



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Evaluación del efecto del tricloruro de vanadio  
en las proteínas reguladoras de la transición de  
la fase  $g_1$  (ciclina D/Cdk4 y ciclina E/Cdk2) de  
linfocitos humanos tratados *in vitro***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

Presenta:

Díaz Sandoval Paulina

Director de tesis: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Asesores: Dra. Lucila Álvarez Barrera

M. en C. Víctor Alan Alcántara Mejía



**FES  
ZARAGOZA**

CD. MX. 2024



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-210324.



**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: **DIAZ SANDOVAL PAULINA** con número de cuenta **417090007** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **22 de Marzo de 2024** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DRA. ALVAREZ BARRERA LUCILA	
VOCAL	DR. MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL	
SECRETARIO	DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	
SUPLENTE	DRA. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	
SUPLENTE	MTRO. ALCANTARA MEJIA VICTOR ALAN	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Evaluación del efecto del tricloruro de vanadio en las proteínas reguladoras de la transición de la fase G1 (ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2) de linfocitos humanos tratados *in vitro*

En la modalidad de: **TESIS**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
CDMX, a 7 de Febrero de 2024

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



## Constancia de verificación de trabajo escrito

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

P R E S E N T E

A través del presente, notifico que el reporte emitido por la herramienta tecnológica (Software) Detector de Plagio Viper, con 2 % de coincidencias, el cual, de acuerdo con los requisitos solicitados por el H. Consejo Técnico de la Facultad, determinó que cumple con los criterios para que él o la sustentante Paulina Diaz Sandoval, número de cuenta 417090007, pueda iniciar con los trámites correspondientes para la presentación de su Examen Profesional.

Sin más, emito mi visto bueno para beneficio de la o él sustentante.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad de México, a 25 de enero de 2024

Dr. Rodrigo Anibal Mateos Nava

Nombre y firma del Director del trabajo escrito.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

### PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL (Titulación o Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.


De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Evaluación del efecto del tricoloruro de unadío en las proteínas reguladoras de la transición de la fase G<sub>1</sub> (ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2) de linfocitos humanos tratados *in vitro*

que presenté para obtener el título/grado de: Biólogo, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

ATENTAMENTE

  
Paulina Díaz Sandoval

NOMBRE Y FIRMA

417090007

NÚMERO DE CUENTA

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por guiarme a lo largo de mi carrera, por brindarme unos padres maravillosos y una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional, a la FES Zaragoza, porque en ella conocí a profesores y amigos que siempre llevaré en mi corazón.

A mi director de tesis, el Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, ya que su experiencia, sus conocimientos y su paciencia han sido fundamentales para la finalización de esta tesis, infinitas gracias por confiar en mí, por su disposición para ayudarme y por brindarme su amistad.

Así mismo, a la Dra. Lucila Álvarez Barrera y al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su orientación, atención, sus enseñanzas y por sus sugerencias para enriquecer mi trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Elizabeth Vieyra Valdez y el M. en C. Víctor Alan Alcántara Mejía por sus observaciones y su buena disposición.

A la Dra. Isabel Soto Cruz, al Dr. Arturo Valle Mendiola y al Mtro. Octavio Alberto Zerecero Carreón, del laboratorio 9 de la planta baja de la UMIEZ por el apoyo en la estandarización de la técnica de Western Blot.

A la Biól. Guadalupe Gómez García por su ayuda en el manejo del Citómetro de Flujo, así como la adquisición de datos del mismo.

A mis compañeros de la carrera, así como del laboratorio 5 del primer piso de la UMIEZ, gracias por los buenos momentos, por hacer amena mi estancia, en especial a Aby, por su amistad, por acompañarme a lo largo de este viaje, por las risas y por las anécdotas vividas.

Finalmente, y no menos importante a mi familia, que sin ellos esto no habría sido posible.

## **Dedicatorias**

Este trabajo lo dedico a mi mamá, Elvira Sandoval Ayala y mi papá, Antonio Díaz Alvarado, por su amor y sacrificio, por poner su fe en mí y no soltarme en los momentos más difíciles, me han enseñado que no importa el tamaño de mi batalla, yo siempre puedo, este logro también va dirigido a mi hermano Luis, gracias por su apoyo incondicional y sus consejos, los amo.

A mi tío Beto, que siento como mi segundo papá, jamás olvidaré que desde el día uno me llevó a realizar mis trámites y nunca me dejó sola, por preocuparse por mí y ser el tío buena onda.

Debo mencionar a mi tía Vero, que ha sabido escucharme y todos los días está echándome porras.

A mi tío Arturo, por estar al pendiente durante este proceso, por sus ánimos y buenas vibras.

A mi abuelita Antonia, quien siempre desea lo mejor para mi vida, que celebra mis logros como si fueran suyos.

A un ser especial que ya no está conmigo, Cariñitos por el inmenso amor que me brindó, que estuvo desde el comienzo de esta etapa y aunque no está presente, su recuerdo siempre me acompaña.



# Contenido

	<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>I.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>2</b>
	1.1 Vanadio.....	2
	1.1.1 Usos del vanadio .....	4
	1.1.2 Exposición de los humanos al vanadio.....	4
	1.1.3 Efecto del vanadio a nivel celular.....	6
	1.1.4 Tricloruro de vanadio.....	7
	1.2 Ciclo celular.....	7
	1.2.1 Control del ciclo celular.....	8
	1.2.2 Efecto de los compuestos de vanadio sobre el ciclo celular.....	9
	1.3 Linfocitos como modelo de estudio.....	10
	1.4 Separación de proteínas.....	11
	1.5 Western blot.....	12
<b>II.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>III.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>13</b>
<b>IV.</b>	<b>Objetivos</b>	
	4.1 General.....	14
	4.2 Particulares.....	14
<b>V.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	
	5.1 Reactivos y soluciones de trabajo.....	15
	5.2 Cultivo de linfocitos.....	15
	5.3 Tratamiento.....	16
	5.4 Viabilidad.....	16
	5.5 Ciclo celular.....	17
	5.6 Obtención y cuantificación de proteínas.....	17
	5.7 Separación e inmunoelectrotransferencia de las proteínas.....	18
	5.8 Análisis estadístico.....	18
<b>VI.</b>	<b>Resultados</b>	
	6.1 Efecto del $VCl_3$ sobre la viabilidad celular.....	19
	6.2 Efecto del $VCl_3$ sobre el ciclo celular.....	20
	6.3 Efecto del $VCl_3$ sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de linfocitos.....	21
<b>VII.</b>	<b>Discusión</b>	
	7.1 Efecto del $VCl_3$ sobre la viabilidad celular.....	26
	7.2 Efecto del $VCl_3$ sobre el ciclo celular.....	27
	7.3 Efecto del $VCl_3$ sobre los niveles de expresión de las proteínas.....	28
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>30</b>
<b>IX.</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>31</b>

## Resumen

El vanadio está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y es emitido a la atmósfera principalmente por las actividades antropogénicas, sus compuestos son utilizados en la industria del acero, la medicina y en catalizadores industriales. Se encuentra en los alimentos y el agua potable, lo cual representa una fuente de exposición de los organismos a este metal. Estudios *in vitro*, en linfocitos humanos, han demostrado que los óxidos de vanadio interactúan con las moléculas responsables que controlan el ciclo celular, provocando su detención. Sin embargo, estos ensayos se centran principalmente en los estados de oxidación +4 y +5, por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de un compuesto con vanadio +3, el tricloruro de vanadio ( $VCl_3$ ), sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, Cdk4, ciclina E y Cdk2 de linfocitos humanos tratados con concentraciones de 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 y 48 h.

Después de los tratamientos con  $VCl_3$ , se determinó la viabilidad celular con colorantes fluorescentes y el contenido de ADN mediante citometría de flujo para determinar su efecto sobre las fases del ciclo celular, asimismo, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas antes mencionadas con la técnica de "Western blot".

Se observó que la administración de  $VCl_3$  no modifica la viabilidad, pero detiene la progresión del ciclo celular en la fase S a las 48 h. En cuanto al análisis de las proteínas, existe incremento en la expresión de ciclina D en la concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h, Cdk4 en 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h respectivamente, y Cdk2 a 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h, ciclina E no muestra cambios en ningún tratamiento ni tiempo de exposición.

Los resultados muestran que el  $VCl_3$  altera la expresión de estas proteínas, las cuales son encargadas de regular el ciclo en la fase  $G_1$  y el aumento de ellas permiten la transición a la fase S, lo que se observa en este trabajo.

## I. Introducción

En los últimos años la contaminación ambiental por los metales pesados se ha convertido en preocupación ecológica y de salud pública mundial (Tchounwou *et al.*, 2014). Son elementos que tienen densidad cinco veces mayor a la del agua, suelen ser tóxicos, aún en concentraciones bajas, entre ellos se encuentran: aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), **vanadio** (V), oro (Au) y zinc (Zn). A pesar de encontrarse naturalmente en toda la corteza terrestre, son principalmente emitidos a la atmósfera por actividades antropogénicas como las operaciones de minería y fundición, el uso industrial, doméstico y agrícola de estos. Debido a su naturaleza, no pueden ser degradados o destruidos, sin embargo, son lixiviados y disueltos por agentes físicos y químicos; algunos resultan esenciales para nuestro organismo y en varios casos, su deficiencia o exceso puede conducir a problemas de salud (Londoño *et al.*, 2016).

### 1.1 Vanadio

En la tabla periódica de los elementos químicos, el vanadio se ubica como el primer elemento de transición del grupo 5 (VB), se representa con el símbolo V, tiene número atómico 23, configuración electrónica [Ar] 4s<sup>2</sup> 3d<sup>3</sup>, masa molar 50.942 g/mol, punto de fusión de 1910 °C y de ebullición de 3420 °C (Lagerkvist *et al.*, 1986; IUPAC, 2007). Es un metal dúctil, blando, de color grisáceo con una densidad de 6.11 g/cm<sup>3</sup>. Fue descubierto en 1801 por Andrés Manuel del Río al analizar un nuevo mineral con plomo y redescubierto en 1831 por Nils Gabriel Sefström, quien lo nombró vanadio en honor a la diosa escandinava de la belleza y la fertilidad Vanadis, Freya (Contreras-Cadena *et al.*, 2014).

Los estados de oxidación que presenta son -1, 0, +2, +3, +4 y +5, siendo los últimos tres los más comunes y con funciones biológicas reconocidas. Generalmente, se pasa de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de óxido-reducción (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). La toxicidad de los compuestos de V

*in vitro* difiere significativamente debido a su naturaleza y al estado de oxidación, siendo el +5 el más tóxico para mamíferos (Mukherjee *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

En la corteza terrestre, ocupa el lugar 22 de los elementos más abundantes con concentración promedio de 100 mg/Kg, se encuentra en alrededor de 65 minerales entre ellos, carnotita, roscoelita, vanadinita, patronita, bravoita y davidita, regularmente se presenta combinado con otros elementos, oxígeno, sodio, azufre o cloruro (ATSDR, 2012).

Está presente en suelo, agua y aire, su liberación en la atmósfera es ocasionada por fuentes naturales que incluyen polvos continentales, aerosoles marinos y emisiones volcánicas (ATSDR, 2012), pero principalmente por la actividad humana, minería, industrias, quema de combustibles fósiles, reciclaje de residuos domésticos y la aplicación de fertilizantes y plaguicidas; emitiendo a la biosfera cerca de 64,000 toneladas por año en total (VANITEC, 2023).

Es importante mencionar que los niveles en el ambiente varían dependiendo de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, en las zonas urbanas va de 0.1 a 10 Kg ha<sup>-1</sup>, para las rurales son 0.01-0.1 Kg ha<sup>-1</sup> y en las remotas corresponden valores menores de 0.001 a 0.01 Kg ha<sup>-1</sup> (WHO, 2001; Zwolak, 2020). Se considera que su concentración en el suelo es alrededor de 100 µg/g de peso seco, pero en los cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los 400 µg/g (IPCS, 2001).

En aguas subterráneas las concentraciones oscilan aproximadamente de 0.04 a 220 µg/L (ATSDR, 2012) y en las superficiales dulces menos de 3 µg/L (IPCS, 2001). Es considerado micronutriente esencial (excepto para el ser humano) y se ha demostrado en mamíferos que su carencia provoca alteraciones en la absorción y la degradación de los carbohidratos y lípidos, el deterioro óseo, la disminución en la producción de la leche materna, los abortos espontáneos, los problemas psicológicos (Contreras *et al.*, 2001), la inhibición del crecimiento y la mineralización de los huesos (Altamirano-Lozano *et al.*, 2014). A nivel mundial, diferentes científicos se han dedicado a investigar su relevancia fisiológica e importancia farmacológica en la población humana durante los últimos 50

años. Así, el estudio del V constituye un campo de investigación interesante en la salud y la enfermedad (Treviño *et al.*, 2019).

### **1.1.1 Usos del vanadio**

Los compuestos de V han sido utilizados como tónico, antiséptico o espiroquicida en el tratamiento de la clorosis, caries dental, anemia, tuberculosis, diabetes (Saad y Najjar, 2005) y la sífilis. Sin embargo, todavía se necesitan varios estudios químicos, clínicos y epidemiológicos para determinar la dosis y la vía más eficaz para su aplicación farmacológica en diversas enfermedades.

Forma aleaciones con Al, Fe, titanio, entre otros, proporcionándole propiedades de dureza y resistencia (Zhong *et al.*, 1994; ATSDR, 2012); debido a esto, es fundamental en la fabricación de autopartes y componentes de aviones. Se utiliza en la cerámica, los colorantes para fotografía, las pinturas, los imanes superconductores, los suplementos dietéticos, las amalgamas, los insecticidas y los fertilizantes (Zhong *et al.*, 1994; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; ATSDR, 2012). Así mismo, se emplea como catalizador para la obtención de los ácidos sulfúrico, ftálico y maleico (Gunnar, 2001). Es importante mencionar que también está presente en la industria de la energía atómica y en la tecnología espacial (IPCS, 2001).

### **1.1.2 Exposición de los humanos al vanadio**

La entrada de V al organismo de los mamíferos ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Para la población humana, la principal fuente de exposición es mediante la ingesta y esta proviene de: a) los alimentos como el perejil, la pimienta negra, la lechuga, las espinacas y los mariscos (ATSDR, 2012), no obstante, estos últimos regularmente tienen cantidades más altas que la carne de animales terrestres, la mayoría reportan bajas concentraciones (menos de 1 ng/g), el consumo diario oscila entre 0.01 y 0.02 mg; b) el agua potable, las concentraciones medias en el agua del grifo son de aproximadamente 0.001 mg/L,

suponiendo que un adulto bebe 2 L de esta misma al día, se deduce el consumo diario de 0.002 mg del metal en cuestión; y c) en los suplementos dietéticos y multivitaminas, en los que tiene presencia de 0.0004 a 12.5 mg, dependiendo de la dosis sugerida por el fabricante. De todo el V que es ingerido se absorbe únicamente el 10 % (Mukherjee *et al.*, 2004).

También ingresa al organismo mediante el aire que se respira, del cual solo se absorbe el 25 %. Esto debido a que está presente en la atmósfera resultado de procesos antropogénicos y naturales (ATSDR, 2012).

Dado que los estudios específicos con respecto a la absorción en humanos o animales después de la exposición dérmica son escasos, no se tiene la cantidad establecida, pero generalmente se considera mínima (WHO, 1988), por su baja solubilidad en lípidos y agua (ATSDR, 2012).

Se sabe que los riñones son los órganos que mayormente lo acumulan, le sigue el bazo, los huesos, el hígado y en menor medida, los pulmones y los testículos (IPCS, 2001), igualmente se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso (Sharma *et al.*, 1987). Finalmente se excreta por la bilis, el pelo y rápidamente por los riñones, con una vida media biológica de 20 a 40 h, en la orina (Barceloux, 1999).

Una vez absorbido, el ion vanadato  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  se reduce a  $\text{VO}_2^+$ , por el glutati6n de los eritrocitos o por el ácido asc6rbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras en el plasma. Posteriormente, es transportado a los sitios de almacenamiento por la transferrina principalmente y la albúmina (Degani *et al.*, 1981).

En condiciones fisiológicas, puede encontrarse en estados de oxidaci6n +4, en forma de cati6n vanadilo  $\text{VO}_2^+$ , +5 como vanadato,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ , y +3. El primero ingresa a la c6lula mediante el mecanismo de difusi6n, y el segundo a trav6s de canales ani6nicos. Por el contrario, la entrada del +3 no es bien conocida ya que su biocin6tica es a6n incierta, se cree que debido a la presencia de ox6geno en la sangre es posible que pueda ser oxidado a  $\text{V}^{4+}$  o  $\text{V}^{5+}$  y parte permanece en  $\text{V}^{3+}$  unido a diferentes ligandos (Rodr6guez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

### 1.1.3 Efecto del vanadio a nivel celular

A nivel celular predomina el  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  debido al pH neutro, éste entra en la célula a través del mecanismo de transporte de aniones, principalmente por los canales de fosfato (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Luego, es reducido a  $\text{VO}_2^+$  por el glutatión intracelular, la reducción es regulada por reacciones de oxido-reducción que controlan los equilibrios entre los estados de oxidación del V (Hansen *et al.*, 1982).

Se ha demostrado que el V ocasiona cambios inmunológicos como la disminución del número de macrófagos alveolares, la viabilidad y la actividad de los fagocitos, también inhibe o estimula la actividad de varias enzimas, incluidas ATPasas, fosfatasas, cinasas, ADN polimerasas y peroxidasas (Zhong *et al.*, 1994).

A nivel celular, se ha observado que los compuestos de V modifican la proliferación celular e inducen daños al ADN. Estudios realizados por Roldán y Altamirano (1990), demostraron que el pentóxido de V ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ) en concentraciones de 2, 4 y 6  $\mu\text{g/mL}$  administrado en cultivos de linfocitos humanos, incrementó las células poliploides y las asociaciones de satélites (AS) entre cromosomas acrocéntricos, además, disminuyen el índice mitótico (IM) y retrasan la duración del ciclo celular.

Por otra parte, Rodríguez-Mercado (1995), al aplicar dos sales: tetrafluoruro de vanadio ( $\text{VF}_4$ ) y  $\text{VCl}_3$ , a concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$ , en linfocitos humanos, reportó que ambos disminuyen el IM e incrementan el tiempo promedio generacional (TPG), el  $\text{VF}_4$  aumentó la frecuencia de los intercambios de las cromátidas hermanas (ICH), mientras que el  $\text{VCl}_3$  no modificó este parámetro.

Años más tarde, en 2003 Rodríguez-Mercado *et al.*, probaron que el tetraóxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_4$ ) a las concentraciones ya antes mencionadas en leucocitos humanos induce mayor tasa de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) e ICH.

Caicedo *et al.*, (2007) al aplicar  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{5+}$ ,  $\text{Nb}^{5+}$ ,  $\text{Zr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{V}^{3+}$  en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 mM en linfocitos T humanos, observaron que estos dos últimos iones produjeron la mayor cantidad de daño al ADN y apoptosis, en menor grado la disminución de la viabilidad y la proliferación celular.

#### **1.1.4 Tricloruro de vanadio**

También llamado cloruro de vanadio(III), es un compuesto inorgánico de fórmula  $VCl_3$  y masa molar de 157.3 g/mol (Gangolli, 1999), con punto de fusión mayor a 300 °C, densidad de 3 g/cm<sup>3</sup>. Es sólido de color púrpura, higroscópico y sensible a la oxidación, soluble en alcohol, éter, agua y no es volátil.

En cuanto a los usos se puede mencionar que es utilizado como agente reductor para determinar nitratos y nitritos en muestras de agua, se emplea para la fabricación de llaves inglesas, destornilladores y otras herramientas, proporcionándoles fuerza y resistencia al desgaste, asimismo, lo podemos encontrar en las baterías de flujo redox para almacenar energía (VANITEC, 2023).

La exposición prolongada a este compuesto llega a perjudicar los tejidos de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, ojos y piel. Si se inhala, podrían ser fatales las consecuencias, entre ellas destacan: espasmos, inflamación, edema de laringe y bronquios, neumonitis química y edema pulmonar (Gangolli, 1999).

#### **1.2 Ciclo celular**

El ciclo celular es un término usado para describir la serie ordenada de eventos mediante el cual las células somáticas eucariotas duplican sus componentes, entre ellos su material genético, que será transmitido a las siguientes generaciones, por tal razón se considera un proceso fundamental en la vida y el desarrollo de los organismos.

En eucariontes se divide en dos partes principalmente: la interfase y la mitosis o división nuclear, la primera está compuesta por  $G_1$  (*gap* en inglés, primera brecha) aquí se sintetizan ARN y proteínas necesarias en el control y progresión del mismo; etapa S en la que ocurre la replicación del ADN y  $G_2$ , periodo donde se asegura la correcta duplicación del ADN, aumenta la cantidad de estructuras celulares y por último la fase M (mitosis), el ADN es segregado hacia dos núcleos diferentes y mediante citocinesis se forman dos células hijas (Harper y Brooks, 2005; Garzón, 2019).

El ciclo debe recibir estímulos que permitan la transcripción y traducción de genes involucrados en él, estos se transmiten por mitógenos, que son reconocidos por



receptores desencadenando una serie de señales intracitoplasmáticas (Sridhar, *et al.*, 2006).

Además de las fases anteriormente mencionadas, existe una conocida como  $G_0$ , en esta la célula se puede encontrar en alguno de los siguientes estados: de quiescencia, senescencia, diferenciadas o apoptóticas, dependerá de lo diferenciada que se encuentre o si necesite un estímulo para reiniciar el ciclo (Garzón, 2019).

### **1.2.1 Control del ciclo celular**

El ciclo celular se encuentra regulado por puntos de control o “Check points”, en los cuales existen proteínas que se encargan de la regulación de la proliferación, del crecimiento de las células y la síntesis de ADN. Son necesarios ya que, si la célula presenta algún daño, principalmente al ADN, estas moléculas son capaces de detener el ciclo dando tiempo para que la reparación se produzca al mismo tiempo y se previenen alteraciones genéticas que pueden propagarse en las generaciones posteriores. La regulación se lleva a cabo por una serie de heterodímeros formados por las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (Cdk, por sus siglas en inglés) (Sridhar, *et al.*, 2006).

Las Cdk se encuentran presentes a lo largo del ciclo, pero las ciclinas solo en ciertos momentos donde sea requerida y si las condiciones de la célula son las apropiadas. Además de esto, tienen otras funciones, las Cdk son reguladores importantes en el metabolismo, la transcripción, la apoptosis y el desarrollo neuronal (Miele, 2004). Si se llegara a mutar da como resultado enfermedades entre ellas el cáncer, infecciones virales, trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares. Por otro lado, las ciclinas sirven de enlace entre la proliferación, el crecimiento y la maquinaria del ciclo celular (Walworth, 2010).

En los mamíferos, la transición de la fase  $G_1$  a S, está estrechamente controlada por los complejos ciclina D/Cdk4 o ciclina D/Cdk6 y ciclina E/Cdk2. De manera normal se encuentran los factores de transcripción E2F, que están unidos a la proteína del retinoblastoma (Rb) en un estado hipofosforilado, por lo que no pueden realizar su función de ayudar en la expresión de los genes y proteínas necesarios para la siguiente fase. La formación de los complejos ciclina/Cdk permite fosforilar a Rb y de esta manera dejar

libre a E2F. Una vez libres inducen la transcripción de genes necesarios para la fase S, asociándose Ciclina A y Cdk2, para llevar a cabo la replicación del ADN (Harper y Brooks, 2005; Lagunas *et al.*, 2014).

### 1.2.2 Efecto de los compuestos de vanadio sobre el ciclo celular

Diversos estudios demuestran que compuestos de este elemento interactúan con las moléculas responsables del ciclo celular, por una parte, puede provocar su detención, y por otra, propiciar su progresión.

Zhang *et al.* (2001), aplicaron metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ) en concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  a la línea celular de epitelio pulmonar humano A549, por 6, 12, 24 y 48 h y observaron que induce el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo la detención de la fase  $\text{G}_2/\text{M}$ , y aumentó los niveles de p21 y Chk1, se redujo la expresión de Cdc25C, lo que condujo a la fosforilación de Cdc2 y ligero aumento en la expresión de ciclina B1.

Mateos-Nava (2012), al aplicar durante 48 h,  $\text{V}_2\text{O}_5$  en concentraciones de 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a linfocitos humanos, reportó disminución en la expresión de proteínas Cdk4 en todas las concentraciones, así como, en la ciclina D1; también el incremento de la ciclina E y Cdk2 en todos los tratamientos, induciendo la detención en la transición de  $\text{G}_1$  a S. Alcántara-Mejía (2017), al exponer cultivos de linfocitos humanos con trióxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_3$ ) por 24 y 48 h, en concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , observó disminución en los niveles de ciclina D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4.

Wu *et al.* (2016), emplearon el bis acetilacetato-oxidovanadio ( $\text{VO}(\text{acac})_2$ ), en estado de oxidación +4 y el  $\text{NaVO}_3$ , a concentraciones de 25, 50, 100, 200, y 400  $\mu\text{M}$ , en células AsPC-1 de carcinoma pancreático humano durante 24, 48 y 72 h, demostraron que ambos compuestos exhibieron efecto antiproliferativo, ya que provocó la detención en  $\text{G}_2/\text{M}$ , y la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS). Se activaron las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK, siendo esta última la responsable de detener el ciclo.

Yang *et al.* (2016), administraron  $\text{NaVO}_3$  en la línea celular de carcinoma escamoso de esófago EC109 a concentraciones de 1.0, 1.5, 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , tanto para el análisis

de la ciclina D1, la caspasa-3 y la proliferación. Los dos primeros se realizaron con un periodo de exposición de 15, 30, 60, 120 y 240 min, y el último a 12, 24 y 48 h. El ciclo celular se evaluó a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  por 24 h, resultando que a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  aumentó la ciclina D1, se redujo la expresión de la caspasa-3 y la proliferación a 50  $\mu\text{M}$ , mientras que el ciclo celular se detuvo en la fase S a 100  $\mu\text{M}$ .

Contrario a esto, Zhang *et al.* (2004), reportaron que células epidérmicas de ratón (JB6P+) tratadas con  $\text{NaVO}_3$  a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  por 6, 12, 24 y 48 h o 10, 25, 50, y 100  $\mu\text{M}$  por 24 h, se observó que aumentó la actividad de Akt provocando que incrementara la expresión de ciclina E y A, promoviendo la entrada a S a través de la vía E2F-pRb.

### **1.3 Linfocitos como modelo de estudio**

En la mayoría de ensayos sobre control del ciclo celular, se utilizan células que se han aislado de tejidos y que se hacen proliferar en presencia de nutrientes esenciales y de otros factores (Mudry, 2014). Esto permite controlar las condiciones del medio, de manera que se identifican los efectos de determinados compuestos en el metabolismo de la célula, eliminando posibles interferencias (Roca *et al.*, 2003). Un linfocito es un tipo de leucocito que forma parte del sistema inmunitario, circulan por el torrente sanguíneo, convirtiéndolos en un modelo de estudio ideal.

Su obtención de sangre periférica es una de las herramientas más útiles con las que cuentan la Genética y es ampliamente utilizada también por la Citogenética, debido a la fácil disponibilidad del material celular, al bajo costo del proceso, el gran número de células que se obtienen de muestras pequeñas y la gran cantidad de información que puede brindar al investigador el cultivo de linfocitos (Mudry, 2014). En números absolutos, se encuentran de 1,000 a 3,000 por  $\text{mm}^3$  de sangre (Vega-Robledo, 2009).

Pueden ser inducidos a dividirse en cultivo, mediante una variedad de estímulos, ya sea por antígenos del complejo principal de histocompatibilidad, por antígenos exógenos o mitógenos policlonales, entre ellos, algunas lectinas vegetales; por ejemplo: la concanavalina A y la fitohemaglutinina (PHA), siendo esta última la más común, ya que estimula a la interleucina 2 y por lo tanto la proliferación.

La PHA se obtiene de las semillas de la leguminosa *Phaseolus vulgaris*, posee la capacidad de aglutinar eritrocitos y leucocitos en menor escala e inducir la actividad mitogénica, esto resultado de la unión con azúcares de la membrana plasmática de los linfocitos y activan procesos de síntesis de mensajeros intracelulares, principalmente monofosfato de guanosina cíclico y que provoca cambios en el potencial de membrana facilitando el transporte de iones calcio, aminoácidos y azúcares al interior de la célula, que posteriormente se traducirán en una respuesta metabólica que desemboca en la división celular (Hamelryck *et al.*, 1996).

#### **1.4 Separación de proteínas**

La electroforesis se define como el método analítico en el que se separan biomoléculas en dependencia entre otros factores de su carga y tamaño, bajo la acción de un campo eléctrico, que las mueve hacia el electrodo de carga opuesta (García-Pérez, 2000). La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente, dado a que reúne una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con gran variedad de compuestos químicos. Se forma por polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N-metil-bis-acrilamida), esta reacción es activada por iones sulfato que son proporcionados por el persulfato de amonio, no obstante, puede ser catalizada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED), de modo que la polimerización tendría lugar sin su presencia, pero sería lento (Lomonte, 2007).

Entre las diversas técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés “polyacrylamide gel electrophoresis”), la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato de sodio, SDS-PAGE (Karp, 2008). Esta consiste en mezclar las proteínas con el SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente, obligándolos a migrar hacia el ánodo de carga positiva en el extremo contrario del gel (Lomonte, 2007). El proceso se sigue al observar la migración de un tinte rastreador cargado que se mueve justo por delante de las proteínas más rápidas. Posteriormente, el gel se tiñe con azul de Coomassie o tinción de plata para revelar la localización de las biomoléculas. Estas

pueden reconocerse mediante un segundo procedimiento electroforético, “Western blot” (Karp, 2008).

### **1.5 Western blot**

También llamada inmunoelectrotransferencia, es una técnica molecular semicuantitativa y de alta sensibilidad que permite el análisis de una proteína o perfil proteico específico (Martínez-Flores *et al.*, 2017). Consiste primero en la separación de acuerdo a su tamaño por electroforesis mediante el sistema SDS-PAGE, posteriormente son transferidas bajo la influencia de corriente eléctrica a una membrana de nitrocelulosa o de polivinilideno, PVDF (Kurien y Scofield, 2015). Es necesario utilizar agentes bloqueadores que contengan proteínas que se unan a los sitios vacíos y no específicos de la membrana, esto con el fin de reducir el ruido de fondo, algunos de estos incluyen además suero fetal de ternero o de caballo y el detergente Tween-20 (Martínez-Flores *et al.*, 2017). Luego, se incuba con el anticuerpo primario (poli o monoclonal), el cual se une de manera no covalente contra una secuencia de aminoácidos pequeña, el epítipo, que queda expuesta al eliminar la estructura tridimensional de la biomolécula en condiciones desnaturizantes y reductoras (Advansta Corporation, 2011). Se añade un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, por ejemplo, la fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés, horseradish peroxidase) que se une al anticuerpo primario, la adición de este sustrato provoca la reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz (Kurien y Scofield, 2015), permitiendo que la proteína de interés pueda ser detectada mediante la exposición de la membrana a una película de rayos X o captada de forma digital utilizando una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD).

## **II. Justificación**

El V es un metal pesado que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, pero las actividades humanas hacen que se liberen óxidos de V al ambiente, convirtiéndose en un contaminante ambiental y es fuente importante de exposición para los humanos. A nivel celular, se ha observado que altera el ciclo celular ya que interactúa con las moléculas que lo controlan. Con base a lo anterior, en el laboratorio se han realizado estudios sobre los efectos genotóxicos, citotóxicos y citostáticos, utilizando los óxidos de V, sin embargo, se conoce poco acerca de estos efectos de compuestos en su estado de oxidación +3, como es el caso del  $VCl_3$ . Por lo que resulta interesante conocer el efecto que pueda inducir en proteínas reguladoras del ciclo celular en ensayos *in vitro*.

## **III. Hipótesis**

Se ha observado que los compuestos de V actúan sobre las proteínas reguladoras de la transición del ciclo celular de la fase  $G_1/S$ , específicamente las ciclinas D, ciclina E, Cdk2 y Cdk4, ya que altera su nivel de expresión, originando que se detenga; entonces sí se administra  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos, se espera que este compuesto modifique el nivel de expresión de dichas proteínas, afectando la progresión de las células.

## **IV. Objetivos**

### **4.1 General**

- Evaluar el efecto del  $VCl_3$  en proteínas (ciclina D, E, Cdk4 y Cdk2) encargadas de promover la transición de la fase  $G_1/S$  en el ciclo celular de cultivos de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

### **4.2 Particular**

- Determinar la viabilidad celular de cultivos de linfocitos humanos tratados con  $VCl_3$  en concentraciones de 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  por 24 y 48 h.
- Evaluar el efecto de la administración del  $VCl_3$  en concentraciones de 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  por 24 y 48 h sobre las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos, utilizando citometría de flujo.
- Analizar los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk4 y Cdk2 de linfocitos humanos, expuestos a  $VCl_3$  en concentraciones de 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  por 24 y 48 h mediante la técnica de "Western blot".

## **V. Materiales y métodos**

### **5.1 Reactivos.**

Para la realización de este trabajo se necesitaron los siguientes reactivos: tricloruro de vanadio,  $VCl_3$  (CAS No. 7718-98-1 con 97 % de pureza), Histopaque®-1077, solución amortiguadora de fosfato salina (PBS por sus siglas en inglés), diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), bromuro de etidio (BrEt), ribonucleasa A (RNasa) y yoduro de propidio, todos de Sigma-Aldrich, Inc. S. Louis MO EUA; medio de cultivo PB-MAX™ Karyotyping de GIBCO, Invitrogen Corporation, NY EUA; reactivo Protein Assay, proteína albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), acrilamida (30 %), TRIS, SDS, persulfato de amonio, tetrametiletilendiamina (TEMED), todos se adquirieron de Bio-Rad Laboratories, CA EUA; anticuerpos primarios anti-ciclina D (sc-246), anti-ciclina E (sc-248), anti-Cdk2 (sc-6248), anti-Cdk4 (sc-53636), anti-actina (sc-8432), anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (m-IgG Fc BP-HRP, sc-525409), inhibidores de proteasas (SC-29130) de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA EUA.

### **Soluciones de trabajo**

Solución amortiguadora de muestras 6x (Tris-HCl 375 mM (pH 6.8), SDS al 9 %, glicerol al 50 %, azul de bromofenol al 0.03 % y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.03 %); TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl), solución de bloqueo TTBS (5 % de leche sin grasa con amortiguador Tris salino más 0.05 % de tween-20), solución amortiguadora de lisis RIPA (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % SDS, 1 Mm  $NaVO_4$ , 5 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM  $NaH_2PO_4$  más inhibidores de proteasas) y solución amortiguadora de transferencia (glicina 192 mM, Tris-HCl 20 mM y metanol al 15 % v/v).

### **5.2 Cultivo de linfocitos**

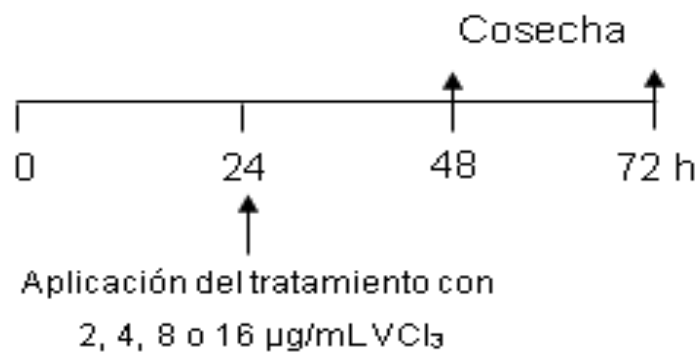
Se realizó la extracción de 10 mL de sangre periférica de tres voluntarios por punción venosa con ayuda de un sistema Vacutainer y se adicionó en un tubo de centrifuga cónico al cual previamente se le colocó Histopaque®-1077 en una proporción 1:1. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 35 min, se recuperó la fase opaca en



otro tubo de centrifuga, la cual corresponde a los linfocitos. Se llevaron a cabo tres lavados con 10 mL de PBS, entre cada uno se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. La densidad celular se obtuvo en una cámara de Neubauer, posteriormente se realizaron los cultivos colocando  $8 \times 10^6$  células en 8 mL de medio de cultivo PB-MAX Karyotyping, el cual contiene PHA y suero fetal bovino para estimular la proliferación, se incubaron a 37 °C durante 24 h.

### 5.3 Tratamientos

Pasado el tiempo de incubación, se administró una de las concentraciones de  $VCl_3$  2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$ , el cual fue disuelto en agua inyectable a temperatura ambiente, a continuación, se dejó incubar por 24 y 48 h (**Figura 1**), también se contó con un grupo sin tratamiento, al cual no se le administró el compuesto. Para cada concentración y tiempo de exposición, se realizaron tres experimentos independientes con dos repeticiones.



**Figura 1.** Aplicación de los tratamientos de  $VCl_3$ , 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$ , a los cultivos de linfocitos humanos con diferentes tiempos de exposición.

### 5.4 Viabilidad.

La viabilidad celular se evaluó al inicio y final de cada tiempo de exposición. Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de una solución de tinción 1:1 (0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  CFDA y 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BrEt), en un tubo Eppendorf y se mezcló con 10  $\mu\text{L}$  de la muestra. Se incubaron a 37 °C por 15 min, después se realizaron tres lavados con PBS, se centrifugaron a 4000 rpm por 4 min entre cada lavado, el botón celular se pasó a un portaobjetos para realizar la evaluación en el

microscopio de fluorescencia (marca Nikon ECLIPSE) con filtro de excitación de 515-560 nm. Se analizaron 100 células en total tomando en cuenta el número de viables, las cuales presentaban fluorescencia de color verde y el de no viables donde su núcleo estaba teñido de color rojo.

### **5.5 Ciclo celular**

El ciclo celular se analizó utilizando la técnica de citometría de flujo calculando la cantidad de ADN presente en cada fase. Transcurrido los tiempos de exposición, las células fueron fijadas en alcohol etílico al 70 % frío por 24 h, posteriormente, se lavaron con PBS, el cual se retiró por medio de centrifugación. A continuación, se permeabilizaron con PBS-Tritón x100 al 5 % y 10 mg/mL RNAsa incubando a 37 °C por 20 min y se tiñeron con 5 mg/mL de yoduro de propidio por 30 min más.

La obtención de 10000 eventos se llevó a cabo en el citómetro BD FACSAriaII de Becton Dickinson and Company, con estos se realizaron los histogramas en el software Win MDI desarrollado por Joe Trotter y el análisis de los mismos en el software Cylchred.

### **5.6 Obtención y cuantificación de proteínas**

Pasado los tiempos de exposición, los cultivos se centrifugaron y el botón celular se lavó con PBS, se centrifugó nuevamente, se desechó el sobrenadante y agregó 160 µL de solución amortiguadora de lisis RIPA fría, se resuspendió aproximadamente 21 veces a través de una aguja 21G. Se mantuvo en refrigeración durante una hora y media. Posteriormente, se centrifugaron a 12500 rpm por 12 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, ya que contenía las proteínas extraídas de los linfocitos y con ayuda de una pipeta se transfirieron a otro tubo limpio.

Se realizó una curva patrón de BSA a una concentración de 1 mg/mL y mediante el método de Bradford, se determinó la concentración de proteínas presentes en cada tratamiento utilizando el reactivo Protein Assay de Bio-Rad, la absorbancia fue obtenida a 595 nm en el espectrofotómetro Epoch de la marca Bio Tek.

## **5.7 Separación e inmunoelectrotransferencia de las proteínas**

Se tomaron 50 µg de proteínas de cada tratamiento y se mezclaron con solución amortiguadora de muestra 6x, fue sometida a un proceso de calentamiento a 95 °C por 5 min con la finalidad de desnaturalizar la proteína y quitar la carga intrínseca de la misma. Después se llevó a cabo la separación de las mismas en una electroforesis discontinua mediante el sistema SDS-PAGE, con corriente constante de 100 voltios por 3 h. Se continuó con la transferencia de las mismas por el método vertical húmedo a una membrana de PVDF de Bio-Rad, que previamente fue activada con metanol, se aplicó corriente constante de 145 miliamperios por 1.5 h.

Posteriormente, la membrana fue incubada en solución de bloqueo TTBS durante una hora y media, pasado el tiempo, se incubó con cada anticuerpo primario: anti-ciclina D, anti-ciclina E, anti-Cdk2, anti-Cdk4 y anti-actina (1:1000) en agitación constante durante toda la noche a 4 °C, por último, se incubó con el anticuerpo secundario (0.4:10000) durante una hora y media y la detección se realizó mediante quimioluminiscencia en el equipo Chemi Doc de Bio Rad, en donde cada proteína se observa como una banda, de las cuales se obtuvo su intensidad relativa con ayuda del programa para computadora ImageJ 1.46r del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

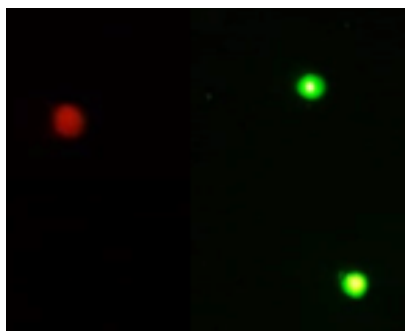
## **5.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de seis experimentos independientes. Para conocer si existe alguna diferencia significativa entre los grupos tratados y sin tratamiento (0 µg/mL) se llevaron a cabo un análisis de varianza (ANOVA) seguida de Tukey, considerando la significancia cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## VI. Resultados

### 6.1 Efecto del $VCl_3$ sobre la viabilidad celular

Se realizaron seis experimentos de manera independiente y por cada uno de estos se cuantifican 100 linfocitos. Se consideraron células viables aquellas que presentaban fluorescencia de color verde y no viables las células de color rojo, como se muestra en la **Figura 2**. El promedio del porcentaje de la viabilidad se muestra en el **Cuadro 1**, donde se observa que la administración de  $VCl_3$  a los cultivos de linfocitos humanos no induce cambios en este parámetro, ya que en todos los tratamientos y en ambos tiempos de exposición se mantuvo mayor al 95 %.



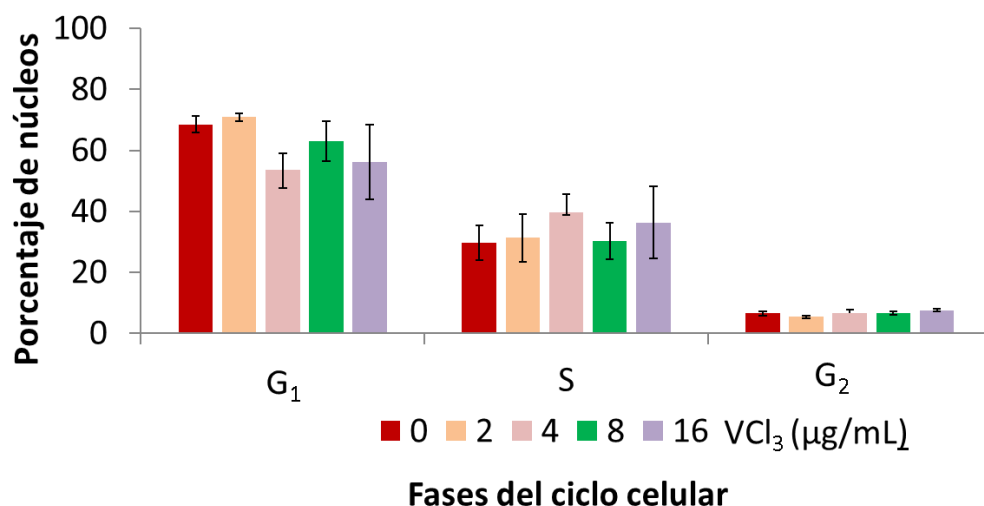
**Figura 2.** Linfocitos teñidos con CFDA-BrEt, los que presentan fluorescencia verde se consideran viables y los de color rojo son no viables.

**Cuadro 1. Porcentaje de la viabilidad celular de linfocitos humanos tratados con  $VCl_3$  durante 24 y 48 h.**

Tratamientos ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 h	48 h
0	98.3 $\pm$ 0.5	98.0 $\pm$ 0.5
2	96.6 $\pm$ 1.5	98.0 $\pm$ 1.0
4	97.3 $\pm$ 1.1	97.0 $\pm$ 4.0
8	98.6 $\pm$ 0.5	98.1 $\pm$ 1.1
16	98.6 $\pm$ 0.5	97.6 $\pm$ 2.0

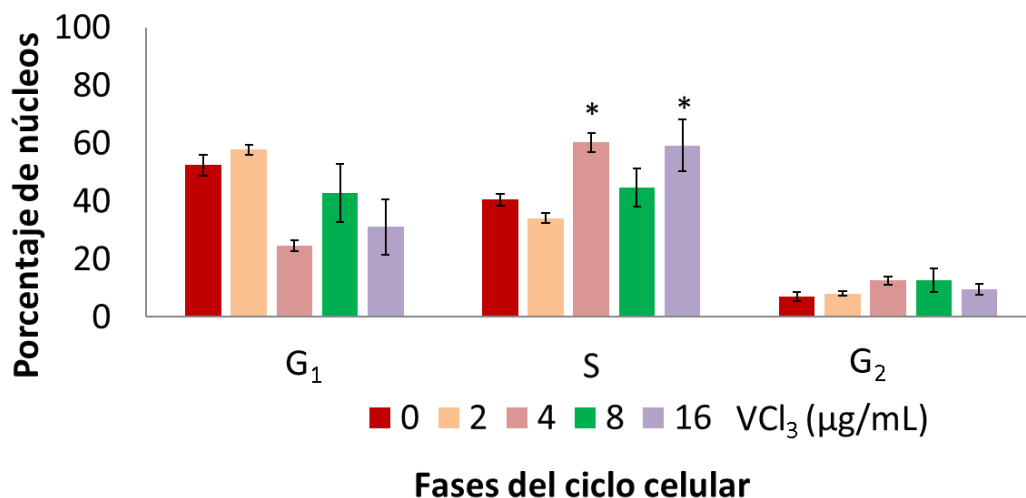
## 6.2 Efecto del VCl<sub>3</sub> sobre el ciclo celular

Como se mencionó, el ciclo celular se evaluó con la técnica de citometría de flujo mediante el análisis del contenido de ADN en las diferentes fases, en el caso de los tratamientos con VCl<sub>3</sub> expuestos durante 24 h se observó aumentó en el porcentaje de núcleos en la fase S, sin embargo, ningunas de las concentraciones fueron significativamente diferentes con respecto al grupo sin tratamiento (**Figura 3**).



**Figura 3.** Porcentaje de núcleos de linfocitos en las distintas fases del ciclo celular tratados con VCl<sub>3</sub> por 24 h. Se presenta la media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes.

En cuanto a los tratamientos por 48 h, se observó que existe disminución en el porcentaje de núcleos de la fase G<sub>1</sub> siendo significativo en las concentraciones de 4 y 16 µg/mL, esto se encuentra relacionado con el incremento en la fase S y en las mismas concentraciones (**Figura 4**).

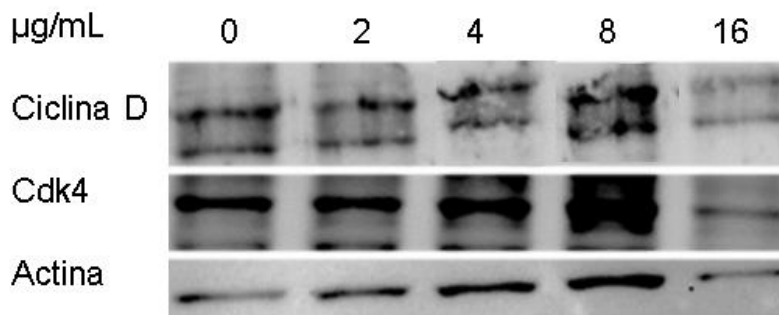


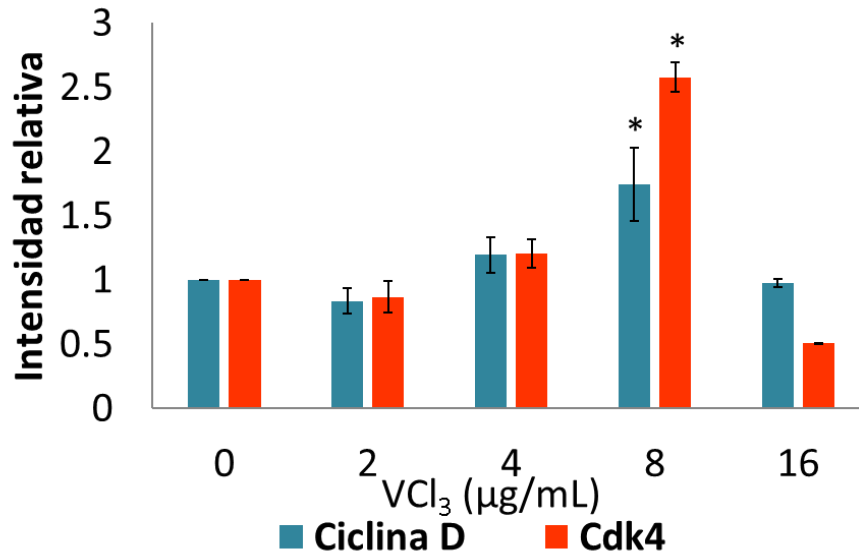
**Figura 4.** Porcentaje de núcleos de linfocitos en las distintas fases del ciclo celular tratados con VCl<sub>3</sub> por 48 h. Se presenta la media ± EEM, de seis experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA seguido de Tukey).

### 6.3 Efecto del VCl<sub>3</sub> sobre los niveles de expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de linfocitos humanos

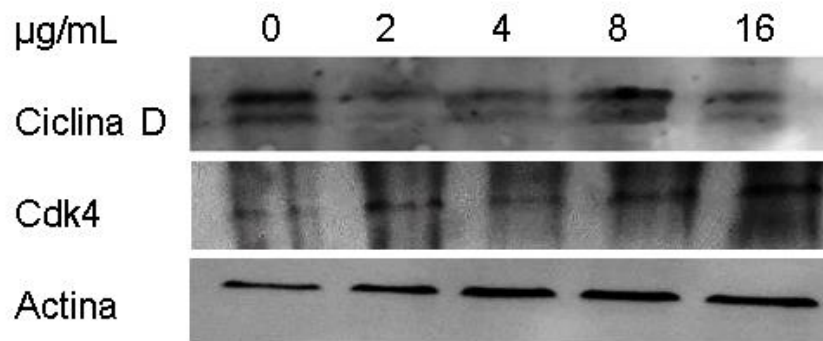
#### Ciclina D y Cdk4

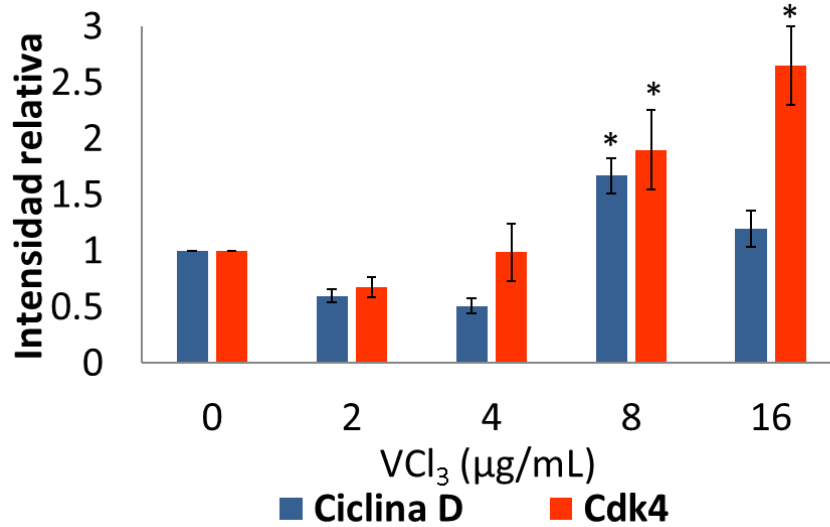
Con respecto a la intensidad relativa de las proteínas, en los tratamientos de 24 h se observó que este compuesto provocó aumento significativo en las proteínas Ciclina D y Cdk4 en la concentración 8 µg/mL con respecto al grupo sin tratamiento (**Figura 5**). En cuanto al tiempo de exposición de 48 h, el incremento se dio en la misma concentración para ambas proteínas y en 16 µg/mL únicamente para Cdk4 (**Figura 6**).





**Figura 5.** Intensidad relativa de las proteínas Ciclina D y Cdk4 de linfocitos humanos tratados con VCl<sub>3</sub> por 24 h. Se presenta la media ± EEM de seis experimentos independientes. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (ANOVA seguida de Tukey).

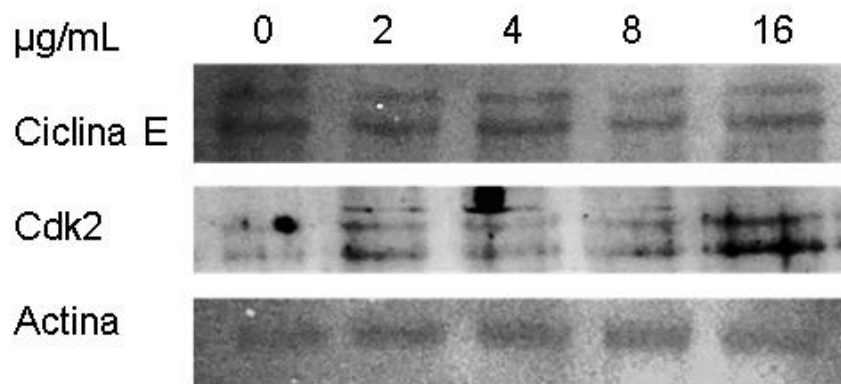




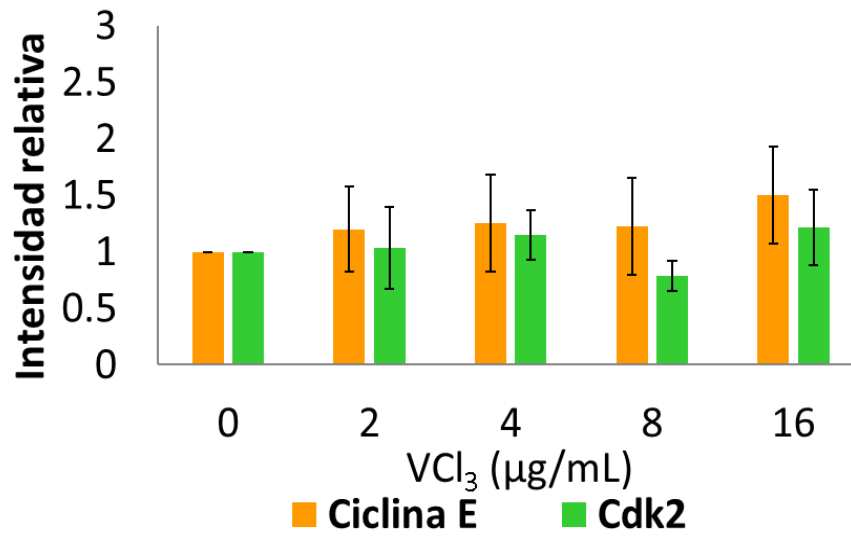
**Figura 6.** Intensidad relativa de las proteínas Ciclina D y Cdk4 de linfocitos humanos tratados con VCl<sub>3</sub> por 48 h. Se presenta la media ± EEM de cuatro experimentos independientes. \*: p < 0.05 vs. grupo sin tratamiento (ANOVA seguida de Tukey).

### Ciclina E y Cdk2

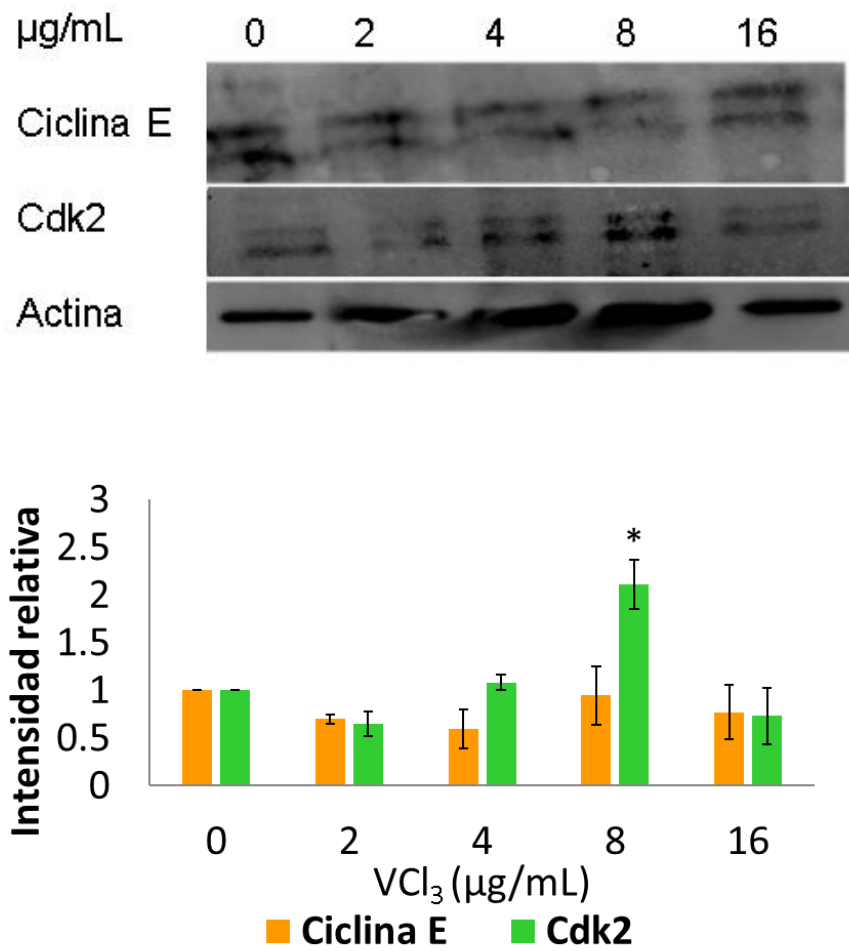
Para las proteínas Ciclina E y Cdk2 de los linfocitos que fueron tratados con VCl<sub>3</sub> durante 24 h, no presentaron cambios con respecto al grupo sin tratamiento, **Figura 7**. A las 48 h, solo la proteína Cdk2 presentó aumento significativo en la concentración de 16 µg/mL, en el caso de la Ciclina E no hubo cambios, **Figura 8**.







**Figura 7.** Intensidad relativa de las proteínas Ciclina E y Cdk2, de linfocitos humanos tratados con VCl<sub>3</sub> por 24 h. Se presenta la media ± EEM de seis experimentos independientes.



**Figura 8.** Intensidad relativa de las proteínas Ciclina E y Cdk2, de linfocitos humanos tratados con tricloruro de vanadio por 48 h. Se presenta la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes. \*:  $p < 0.05$  vs. grupo sin tratamiento (ANOVA seguida de Tukey).

## VII. Discusión

El vanadio se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra y es liberado al ambiente por las actividades antropogénicas, se sabe que la exposición prolongada a este metal puede inducir el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, debido a lo anterior es importante conocer el efecto que induzca sobre las células humanas. En el presente trabajo se observó que la administración de  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos, no modifica la viabilidad, pero detiene la progresión del ciclo celular en la fase S a las 48 h. En cuanto al análisis de las proteínas, ciclina D1 aumenta en los tratamientos de 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h, Cdk4 en 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h respectivamente, ciclina E no muestra aumentos en ningún tiempo de exposición y Cdk2 en 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h.

### 7.1 Efecto del $VCl_3$ sobre la viabilidad celular

Para la evaluación de la viabilidad se utilizó una combinación de dos substratos fluorescentes, la CFDA y el BrEt. La CFDA se difunde a través de la superficie de la membrana celular hacia el citoplasma donde interactúa con esterasas presentando fluorescencia de color verde. Por el contrario, el BrEt es impermeable, pero si ésta tiene fisuras en la estructura, el colorante entra y se intercala entre los pares de bases del ADN, siendo un indicador de células que tienen comprometida su membrana, tiñéndolas de color rojo (Morono *et al.*, 2004)

En este trabajo, los resultados muestran que la administración de  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* no modifica la viabilidad celular, ya que fue mayor al 95 %. Este comportamiento también se ha observado con otros óxidos de V, por ejemplo, Rodríguez-Mercado (2006), quien expuso leucocitos humanos a  $V_2O_3$ ,  $V_2O_4$  y  $V_2O_5$  en concentraciones de 1, 2, 4 u 8  $\mu\text{g/mL}$  por 2, 4 o 6 h, fue mayor al 95 %. De igual manera, Mateos-Nava (2017) demostró que los tres óxidos antes mencionados aplicados durante 48 h a cultivos de linfocitos humanos la viabilidad en estos fue superior al 92 %. Alcántara-Mejía (2017) observó que el  $V_2O_3$  en tiempos de exposición de 24 y 48 h, no induce cambios en este parámetro. Cabe mencionar que ambos autores utilizaron el mismo modelo biológico, así como las concentraciones y colorantes que se usaron en este trabajo.

Sin embargo, Caicedo *et al.*, (2007) al aplicar varios iones metálicos, entre los cuales estaba el  $V^{3+}$  ( $VCl_3$ ) en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 mM en linfocitos Jurkat T humanos por 48 h, indicó que el porcentaje de células viables disminuye mientras la concentración aumenta, incluso fue menor a 50 %, ellos utilizaron la tinción con yoduro de propidio. Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas en el presente estudio van de 10 a 100  $\mu M$ .

Por otra parte, utilizando la prueba de azul de tripano, en un estudio realizado con personas expuestas ocupacionalmente al V, indica que la viabilidad en cultivos de fibroblastos, leucocitos y linfocitos tratados con  $Na_3VO_4$  (0.5–10  $\mu M$ ) durante 22 h, fue superior al 90 % (Ivancsits *et al.*, 2002). Lo anterior demuestra que el  $VCl_3$ , en el modelo biológico y las concentraciones empleadas, no induce efecto sobre la viabilidad de las células, en tiempos cortos de exposición.

## 7.2 Efecto del $VCl_3$ sobre el ciclo celular

Los resultados en esta investigación demostraron que la aplicación de  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos detiene el ciclo celular en la fase S a las 48 h. Estudios donde utilizan este mismo modelo biológico y concentraciones, pero diferentes óxidos de V, reportan efectos similares a los mostrados; Mateos-Nava (2012) demostró que el  $V_2O_5$  administrado por 48 h induce la detención en  $G_1/S$ . Sin embargo, en otro estudio, propuso que este compuesto, el  $V_2O_3$  y  $V_2O_4$  aplicados por 24 h, no provocan alteraciones en la proliferación (Mateos-Nava *et al.*, 2021).

Con respecto al estado de oxidación del  $V^{3+}$ , Alcántara-Mejía (2017), observó que el  $V_2O_3$  produce el incremento de núcleos en la fase  $G_1$  a las 24 h en las concentraciones de 4 y 8  $\mu g/mL$  aunado a la disminución de la fase S; pero a las 48 h, solo la fase  $G_1$  disminuyó en la concentración de 16  $\mu g/mL$ , sugiere que hay retraso durante  $G_1/S$ .

El efecto de detención del ciclo celular por parte del V también se ha observado en otras líneas celulares como en células de epitelio pulmonar humano (A549) tratadas con  $NaVO_3$  en concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu M$  por 6, 12, 24 y 48 h induciendo la detención en la fase  $G_2/M$  (Zhang *et al.*, 2001), esto igual ocurre en células de cáncer pancreático humano (AsPC-1) tratadas con  $(VO(acac)_2)$  y  $NaVO_3$  a concentraciones de

25, 50, 100, 200, y 400  $\mu\text{M}$  por 24, 48 y 72 h (Wu *et al.*, 2016). Así mismo, Yang *et al.* (2016), probaron que el  $\text{NaVO}_3$  a concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  por 24 h en células de sarcoma escamoso del epitelio EC109, detiene el ciclo celular en la fase S.

Con base en lo anterior, se deduce que el retraso del ciclo celular depende del compuesto y de las concentraciones empleadas, así como, el efecto que induce en las proteínas que se encargan de controlar las transiciones en las distintas fases.

### **7.3 Efecto del $\text{VCl}_3$ sobre los niveles de expresión de las proteínas**

El ciclo celular, está regulado por puntos de control, también conocidos como “Checkpoints” donde participan complejos de proteínas formados por las ciclinas y las Cdk. En estos se censura daño en el ADN y en caso de incrementarse, el ciclo se detiene para que se repare o si no es posible repáralo se pasa a la muerte celular programada (Walworth, 2000).

En este trabajo se determinaron los niveles de expresión de las proteínas encargadas de controlar la transición de la fase  $G_1$  a la S en todos los cultivos tratados con  $\text{VCl}_3$ . Se observó que al igual que otros compuestos de V, el  $\text{VCl}_3$  tanto a las 24 y 48 h modifica este parámetro lo que puede estar relacionado con la detención del ciclo celular en S. La Ciclina D1 incrementó en la concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h, Cdk4 en 8 y 16  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h, respectivamente; ciclina E no muestra cambios en ningún tiempo de exposición y Cdk2 en 8  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h.

Los niveles de Cdk2 y Cdk4 pueden deberse a que esté interactuando con inhibidores del ciclo celular, por un lado, las moléculas de la familia INK4 (p16, p15, p18 y p19) se unen a Cdk4 o 6 y, por otro lado, los integrantes de Cip/Kip (p21, 27 y p57) lo hacen en Cdk2, al unirse bloquean la actividad de dichos complejos para evitar la fosforilación de pRb de manera que E2F está inactivo, impidiendo la progresión a S, ganando tiempo para la reparación del ADN (Sherr y Roberts, 1999).

Estudios realizados por Miller *et al.*, (2000) con células Mv1Lu que fueron transfectadas con plásmidos que expresaban Cdk4 revelaron que p53 se une a UTR 5' del ARNm de Cdk4 para inhibir su traducción. Sin embargo, Parker *et al.* (2003), observaron que en

células de hepatocitos de ratón condicionalmente inmortalizadas (ImHep), esta Cdk aumenta tanto *in vivo* como *in vitro*, cuando había sobreexpresión de ciclina D1.

Wu *et al.*, (2016) demostraron que el bis(acetilacetato)-oxidovanadio (IV) ( $\text{VO}(\text{acac})_2$ ) y el  $\text{NaVO}_3$  administrados en concentraciones de 25, 50, 100, 200, y 400  $\mu\text{M}$ , en células AsPC-1 durante 24, 48 y 72 h, inducen la activación de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK, la cual, es una vía de inducción de ciclina D1.

Zhang *et al.* (2004), trataron células JB6P<sup>+</sup> con  $\text{NaVO}_3$  a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  por 6, 12, 24 y 48 h o 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  por 24 h, mostraron que se fosforila a Akt en Ser473 y Thr308 para activarla y poder fosforilar a pRb provocando la liberación de E2F aumentando la expresión de ciclina E y A de manera dependiente de la dosis y el tiempo, siendo la concentración de 50  $\mu\text{M}$  y a las 48 h donde este efecto es más visible, promoviendo la entrada en la fase S a través de la vía E2F-pRb.

Mateos-Nava (2012) probó que la aplicación de  $\text{V}_2\text{O}_5$  a concentraciones de 2, 4, 8 o 16  $\mu\text{g/mL}$  a linfocitos humanos por 48h induce la disminución en la expresión de Cdk4 y de ciclina D, así como la sobreexpresión de la ciclina E y Cdk2, esto sugiere que la detención ocurre en la transición  $G_1$  a S, aunado a esto, reportó que conforme aumentaba la dosis también lo hacía p21 y p53 sugiriendo que hubo daño al ADN lo que contribuyó a la detención.

Asimismo, Alcántara-Mejía (2017) indica que los tratamientos con  $\text{V}_2\text{O}_3$  a linfocitos humanos durante 24 y 48h a las mismas concentraciones, provoca la disminución de los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2 y Cdk4 con 24 h de exposición, pero con 48 horas se incrementan, resultando en el retraso de la proliferación durante la fase  $G_1$  a S, además encontró que los núcleos que entraban en la fase S correspondientes a los cultivos tratados durante las 24 h, eran pocos en relación con el grupo sin tratamiento, mientras que los expuestos por 48 h no tenían cambios, lo que insinúa que la proliferación puede estar tardando el doble del tiempo necesario para cumplir un ciclo.

Yang *et al.* (2016), administraron  $\text{NaVO}_3$  a células EC109 a concentraciones de 1.0, 1.5, 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  durante 24 h y observaron que la ciclina D1 disminuyó significativamente de una manera dependiente de la concentración y el tiempo, se registró aumentó a 100  $\mu\text{M}$ .

En este estudio se administró  $VCl_3$  a cultivos de linfocitos humanos y se apreció que no modifica la viabilidad celular, sin embargo, altera la expresión de las proteínas, ciclina D1 y Cdk4 aumentan en ambos tiempos de exposición, ciclina E no muestra cambios y Cdk2 únicamente a las 48 h, que puede relacionarse con la detención del ciclo celular en la transición de la fase  $G_1$  a S.

### **VIII. Conclusiones**

- Los tratamientos de  $VCl_3$  en concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu g/mL$  a cultivos de linfocitos humanos por 24 y 48 h, no afecta la viabilidad celular.
- El  $VCl_3$  detiene la progresión del ciclo celular en la fase S a las 48 h.
- Al igual que otros compuestos de V, el  $VCl_3$  altera los niveles de expresión de las proteínas ciclina D, E, Cdk2.
- Es probable que el  $VCl_3$  esté interactuado con otras proteínas que también regulan el ciclo celular, como puede ser p21, p53, ERK, Akt. También, puede ser que las concentraciones y tiempos de exposición empleados en este estudio no sean los necesarios para observar un claro efecto en las proteínas, por lo que resulta interesante observar el comportamiento en estas otras y aumentar las concentraciones de dicho compuesto, al igual que los tiempos de exposición.

## IX. Referencias bibliográficas

- Advansta Corporation.** (2011). Manual de laboratorio. Análisis de Proteínas: Electroforesis, Transferencia e Inmunoprecipitación. San José, California, EE. UU.
- 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.
- Altamirano-Lozano, M.A., Álvarez-Barrera, L., Mateos-Nava, R.A., Fortoul, T.I., Rodríguez-Mercado, J.J.** (2014). Potential for genotoxic and reprotoxic effects of vanadium compounds due to occupational and environmental exposures: an article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15-18, 2012. *Journal of Immunotoxicology*. 11(1):19-27.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** 2012. Toxicological profile for vanadium. Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Páginas 1-8, 77-82.
- Barceloux, D.G.** (1999). Vanadium. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*. 37(2):265–278.
- Caicedo, M., Jacobs, J., Reddy, A., Hallab, N.** (2007). Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni<sup>2+</sup> and V<sup>3+</sup> are more toxic than other metals: Al<sup>3+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mo<sup>5+</sup>, Nb<sup>5+</sup>, Zr<sup>2+</sup>. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 86(4):905-913.
- Contreras-Cadena, D.A., Gómez-Pech, C., Rangel-García, M., Ruíz-Hernández, A., Martínez-Bulit, P., Barba-Behrens, N.** (2014). La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*. 25(E1):245-253.
- Degani, H., Gohin, M., Karlish, D., Shechter, Y.** (1981). Electron paramagnetic studies and insulin like effects of vanadium in rat adipocytes. *Biochemistry*. 20:5795–5799.
- Gangolli, S.** (1999). The Dictionary of Substances and their Effects. Vol. 7. The Royal Society of Chemistry. Inglaterra. Páginas 581-582.
- García-Pérez, H.M.** (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universidad Diagnóstico*. 1(2):31-41.



- Garzón, D.** (2019). Capítulo 5. Biología Molecular: Principios y Aplicaciones. ECOE Ediciones. Medellín.
- Hamelryck, T., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M., Wyns, L., Loris, R.** (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34):20479–20485.
- Hansen, T.V., Aaseth, J., Alexander, J.** (1982). The effects of chelating agents on vanadium distribution in the rat body and uptake by human erythrocytes. *Archives of Toxicology*. 50:195–202.
- Harper, J., Brooks, G.** (2005). The Mammalian Cell Cycle. En Humphrey, T., Brooks, G. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 296: Cell Cycle Control. Mechanisms and Protocols New Jersey. Humana Press Inc.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety.** (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organisation, Ginebra, No. 29.
- IUPAC, The International Union of Pure and Applied Chemistry.** (2007). [www.iupac.org/reports/periodic\\_table/](http://www.iupac.org/reports/periodic_table/). versión 22 de junio de 2007.
- Ivancsits, S., Pilger, A., Diem, E., Schaffer, A., Rüdiger, H.W.** (2002). Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 519:25-35.
- Karp, G.** (2008). Biología Celular y Molecular, Conceptos Básicos y Experimentos. (5ª edición) México. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Kurien, T., Scofield, R.** (2015). Chapter 5. Western Blotting: An Introduction. *Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science
- Lagerkvist, G., Nordberg, G., Vouk, V.** (1986). Vanadium. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Vol. II. Amsterdam, Elsevier Science Publishing.
- Lagunas, M., Valle, A., Soto, I.** (2014). Ciclo celular: mecanismos de regulación. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 17(2):98-107.
- Lomonte, B.** (2007). Capítulo 13, Electroforesis en gel de poliacrilamida. En *Manual de Métodos Inmunológicos*. (4ª ed.). Universidad de Costa Rica.
- Londoño, F., Muñoz, P., Muñoz, F.** (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14(2):145-153.

- Martínez-Flores, K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J.** (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigación en Discapacidad*. 6(3):128-137.
- Mateos-Nava, R.A.** (2012). Efectos del pentóxido de vanadio sobre la expresión de las proteínas ciclinas y Cdk de la fase G1 en linfocitos humanos tratados *in vitro*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mateos-Nava, R.A.** (2017). Estudio del efecto de 3 óxidos de vanadio sobre la progresión del ciclo celular: ¿mecanismo directo ó indirecto? Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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(8):1536-1543.
- Miele, L.** (2004). The Biology of Cyclins and Cyclin-Dependent Protein Kinases An Introduction. En A. Giordano y G. Romano (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 285: Cell Cycle Control and Dysregulation Protocols. New Jersey. Humana Press Inc.
- Miller, S., Suthiphongchai, T., Zambetti, G., Ewen, M.** (2000). p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Molecular and Cellular Biology*. 20(22):8420–8431.
- Morono, Y., Takano, S., Miyanaga, K., Tanji, Y., Unno, H., Hori, K.** (2004). Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnology Letters*. 26:379-383.
- Mudry, M.** (2014). Citogenética guía de trabajos prácticos. Departamento de Ecología, Genética y Evolución Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., Chatterjee, M.** (2004). Vanadium an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*. 21:135-143.
- Parker, M., Deane, N., Thompson, E., Whitehead, R., Mithani, S., Washington, M., Datta, P., Dixon, D., Beauchamp, R.** (2003). Over-expression of cyclin D1 regulates Cdk4 protein synthesis. *Cell Proliferation*.36(6):347-360.
- Roca, P., Oliver, J., Rodriguez, A.** (2003). Obtención de muestras. En Roca, P. (Ed.), *Bioquímica. Técnicas y métodos*. Madrid. Hélice.

- Rodríguez-Mercado, J.J** (2006). Estudio de los efectos inducidos *in vitro* por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez-Mercado, J.J.** (1995). Genotoxicidad inducida *in vitro* por sales de vanadio en cromosomas de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez-Mercado, J.J., Altamirano-Lozano, M.A.** (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22(4):173-189.
- 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(8):1996-2002.
- Rodríguez-Mercado, J.J., Roldan-Reyes, E., Altamirano-Lozano, M.A.** (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 144(3):359-369.
- Roldán, R.E., Altamirano, L.M.** (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 245(2):61-65.
- Saad, S., Najjar, T.** (2005). Effects of STZ-induced diabetes and its treatment with vanadyl sulphate on cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Archives of Toxicology*. 79(9):493-499.
- Sharma, R., Flora, S., Drown, D., Oberg, S.** (1987). Persistence of vanadium compounds in lungs after intratracheal instillation in rats. *Toxicology and industrial Health*. 3(3):321-329.
- Sherr, C., Roberts, J.** (1999). Inhibidores de CDK: reguladores positivos y negativos de la progresión de la fase G<sub>1</sub>. *Genes & Development*. 13(12):1501-1512.
- Sridhar, J., Akula, N., Pattabiraman, N.** (2006). Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *The AAPS Journal*. 8(1):E204-E221.
- Tchounwou, P.B., Yendjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J.** (2014). Heavy metals toxicity and the environment. *Experientia Supplementum*. 101:133–164.
- Treviño, S., Díaz, A., Sánchez-Lara, E., Sanchez-Gaytan, B.L., Perez-Aguilar, J.M., González-Vergara, E.** (2019). Vanadium in biological action: chemical, pharmacological

aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biological Trace Element Research*. 188(1):68-98.

**VANITEC.** (2023). Recuperado de: <https://vanitec.org/vanadium/using-vanadium>

**Vega-Robledo, G.B.** (2009). Inmunología para el médico general. Linfocitos. Revista de la Facultad de Medicina. UNAM. 52(6):276-277.

**Walworth, N.C.** (2000). Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*. 12(6):697-704.

**WHO, World Health Organization.** (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Concise International Chemical Assessment Document 29. Elsevier, Geneva.

**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(8):919–929.

**Yang, J., Zhang, Z., Jiang, S., Zhang, M., Lu, J., Huang, L., 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(19):864-868.

**Zhang, Z., Gao, N., He, H., Huang, C., Luo, J., Shi, X.** (2004). Vanadate activated Akt and promoted S phase entry. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 255(1-2):227–237.

**Zhang, Z., Huang, C., Shi, X.** (2001). Vanadate-induce cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 89(1-2):142-148.

**Zhong, Z., Gu, Z.W., Wallace, W.E., Whong, W.Z., Ong, T.** (1994). Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 321(1-2):35-42.

**Zwolak, I.** (2020). Protective effects of dietary antioxidants against vanadium-induced toxicity: a review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID:149031

