis sobrinas Corina y Emily a quienes quiero mucho.

Hago mención especial a una pequeña alma que me acompañó durante esta etapa, dándome mucho amor y que siento presente en todo momento, Yoko.

Claro que no pueden faltar aquellas personas que han llegado a mi vida y han sido parte de esta experiencia. Estoy agradecida por las amistades que están y las que no, porque todas han aportado sus buenos deseos y me regalaron momentos de felicidad. Todos han confiado en mí y que se sientan orgullosos de mis logros es un obsequio. Gracias especialmente a Grecia, Gloria, Memo, Levi, Víctor, Rosa, Rodrigo, Isaí, Jordy y Mike.

Gracias a Norberto, mi mejor amigo, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por escucharme, darme consejos y creer siempre en mí.

A mi mejor amiga Karla, tu amistad me ha hecho mucho bien, me has dado ánimos en todo y por eso y más siempre serás una hermana para mí.

Por ser parte de este viaje, por todo el amor y por no dejar que me rinda gracias, Oliver.

Finalmente agradezco a la Dra. Aída Gabriela Guzmán López por ser quien me inspiró para elegir Biología como carrera, me has enseñado y apoyado mucho; y al Dr. Juan Carlos Báez Rodríguez, por sus consejos y compartir su conocimiento.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Metales pesados	2
2.1.1. Vanadio.....	2
2.1.2. Vías de exposición al vanadio	4
2.1.3. Toxicidad del vanadio	4
2.1.4. Efectos del vanadio en el ciclo celular	5
2.1.5. Tricloruro de vanadio (VCl ₃)	6
2.2. Ciclo celular	6
2.2.1. Regulación del ciclo celular	7
2.2.2. Proteína p53	8
2.2.3. Proteína p21	9
2.3. Análisis y separación de proteínas	9
2.4. Western Blot.....	10
2.5. Citometría de flujo	10
2.6. Linfocitos humanos como modelo de estudio	11
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. HIPÓTESIS	12
V. OBJETIVOS	13
5.1. General.....	13
5.2. Particulares	13
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1. Reactivos.....	14
6.2. Separación y cultivo de linfocitos	14
6.3. Tratamientos	15
6.4. Viabilidad.....	15
6.5. Análisis del contenido de ADN.....	15
6.6. Obtención de las proteínas	16
6.7. Separación y detección de proteínas.....	16
6.8. Análisis estadístico	17
VII. RESULTADOS	18
7.1 Efecto del VCl ₃ sobre la viabilidad celular	18
7.2 Efecto del VCl ₃ sobre las fases del ciclo celular.....	18

7.3 Efecto del VCl_3 sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53.....	20
VIII. DISCUSIÓN.....	23
8.1 Efecto del VCl_3 sobre la viabilidad	23
8.2 Efecto del VCl_3 sobre el contenido de ADN	23
8.3 Efecto del VCl_3 sobre los niveles de p21 y p53.....	25
IX. CONCLUSIONES	28
9.1 Perspectivas.....	28
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
XI. ANEXOS	36

I. RESUMEN

El vanadio (V) es un metal que se encuentra presente en la naturaleza y las actividades humanas han incrementado sus cantidades en el ambiente. Los seres humanos están expuestos por la ingesta de alimentos, el aire que respiran y la absorción dérmica, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran que el V interactúa con las diferentes moléculas biológicas e induce efectos genotóxicos y citotóxicos. En linfocitos humanos tratados *in vitro*, se ha observado que los óxidos afectan los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular.

Con respecto al tricloruro de V (VCl_3) se tiene poca información relacionada con su toxicidad a nivel celular, por lo que en este estudio se evaluó su efecto sobre p53 y p21 en cultivos de linfocitos humanos.

Los cultivos fueron expuestos en concentraciones de 2, 4, 8 o 16 $\mu g/mL$ de VCl_3 durante 24 y 48 h. Después de los tratamientos se determinó la viabilidad celular con colorantes fluorescentes y el contenido de ADN por citometría de flujo. Al mismo tiempo se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p53 y p21 con la técnica de "Wester blot".

La administración de VCl_3 no modificó la viabilidad y a diferencia de los óxidos de V, este compuesto no retrasa el ciclo en alguna fase en específico. Con relación a las proteínas, p21 incrementó en los tratamientos de 2, 4 y 16 $\mu g/mL$ a las 24 h, mientras p53 en 4, 8 y 16 $\mu g/mL$ a las 48 h. Es posible que el VCl_3 esté afectando otra vía en la cual p21 participa y no en el bloqueo de la progresión del ciclo celular.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos cuya densidad es cinco veces más alta que la del agua. De manera natural se encuentran en el ambiente en concentraciones que, por lo general, no perjudican las diferentes formas de vida, siendo algunos considerados micronutrientes que constituyen parte esencial de los sistemas biológicos. En las células catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo, el transporte de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales. Sin embargo, aún en concentraciones bajas, pueden inducir efectos genotóxicos y carcinógenos (Calva y Torres, 2003; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Londoño-Franco *et al.*, 2016).

Se consideran tóxicos por la capacidad de bioacumularse a concentraciones altas y más importante aún, por el tipo de compuesto o metabolito que forman. En el mundo industrializado actual las fuentes de exposición a ellos se hallan tanto en el campo laboral como a partir de agua, alimentos o en ambientes contaminados (Ferrer, 2003). Ejemplos de estos son el cadmio (Cd), el arsénico (As), el mercurio (Hg), el plomo (Pb) o el vanadio (V).

2.1.1. Vanadio

El V es el elemento químico de número atómico 23 situado en el grupo 5, periodo 4 de la tabla periódica de los elementos químicos. Puede tener estados de oxidación que van desde -1 a +5, siendo +3, +4 y +5 los que han demostrado tener actividad biológica (Contreras *et al.*, 2014). Su masa molar es de 50.9414 g/mol, densidad de 6.11 g/cm³, punto de fusión y ebullición de 1919 °C y 3400 °C, respectivamente. Es un metal blanco brillante, suave y dúctil (ATSDR, 2012; Barán, 2017).

En la corteza terrestre ocupa el lugar número 22 en abundancia con respecto a los otros metales, aproximadamente del 0.013 al 0.2 %. Suele presentarse en la naturaleza en forma de anión vanadato (VO_4^{3-}), en formas iónicas combinadas con oxígeno (VO^{2+} , VO_2^+) que actúan como agentes oxidantes o en combinación con azufre, VS_4^{3-} , VS^{2+} , VSSH^+ (Castillo *et al.*, 2005; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). La presencia natural de V en el aire es en forma de polvo continental, aerosoles marinos y emisiones volcánicas (ATSDR, 2012). En las aguas marinas, la

concentración media es de 30 nM, constituyéndose en el segundo elemento de transición más abundante en entornos marinos (Barán, 2017).

Se encuentra además en muchos sistemas biológicos, es micronutriente para varias especies marinas, en la síntesis de clorofila en plantas, hongos y en algunos mamíferos es un elemento esencial en el metabolismo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Contreras *et al.*, 2014; Imtiaz *et al.*, 2015). Su requerimiento en los humanos no ha sido confirmado, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que en el caso de ser necesario la ingesta aproximada sería de 15 µg por día (Rodríguez-Mercado y Altamirano Lozano, 2006).

Sus compuestos son útiles en la fabricación de automóviles, astilleros, fertilizantes, aceros para herramientas, catalizadores, cerámica y acumuladores. También está presente en varios suplementos nutricionales comerciales y multivitaminas (ATSDR, 2012; Hernández-Pérez, 2017). En la atmósfera está presente en forma de óxidos, trióxido, tetraóxido y pentóxido de V (V_2O_3 , V_2O_4 y V_2O_5 , respectivamente), siendo este último la más común. Es un residuo de las partículas suspendidas liberadas por las emisiones de plantas generadoras de electricidad, la combustión de aceites y gasolinas derivados del petróleo, además de los vehículos automotores (Falcón-Rodríguez, 2008).

De esta forma la presencia de V en el ambiente es ocasionada principalmente por la actividad humana. Se estima que en el aire de zonas urbanas hay mayor cantidad que en las rurales, con concentraciones que van de 0.15 a 1.4 µg/m³ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Los suelos que están directamente bajo el uso de seres humanos contienen cantidades más altas (1510 a 3600 mg/kg) y las áreas mineras de 738 mg/kg hasta 3505 mg/kg (Imtiaz *et al.*, 2015). Se han determinado en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales que van de 49.2 a 70 µg/L (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Debido a la presencia de V en suelos y agua se puede encontrar este metal en algunos alimentos, por ejemplo, en la pimienta, los cereales, los aceites vegetales, las setas, el perejil, los huevos, la carne bovina, los peces, las aves y los mariscos, entre otras. Asimismo, en el agua potable está por debajo de los 10 µg/L, con un promedio de 4.3 µg/L (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Contreras *et al.*, 2014).

2.1.2. Vías de exposición al vanadio

Las principales vías de exposición del ser humano al V son por medio de la ingesta de alimentos, la inhalación y en menor cantidad la absorción a través de la piel. El V puede ingresar a las vías respiratorias por medio del humo del cigarro, el aire de lugares de trabajo, como es en las plantas generadoras de energía, igualmente dependerá de qué tan contaminada está el área donde viven las personas. Esto lo demostró Fortoul *et al.*, (2002) quien trabajó con autopsias de tejido pulmonar de habitantes de la Ciudad de México de los años 1960 y 1990 y observó que las concentraciones medias de V aumentaron significativamente. Así mismo, ingresa al organismo mediante la piel en personas que emplean diariamente herramientas hechas con V, también las que utilizan prótesis elaboradas con aleaciones de V (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; ATSDR, 2012; Engelhart y Segal, 2017).

Una vez dentro del cuerpo se presenta en estado de oxidación V^{3+} , V^{4+} o V^{5+} , se distribuye a través de la sangre unido a la proteína transferrina principalmente, formando el complejo transferrina-vanádica. Se acumula en órganos, entre ellos el hígado, los riñones, los pulmones y los huesos. Para ingresar a la célula, se sabe que el V^{5+} utiliza el mecanismo de transporte aniónico a través de los canales de fosfato, sin embargo, para el V^{3+} y V^{4+} todavía no es bien comprendido, se estima que sea similar a la del catión (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011). Estudios han demostrado que los compuestos de V interactúan con las diferentes biomoléculas del organismo, principalmente proteínas y ácidos nucleicos, ya que tienden a unirse a grupos fosfato, carboxilo y amino (Crans *et al.*, 1989; Valko *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008).

2.1.3. Toxicidad del vanadio

La toxicidad del V, al igual que la de otros metales, depende de la estructura química del compuesto, de la solubilidad, del estado de oxidación y de la biotransformación que ocurra por el metabolismo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Los estudios *in vivo* demuestran que el tracto respiratorio es sensible a la exposición por inhalación al V, provocando síntomas como tos, irritación en nariz, sibilancias y dolor de garganta. En el caso de la ingesta, el cual afecta el sistema gastrointestinal, se presentan diarreas, movimientos intestinales y daño renal. La absorción por la piel es

mínima, aunque estudios demuestran que la exposición aguda a polvos de este metal en concentraciones de 0.2 a 1 mg/m³ provoca dermatitis (ATSDR, 2012). Existen casos clínicos donde pacientes presentan alergias en la piel, pruritos o eccemas provocadas por la mala aleación de las prótesis elaboradas con compuestos de V (Engelhart y Segal, 2017).

2.1.4. Efectos del vanadio en el ciclo celular

En estudios realizados con diferentes líneas celulares, se ha demostrado que los compuestos de V tienen preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Méndez *et al.*, 2014). De esta forma, pueden presentar comportamiento antagónico, ya sea al detener o estimular la proliferación celular. Por ejemplo, al administrar metavanadato de sodio (NaVO₃) en concentraciones de 10 a 100 µM en células de epidermis de ratón JB6+, aumentó el factor de transcripción p53 e indujo a la muerte celular programada, apoptosis, esto mediante la generación de peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (Huang *et al.*, 2000). Sin embargo, este compuesto también promueve la entrada a la fase S activando a la cinasa Akt que regula al factor de transcripción E2F e incrementando los niveles de ciclina E y D en células C141 (Zhang, 2004).

En otro estudio, en el que se evaluó el papel apoptogénico del metavanadato de amonio (NH₄VO₃) en concentraciones de 100, 175 y 250 µM en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7, se encontró detención del ciclo celular y la condensación cromosómica e indujo la muerte celular por apoptosis (Ray *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, mediante análisis inmunohistoquímico *in vivo*, empleando un modelo definido de carcinogénesis mamaria en ratas, encontraron disminución en la proliferación celular (cerca al 25 %) y aumento de células apoptóticas con la prueba de TUNEL, además de expresión de p53 y Bax, con la regulación negativa de las proteínas Bcl2.

Markopoulou *et al.* (2009), describieron que el tratamiento de queratinocitos humanos HaCaT con sulfato de vanadilo (VOSO₄) en concentraciones de 25 a 1000 µM inhiben la proliferación celular, ya que incrementa la expresión de las proteínas p53 y p21 y reducen la supervivencia de manera dependiente de la dosis.

En ensayos realizados en el laboratorio se ha observado que los óxidos de vanadio inducen efectos genotóxicos y citotóxicos en leucocitos humanos, evidenciados por

rompimiento de las cadenas de ADN (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011), separación prematura de las cromátidas (Mateos-Nava *et al.*, 2017), incremento en la frecuencia de los intercambios de las cromátidas hermanas (ICH) (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003), disminución de los índices mitótico y de replicación (Roldán y Altamirano, 1990; Mateos-Nava *et al.*, 2017) lo que lleva al retraso del ciclo celular (Mateos-Nava *et al.*, 2017).

Sin embargo, se tiene poca información de sales de V, como el tricloruro (VCl_3) sobre los efectos que induce a nivel celular. En un estudio previo, en el laboratorio donde se realizó esta tesis, utilizando cultivos de linfocitos humanos tratados con 2, 4, 8 y 16 $\mu g/mL$, se observó reducción del índice mitótico y de manera dependiente de la concentración, pero no se encontraron cambios en la frecuencia de los ICH (Rodríguez-Mercado, 1996). Por otro lado, Caicedo *et al.* (2007) al administrar de 0.5 a 5 mM del mismo compuesto a cultivos de células Jurkat por 48 h, observaron que en concentraciones de 1 a 5 mM disminuyó la proliferación y la viabilidad celular e incrementó el daño al ADN y la muerte celular por apoptosis.

2.1.5. Tricloruro de vanadio (VCl_3)

El VCl_3 es un compuesto inorgánico con una masa molar de 157.3 g/mol, higroscópico, sensible a la oxidación y en condiciones normales tiene aspecto de cristales color púrpura oscuro. Presenta punto de fusión de 300 °C, temperatura a la que se descompone. Su densidad es de 3 g/cm³ a 20 °C. Se utiliza como catalizador y precursor para la síntesis de otros compuestos basados en V (Gangolli, 1999; García-Núñez *et al.*, 2018; TODINI, 2020), es agente reductor en la determinación de nitritos y nitratos presentes en muestras de agua, también se emplea en la fabricación de baterías, en el flujo redox que tiene su solución electrolítica, lo que lleva a que tenga alto almacenamiento de energía (VANITEC, 2022).

2.2. Ciclo celular

Las células eucariotas pasan por una secuencia ordenada de eventos que conduce al crecimiento y maduración para que se lleve a cabo la división celular. En el caso de las somáticas, durante la proliferación se produce un par de células con la información genética idéntica. Este proceso es conocido como ciclo celular, el cual se

conforma de dos etapas: a) la interfase, que comprende las fases G₁, S y G₂; y b) la etapa de división nuclear o fase M. Durante la fase G₁ los organelos se replican, también otras moléculas y estructuras citoplasmáticas aumentan de número, en consecuencia, la célula aumenta de tamaño. En la fase S o síntesis se duplica el ADN nuclear, se transcriben muchos genes incluidos los que sintetizan proteínas histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4). La preparación para la mitosis se realiza en la fase G₂ y finalmente en la fase M en la que el material genético duplicado se separa para constituir dos células nuevas (Galván-Huerta y Bojórquez-Castro, 2002; Lomanto, 2003; Megías *et al.*, 2017).

Para que transcurra de una fase a la otra se han establecido diferentes puntos de control: uno en la transición de la fase G₁ y la entrada a la fase S, otro durante el transcurso de la fase G₂/M y durante la mitosis (Peralta *et al.* 1997).

2.2.1. Regulación del ciclo celular

La proliferación celular está controlada por la maquinaria de regulación del ciclo celular, la cual contiene puntos de control donde se examina el estado nutricional de la célula, el incremento de la masa celular, los procesos de crecimiento aunado a factores ambientales, entre otros elementos necesarios para el ciclo celular típico normal, asimismo evitar la presencia de ADN dañado, en caso de que este existiera dando tiempo a que se produzca la reparación de esta molécula y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores (Lomanto *et al.*, 2003).

Para esto existen un conjunto de proteínas con actividad reguladora y catalítica, conformadas principalmente por la familia de cinasas dependientes de ciclina (Cdk, por sus siglas en inglés) y las ciclinas (Galván-Huerta y Bojórquez-Castro, 2002; Lagunas *et al.*, 2014).

Las ciclinas son subunidades reguladoras críticas de las Cdk. Cuando los niveles de las primeras aumentan, forman complejos heterodiméricos estables con Cdk enzimáticamente activos, pero una vez que disminuyen las Cdk pierden actividad catalítica (Miele, 2004). Se conocen 20 diferentes Cdk en mamíferos y sólo la 1, 2, 4 y 6 están claramente asociados con el control del ciclo celular. En cambio, hay 15 familias de ciclinas, donde la ciclina A, B, D y E son las más relacionadas (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2004; Malumbres, 2011).

Los primeros eventos en el compromiso de la división incluyen la inducción de las ciclinas tipo D en respuesta a factores de crecimiento y la subsiguiente fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) por complejos ciclina D/Cdk4,6. pRb hiperfosforilada libera al factor de transcripción E2F que promueve la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de ADN en la fase S (Shackelford *et al.*, 1999; Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2004).

Otro complejo que actúa en la progresión de la fase G₁ a S es ciclina E/Cdk2, el cual fosforila la histona H1 que conduce al reacomodo de la cromatina y mantiene activo a E2F. Este induce la expresión de la ciclina A que forma un complejo con Cdk2 y se encargan de la replicación del ADN para continuar con el ciclo y entrar a la fase G₂/M. La regulación negativa de los complejos ciclina/Cdk involucra inhibidores de Cdk (CKIs) y existen dos familias: Cip/Kip que incluye p21, p27 y p57, estas inactivan a Cdk 2, Cdk4 y Cdk6, mientras que la familia INK4 conformada por p15, p16, p18 y p19 inhiben Cdk 4 y Cdk 6 (Morisaki *et al.*, 1999; Sherr y Roberts, 1999).

2.2.2. Proteína p53

Los puntos de control son regulados molecularmente. La p53 es conocida como proteína supresora de tumores, cuya propiedad más predominante es su transactivación en respuesta al daño al ADN, contrarrestando la propagación de alteraciones genéticas a células hijas bajo condiciones que provoquen mutagénesis. En distintos eventos de estrés celular, los niveles de p53 aumentan, deteniendo el ciclo celular e induciendo apoptosis. Además, controla la eficiencia de la reparación y recombinación del ADN (Blattner, 2008).

En células en reposo, p53 está presente en forma latente y en poca cantidad, principalmente debido a la actividad antagonista de Mdm2 (*murine doble minute 2*, por sus siglas en inglés) y MdmX. Sus niveles son bajos debido a la ubiquitinación mediada por Mdm2 y la degradación a través de la vía del proteasoma. Así mismo, regula su actividad facilitando la exportación nuclear. MdmX, en cambio, no puede dirigir a p53 a la destrucción proteosomal. Tras el daño en el ADN, p53 es fosforilada en los sitios Ser15 y Ser20 por ATM (ataxia-telangiectasia mutado) y ATR (ataxia telangiectasia y proteína relacionada con Rad3), respectivamente, lo que inhibe su interacción con Mdm2, aumentando su presencia en la célula. El objetivo transcripcional clave de p53 es p21 que inhibe la actividad de ciclina E/Cdk2,

deteniendo el ciclo en la transición G₁/S. La proteína p21, se une al complejo ciclina D/Cdk4 y evita que fosforile pRb, suprimiendo así la vía pRb/E2F. Sin embargo, esta respuesta del punto de control es independiente de ATM-p53 (Niida y Nakanishi, 2006; Blattner, 2008).

La pérdida de las funciones de p53, más comúnmente a través de mutaciones puntuales, ocurre en aproximadamente más de la mitad de los cánceres principales y el papel esencial que desempeña en la supresión tumoral se ilustra por la alta tasa de neoplasias malignas en ratones que carecen de este en estado funcional (Bates y Vousden, 1996).

2.2.3. Proteína p21

Es una proteína producto del gen WAF-1/CIP1 perteneciente a la familia Cip/Kip que a altas concentraciones inhibe las Cdk. Su expresión está controlada por p53, aunque no siempre. Se une a los complejos ciclina Cdk2 y Cdk1, impidiendo la acción fosforilante de estos sobre pRb y evita que el factor de transcripción E2F se libere para mediar la expresión de Ciclina B y CDC2, que no permiten el paso por el punto de restricción antes del límite G₁/S (Macleod *et al.*, 1995; Lagunas, 2014).

La expresión de p21 se puede inducir de forma independiente de p53 en determinadas condiciones, como durante la diferenciación celular. Así mismo, se asocia con la proliferación de antígenos nucleares y se ha sugerido que inhibe directamente la replicación del ADN.

A pesar de su inhibición del ciclo, puede proteger a las células contra la apoptosis. Esta capacidad se basa en gran medida en la regulación transcripcional del gen a través de la interacción proteína-proteína o la actividad de reparación del ADN de p21 (Karimian *et al.*, 2016). La mitad del extremo N-terminal de p21 comparte homología con las proteínas inhibidoras de Cdk p27 y p57, estos inhibidores interactúan con Cdk en respuesta a otras señales (Shackelford *et al.*, 1999).

2.3. Análisis y separación de proteínas

Antes de estudiar la estructura y el mecanismo de acción de una proteína, éstas se deben separar utilizando sus propiedades fisicoquímicas. El método más empleado para su purificación es la electroforesis en geles de poliacrilamida, PAGE por sus

siglas en inglés (Koolman y Heinrich, 2003; Lodish *et.al.*, 2016). La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico. Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo, en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (García-Pérez, 2000).

La PAGE en su forma más utilizada se lleva a cabo en presencia del detergente duodecil sulfato de sodio (SDS), el cual desnaturaliza e imparte carga negativa y uniforme a cada proteína. Por lo tanto, cuando pasan por un gel utilizando una corriente eléctrica en presencia de SDS (SDS-PAGE), se separan en función del peso molecular. El rango de pesos moleculares que se pueden separar depende del tamaño de poro en el gel utilizado y esto normalmente se controla mediante la concentración de acrilamida y el agente de reticulación utilizado en la formación del gel de poliacrilamida. Las proteínas separadas en SDS-PAGE se visualizan usando tinción general, tal como el colorante azul de Coomassie o, más sensiblemente, tinción de plata. Sin embargo, se tiñen todas y a menudo es deseable poder identificar algunas en específico, esto se logra mediante la inmunoelectrotransferencia o “western blot” (King, 1998).

2.4. Western Blot

Es una técnica utilizada para detectar una proteína específica de la mezcla compleja extraída de la muestra de células (Mahmudy, 2012). El método implica el uso de electroforesis en gel para separarlas, después se transfieren a la superficie de la membrana sólida para la inmunodetección selectiva del antígeno (NIH, 2020). Este método depende de la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo y es útil para la identificación cualitativa y semicuantitativa de proteínas específicas y su peso molecular. Finalmente, estas se observan como bandas en la membrana, se detectan y cuantifican empleando métodos quimioluminiscentes, cromogénicos o con marcadores fluorescentes (MacPhee, 2010).

2.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo permite determinar y cuantificar características físicas y químicas como el tamaño, forma, orgánulos y componentes estructurales de las células, principalmente por medios tanto ópticos y electrónicos (Givan, 2001).

Se prepara una suspensión celular y se pasa a través de una cámara mediante un flujo continuo. Las células son excitadas de una en una por un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos: a) la generada por dispersión de la luz y b) la emitida por fluorocromos. En esta última se usan sondas fluorescentes para analizar elementos intracelulares, por ejemplo la cantidad de ADN en cada una de las fases del ciclo (Nunez, 2001; Barrera *et al.*, 2004).

2.6. Linfocitos humanos como modelo de estudio

Los linfocitos son células efectoras de la respuesta del sistema inmunitario a patógenos nocivos y sustancias dañinas (Ross y Pawlina, 2015).

Debido a que la sangre es el tejido más accesible, el cultivo de células sanguíneas ha sido ampliamente utilizado en investigación. Son idóneos para diversos estudios ya que proporcionan una estimación a algún agente químico, físico o biológico (Tucker y Preston, 1996). Los linfocitos pueden cultivarse en medios con una composición química definida (solución salina, azúcares, aminoácidos, vitaminas, antimicóticos y antimicrobianos, entre otros nutrientes) (Molina-Álvarez y Frías-Vázquez, 2008; Vargas-Anaya, 2012). Una vez aislados pueden responder fácilmente a estímulos mitogénicos; de los más utilizados es la fitohemaglutinina (PHA), mucoproteína extraída de *Phaseolus vulgaris* que estimula la proliferación policlonal, principalmente de linfocitos T durante las primeras 24 horas del cultivo (Molina-Álvarez y Frías-Vázquez, 2008). Una vez estimulados producen una variedad de linfocinas, incluyendo el factor de crecimiento de células T (TCGF, por sus siglas en inglés), también conocido como interleucina 2 (IL-2). En respuesta a la PHA obtienen la habilidad de proliferar por la expresión de receptores para TCFG en su superficie (Hernández y Leavitt, 1984).

III. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que los diferentes compuestos de V pueden interactuar con moléculas biológicas, incluyendo a la proteína supresora de tumores p53 y p21, que están implicadas en el control del ciclo celular. En estudios realizados en el laboratorio se ha demostrado que el V induce retraso en la proliferación celular de linfocitos humanos, principalmente en los estados de oxidación +3, +4 y +5; sin embargo, los efectos del V^{3+} son los menos estudiados y es importante determinar su papel sobre los niveles de expresión de estas proteínas, así como el mecanismo mediante el cual interviene en el progreso normal del ciclo celular.

IV. HIPÓTESIS

Se ha comprobado que los compuestos de V (V^{5+} y V^{4+}) tienen afinidad por los grupos fosfato de proteínas implicadas en el control de la proliferación celular, así como con el ADN, induciendo retraso en el ciclo celular. No obstante, los mecanismos del V^{3+} no se conoce y se requieren explorar, por lo tanto, si se administra VCl_3 a cultivos de linfocitos humanos se modificarán los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular, p53 y p21.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto del VCl_3 sobre los niveles de expresión de las proteínas p53 y p21 en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

5.2. Particulares

Evaluar la viabilidad celular de los cultivos de linfocitos tratados con 2, 4, 8 o 16 $\mu\text{g/mL}$ de VCl_3 a 24 y 48 h de exposición, utilizando la tinción dual con fluorocromos.

Determinar el contenido de ADN en los linfocitos humanos tratados con VCl_3 en concentraciones de 2, 4, 8, o 16 $\mu\text{g/mL}$, expuestos por 24 y 48 h, con la finalidad de conocer si existe retraso en alguna fase en específico del ciclo mediante la técnica de citometría de flujo.

Evaluar los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 de linfocitos humanos tratados con VCl_3 a concentraciones de 2, 4, 8 o 16 $\mu\text{g/mL}$ expuestos a diferentes tiempos, 24 y 48 h, mediante la técnica de "Western blot".

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

Para realizar los diferentes métodos se utilizaron los siguientes reactivos: tricloruro de vanadio (VCl_3) CAS número 7718-98-1 y 97 % de pureza, Histopaque® -1077, medio de cultivo RPMI 1640, 5(6)-diacetato de carboxifluorosceína (CFDA) mezcla de isómeros, solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS por sus siglas en inglés), ribonucleasa A (RNasa), solución de tinción (0.1 % de Tritón X-100 en PBS más 200 μ g/mL de RNasa y 50 μ g/mL de ioduro de propidio), 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, bromuro de etidio (Br-Et), ioduro de propidio de la marca Sigma-Aldrich, Inc., MO EUA; medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, 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 anti-p21 (sc-51689), anti-p53 (sc-99), anti-actina (sc-8432) anticuerpo secundario m-IgG Fc BP-HRP anti ratón de cabra, Tween-20 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA y Clarity Max ECL Substrate de Bio-Rad Laboratories Inc.

6.2. Separación y cultivo de linfocitos

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica de tres donadores por punción venosa con sistema Vacutainer, de la cual se separaron los linfocitos, añadiéndola en proporción 1:1 al reactivo Histopaque-1077 que se encontraba en tubos cónicos de centrifuga sin mezclarse. Se centrifugaron a 1800 rpm durante 32 min a temperatura ambiente para obtener cuatro fases, de las cuales se aisló la fase opaca que corresponde a los linfocitos. Estos se colectaron y se lavaron tres veces con 10 mL de PBS, entre cada lavado se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, finalmente se determinó la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer.

Por cada tratamiento y tiempo de exposición se sembraron aproximadamente ocho millones de células en siete mL de medio de cultivo PB-Max Karyotyping, el cual

contenía PHA para estimular la mitosis progresiva en los linfocitos y se incubaron a 37 °C por 24 h.

6.3. Tratamientos

Se preparó la solución de trabajo de VCl_3 , el cual se disolvió en agua inyectable. A continuación, se les administró a los cultivos el tratamiento en concentraciones de 2, 4, 8, o 16 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron por 24 y 48 h más, también se contó con un grupo sin tratamiento al cual no se le administró V. Cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado, contando con 6 experimentos independientes.

6.4. Viabilidad

Para evaluar la viabilidad se preparó una solución de tinción (1:1) de Br-Et (0.025 $\mu\text{g/mL}$) y CFDA (0.125 $\mu\text{g/mL}$), de esta se mezclaron 10 μL con 10 μL de la suspensión celular que contenía a los linfocitos y se incubaron a 37 °C por 15 min, posteriormente, se hicieron tres lavados con 1 mL de PBS, centrifugando entre cada uno a 4000 rpm por 3 min. El botón celular se colocó en un portaobjetos para ser analizado en microscopio de fluorescencia (marca Nikon ECLIPSE). Se clasificaron 100 células en total tomando en cuenta el número de células viables que presentan fluorescencia verde y las no viables con el núcleo rojo.

6.5. Análisis del contenido de ADN

Para saber en qué fase del ciclo celular se detiene la proliferación se determinó el contenido de ADN mediante citometría de flujo utilizando la técnica de tinción con yoduro de propidio. Al término del tiempo de incubación, las células se fijaron con alcohol etílico al 70 % frío por 24 h y se retiró para después incubar en solución de tinción (0.1 % de Tritón X-100 en PBS más 200 $\mu\text{g/mL}$ de RNasa y 50 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio), por 30 min en oscuridad.

Se adquirieron 10 000 núcleos por muestra en el citómetro BD FACSAria™ II (Becton Dickinson and Company, San José CA EUA). Con los datos se realizaron los histogramas en el programa para computadora Flowing Software versión 2.5.1 de la

Universidad de Turku y Universidad Åbo Akademi y se determinó el porcentaje de núcleos en cada fase.

6.6. Obtención de las proteínas

Para obtener las proteínas de los linfocitos se colocaron los cultivos en la centrífuga a 1 800 rpm durante 8 min, el botón celular se lavó con 5 mL de PBS y se centrifugó nuevamente. Se resuspendió en 160 µL de solución amortiguadora de lisis RIPA fría (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % SDS, 1 mM NaVO₄, 5 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄) y se dejó en ella toda la noche en refrigeración. Pasado este tiempo los tubos se centrifugaron a 12500 rpm por 12 min a 4 °C. Las proteínas se encontraron en el sobrenadante. La concentración de estas se determinó utilizando el reactivo Protein Assay de Bio-Rad que sigue el método de Bradford (1976).

6.7. Separación y detección de proteínas

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Primero se desnaturalizaron mezclando 50 µg con solución amortiguadora de muestra 6X que contiene SDS y la adición de β-mercaptoetanol que rompe los enlaces disulfuro, lo cual permitió su desnaturalización y le quita la carga intrínseca, a continuación, se calentaron a 92 °C por 5 min y se cargaron en los pozos formados en el gel, de esta manera se procedió a la separación aplicando corriente constante de 100 voltios. Posteriormente se transfirieron a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Bio-Rad por electroblotting con corriente constante de 145 miliamperios (mA) por 1.5 h. La membrana se incubó en solución de bloqueo (5 % de leche sin grasa con amortiguador tris salino más 0.5 % de Tween-20, TTBS) por 1.5 h. Después se incubó con alguno de los anticuerpos primarios 1:2000, anti-p21, anti-p53 o anti-actina como marcador de carga, durante toda la noche con agitación constante a 4 °C. Al finalizar el periodo de incubación se realizaron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno y se agregó el anticuerpo secundario 1:10000 (m-IgG Fc BP-HRP anti ratón de cabra) incubando por 1.5 h, se lavó de nuevo tres veces con TTBS. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato Clarity Max ECL sobre la membrana para

provocar la señal luminiscente, esta se fotodocumentó con el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

Las proteínas en específico se observaron como bandas en la membrana, la intensidad de cada una se obtuvo con el programa para computadora *ImageJ* 1.53K del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (<http://imagej.nih.gov/ij>) que es de libre acceso. La intensidad relativa de la proteína en cada tratamiento se calculó realizando la relación de intensidad de la banda entre la intensidad de su respectiva actina.

6.8. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se calculó la media \pm el error estándar de la media (EEM). Para saber si había diferencia entre los grupos tratados y sin tratamiento se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto del VCl₃ sobre la viabilidad celular

En el **Cuadro I** se presenta el porcentaje de viabilidad de cada tratamiento, el cual se obtuvo cuantificando 100 células por experimento. Se observa que la administración del VCl₃ no induce cambios significativos en ningún tiempo de exposición comparando con el grupo sin tratamiento.

Cuadro I. Porcentaje de viabilidad de los cultivos de linfocitos humanos tratados con VCl₃ por 24 y 48 h. Se presenta la media \pm EEM de seis experimentos independientes.

VCl ₃ en $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de viabilidad	
	24 h	48 h
0	98.3 \pm 0.3	98.0 \pm 0.5
2	96.6 \pm 0.8	98.0 \pm 0.4
4	97.3 \pm 0.6	97.0 \pm 1.6
8	98.6 \pm 0.3	98.1 \pm 0.4
16	98.6 \pm 0.3	97.6 \pm 0.8

7.2 Efecto del VCl₃ sobre las fases del ciclo celular

Los resultados del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular se muestran en las **Figuras 1 y 2**. No se presentó cambio significativo en ninguna concentración con respecto al grupo sin tratamiento a cualquier tiempo de exposición.

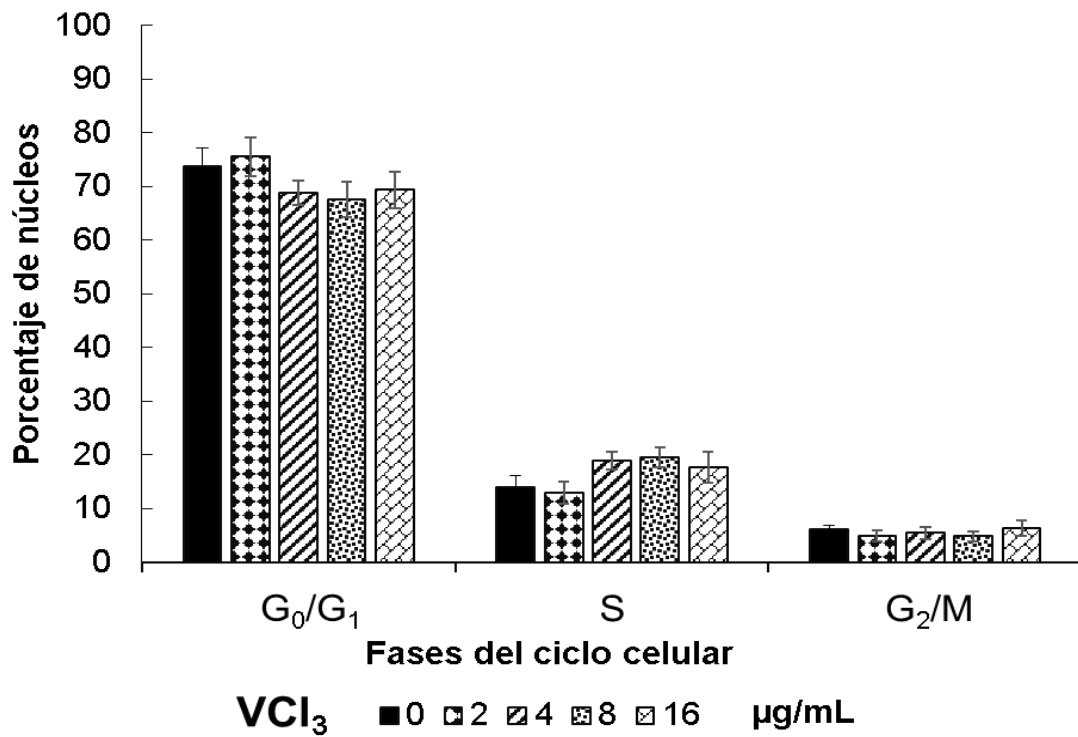


Figura 1. Porcentaje del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados *in vitro* con las concentraciones de VCl₃ por 24 h, se muestra la media ± EEM de seis experimentos independientes.

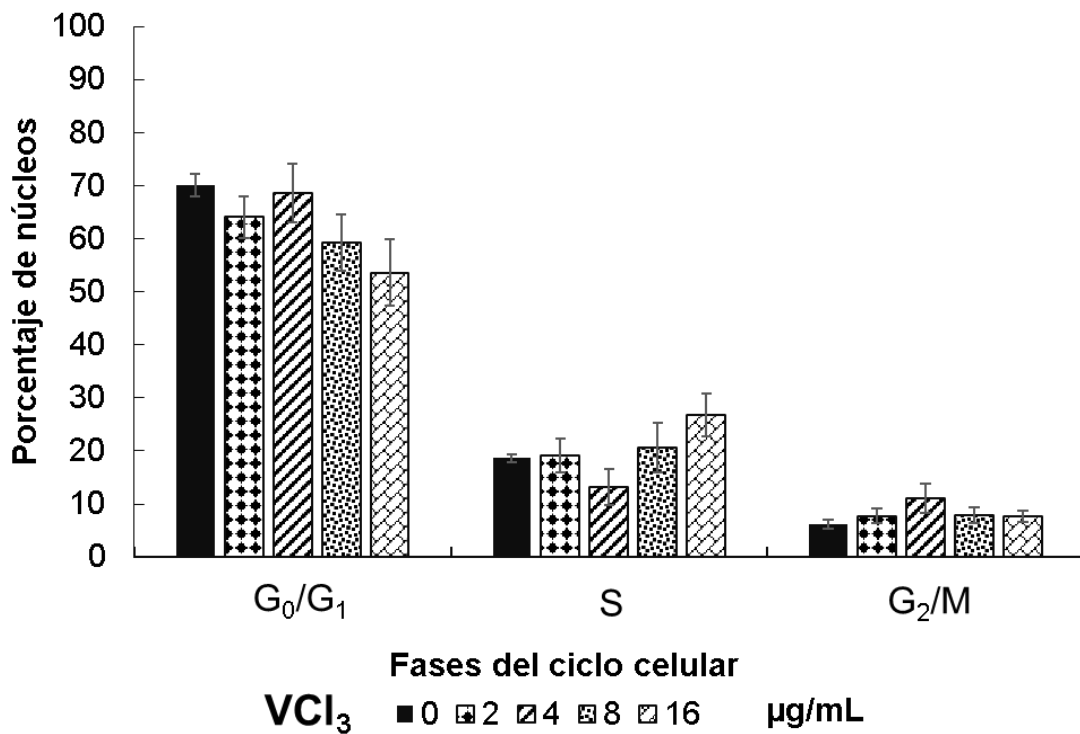


Figura 2. Porcentaje del contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos humanos tratados *in vitro* con las concentraciones de VCl₃ por 48 h, se presenta la media ± EEM de seis experimentos independientes.

7.3 Efecto del VCl_3 sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53

La exposición de los linfocitos humanos al VCl_3 por 24 h aumentó los niveles de expresión de la proteína p21 y de manera significativa en la concentración de 2, 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$ con relación al grupo sin tratamiento, 0 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3 y 4**). Por otra parte, la proteína p53 incrementó significativamente en 16 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3 y 5**).

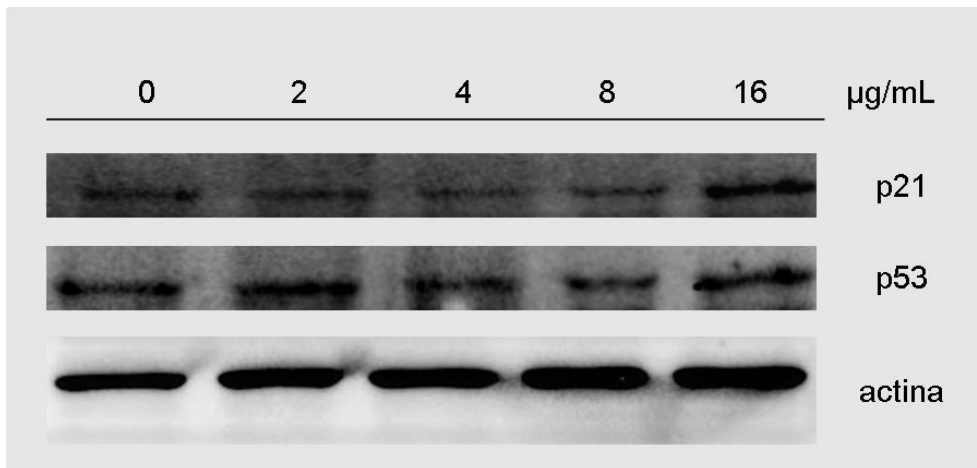


Figura 3. Fotografías representativas de las bandas de las proteínas p21, p53 y actina de los cultivos de linfocitos tratados con VCl_3 por 24 h.

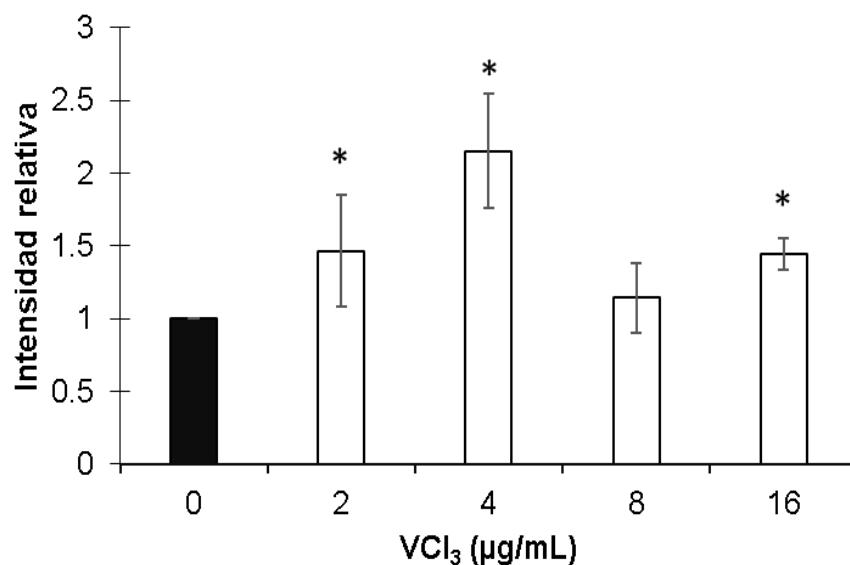


Figura 4. Intensidad relativa de la proteína p21 de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de VCl_3 por 24 h. Se muestra la media \pm EEM de seis experimentos independientes.

*: $p < 0.05$ vs sin tratamiento (ANOVA seguido de Tukey).

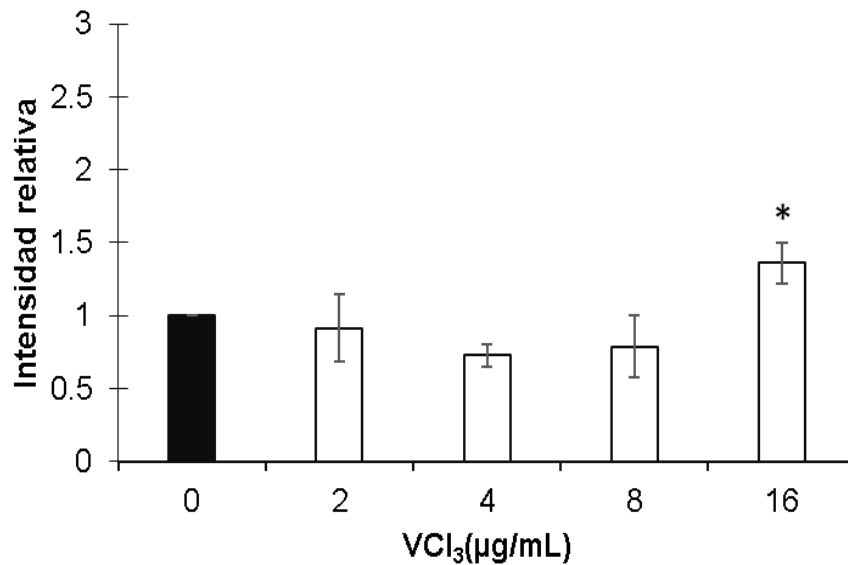


Figura 5. Intensidad relativa de la proteína p53 de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de VCl₃ por 24 h. Se muestra la media \pm E.E.M de seis experimentos independientes.

*: $p < 0.05$ vs sin tratamiento (ANOVA seguido de Tukey).

A diferencia de los tratamientos de 24 h, en la administración de VCl₃ por 48 h no se observó cambio en los niveles expresión de la proteína p21 en ninguna de las concentraciones (**Figura 6 y 7**) En cuanto p53, se observó incremento dependiente de la concentración, con diferencias estadísticas en 4, 8 y 16 µg/mL (**Figura 6 y 8**).

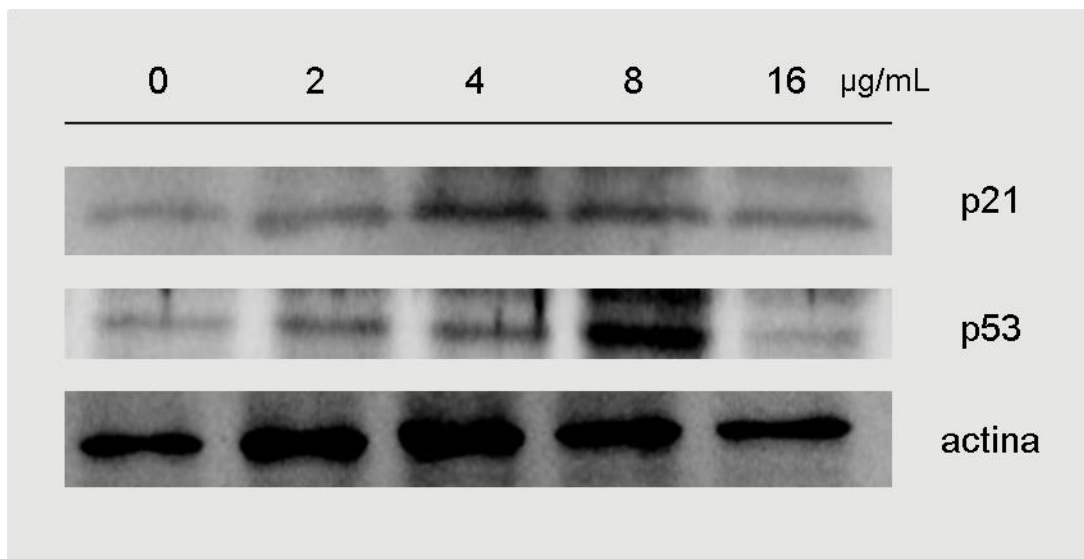


Figura 6. Fotografías representativas de las bandas de las proteínas p21, p53 y actina de los cultivos de linfocitos tratados con VCl₃ por 48 h.

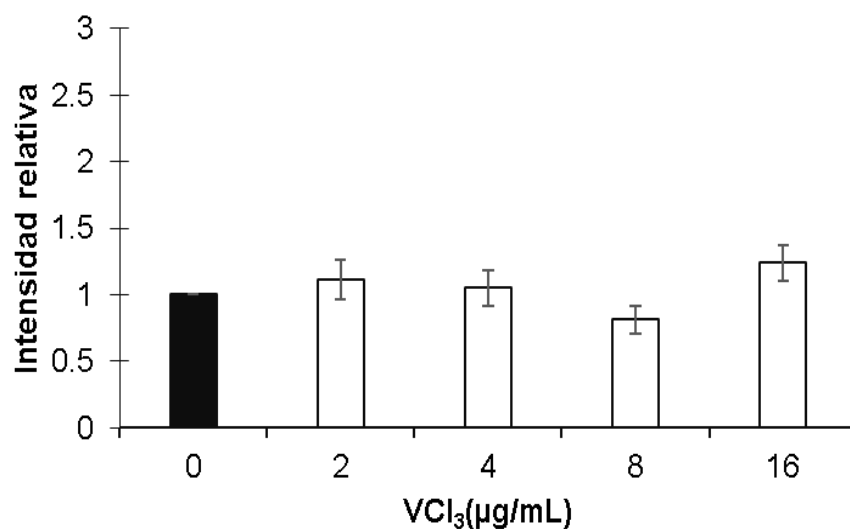


Figura 7. Intensidad relativa de la proteína p21 de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de VCl₃ por 48 h. Se muestra la media ± EEM de seis experimentos independientes.

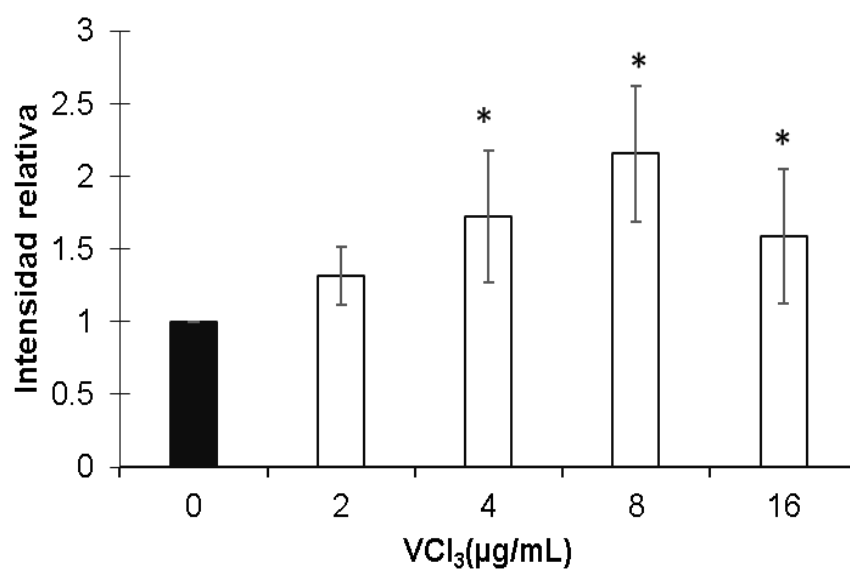


Figura 8. Intensidad relativa de la proteína p53 de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de VCl₃ por 48 h. Se muestra la media ± EEM de seis experimentos independientes.

*: $p < 0.05$ vs sin tratamiento (ANOVA seguido de Tukey).

VIII. DISCUSIÓN

El V es un metal que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza lo que propicia el contacto constante con los diferentes componentes del cuerpo. En mamíferos, incluyendo al humano, el V ingresa por los alimentos que se consumen y el aire que se respira. Dentro del organismo interactúa con las moléculas biológicas por lo que puede inducir alteraciones en su función y en algunos casos llevar al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Crans *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2008; Imtiaz *et al.*, 2015).

8.1 Efecto del VCl_3 sobre la viabilidad

La administración del VCl_3 a los cultivos de linfocitos humanos no mostró cambios en el porcentaje de viabilidad celular, ya que fue superior al 96 % en todos los tratamientos y tiempos de exposición. Este efecto también se observó en otro estudio donde administraron V_2O_3 , el V trabaja en estado de oxidación +3, utilizando el mismo modelo biológico con las mismas concentraciones y tiempos de exposición (Alcántara-Mejía, 2017).

Resultados similares se encontraron probando con otros compuestos de V en estados +4 y +5, por ejemplo, el tratamiento con V_2O_4 y V_2O_5 en concentraciones de 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ a linfocitos humanos con los mismos tiempos de exposición (Mateos-Nava, 2017; Frías-Jiménez, 2017). En leucocitos humanos con tratamientos de 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$ por 2, 4 y 6 h tampoco encontraron disminución en la viabilidad (Rodríguez-Mercado, 2006; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2011).

De igual manera Rojas *et al.* 1996, utilizando la prueba de azul de tripano observaron que en concentraciones de 0.3, 30 y 3000 μM de V_2O_5 administrados a leucocitos humanos por 2 h el porcentaje de células viables fue mayor a 95 %. Con base en lo anterior, se puede mencionar que el VCl_3 en esas concentraciones no tiene efectos sobre la viabilidad celular.

8.2 Efecto del VCl_3 sobre el contenido de ADN

Se ha comprobado que el VCl_3 puede alterar la proliferación celular al disminuir el índice mitótico (Rodríguez-Mercado, 1996), por lo que se estudió su efecto sobre el contenido de ADN, así como en los niveles de las proteínas que controlan el ciclo.

En el análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo se observó que el tratamiento con VCl_3 a linfocitos humanos no induce cambios significativos en las fases del ciclo con respecto al grupo sin tratamiento. Mateos-Nava, 2017, obtuvo resultados semejantes al utilizar el V_2O_3 a las concentraciones utilizadas en el presente estudio.

En diversos trabajos utilizando líneas celulares, se ha demostrado que los compuestos de V son capaces de retrasar la proliferación; por ejemplo, en células del carcinoma escamoso de esófago (EC109) tratadas con 0.1 a 50 μM de $NaVO_3$, (V^{+5}), por 24 h, detiene el ciclo en fase S e induce apoptosis (Yang *et al.*, 2016). Asimismo, en células de cáncer pancreático humano AsPC-1 a 100 μM detiene el ciclo en G_2/M de forma dependiente a p21 (Wu *et al.*, 2016).

De igual manera, hubo retraso en esta fase en líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano HepG2, Hep3B y Sk-Hep-1 cuando se trataron con 15 y 30 μM de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) (Wu *et al.*, 2014).

Mirjalili *et al.* 2020, al momento de administrar el complejo de óxido de [N,N'-bis(3-metoxi-salicilideno)-1,2-fenilendiamina]vanadio(IV) a células de cáncer gástrico MKN45 detiene el ciclo en la fase G_2/M a la concentración de 1 $\mu g/mL$ cuando se exponen por 48 h, lo cual era atribuible al aumento de la proteína p53. Se ha demostrado que otros complejos de oxidovanadio (VI) sintetizados con los ligandos 2-metilnitrolotriacetato, N-(2-carbamoiletil) iminodiacetato y N-(fosfometil)-iminodiacetato también detienen el ciclo en G_2/M en concentraciones de 10 a 25 μM a 48 h, siendo citotóxicos en células de cáncer de páncreas (PANC-1 y MIA PaCa2) con activación simultánea de la vía p53/p21 (Kowalski *et al.*, 2019).

Respecto al VCl_3 , se sabe que inhibe la proliferación de cultivos de células Jurkat en concentraciones de 0.1 a 5 mM a las 48 h de tratamiento, lo cual está relacionado con el incremento en el daño al ADN (Caicedo *et al.*, 2007).

Por otra parte, en un estudio *in vivo* donde administraron NH_4VO_3 a pollos, en dosis de 45 y 60 mg/kg de peso corporal en su dieta, demostraron que existía detención de los hepatocitos en la fase G_1 (Liu *et al.*, 2011). Lo que demuestra que los compuestos de V son capaces de detener el ciclo celular y que depende del tipo de célula, la especie química, la concentración y la interacción con las moléculas encargadas de las señales de proliferación.

8.3 Efecto del VCl_3 sobre los niveles de p21 y p53

Anteriormente se mencionó que las células tienen la capacidad de mantener la integridad genómica para su supervivencia y proliferación. En la regulación de la progresión del ciclo están implicados mecanismos moleculares donde participan distintas proteínas que llevan a cabo su función bajo ciertos estímulos, entre ellos la reparación del daño al ADN provocado de manera endógena o exógena, muerte celular programada, procesos de transcripción, entre otros (Shackelford, 1999; Sancar, 2004). En este trabajo se observó que el VCl_3 modifica los niveles de las proteínas p21 y p53 las cuales intervienen en los puntos de control.

Se conoce que la proteína p21 puede detener el ciclo celular en la fase G_1/S y G_2/M inhibiendo los complejos ciclina D/Cdk4 o Cdk6 y ciclina E/Cdk2, respectivamente. Su actividad está regulada por mecanismos dependientes e independientes de p53. Por otro lado, se ha observado que p21 eleva la resiliencia celular. Estudios demuestran que el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1, por sus siglas en inglés) podría aumentar la permanencia de los mioblastos C3 mediante la regulación positiva de p21 a través del proceso dependiente de Akt (Pinzón *et al.*, 2009).

Además, tiene función importante en la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN y la regulación de la apoptosis, estos incluyen a las familias de los factores de transcripción E2F, $NF\kappa\beta$, c-myc, STAT y p300/CPB. Igualmente, la vía MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) juega un papel importante en procesos como embriogénesis, proliferación y diferenciación. Es estimulada por factores de crecimiento a través de las vías Ras, Raf y MAPKK, en consecuencia, mejora la transcripción de p21. (Karimian *et al.*, 2016).

Se conoce poco acerca del efecto del V^{3+} sobre p21 y p53, sin embargo, compuestos V^{4+} y V^{5+} han demostrado interacción con diferentes moléculas biológicas, entre ellas, las proteínas. Se ha demostrado que el Na_3VO_4 en concentraciones de 25 a 350 μM en células de cáncer de mama MCF7 incrementó la expresión de las proteínas p21 y p53 de manera dependiente de la concentración, lo que llevó a la detención de la proliferación celular (Ray *et al.*, 2006). Klein *et al.* 2008, utilizaron este compuesto con líneas celulares de cáncer de epitelio humano A549, HTB44, DU145 y queratinocitos HaCaT en concentraciones de 2 a 50 μM por 24 h y comprobaron que hay inhibición

de la proliferación. Así mismo, estudios con linfocitos humanos tratados con V_2O_3 , V_2O_4 y V_2O_5 a 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h dieron como resultado aumento en los niveles de expresión de estas proteínas (Mateos-Nava *et al.*, 2021).

Ensayos con V^{4+} han demostrado que incrementa los niveles de expresión de p21, por ejemplo, en células de hígado humano HepG2 tratadas con el bisacetilacetato de vanadio [$\text{VO}(\text{aca})_2$] en concentraciones de 0 a 800 μM llevó a la detención del ciclo (Fu *et al.*, 2008). Asimismo, este compuesto en células humanas de cáncer pancreático AsPC-1 en la concentración de 100 μM detiene la proliferación en G_2/M de manera dependiente a p21 (Wu *et al.*, 2016). Sin embargo, en células HaCat a las que se les administró VO_4 presentan disminución de p21 a partir de 100 y hasta 1000 μM a las 24 h de tratamiento (Markopoulou *et al.*, 2009).

Por lo que se refiere a el efecto del V en las células, se sabe que el vanadato en concentraciones micromolares incrementa la actividad mitogénica en fibroblastos humanos, esto mediante la incorporación de timidina a la molécula de ADN (Carpenter, 1981).

Con base en lo anterior, en este trabajo se sugiere que el aumento de la expresión de p21 a las 24 h se deba a que el V estimula la división celular, ya que en el análisis de contenido de ADN se presentó tendencia a incrementar el número de núcleos en la fase S.

Cuando existe daño al ADN, la proteína p53 coordina la respuesta celular para la reparación del mismo o eliminación de la célula, provocando la detención del ciclo o estimulando la apoptosis (Blattner, 2008).

En estudios con el complejo de óxido de $[\text{N,N}'\text{-bis(3-metoxi-salicilideno)-1,2-fenilendiamina}]\text{vanadio(IV)}$ en células humanas de cáncer gástrico MKN45 a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ incrementa la expresión de p53 y detiene el ciclo en la fase G_2/M a las 48 h de tratamiento (Mirjalili *et al.*, 2020). El aumento de esta proteína se observó al administrar metavanadato de sodio (NaVO_3) en concentraciones de 10 a 100 μM en células de epidermis de ratón JB6+, lo cual indujo a la muerte celular programada mediante la generación de peróxido de hidrógeno, H_2O_2 (Huang *et al.*, 2000).

Por consiguiente, la tendencia a la detención del ciclo celular en la fase S a las 48 h de tratamiento indica que el V está causando daño al ADN, lo que incrementa la expresión de p53.

En este estudio se administró VCl_3 a cultivos de linfocitos y se observó que no modifica la viabilidad celular y tampoco se observan cambios en alguna fase del ciclo en específico, pero si incremento los niveles de expresión de las proteínas p21 a las 24 h y de p53 a las 48 h, lo cual puede estar relacionado con daño al ADN.

IX. CONCLUSIONES

- La administración de VCl_3 a linfocitos humanos no modifica la viabilidad celular
- El VCl_3 no cambia el contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo de los linfocitos humanos, expuestos a diferentes horas de tratamiento.
- El compuesto no altera la estructura de las células, sin embargo, al modificar los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 indica que sí cambia su función, lo cual implica la alteración de la proliferación celular, posiblemente por la inducción de daño al ADN.

9.1 Perspectivas

Entre los mecanismos de la actividad antitumoral de compuestos de V, que aún requieren más estudios, se sugiere la generación intensificada de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se sabe que la producción de ERO provoca alteraciones en el metabolismo celular y daños en lisosomas y las mitocondrias (críticos para mantener la homeostasis celular), lo que resulta en la activación de caspasas y apoptosis mediada por p21 y p53.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara-Mejía V.A.** 2017. Efecto del trióxido de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 de linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Página 49.
- ATSDR, Agency of Toxic Substances and Disease Registry.** 2012. *Toxicological profile for vanadium*. Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Páginas 77-78.
- Barán E.J.** 2017. Vanadio: ¿Un elemento estratégico? *Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 69:84-114.
- Barrera L., Drago MA., Zamora A., Gómez F., Sainz T., Mendoza F.** 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 1:42-55.
- Bates S., Vousden K.H.** 1996. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*. 6:12 -19.
- Blattner C.** 2008. Regulation of p53. *Cell Cycle*. 7:3147-3153.
- Caicedo M., Jacobs J., Reddy A., James N.** 2007. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jukart) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 86:905-913.
- Calva-B L.G., Torres-A M.R.** 2003. Metales pesados y sus efectos en organismos. México. Consultado el 20/08/2021. Recuperado de <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n51ne/metales.pdf>
- Carpenter G.** 1981. Vanadate, epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 102:1115-1121.
- Castillo F., Roldán M., Blasco R., Huertas M., Caballero F., Moreno C., Luque M.** 2005. *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar. España. Página 238.
- Contreras D.A., Gómez C., Rangel M., Ruiz A., Martínez P., Barba N.** 2014. La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*. 25:245-253.
- Crans D.C., Robin I., Theisen L.A.** 1989. Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *Journal of the American Chemical Society*. 111:7597-7607.

- Engelhart S., Senegal R.** 2017. Allergic reaction to vanadium causes a diffuse eczematous eruption and titanium alloy orthopedic implant failure. *Contact Dermatitis*. 99:245-249.
- Falcón-Rodríguez C.** 2008. Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio. Estudio comparativo en rata y ratón. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Página 6.
- Ferrer A.** 2003. Intoxicación por metales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 26:141-153.
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López I.E., Bizarro P., Mendoza M.L., Osorio L.S., Espejel-Maya G., Ávila-Casado M. del C., Ávila-Costa M.R., ColinBarenque L., Villanueva D.N., Olaiz-Fernandez G.** 2002. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 57:446-449.
- Frías-Jiménez E.** 2017. Efecto del pentóxido de vanadio sobre los niveles de la proteína Cdc25C de linfocitos humanos tratados in vitro. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Página 40.
- Fu Y., Wang Q., Yang X.G., Yang X.D., Wang K.** 2008. Vanadyl bisacetylacetonato induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 13:407-418.
- Galván-Huerta S.C., Bojórquez-Castro L.** 2002. *Biología*. Editorial Santillana. México. Páginas 107-110.
- Gangolli S.** 1999. *The Dictionary of Substances and their Effects*. Volume 7, The Royal Society of Chemistry. Inglaterra. Páginas 581-582.
- García-Núñez I., Algaba-Mármol M.A., Suárez-Vergara M., Fuentes-Soltero J., Fernández-Barrera C., Bartolomé B., Grau-Bonete A., Ignacio-García J.M.** 2018. Vanadium contact dermatitis: Case report and studies performed. *Contact Dermatitis* 218:1-2.
- García-Pérez H.** 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *University Diagnostics*. 1:31-41.
- Givan A.** 2001. Principles of flow cytometry: An overview. *Methods in Cell Biology*. 63:19-50

- Hernández D.E., Leavitt R.D.** 1984. Mitogenic and mitogenically defective phytohemagglutinin isolectins T-cell growth factor (Interleukin 2) production and response in fresh and cultured human T lymphocytes. *Cellular Immunology*. 86:101-108.
- Hernández-Pérez F.** 2017. Estudio electroquímico de vanadio para su posible recuperación de un catalizador gastado. Tesis Maestría. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. México. Página 112.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S.S., Shen H., Butterworth L., Lu Y., Costa M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Shi X.** 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 275:32516-32522.
- 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. *Environment International*. 80:79-88.
- Kariman A., Ahmadi Y., Yousefi B.** 2016. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*. 42:63-71.
- King D.J.** 1998. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. Inglaterra. CRC Press. Página 100.
- Klein A., Holko P., Ligeza J., Kordowiak A.M.** 2008. Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer cells (A549, HTB44, DU145). *Folia Biologica*. 56:115-121.
- Koolman J., Heinrich K.** 2003. *Bioquímica. Texto y Atlas*. Editorial Panamericana. Tercera edición. País Páginas 78-79.
- Kowalski S., Wyrzykowski D., Hac S., Rychlowski M., Radomski M.W., Inkielewicz-Stepniak I.** 2019. New oxidovanadium(IV) coordination complex containing 2-methylnitriloacetate ligands induces cell cycle arrest and autophagy in human pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*. 20:1-20.
- Lagunas M., Valle A., Soto I.** 2014. Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *VERTIENTES. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 17:98-107.
- Li M., Ding W., Baruah B., Cans D.C., Wang R.** 2008. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 102:1846-1853.

- Liu X., Cui H., Peng X., Fang J., Cui W., Wu B.** 2011. The Effect of Dietary Vanadium on Cell Cycle and Apoptosis of Liver in Broilers. *Biological Trace Element Research*. 143:1508-1515.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J.** 2016. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Panamericana. Argentina. Página 94.
- Lomanto L., Ortíz O., Bretón C., Gómez A., Mesa V.** 2003. El ciclo celular. *MedUNAB*. 16:21-29.
- Londoño-Franco L., Londoño-Muñoz P., Muñoz-García F.** 2016. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14:145-153.
- Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T.** 1995. P53-Dependent and independent expresión of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Development*. 9:935-944.
- Mahmudy T., Ping-Chang Yang.** 2012. Western Blot: técnica, teoría y resolución de problemas. *North American Journal of Medical Sciences*. 4:429-434
- Malumbres M.** 2011. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological Reviews*. 91:973-1007.
- Markopoulou S., Kontargiris E., Batsi C., Tzavaras T., Trougakos I., Boothman D.A., Gonos E.S., Kolettas E.** 2009. Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. *FEBS Journal*. 276:3784-3799.
- Mateos-Nava R.A.** 2017. Estudio del efecto de 3 óxidos de vanadio sobre la progresión del ciclo celular: ¿Mecanismo directo ó indirecto? Tesis Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Página 70.
- Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Altamirano-Lozano M.A.** 2017. Premature chromatid separation and altered proliferation of human leukocytes treated with vanadium (III) oxide. *Drug and Chemical Toxicology*. 40:457-462.
- Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L., García-Rodríguez M.C., Altamirano-Lozano M.A.** 2021 Vanadium oxides modify the expression levels of the p21, p53, and Cdc25C proteins in human lymphocytes treated *in vitro*. *Environmental Toxicology*. 36:1536-1543.

- McPhee D.J.** 2010. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 6:171-177.
- Megías M., Molist P., Pombal M.** 2017. Atlas de Histología Animal y Vegetal. *La célula. Ciclo Celular*. Consultado el día 18/04/2020. Recuperado de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-08-ciclo-celular.pdf
- Méndez Y., Báez F., Villamedia P.** 2014. Efecto *in vitro* del pentóxido de vanadio (V_2O_5) sobre la calidad espermática. *Perinatología y Reproducción Humana*. 28:187-192.
- Miele L.** 2004. The biology of cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Methods in Molecular Biology*. 285:3-21.
- Mirjalili S., Dejamfekar M., Moshtaghian A., Salehi M., Behzad M., Khaleghian A.** 2020. Induction of cell cycle arrest in MNK45 cells after schiff base oxovanadium complex treatment using changes in gene expression of CdC25 and p53. *Drug Research*. 70:545-551
- Molina-Álvarez B., Frías Vázquez S.** 2008. Capítulo 8: Cultivo de tejidos. En González-Moran M.G. (Ed.) *Técnicas en Biología Celular*. 135-156.
- Morisaki H., Ando A., Nagata Y., Pereira-Smith O., Smith J.R., Ikeda K., Nakanishi M.** 1999. Complex Mechanism Underlying Impaired Activation of Cdk4 and Cdk2 in Replicative Senescence: Roles of p16, p21 and Cyclin D1. *Experimental Cell Research*. 253:503-510.
- Niida H., Nakanishi M.** 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 21:3-9.
- NIH, National Institute of Health. National Human Genome Research Institute.** (2020) *Western blot*. Recuperado de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot> Consultado el día 25/03/2020.
- Nunez R.** 2001. *Flow cytometry for research scientists: principles and applications*. Horizon Press. Estados Unidos Americanos.
- Peralta O., Bahena M., Díaz C., Madrid V.** 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*. 39:451-462.
- Pinzón C.E., Serrano M.L., Sanabria M.C.** 2009. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*. 7:47-66.

- Ray R.S., Rana B., Swami B., Venu V., Chatterjee M.** 2006. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chemico-biological Interactions*. 163:239-247.
- Rodriguez-Frogoso L., Hernández-Baltasar E., Reyes-Esparza J.A.** 2004. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*. 21:60-69.
- 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., Altamirano-Lozano M.A.** 2006. Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 22:173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J., Roldán-Reyes E., Altamirano-Lozano M.** 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 144:359-369.
- 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*. *Toxicology 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. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 359:77-84
- Roldán R.E., Altamirano-Lozano M.A.** 1990. Chromosomal aberrations, sister chromatid Exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 245:6165.
- Ross M.H., Pawlina W.** 2015. *Histología: Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular*. España. Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L., Unsal-Kaçmaz K., Linn S.** 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. 73:39-85.

- Shackelford R., Kaufmann W., Paules R.** 1999. Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. *Environmental Health Perspectives*. 107:5-24.
- Sherr C.J. y Roberts J.M.** 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes & Development*. 13:1501-1512.
- TODINI Chemicals.** 2020. Tricloruro de vanadio <https://www.todini.com/es/productos-quimicos/vanadio/tricloruro-de-vandio>
- Tucker J.D. y Preston R.J.** 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 365:147-159.
- Valko M., Rodhes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160:1-40.
- VANITEC.** 2022 Vanadium redox flow battery. <https://vanitec.org/vanadium/article/vanadium-redox-flow-battery-vrflb>
- Vargas-Anaya, C.** 2012. Diferencias en la expresión de la proteína p53 en linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wu Y., Ma Y., Xu Z., Wang D., Zhao B., Pan H., Wang J., Xu D. Zhao X., Pan S., Liu L., Dai W., Jiang H.** 2014. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Letters*. 351:108-116.
- Wu J., Hong Y., Yang X.** 2016. Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer ASPC-1 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 21:919-929.
- Yang J., Zhang Z., Jiang S., Zhang M., Lu J., Huang L., Zhang T., Gong K., Yan S., Yang Z., Shao G.** 2016. Vanadate-induced antiproliferative and apoptotic response in esophageal squamous carcinoma cell line EC109. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part. A*. 79:864-868.
- Zhang Z., Gao N., He H., Guang C., Luo J., Shi X.** 2004. Vanadate activated Akt and -promoted S phase entry. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 255:227-237.

XI. ANEXOS

Este trabajo fue presentado parcialmente en:

Evento: Congreso Nacional de Genética 2022 de la Sociedad Mexicana de Genética, celebrado en Chapala, Jalisco, México, del 25 al 28 de Octubre de 2022.

Título de ponencia: Efecto del tricloruro de vanadio sobre los niveles de expresión de las proteínas p53 y p21 de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Autores: García-Sosa B.A., Álvarez-Barrera L., Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A.



CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2022

GENÉTICA Y SOCIEDAD: 120 AÑOS

25 - 28 OCTUBRE
Chapala, Jalisco.

Hotel Villa Montecarlo de la UdG
Av. Hidalgo 296

<https://smgac.org.mx>
smgcongreso2022@gmail.com
Sociedad Mexicana de Genética AC

Talleres pre-congreso:
24 - octubre 8:00 - 16:00 h.
Instituto Tecnológico de Tlajomulco

- Técnicas básicas de biología molecular con aplicación al estudio de la biodiversidad
- Dr. Juan Florencio Gómez Leyva
- Genética para principiantes.
- Dr. Alejandro Ángeles Espino.

Conferencias magistrales
Simposios
Ponencias orales y en cartel
Concurso al mejor cartel "Dr. Lino Díaz de León"
Licenciatura, maestría y doctorado.

Fecha límite de recepción de resúmenes: 02 de septiembre

Cuotas de recuperación	Hasta el 16 de septiembre	Después del 16 de septiembre
Profesionista	\$2,500. ^{**}	\$3,000. ^{**}
Profesionista socio activo *	\$1,000. ^{**}	\$1,300. ^{**}
Estudiante de pregrado **	\$500. ^{**}	\$750. ^{**}

* Han cubierto su cuota anual (\$1000.-) ** Con credencial vigente

Cuenta de la Sociedad Mexicana de Genética A.C.
Banco Santander Serfin: Sucursal 5805
Cuenta 92-00183836-7; CLABE: 014180920018383679

SMG Sociedad Mexicana de Genética A. C.
ITESO Universidad Jesuita de Guadalajara Ingeniería en Biotecnología
CENICEN Centro Nacional de Genética y Evolución
TEQUILA Consejo Mexicano del

EFFECTO DEL TRICLORURO DE VANADIO SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS P21 Y P53 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS *IN VITRO*

García-Sosa B.A., Álvarez-Barrera L., Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A.*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, UMIEZ, Laboratorio 5 primer piso. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Campus II, UNAM. CP 09230, Cd. Mx. México. rodrigo.mateos@zaragoza.unam.mx; aby_gsosa@comunidad.unam.mx

El vanadio es un metal que se encuentra presente en la naturaleza y las actividades humanas han incrementado sus cantidades en el medio ambiente. Los seres vivos están expuestos a él por la ingesta de alimentos, el aire que respira y la absorción dérmica, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran que el vanadio interactúa con las diferentes moléculas biológicas e induce efectos genotóxicos y citotóxicos. En el laboratorio, en trabajos con linfocitos humanos *in vitro*, se ha observado que los óxidos de vanadio afectan los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular.

Con respecto al tricloruro de vanadio (VCl_3) se tiene poca información relacionada con su toxicidad a nivel celular, por lo que en este estudio se evaluó el efecto del VCl_3 sobre los niveles de expresión de las proteínas p53 y p21 en cultivos de linfocitos humanos.

Los cultivos fueron expuestos durante 24 y 48 h a concentraciones de 2, 4, 8 o 16 $\mu g/mL$ de VCl_3 . Después de los tratamientos se determinó la viabilidad celular con colorantes fluorescentes y el contenido de ADN por citometría de flujo. Al mismo tiempo se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p53 y p21 con la técnica de "Wester blot".

La administración de VCl_3 no modificó la viabilidad y a diferencia de los óxidos de vanadio el VCl_3 no retrasa el ciclo en alguna fase en específico. Con relación a las proteínas, p21 incrementó en los tratamientos de 4 y 16 $\mu g/mL$ a las 24 h, mientras p53 en 8 $\mu g/mL$ a las 48 h. Es posible que el VCl_3 esté afectando otra vía en la cual p21 participa y no en el bloqueo de la progresión del ciclo celular.

Trabajo realizado con el apoyo del proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT IN229220.