

**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas**



**COMPUESTOS DE  
VANADIO CON  
POTENCIALES  
APLICACIONES  
FARMACOLÓGICAS.  
MECANISMOS DE  
CITOTOXICIDAD.**

(0432)  
TESIS  
Nº 1199

**Tesis Doctoral**

**Lic. Josefina Rivadeneira**

**2009**

LIBRACION.....  
A.....  
Fecha..... 11-11-2009.....  
Inv. B..... Inv..... B. 58888


# **Compuestos de vanadio con potenciales aplicaciones farmacológicas. Mecanismos de citotoxicidad.**



Josefina Rivadeneira

2009

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas

*El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en la Cátedra de Bioquímica Patológica del Departamento de Ciencias Biológicas y en el CEQUINOR del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Susana B. Etcheverry y la codirección de la Prof. Dra. Patricia A. M. Williams.*

*Abril de 2009*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis:

- A mi directora, Dra. Susana “Nené” Etcheverry por enseñarme que la humildad y la perseverancia son los pilares de cualquier emprendimiento. Gracias por su apoyo incondicional en los momentos difíciles que me tocó vivir durante el desarrollo de esta tesis. Gracias también por su cariño muchas veces de madre el cual llevaré siempre presente.
- A mi codirectora, Dra. Patricia Williams por su ayuda en los momentos que más la necesité.
- Al Dr. Daniel Barrio, por enseñarme y guiarme en aspectos fundamentales para mi trabajo. Por su excelencia académica que fue mi modelo a seguir. Gracias Dani.
- A mi madre, por inculcarme el deseo constante de superación y amor infinito.
- A “la Mara” por su amistad y cariño invaluable.
- A Ceci Muglia por sus mediciones en el citómetro. Impagable.
- A las chicos del labo, Vero, Vir , Sil, Juan, Marix por los lindos momentos compartidos.
- A la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata por brindarme el lugar de trabajo
- A la ANPCYT y al CONICET por aportar las becas Tipo I y II para el desarrollo de este trabajo de Tesis doctoral.
- A la ANPCyT , CONICET y UNLP por el otorgamiento de fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. VANADIO	1
1.1 Descubrimientos y fuentes	1
1.2 Importancia farmacológica y terapéutica. Historia del vanadio	2
1.3 Química del vanadio	6
1.3.1 Química del V(IV) en solución	7
1.3.2 Química del V(V) en solución	9
1.4. Bioquímica del vanadio	11
1.4.1. Analogía Fosfato-Vanadato	11
1.4.2. Importancia de la complejación del vanadio por ligandos orgánicos	15
1.4.3. Inhibición de Fosfatas por compuestos de vanadio	15
1.5 Actividades biológicas del vanadio	20
1.5.1. Metabolismo del vanadio	20
1.5.2. Efectos del vanadio sobre células en cultivo	22
1.5.2.1. Efectos insulínomiméticos. Mecanismos de acción	22
1.5.2.2 Efectos antitumorales	26
1.5.2.2.1. Generación de estrés oxidativo por el vanadio	35
1.5.2.2.2. Efectos del vanadio sobre la proliferación celular	37
1.5.2.2.3. Efectos del vanadio sobre la apoptosis	40
1.5.2.2.4. Potencial antimetástasico de los compuestos de vanadio	41
1.5.2.2.4. Resistencia a drogas y compuestos de vanadio	42
1.5.3 El vanadio en el hueso.	43
2. FISIOLOGÍA DE LOS OSTEÓBLASTOS	44
2.1 Modelos de células de tipo osteoblasto murino.	45
OBJETIVOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Síntesis de los compuestos de vanadio.	49

1.1 Complejos de vanadio(IV)	
1.1.1 [VO(hesp)(OH) <sub>3</sub> Na <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O, VO(hesp)	49
1.1.2 [VO(oda)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ], VO(oda)	49
1.2 Complejos de vanadio(V)	49
1.2.1 V <sup>V</sup> O <sub>2</sub> (salicilaldehído semicarbazona), V(V)-Salsem	50
1.2.2 K <sub>3</sub> [VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ].H <sub>2</sub> O, peroxocarbonato de vanadio(V)	50
2. Caracterización fisicoquímica	50
2.1 Análisis elemental	50
2.2 Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)	50
2.3 Espectros electrónico (UV-vis) y titulaciones espectrofotométricas	51
2.4 Espectros infrarrojo (FTIR)	51
2.5 Espectros Raman	51
2.6 Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	51
3. Medida de la actividad antioxidante	51
3.1 Actividad superóxidodismutasa	51
3.2 Ensayos con DPPH•	52
3.3 Ensayo de decoloración de ABTS	52
4. Actividad biológica	53
4.1 Cultivos de osteoblastos	53
4.2 Ensayos de viabilidad celular	54
4.2.1 Ensayo mitogénico	54
4.2.2 Ensayo de captación del rojo neutro	54
4.2.3 Ensayo de reversibilidad	54
5. Estudios morfológicos	55
5.1 Tinción con Giemsa	56
5.2 Tinción de los microfilamentos de actina	56
6. Mecanismos de acción	56
6.1 Estrés oxidativo	56
6.1.1 Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)	57
6.1.2 Determinación de los niveles de GSH y GSSG	57
6.2 Estudios de apoptosis	57
6.2.1 Medición de la externalización de fosfatidilserina	57

6.2.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )	58
6.3 Estudio de la vía de las Erks	58
6.4 Ensayos con inhibidores	59
7. Técnicas auxiliares	59
8. Análisis estadístico	60
RESULTADOS	61
Complejo de vanadio(IV) con hesperidina, VO(hesp)	62
1. Caracterización Físicoquímica	62
2. Medida de la actividad antioxidante del complejo	67
3. Actividad biológica	71
Complejo del catión vanadilo (IV) con oxodiacetato (oda), VO(oda)	74
1. Estudios de viabilidad celular	74
2. Cambios morfológicos	77
3. Mecanismos de acción	80
Complejo de vanadio(V) con salicilaldeído semicabazona, V(V)-Salsem	90
2. Estudios de viabilidad celular	90
2. Cambios morfológicos	91
4. Mecanismos de acción	94
Complejo de vanadio(V) con peroxocarbonato, $K_3[VO(O_2)CO_3].H_2O$	103
1. Caracterización físicoquímica	103
2. Actividad biológica en cultivos de osteoblastos	107
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	133
Publicaciones a las que dio origen este trabajo de Tesis doctoral	164

# *Introducción*



## INTRODUCCIÓN

### 1. VANADIO

#### 1.1 Descubrimiento y fuentes

El vanadio es un metal de transición del grupo 5d de la tabla periódica con propiedades químicas y bioquímicas particulares. Fue descubierto por el químico español Andrés Manuel del Río, en México, a partir del mineral de plomo vanadinita ( $Pb_5(VO_4)_3Cl$ ), el cual lo llamó pancromio por la variedad de colores que presentan sus sales al variar el pH. Más tarde, el mismo del Río lo rebautizó como eritronio debido al color rojo que presentan algunas de sus sales en medio ácido, pero luego pensó que se trataba de una nueva forma de cromo y se desdijo de su descubrimiento. En 1830 el sueco Nils Gabriel Seftrön redescubrió el vanadio en minerales de hierro y lo denominó vanadio en honor a Vanadis, la diosa de la belleza y fertilidad en la mitología Nórdica (Nriagu 1998).

El vanadio es un elemento traza presente en la corteza terrestre (aproximadamente 0,02%) con una concentración promedio de 150 g/t, similar a la del zinc y más común que el cobre o el níquel (Habashi 2002). También se encuentra en ciertos organismos vivos tales como tunicados (invertebrados marinos), hallándose en altas concentraciones en unas células de estos animales llamadas vanadocitos (Michibata y Sakurai 1990; Michibata y col. 2002), ciertas algas marinas, hongos (*Amanita muscaria*) (Bayer y Kneifel 1972) e inclusive gusanos segmentados (*Pseudopotamilla ocellata*) (Ishii 1996). Si bien en estos organismos al igual que en plantas se considera un metal esencial, su esencialidad en humanos resta por ser establecida. Sin embargo, en vertebrados superiores hay datos que permiten sugerir para el vanadio, funciones importantes a nivel del tejido óseo (Nielsen 1995).

El vanadio proviene de fuentes primarias tales como minería, residuos de petróleo y desechos metalúrgicos (Reese 2001). Nunca es encontrado en su estado puro, si no que existen más de 50 minerales en donde puede ser hallado bajo la forma de compuestos (ej. carnotita, roscoelita, vanadinita, motramita y

patronita) (Perron 2001). Los principales explotadores de vanadio en el mundo son China, Rusia (70%) y Sudáfrica (30%); y en pequeñas cantidades, Australia y Estados Unidos.

El  $V_2O_5$  es usado como catalizador en la industria del ácido sulfúrico y diferentes reacciones en donde interviene el vanadio. Además, el vanadio es usado en manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con Al, Ti, B, Cr, Ni, Mn y W.

Por otro lado, las sales de vanadio poseen diferentes propiedades biológicas y farmacológicas.

## **1.2 Importancia farmacológica y terapéutica. Historia del vanadio**

Los efectos farmacológicos del vanadio incluyen principalmente acciones insulinomiméticas (Morinville y col. 1998; Thompson y col. 1999; Thompson y Orvig 2008) y antitumorales (Djorjevic 1995; Evangelou 2002). También se han reportado efectos sobre la contracción de vasos sanguíneos, incremento de la afinidad de la mioglobina y la hemoglobina por el oxígeno (Rehder 1992; Thompson y col. 1993; Poucheret y col. 1998) e inclusive efectos osteogénicos (Cortizo y col. 2006; Etcheverry y Barrio 2007).

Actualmente, el sulfato de vanadilo es empleado como generador de masa muscular (Clarkson y Rawson 1999) y también para mejorar el rendimiento de atletas que levantan peso (Fawcett y col. 1997). Sin embargo, el empleo farmacológico del vanadio empezó hace más de un siglo.

En el siglo XIX se recomendaba el uso del vanadio en humanos para casos de desnutrición, anemia, tuberculosis y diabetes (Shechter y Shisheva 1993). En 1899, Lyonnet y Martin observaron que pacientes diabéticos tratados con vanadato de sodio presentaban una mejoría en la glucosuria de los mismos (Lyonnet y Martin 1899). Con el descubrimiento de la insulina, el empleo de las sales de vanadio con fines terapéuticos fue dejado de lado. Sin embargo, los estudios en plantas y animales continuaron. Por ejemplo, durante la primera mitad del siglo XX, Bertrand (padre e hijo), publicaron 18 artículos sobre las actividades biológicas del vanadio en plantas y hongos (Schroeder y Balassa 1963).

La importancia del vanadio en organismos vivos fue demostrada por Henze, el cual investigaba el contenido de vanadio en células sanguíneas de tunicados (vanadocitos) (Henze y Hopper 1911). Por entonces, se pensaba que el vanadio actuaba como transportador de oxígeno en los tunicados por lo que al compuesto que lo contenía se lo llamo hemovanadina y posteriormente amavadina. El esclarecimiento estructural de la amavadina continúa siendo un área de la investigación interesante. A comienzos de los años treinta, Bortels notó que la fijación de nitrógeno por *Azotobacter* es eficiente sólo en presencia de molibdato o vanadato (Rheder 1999). Esta observación ayudaría, medio siglo después, a aislar una enzima con vanadio en bacterias fijadoras de nitrógeno.

En 1939, se observó un incremento en la oxidación de fosfolípidos en cultivo de tejidos en presencia de metavanadato o acetato de vanadilo en concentraciones milimolares (Bernheim y Bernheim 1939). Esta observación junto con otras publicaciones sobre los efectos farmacológicos del vanadio, llevaron a una serie de tratamientos clínicos en humanos en la segunda mitad del siglo XX como un potencial agente farmacéutico para disminuir los niveles de colésterol (Curran y col. 1959; Somerville y Davies 1962; Dimond y col. 1963). Las sales de vanadio tienen sólo un modesto efecto inhibitorio sobre el colésterol sérico, sin embargo su interés radicaba en la ausencia de efectos negativos aún a altas dosis de vanadotratrato de diamonio (Curran y col. 1959; Somerville y Davies 1962; Dimond y col. 1963). Durante el mismo período (comienzos y mediados de 1960) hubo un aumento en la apreciación de la complejidad y versatilidad de los complejos de vanadio. Se sintetizó y caracterizó el bis(acetilacetato) de vanadilo (Dodge y col. 1961); se describió por primera vez un vanadato tetraédrico y un oxoanión de vanadio(V) (Carrington y Symons 1963); se hizo posible la caracterización espectral de complejos de vanadio (IV) y (V) (Dutta y Lahiry 1963; Dutta y Lahiry 1964). La química de coordinación del oxovanadio(IV) fue resumida en 1965 (Selbil 1965). La compleja química del vanadio en solución fue analizada pocos años después (Pope y Dale 1968).

El propósito primordial del artículo de revisión titulado "Elementos Traza Anormales-Vanadio" fue considerar si el vanadio podría ser un elemento esencial en humanos (Schroeder y col. 1963). Al tiempo de que esta monografía era

publicada, la medición del vanadio en muestras biológicas era extremadamente difícil dado que los análisis de emisión espectrográficos no eran muy precisos a niveles nanomolares. Sin embargo, Schroeder y col. (1963) fueron capaces de concluir que las cantidades traza de vanadio eran ubicuas, aparentemente bajo control homeostático y tenían un “bajo orden de toxicidad”, todo lo cual tendía a suponer (no probar) su esencialidad. Posteriormente, se estudió el metabolismo del vanadio (Hopkins y Tilton 1966; Hopkins y Mohr 1974), efectos en el crecimiento (Schwarz y Milne 1971) y posibles síntomas de deficiencia (Hopkins y Mohr 1974).

En los años 1975-1980 se descubrió la eficacia del vanadato para inhibir fosfohidrolasas en cantidades micromolares (Simos 1979; Macara 1980). Un ejemplo de ellas es la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa (Cantley y col. 1977). Esta enzima mantiene el balance iónico correcto en las células bombeando iones de potasio hacia el citoplasma e iones de sodio hacia el exterior celular, utilizando en este proceso adenosina trifosfato (ATP). La eficacia del vanadato para inhibir la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa está históricamente ligada con los descubrimientos futuros de las acciones insulinomiméticas de las sales de vanadio. Este descubrimiento, fue completamente inesperado. Hubo laboratorios de distintas partes del mundo que anunciaron que una preparación comercial de ATP (de Sigma Co.) tenía baja velocidad catalítica en un ensayo estándar de ATPasa (Beauge y Glynn 1977; Cantley y col. 1977; Josephson y Cantley 1977).

En 1980, el mecanismo de acción de la insulina era todavía desconocido. Una aproximación común a entender su modo de acción era aplicar sustancias que imitaban las acciones de la insulina en células “blanco”. La Oubaina y la privación de iones  $\text{K}^+$ , condiciones que inhiben la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa, se conocían como activadores del transporte de glucosa y la oxidación de la glucosa en adipocitos de ratas (Fain 1968). En este contexto, también se estudió la capacidad de las sales de vanadio para mimetizar los efectos de la insulina. De tal modo, se demostró que las sales de vanadio poseían actividad insulinomiméticas en el metabolismo de la glucosa en adipocitos de ratas (Shechter 1980; Dubyak y Klienzer 1980). Los aniones de vanadio(V) (orto vanadato y metavanadato) y el catión de vanadio(IV) (vanadilo) resultaron

efectivos en este aspecto (Shechter 1980). Estudios posteriores pronto revelaron que las acciones insulino-miméticas del vanadio no estaban relacionadas con la inhibición de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa sino a otro mecanismo. De hecho, a diferencia de su acción en sistemas acelulares, el vanadio no fue capaz de inhibir la enzima en adipocitos de rata intactos (Shechter 1980; Dubyak y Klien-zeller 1980). No obstante, los diversos estudios sobre el modo de acción del vanadato conocidos hasta ese momento, llevaron a los investigadores a las siguientes conclusiones: a) el vanadato(V), como un análogo estructural del fosfato, ingresa a las células a través de los canales de ese anión. b) una vez en el citoplasma, es reducido por el glutatión (GSH) a vanadilo(IV) (Simons 1979). Este último es un inhibidor ineficiente de la bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa por lo que se explica lo observado en adipocitos (Cantley y Aisen 1977). Estudios más recientes desacreditaron ese dogma. El GSH es un reductor ineficiente del vanadato a vanadilo a pH fisiológico (Li y col. 1996). La incapacidad del vanadio para arrestar la  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa en células intactas podría ser atribuido a la unión intracelular del vanadato o a una concentración insuficiente para interactuar con el dominio de unión al ATP de la enzima (Cantley y col. 1978).

Posteriormente al descubrimiento de las propiedades insulino-miméticas del vanadio, surgieron otras que posicionarían definitivamente al vanadio como uno de los metales más interesantes a ser estudiados como potencial agente farmacológico. En 1984, se publicó el primer trabajo sobre las propiedades quimiopreventivas del vanadio *in vivo*. En ese reporte, el cáncer de mama inducido con metil-1-nitrosurea en ratas era prevenido alimentando a los animales con un suplemento de 25 mg/l de  $\text{VOSO}_4$ . La presencia de vanadio reducía tanto el número de incidencias como el promedio de tumores (Thompson y col. 1984). Desde entonces, los efectos antitumorales y quimiopreventivos del vanadio han sido ampliamente investigados tanto en modelos animales como en diferentes tipos de líneas celulares tumorales (Bishayee y Chatterjee 1995; Bishayee y col. 1997; Bishayee y col. 2000; Evangelou 2002).

Por el mismo tiempo en que Thompson y col. hicieran su descubrimiento, otro hallazgo, pero esta vez en el área de la química y bioquímica, revolucionó el estudio del vanadio. En 1984, se aisló haloperoxidasas de vanadio (V-

haloperoxidas) a partir del alga *Ascophyllum nodosum* (Vilter 1984). Era la primera vez que los químicos bioinorgánicos podían citar un ejemplo de una enzima que requería al vanadio como cofactor (Vilter 1984; Vilter 1995). En 1986, se descubrió otra enzima de vanadio, la vanadio-nitrogenasa, V-nitrogenasa, que se encuentra presente en bacterias fijadoras de nitrógeno (Robson y col. 1986).

Actualmente los estudios estructurales con cristalografía de rayos X muestran una relación estructural y funcional entre haloperoxidasas y ciertas fosfatasas (Wever y col. 1997; Messerschmidt y col. 1998; Littlechild y col. 2002). Las V-nitrogenasas no están tan bien entendidas como las V-haloperoxidasas, pero son frecuentemente un blanco para estudios mecanísticos (Slebodnick y col. 1997; Rehder 2000; Eady 2003) y también para estudios de modelado (Hinnemann y Norskov 2003).

Por la mitad de 1980, los compuestos de vanadio ocuparon una posición única entre los metalo-fármacos, tanto por sus potentes efectos farmacológicos como por su compleja química de coordinación (Rubinson 1981; Sakurai y col. 1981; Willsky y col. 1984). El vanadio fue catalogado como un metal traza con "funciones biológicas difíciles de entender" (Boyd y Kustin 1984), con posibles funciones relacionadas a las vías metabólicas de la glucosa y de los lípidos (Ramasarma y Crane 1981).

En resumen, la manera de cómo el vanadio puede actuar y funcionar en la biosfera incluye investigaciones sobre su química redox y química de coordinación así como aspectos estructurales y funcionales en sistemas biológicos.

### **1.3 Química del vanadio**

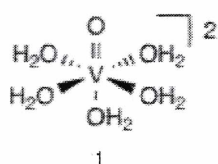
El vanadio presenta diferentes estados de oxidación (desde -1 a + 5) siendo los estados (+3), (+4) y (+5) los más relevantes en sistemas biológicos. En solución acuosa, el vanadato y el vanadilo presentan diferentes reacciones de hidrólisis y condensación. Los productos obtenidos varían con el pH, la concentración de vanadio y ligandos que pueden formar complejos con diferentes geometrías de coordinación. Una característica importante de las soluciones

acuosas ácidas de vanadio es que el vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ) se encuentra en forma de catión, mientras que el vanadato es un anión, excepto a pH inferior a 3 donde está presente como catión pervanadilo, denominado comúnmente como  $\text{VO}_2^+$ .

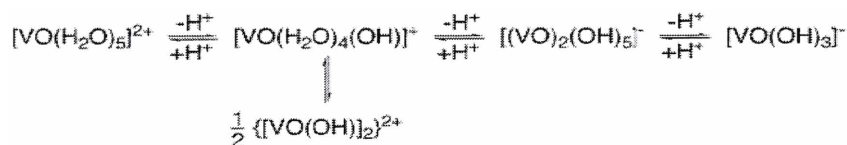
Además, el par  $\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{VO}^{2+}$  posee un potencial redox de alrededor de 1,31 V, mientras que el par  $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$  es de 1,24 V y el par  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  es de - 0,32 V a pH fisiológico. Esta cualidad permite que el vanadato pueda ser reducido por moléculas biológicas que proporcionen el potencial requerido, como el NADPH (Liochev y Fridovich 1990).

### 1.3.1 Química del V(IV) en solución

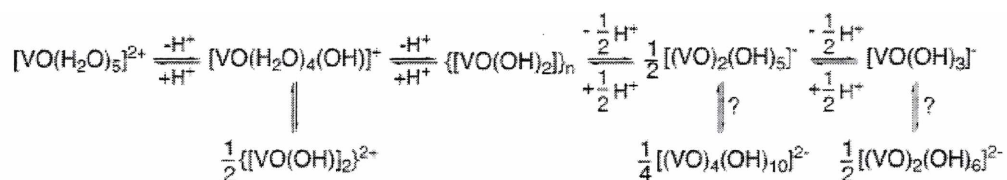
La especie mejor conocida del V(IV) en solución acuosa es el catión vanadilo (catión  $\text{VO}^{2+}$ ,  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ ) (1) (Baes y col. 1976; Chasteen 1983; Vilas Boas y col. 1987). Es estable a pH ácido y es la principal especie a pH 3. Se distingue por poseer 8 líneas en el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a temperatura ambiente. Cuando se incrementa el pH a ~ 4, un protón empieza a perderse ( $\text{pK}_a$  entre 5,0 a 6) y se forman especies hidrolizadas  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$  (esquema 1 y 2). El esquema 1 muestra la especiación simple que existe a concentraciones nano-micromolares del V(IV). El esquema 2 muestra la especiación a concentraciones milimolares.



Esquema 1. Productos de hidrólisis de  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  a concentraciones nano-micromolares. Tomado de Crans y col. 2004.



Esquema 2. Productos de hidrólisis de  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  a concentraciones micro-milimolar. Tomado de Crans y col. 2004.



A medida que el  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$  se forma, aparece un dímero silencioso al EPR, el monohidroxovanadilo(IV),  $[\text{VO}(\text{OH})_2]^{+2}$ . Incrementando el pH de la solución arriba de 5 hay una abrupta disminución en la intensidad de la señal en el EPR debido a la formación de hidróxido de vanadilo  $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]\}_n$ , insoluble. Si se continúa incrementando el pH (6-8), el  $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]\}_n$  se disuelve para formar un dímero,  $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$  y subsecuentemente un monómero cargados negativamente,  $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$ . Solamente esta última especie ha sido bien caracterizada por EPR y espectropía UV-Vis (Iannuzzi y Rieger 1975), mientras que la formación de  $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$  fue deducida por análisis potenciométrico (Komura y col. 1977).

La fórmula  $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$  implica especies tetra-coordinadas. Las características espectroscópicas de estas especies fueron investigadas utilizando UV-visible y EPR para confirmar la geometría (Iannuzzi y Rieger 1975). Los resultados no fueron consistentes para especies tetra o penta-coordinadas sino para una geometría hexa-coordinada (Iannuzzi y Rieger 1975). Ni los métodos de potencimetría ni otros métodos espectroscópicos empleados hasta el momento pueden brindar información exacta del número de moléculas de agua asociadas con el ión metálico en solución. Presumiblemente, dos moléculas de aguas están asociadas con el ión  $[\text{VO}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ . Tal estequiometría podría convertir este anión en el catión vanadilo a través de tres pasos de protonación sin cambios en la esfera de coordinación (Crans y col. 2004).

La existencia de especies oligoméricas fue sugerida en solución básica y neutra a concentraciones micromolares, pero a pH fisiológico, en un medio de no complejación, no puede observarse ningún espectro de EPR (Lachowicz y col. 1975; Chasteen 1983).

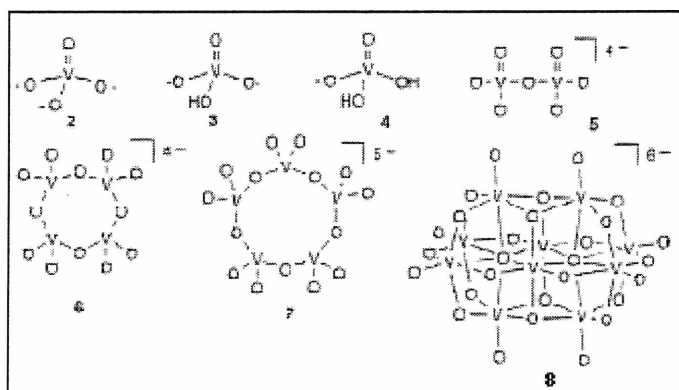


Diversos estudios sobre la complejación de V(IV) con ligandos de bajo peso molecular presentes en sistemas biológicos como fosfato (Alberico y Micera 1994; Kiss y col. 1998), oxalato (Buglyó y col. 2000), lactato (Micera y col. 1993), glutatión (Pessoa y col. 2001; Pessoa y col. 2002) NAD, NADP (Micera y col. 1999) y azúcares (Branca y col. 1992; Garribba y col. 2001) apoyaron la especiación descrita más arriba en la cual el  $[(VO)_2(OH)_5]$  es la especie predominante a pH 7-7,5 y el total de V(IV) en todas las especies estaba en el rango de 1-10  $\mu$ M.

### 1.3.2 Química del V(V) en solución

El vanadio (V) forma el anión vanadato y sus derivados en solución acuosa. El vanadato ha sido reconocido como un análogo estructural (2-4) y también electrónico del fosfato con reacciones de protonación similares (Chasteen 1983; Crans y Tracey 1998; Rehder 1999). Esta analogía es más evidente en la forma trianiónica tetraédrica ( $VO_4^{3-}$  (2) y  $PO_4^{3-}$ ). La similitud en los valores de  $pK_a$  para el vanadato (3,5, 7,8 y 12,5) con los del fosfato (2,1, 7,2 y 12,7) (Chasteen 1990) evidencian la analogía electrónica de estas dos especies. Sin embargo, existen diferencias. A pH neutro el vanadato en concentraciones menores a 0,1 mM está presente principalmente como monoanión ( $H_2VO_4^-$ ) mientras que el fosfato se halla como dianión ( $HPO_4^{2-}$ ). Además, en contraste con la alta estabilidad del  $H_3PO_4$ , el  $H_3VO_4$  rara vez ha sido documentado (Crans 2005) presumiblemente reflejando la conversión a  $VO_2^+$ . En este aspecto, la alta estabilidad del  $VO_2^+$  se debe al mayor número de coordinación comparado con  $H_3VO_4$ . En concentraciones mayores a 0,1 mM a pH fisiológico el  $H_2VO_4^-$  y  $HVO_4^{2-}$  oligomerizan a la forma dimérica (5), tetramérica (6) y pentamérica (7) (Pettersson y col. 1985; Cruywagen y col. 1996). Estas especies son análogas al pirofosfato, especies oligoméricas y poliméricas del fosfato, y contienen uniones anhídrido. Sin embargo, mientras que los derivados del pirofosfato son estables y cinéticamente inertes, las especies de vanadato experimentan interconversiones en solución (Crans y col. 1991; Crans y col. 2004). Otra diferencia importante es

que bajo condiciones fisiológicas, el vanadato puede sufrir química redox mientras que el fosfato no.



Resulta difícil conseguir información estructural de las especies oligoméricas en solución ya que los sistemas oligoméricos son preparados principalmente a partir de solventes orgánicos (Day y col. 1990; Hamilton y col. 2002) y en complejos enzimáticos, (Rigden y col. 2003) lo cual podría no reflejar las especies formadas en solución. Los efectos biológicos de mezclas de oxovanadatos en solución manifiestan que algunas analogías estructurales con los correspondientes derivados del fosfato realmente existen. La figura 1 muestra un diagrama del potencial de reducción  $E$  vs  $\text{pH}$ . A valores altos de  $\text{pH}$ , la forma más estable del vanadio es el  $\text{V(V)}$  mientras que a bajos valores, predominan las especies de  $\text{V(IV)}$ . Desde  $\text{pH}$  2 a 6, la principal especie de  $\text{V(V)}$  es el decámero  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  (**8**) y sus diferentes formas protonadas.

Este comportamiento químico del vanadio tiene una implicancia muy importante. Las especies difícilmente retengan la forma del estado sólido una vez disueltas o ingeridas. La situación se complica más por el hecho de que la química de las distintas especies difiere considerablemente.

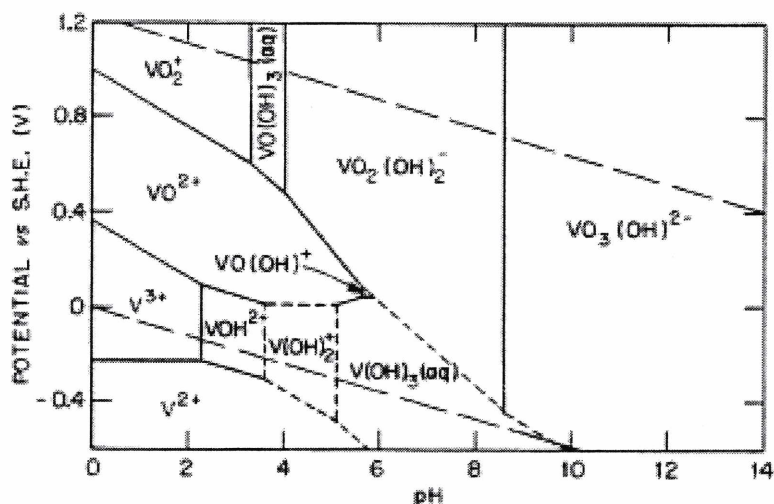


Figura 1. Diagrama de E vs pH que muestra los estados de oxidación del vanadio en función del pH y el potencial de reducción (versus electrodo estándar de hidrógeno). En las regiones adyacentes están presentes especies intermedias en iguales concentraciones. Los límites indicados con líneas cortas tipo guión son menos ciertos que aquellos indicados con líneas de un solo trazo. Las líneas tipo guión largas indican el límite superior e inferior de la estabilidad del agua. Tomado de Crans y col. (2003).

## 1.4. Bioquímica del vanadio

### 1.4.1. Analogía Fosfato-Vanadato

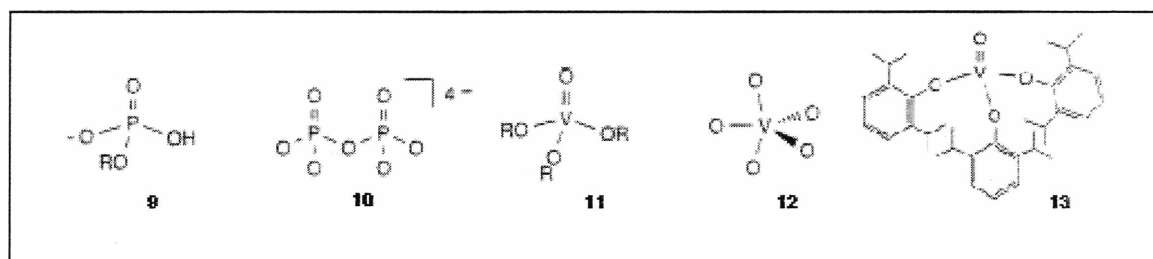
Los ésteres de fosfato son comunes e importantes metabolitos celulares, el grupo fosfato aumenta la solubilidad mientras que la carga aniónica incrementa el reconocimiento entre una enzima y su sustrato. En el ATP, el fosfato almacena 7 kcal/mol de energía a través de la formación de uniones anhídridas mientras que los ésteres de fosfato almacenan alrededor de 3 Kcal/mol. El fosfato además, juega un papel estructural y funcional en moléculas de ADN y ARN.

La analogía Fosfato-Vanadato (F-V) ha sido empleada con éxito en enzimas que catalizan reacciones de ésteres de fosfato (9) y fosfato anhídridos (10). La formación de estos análogos abrió las puertas al estudio funcional y estructural de esta clase de V-compuestos.

La analogía entre los V-compuestos pentacoordinados y el estado de transición de la hidrólisis del éster fosfato explica por qué diversos compuestos de vanadio son potentes inhibidores de ribonucleasas, fosfatasas, ATPasas y otras fosforilasas.

## 1.4.1.1 Ésteres de vanadato. Estudios funcionales y estructurales

Se han empleado numerosos sistemas modelo para investigar la similitud estructural entre ésteres de vanadato (**11**) y los ésteres de fosfato. En general, estos estudios demostraron que para distintos ligandos alcóxidos, el V(V) presentaba la forma pentacoordinada (**12**) por dimerización (Priebisch y Rehder 1990; Crans y col. 1992). Esta dimerización ocurre en solución a concentraciones de 10 mM o más de ésteres de vanadato (Lachowicz y col. 1975; Priebisch y Rehder 1990; Crans y col. 1992). A medida que disminuye la concentración, se incrementa la fracción tetracoordinada. La analogía F-V fue generalmente aceptada a pesar de que los primeros estudios con rayos X mostraron un oxovanadio (V) trimetóxido altamente desordenado con un átomo hexacoordinado (Caughlan y col. 1966) lo cual expuso diferencias entre estos dos sistemas. Actualmente se sabe que aunque la geometría de coordinación más común de los ésteres de vanadato es la pentacoordinada, ocurren importantes excepciones cuando los ésteres contienen ligandos con impedimento estérico. El ejemplo más categórico de esto último es el complejo tris(2,6-di-isopropilfenóxido) de oxovanadio(V) (**13**) (Henderson y col. 1998). Esta estructura establece firmemente la analogía entre complejos de ésteres de vanadato tetracoordinados y ésteres de fosfato.



Los ésteres de vanadato son sustratos para un amplio rango de enzimas como deshidrogenasas, isomerasas y aldolasas (Gresser y Tracey 1985; Crans y col. 1993) La constante de formación de los ésteres de vanadato en solución está en el orden de  $0,1-0,2 \text{ M}^{-1}$  para los ésteres alifáticos, (Gresser y Tracey 1985; Tracey y Gresser 1986), alrededor de 3-5 veces más que para la formación de los

ésteres aromáticos (Gresser y Tracey 1985; Tracey y Gresser 1986). Las uniones vanadato-éster son mucho más lábiles que las de fosfato-éster en solución acuosa.

Un ejemplo de la formación de éster de vanadato es la reacción entre la D-glucosa y el vanadato. La glucosa contiene un grupo hidroxilo primario y varios secundarios que pueden formar ésteres de vanadato. La pequeña cantidad de glucosa-6-vanadato que se forma es reconocida por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada (Nour-Eldeen y col. 1985; Crans 2005).

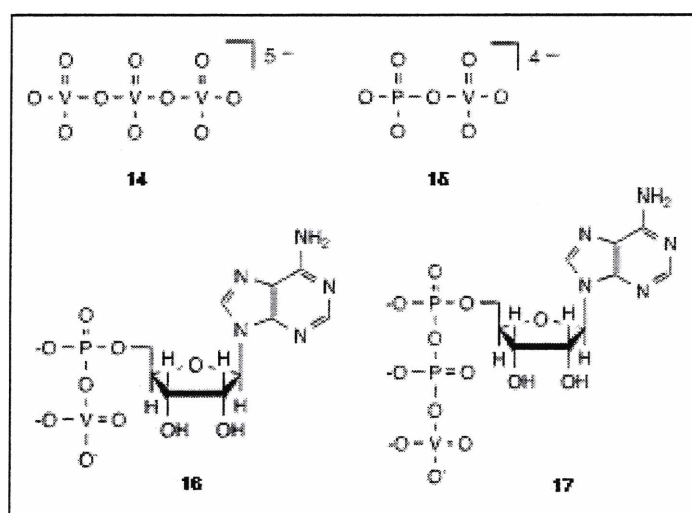
#### 1.4.1.2 Vanadato anhídridos: Analogía estructural con fosfatos condensados

La analogía con las uniones pirofosfato abarca a especies de vanadato oligoméricas (Crans y col. 2004) tales como dímero, tetrámero y pentámero en estado sólido. En solución, los tetrámeros y pentámeros son cíclicos y no poseen analogía estructural con fosfatos lineales.

Los trivanadatos lineales (**14**) se han observado en solución por  $^{51}\text{V}$  RMN (resonancia magnética nuclear) desde pH 8,8 a 9,2 a gran fuerza iónica en menos del 5 % del total de vanadio en solución (Heath y Howarth 1981). Otro trímero lineal de vanadato fue reportado complejo a la fosfatasa PhoE de *Bacillus stearothermophilus* (Ringden y col. 2003). Previo a este trabajo, la analogía estructural de estos homovanadatos estaba limitada a la analogía entre el pirofosfato y el dímero de vanadato en sistemas puramente inorgánicos (Crans y col. 2004).

A pesar de la fosfatasa alcalina óseata de un análogo estructural, los ejemplos más importantes de sistemas vanadato-fosfato en biología son los varios heterovanadatos que contienen fosfato y vanadato (**15**). Los análogos más empleados son AMPV (**16**) y ADPV (**17**) (Tracey y col. 1988; Gerald y col. 1989). Las aplicaciones de estos análogos han tenido cierto éxito particularmente cuando el análogo está unido en sitios alostéricos. La limitada habilidad de estos análogos para inducir respuestas biológicas, puede presumiblemente deberse en parte, al hecho de que ninguno de estos análogos contiene las 7 Kcal/mol de la unión del pirofosfato (Crans y col. 2004). La unión heterovanadato-fosfato de 2-3

kcal/mol no provee la energía necesaria. El hecho de que el análogo vanadato-fosfato parece no unirse al magnesio como lo hacen los fosfatos lineales complica y disminuye el encaje que un análogo tendría cuando se une a una enzima. Presumiblemente, lo último explica por qué existen pocas publicaciones sobre los efectos de vanadato en reacciones con enzimas quinasas (Boyd y col. 1985; Crans 1994) en comparación con la bien establecida inhibición del vanadato sobre las fosfatasas (Gresser y col. 1987; Crans y col. 2004).



Aunque la mayoría de los trabajos en esta área se han realizado con vanadio en estado de oxidación V, existe evidencia de que el ATP y otros nucleótidos forman complejos con el catión vanadilo (Crans col. 2003). Trabajos posteriores extendieron estos estudios y se llegó a la conclusión de que las bases nucleotídicas están implicadas en la complejación del vanadio (Williams y Baran 1992; Williams y col. 1996). La información estructural para este tipo de interacción muestra al vanadio con un número de coordinación mayor que cuatro. No hay información disponible hasta el momento de que estos complejos puedan reemplazar al ATP o a otros nucleótidos en biología (Crans y col. 2004).

### **1.4.2. Importancia de la complejación del vanadio por ligandos orgánicos**

La coordinación de especies inorgánicas de vanadio con ligandos orgánicos tiende a lograr un aumento de la solubilidad, especialmente en el caso del catión vanadilo(IV) que si bien es menos tóxico que el vanadato, es poco soluble bajo las condiciones fisiológicas. La complejación permitiría aumentar la estabilidad y absorción del vanadio, a fin de obtener mejores efectos biológicos y/o farmacológicos. Además, de esta forma se trata de utilizar dosis de concentraciones menores pero más efectivas para el tratamiento de diversas afecciones (Yuen y colaboradores 1993; Mc Neill y colaboradores 1995, Thompson 1999).

### **1.4.3. Inhibición de Fosfatas por compuestos de vanadio**

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de las uniones éster fosfato y el mecanismo implica la formación de intermediarios pentacoordinados de alta energía. La inhibición de fosfatasas por oxometales abarca estudios cinéticos (Crans y col. 1996; Zhang y col. 1997) y estructurales (Yuvaniyama y col. 1996; Ladner y col. 1997). Las fosfatasas pueden dividirse en cuatro clases según el nucleófilo del sitio activo.

La primera clase de fosfatasas, la fosfatasa alcalina, tiene un residuo de serina nucleofílico en el sitio activo de manera que un grupo hidroxilo forma las especies covalentes con los ésteres fosfato a ser hidrolizados. Una segunda clase de fosfatasas está comprendida por las fosfatasas ácidas y otras fosfatasas; éstas contienen un ligando de nitrógeno generalmente en la forma de histidina en el sitio activo, de esa forma un grupo imidazol forma las uniones covalentes con el éster fosfato. La tercera clase de fosfatasas, las bien conocidas tirosina fosfatasas (PTPasas), tienen un residuo de cisteína altamente conservado en el sitio activo y entonces, el grupo tiol es el que forma las especies covalentes con el éster fosfato. La última clase de fosfatasas contiene un ión metálico binuclear en su sitio activo; un grupo hidroxilo unido a un metal actúa como nucleófilo permitiendo la hidrólisis del éster fosfato.

Las caracterizaciones estructurales de los complejos oxometales-proteínas muestran al oxometal con geometrías de tetra-coordinación (Lindqvist y col. 1994; Bond y col. 2002) o penta-coordinación (Ladner y col. 1997; Zhang y col. 1997; Holtz y col. 1999).

El concepto de que el vanadato es un análogo del estado de transición para la hidrólisis del éster fosfato fue descrito por primera vez hace tres décadas atrás y en la actualidad se ha convertido en dogma (Van Etten y col. 1974; Chasteen 1983; Gresser y col. 1987; Zhang y col. 1994). Estudios diseñados para probar cuán buen análogo del estado de transición puede ser el vanadato, han probado el origen de la inhibición (Deng y col. 2002). Un análogo del estado de transición perfecto tiene una afinidad por la enzima que excede a la del sustrato por varios órdenes de magnitud ( $\sim 10^{10}$  a  $10^{11}$  veces). Los estudios de afinidad del vanadato o sus derivados sugieren que aunque en este caso la afinidad es incrementada por múltiples veces, no alcanza por unos pocos órdenes de magnitud en lo que respecta a su afinidad por la fosfatasa de *Yersinia* (Deng y col. 2002). Estos resultados reflejan el hecho de que el vanadato es probablemente un análogo de estado de transición imperfecto. De todas maneras, está muy cerca de serlo y por muchos criterios, puede ser caracterizado como un excelente análogo del estado de transición de las fosfatasas.

La complejidad de la química del V(IV) en solución y la posibilidad de oxidación de V(IV) a V(V) a pH neutro llevó a los investigadores a asumir que cualquier afinidad de las fosfatasas por el V(IV) era reflejo de la oxidación V(IV) a V(V). Por lo tanto, el hecho de que el sulfato de vanadilo ( $\text{VOSO}_4$ ) también hubiese sido reportado como un potente inhibidor de algunas fosfatasas parecía ser un aspecto inexplicable. El hecho de que las principales especies monoméricas de V(IV) no sean catiónicas sino aniónicas a pH cercano a la neutralidad explicaría la aparente inconsistencia de los resultados. Sin embargo se ha demostrado que el V(IV) también puede actuar como un análogo de estado de transición similar al vanadato (Peters y col. 2003).



#### **1.4.3.1. Inhibición de Fosfatasas Alcalina y Ácida por compuestos de vanadio**

Las fosfatasas alcalina y ácida han sido empleadas exhaustivamente para estudiar los efectos de los complejos de vanadio en la inhibición de las fosfatasas. Los modelos de compuestos de vanadio para la reacción de hidrólisis del fosfato, son complejos pentacoordinados que tienen una geometría trigonal-bipiramidal distorsionada o de pirámide cuadrada (Chasteen 1983; Crans y Smee 2004). Aunque la distorsión de la geometría puede disminuir su analogía con el estado de transición de hidrólisis del éster de fosfato (Ray y col. 1995), todos los compuestos de vanadio probados fueron inhibidores de las fosfatasas alcalina y ácida (Posner y col. 1994; Bevan y col. 1995; Crans y col. 1996; Tracey 2000). En particular, la potencia inhibitoria del complejo vanadato-dipicolinato penta, hexa y heptacoordinado fue analizada en detalle y la inhibición fue correlacionada con el compuesto de vanadio intacto. El complejo pentacoordinado fue el inhibidor más potente en línea con la predicción de que un compuesto con geometría más similar al estado de transición del fosfato podría ser el inhibidor más potente. Es posible que el complejo se coordinara con la fosfatasa y quizás, en el proceso, perdiera el ligando. Alternativamente, el sitio activo podría ser lo suficientemente flexible para soportar un pequeño cambio. Interesantemente, los complejos hexa y heptacoordinados son también fuertes inhibidores (Crans y Keramidas 1996).

El fenol incrementa la afinidad del vanadato para inhibir fosfatasas alcalina y ácida (Bevan y col. 1995). Esta observación es interpretada como la formación de un éster fenil-vanadato, el cual es un inhibidor mucho más potente que el vanadato (Stankiewicz y Gresser 1988). Estas consideraciones y aquellas introducidas anteriormente demuestran que una perfecta geometría del estado de transición no es necesariamente la clave para una mayor potencia inhibitoria y que algunas diferencias son anticipadas dependiendo de la fosfatasa específica bajo consideración.

### 1.4.3.2 Inhibición de Tirosinas fosfatasas por compuestos de vanadio

Los compuestos de vanadio son potentes inhibidores de PTPasas (Posner y col. 1994; Bevan y col. 1995). Generalmente la inhibición es menor para las serina/treonina fosfatasas que para las tirosina fosfatasas (Gresser y Tracey 1987). Sin embargo, se han publicado excepciones (Reiter y White 2002). Un amplio rango de compuestos de vanadio diferentes han sido investigados: compuestos de V(V) (Bevan y col. 1995; Tracey 2000; Reiter y col. 2002) y V(IV) (Krejsa y Schieven 1998), compuestos de peroxovanadio (Chasteen 1986; Bevan y col. 1995; Reiter y col. 2002), de hidroxilamidovanadio (Nxumalo y Tracey 1998; Nxumalo y col. 1998; Tracey 2000; Bhattacharyya y Tracey 2001) y sales simples (Krejsa y Schieven 1998). Algunos de estos complejos (Crans y Keramidas 1996) son inhibidores más potentes que las sales simples de V(V) mientras que en otros casos sucede lo contrario (Nxumalo y col. 1998). Además, se han llevado a cabo una serie de estudios en los cuales los efectos inhibitorios de estos compuestos han sido medidos de manera indirecta (Gresser y col. 1987; Posner y col. 1994; Fantus y col. 1995).

El mecanismo de inhibición de los compuestos de vanadio puede variar según esté implicado el V(IV) o el V(V). Por ejemplo, los complejos de hidroxilamida oxovanadio(V) son análogos isoeléctricos de los peroxovanadatos y pueden inhibir reversiblemente tanto a la PTPasa relacionada con el antígeno de leucocitos (LAR) y pp1B (Nxumalo y col. 1998; Bhattacharya y Tracey 2001). El mecanismo de inhibición sugerido para estos complejos según estudios de modelado señala que el grupo R del complejo está apuntando al bolsillo del sitio activo de la enzima (Nxumalo y col. 1998). Por otro lado, estudios de RMN y cristalografía de rayos X demostraron que la inhibición de las PTPasas PTP1B y citoplasmática humana de bajo peso molecular en presencia de bismatolato oxovanadio(IV), BMOV, es debida al vanadilo "desnudo" que se ubica en el centro activo de la fosfatasa con una geometría de coordinación de bipirámide trigonal con la base formada por tres átomos de oxígeno y los ápices formados por un oxígeno y un grupo hidroxilo de la serina (Peters y col. 2003)

Además de comportarse como análogos de los estados de transición, algunos compuestos de vanadio pueden también participar en la regulación redox de las proteínas fosfatasa (Rusnak 2000). La cisteína nucleofílica del sitio activo de las PTPasas da lugar a que pueda ocurrir química redox entre el grupo tiol de las fosfatasa y el compuesto de vanadio. En este aspecto, los peroxovanadatos son inhibidores 100-1000 veces más efectivos que el vanadato debido a la capacidad de los peroxo para oxidar el residuo de cisteína del sitio activo de manera irreversible (Morenville y col. 1998). El hecho de que las serina/treonina fosfatasa no tengan cisteína en sus sitios activos explica la menor potencia inhibitoria para estas enzimas (Posner y col. 1994). La figura 2 muestra el mecanismo de inhibición de tirosina y serina/treonina fosfatasa por el vanadato y el peroxovanadato.

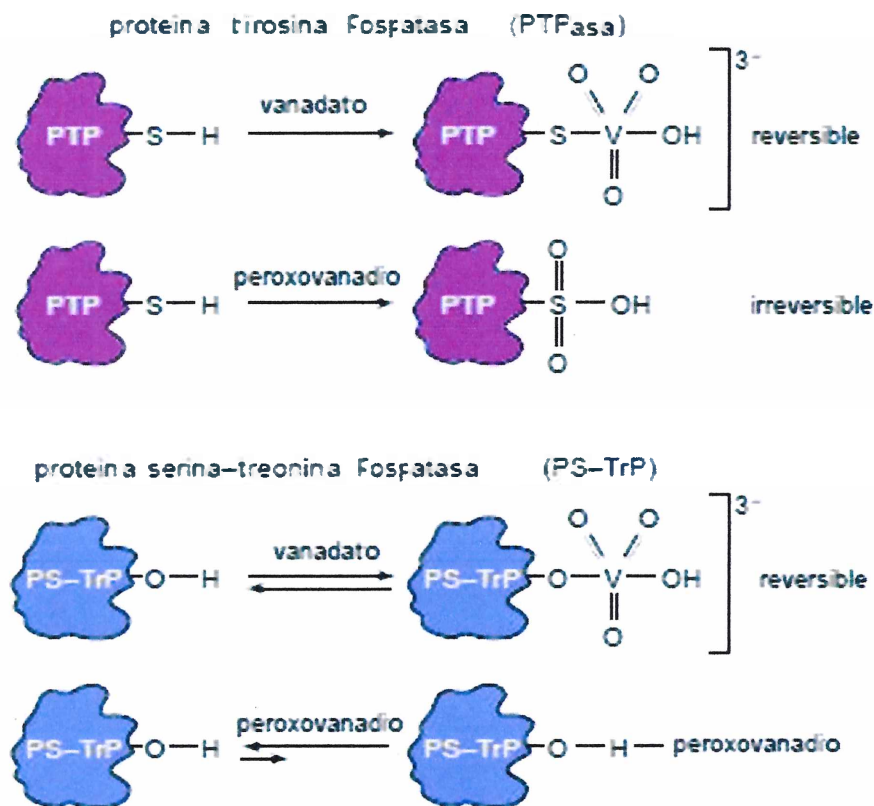


Figura 2. Mecanismo postulado de inhibición de fosfatasa por el vanadato y los complejos de peroxovanadio. El vanadato inhibe a las PTPasas actuando como un análogo de transición y formando uniones reversibles. Por el contrario, los peroxovanadio inhiben irreversiblemente las PTPasas a través de la oxidación del residuo de cisteína en el dominio catalítico. Los peroxovanadio no desactivan tirosina-treonina fosfatasa mientras que el vanadato si tiene el potencial de desactivarlas. Tomado de Morenville y col. (1998).

La inhibición de fosfatasa por los compuestos de vanadio no sólo es de interés para interpretar sus acciones insulinomiméticas, sino otros procesos biológicos en los cuales participan diversas fosfatasa, tales como la osteoporosis (Rao y col. 1996; Salice y col. 1999; Hulley y col. 2002), apoptosis (Aubrecht y col. 1999; Zhang y col. 2001) y cáncer (Ghosh y col. 2000; Chen y col. 2001; Evangelou 2002).

## **1.5 Actividades biológicas del vanadio**

### **1.5.1. Metabolismo del vanadio**

Para la población general, los alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, seguida de la vía aérea. La entrada de vanadio al organismo de los mamíferos ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio (figura 3). La absorción por la piel es mínima. Sólo el 10 % del vanadio ingerido o el 25 % inhalado, es absorbido y transportado por la albúmina y preferentemente por la transferrina a varios tejidos del cuerpo (Elinder y col. 1988, Mukherjee y col. 2004). Los órganos que lo acumulan son principalmente hueso, hígado, riñón, y bazo, mientras que en pulmones y testículos se concentra en menor cantidad; también se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso (Thompson y Orving 2006). En trabajadores expuestos a óxidos de vanadio y en modelos animales, el vanadio absorbido es rápidamente desechado por los riñones o a través de la bilis y excretado en la orina o en las heces (Mukherjee y col. 2004).

Algunos estudios de farmacocinética en eritrocitos demuestran que la entrada de vanadio al interior de la célula ocurre en dos etapas, cada una regida por un mecanismo particular. En la etapa inicial, el V(V) cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico. En el interior de la célula puede ser reducido a V(IV) por el glutatión y otros sustratos a los que permanece unido (Cantley y col. 1978; Yang y col. 2003). En la segunda etapa, el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, V(IV) y un mecanismo de paso

semejante al de los cationes divalentes (Evangelou 2002). De hecho, se ha descrito que el vanadio ingerido es transformado por el estómago a su forma catiónica antes de empezar a ser absorbido en el duodeno. Por otro lado, la absorción del  $\text{VO}^{2+}$  es cinco veces menor que la del  $\text{VO}_4^{3-}$  (Evangelou 2002, Mukherjee y col. 2004).

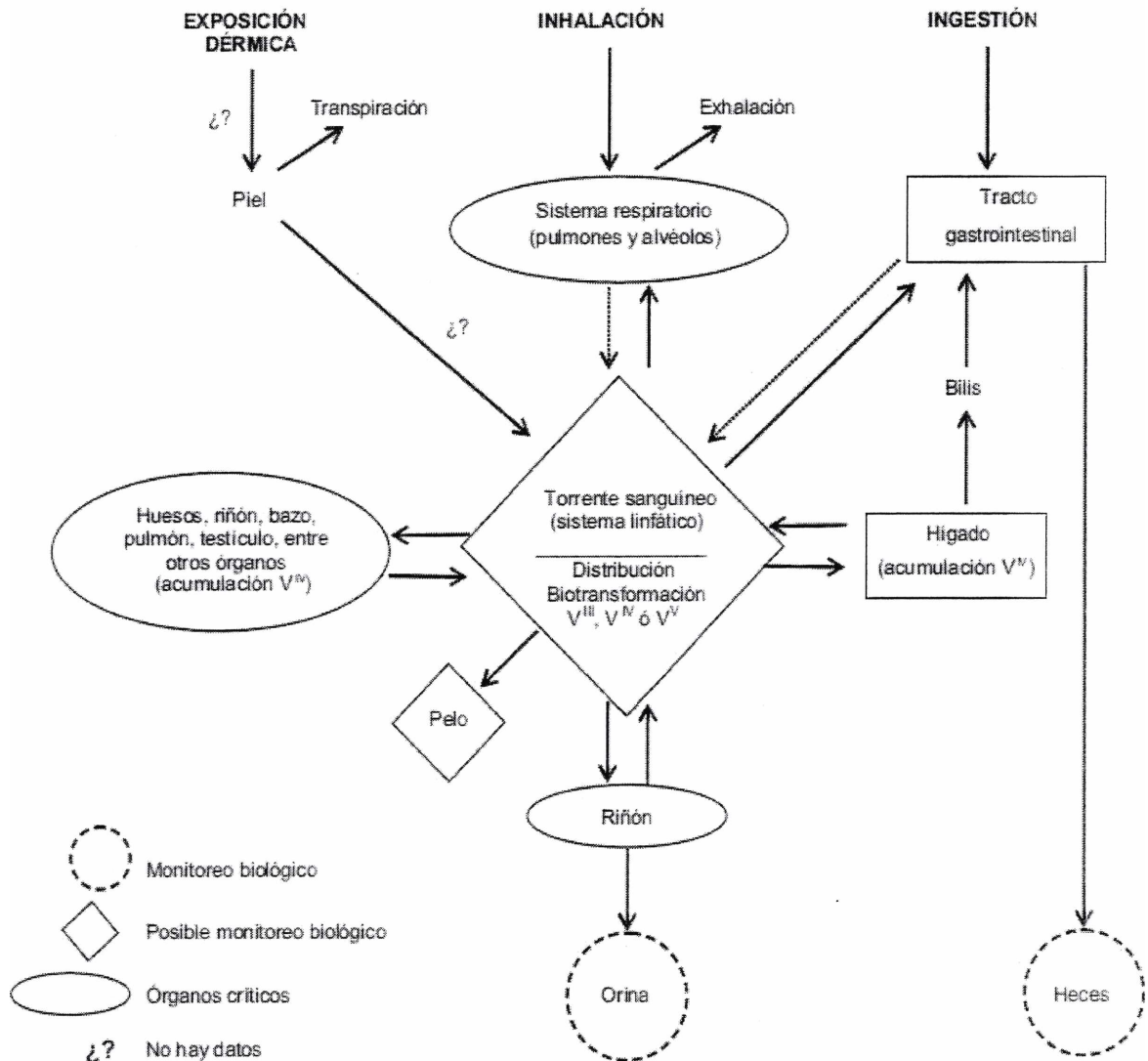


Figura 3. Metabolismo del vanadio. Modificado de Elinder y col. (1988).

El V(IV) o el V(V) administrados a ratas por vía intratraqueal o intraperitoneal, se distribuye en el núcleo, las mitocondrias, los microsomas y en el citoplasma en células de hígado (Sakurai 1994). Diversas pruebas bioquímicas demostraron que el vanadio en estados de oxidación IV y V, interactúa en concentraciones de micromoles ( $\mu\text{M}$ ) con muchas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (Baran 2000). En la célula, el vanadio tiene preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas; se calcula que el 61 % del total de V(IV) se une a los fosfatos, el 29 % a las proteínas, el 1 % queda libre y el resto se une a radicales sulfhidrilo y vitaminas, entre otras moléculas (Evangelou 2002).

### **1.5.2. Efectos del vanadio sobre células en cultivo**

Luego de encontrar que el vanadio inhibe la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se comenzaron a diseñar diferentes experimentos *in vitro* con células en cultivo para estudiar y conocer sus efectos biológicos. Se encontró que el vanadio estimula la fosforilación de proteínas en restos de tirosina, aumenta los niveles de fosfoinosítidos, estimula la proliferación de diferentes líneas celulares, incrementa la captación de pequeñas moléculas e iones, entre otros efectos insulino-miméticos. Por otro lado, se han descrito efectos antitumorales, tóxicos y transformantes en diferentes líneas celulares.

#### **1.5.2.1. Efectos insulino-miméticos. Mecanismos de acción**

Gran parte de los efectos biológicos de la insulina son reproducidos por las sales de vanadio y sus compuestos. Pueden estimular la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y de lípidos en tejido muscular, adiposo y hepático (Mehdi y Srivastava 2005, Shukla y Bhonde 2008). Inhiben la gluconeogénesis en el hígado y riñón (Reul y col. 1999; Mosseri y col. 2000; Marzban y col. 2002) al igual que la lipólisis (Shisheva y Shechter 1992; Thompson y Orving 2006) en células adiposas. El efecto del vanadio sobre las proteínas ha sido poco estudiado, sin

embargo parece tener un efecto anabólico al estimular su síntesis e inhibir su degradación (Seglen y Gordon 1981).

A nivel celular, el vanadio activa elementos claves de la vía de señalización de la insulina (figura 4): fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) (Pandey y col. 1998) y activación de vías de transducción de señales intracelulares tales como la vía de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK-1/2) (Pandey y col. 1999; Molero y col. 2002), la vía de la quinasa del inositol 3 fosfato (PI3-K) (Pandey y col. 1998; Molero y col. 1998) y la vía de la quinasa B (PKB) (Li y col. 1997; Pandey y col. 1999).

Las acciones del vanadato no dependen del receptor de insulina. Esto fue claramente demostrado con quercetina ( $IC_{50}$  1-2  $\mu$ M), un flavonoide natural usado como inhibidor de la fosforilación de sustratos por el receptor (Shisheva, y Shechter 1992). En adipocitos (primer modelo biológico utilizado para estudiar los efectos insulinomiméticos del vanadio), la quercetina fue capaz de inhibir el transporte y oxidación de glucosa, la lipogénesis y la glicogénesis mediada por la insulina, pero no inhibió completamente los efectos miméticos del vanadato (Shisheva, y Shechter 1992). Además, las acciones antilipolíticas de la insulina y el vanadato tampoco fueron antagonizadas por la quercetina. En base a esto, se concluyó que el receptor de insulina no estaba implicado y que otra tirosina quinasa participaba en las acciones insulinomiméticas del vanadato.

La wortmanina es un potente inhibidor de la PI3-K que bloquea todas las acciones metabólicas de la insulina en adipocitos de rata incluyendo la acción antilipolítica de la hormona (Wilden y col. 1992). En relación con el vanadato, la wortmanina pudo arrestar las acciones de captación y oxidación de glucosa, lipogénesis y glicogénesis del vanadato, pero no bloquear su acción antilipolítica (Li y col. 1997; Sekar y col. 1999). Se estableció entonces que la acción antilipolítica del vanadato era independiente de la activación de la PI3-K y que podría intervenir en un sitio muy distal de la cascada lipolítica (Li y col. 1997).

Las fosfotirosinas en las células comprenden menos del 0,1 % de la cantidad combinada de fosfoserina y fosfotreonina. Sin embargo, las células cuentan con una apreciable cantidad de proteínas tirosina quinasas en el citoplasma (PTK citosólicas). Al igual que los receptores tirosina quinasa, la

mayoría de las PTK citosólicas se activan por autofosforilación en motivos de tirosina (Srivastava 1990).

La estaurosporina es un potente inhibidor de estas PTKs y un pobre inhibidor de PTKs de membrana (Elberg y col. 1995). En adipocitos intactos, la estaurosporina bloquea los efectos del vanadato en las acciones lipogénicas, oxidación de la glucosa y glicogénesis ( $IC_{50}$  0,1-0,3  $\mu$ M) (Shisheva y Shechter 1993; Sekar y col. 1999), pero no tiene efecto sobre la captación de glucosa o acción antilipolítica. Ninguno de los efectos de la insulina son inhibidos en ese rango de concentración. Se concluyó por lo tanto que la PTK citosólica participaba en los efectos del vanadato en el metabolismo de la glucosa, pero no en la activación del transporte de la hexosa ni en la acción antilipolítica del vanadato (Shechter y col. 2003).

Además de esta PTK citosólica identificada y parcialmente caracterizada en 1993 (Shisheva y. Shechter 1993), una segunda PTK activada por vanadio fue identificada en 1997 (Elberg y col. 1997). Esta última es una proteína de 55 kDa no glicosilada, exclusivamente localizada en membrana plasmática (membPTK). En este caso, la estaurosporina puede inhibirla. En adipocitos, la estaurosporina antagoniza la captación de glucosa inducida por el vanadato y revierte sus efectos antilipolíticos (Elberg y col. 1997). La mem-PTK es activada por el vanadato y más aún por el vanadilo en sistemas acelulares (Elberg y col. 1997). Aunque estas observaciones podrían no reflejar lo que sucede *in vivo*, estudios adicionales indicarían que el vanadio(IV) y el V(V) son insulino miméticamente activos, pero operan por vías diferentes (Shechter y col. 2003). El vanadilo sería activo a nivel de membrana plasmática y sería el responsable de la captación de glucosa y posiblemente de la inhibición de la lipólisis mientras que el vanadato operaría exclusivamente en el compartimiento citosólico potenciando el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Shechter y col. 2003).

Otro mecanismo utilizado por el vanadio para estimular el metabolismo de la glucosa es la inhibición de las enzimas que estimulan la síntesis de glucógeno como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la glucosa-6-fosfatasa (G6pasa) y la fructosa-6-fosfatasa (Pandey y col. 1998; Sekar y col. 1999; Mosseri y col. 2000; Marzban y col. 2002)



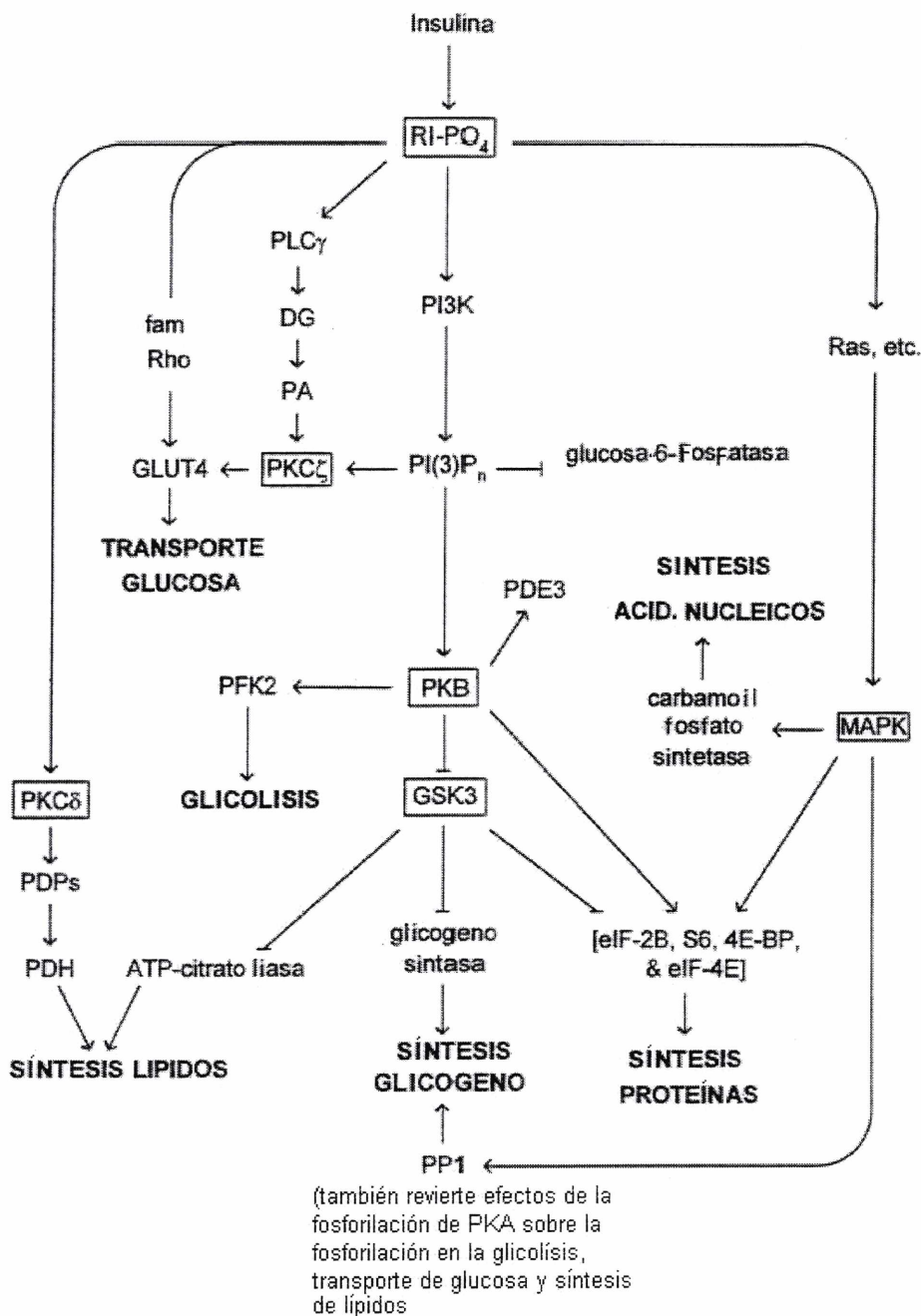


Figura 4. Vía de señalización de la insulina. Modificado de Bolander (2004).

Los complejos de vanadio también ejercen efectos insulinomiméticos frente a lo cual, inevitablemente, surge la pregunta sobre cuáles son sus mecanismos de acción. Para el caso de los peroxovanadatos, la respuesta se ha contestado hace tiempo: la inhibición potente e irreversible de PTPasas domina todos sus efectos bioquímicos (Morenville y col. 1998). Para los demás complejos, los mecanismos

no están claramente establecidos. El bismaltolato oxovanadio(IV) (BMOV), fue capaz de inhibir PTPB1 en células HEK293 transfectadas con esa fosfatasa y potenciar la activación del receptor de insulina *in vivo*, pero no activarlo por sí solo. El mecanismo de acción implica la descomplejación y ubicación del vanadilo en el sitio activo de la fosfatasa (Peters y col. 2003). En células de ovario de hamster (CHO) que sobreexpresan el receptor de insulina, el BMOV y el oxo bis(acetilacetato) de vanadilo pueden inducir significativamente la fosforilación de la unidad  $\beta$  del receptor de insulina ( $IR\beta$ ), de IRS-1 al igual que PKB y quinasa-3 de la glucógeno sintasa (GSK-3). En comparación, el sulfato de vanadilo es un inductor más débil mientras que el ortovanadato de sodio ( $Na_3VO_4$ ) no tiene efecto (Medhi y Srivastava 2005).

### **1.5.2.2 Efectos antitumorales**

El tratamiento antitumoral por cualquier compuesto debería cumplir ciertos criterios y ejercer los siguientes efectos selectivos en células malignas: (a) inhibición de la proliferación, (b) acciones citotóxicas y/o citostáticas (c) reducción y/o inhibición del potencial invasivo o metatástico de las células y (d) reducción o ausencia del potencial para inducir resistencia celular. Los compuestos de vanadio poseen todas estas propiedades y las ejercen concertadamente o independientemente a través de una variedad de mecanismos celulares (*vide infra*) (figura 5).

Los efectos antitumorales de los compuestos de vanadio han sido investigados en una variedad de células tumorales (English y col. 1983; Djordjevitc y Wampler 1985; Zick y Sager-Eisenberg 1990; Bergamashi y col. 1993; Cortizo y col. 1994; Djordjevic y col. 1995; Kresja y col. 1997; Cortizo y col. 2000; Fu y col. 2008)

La generación de estrés oxidativo es un mecanismo que subyace a la mayoría de los efectos antitumorales que se observan para el vanadio y sus derivados. Es por eso, que antes de describir en detalle los mecanismos de la figura 5, para una mejor comprensión, se hará una revisión del papel del estrés oxidativo a nivel celular.

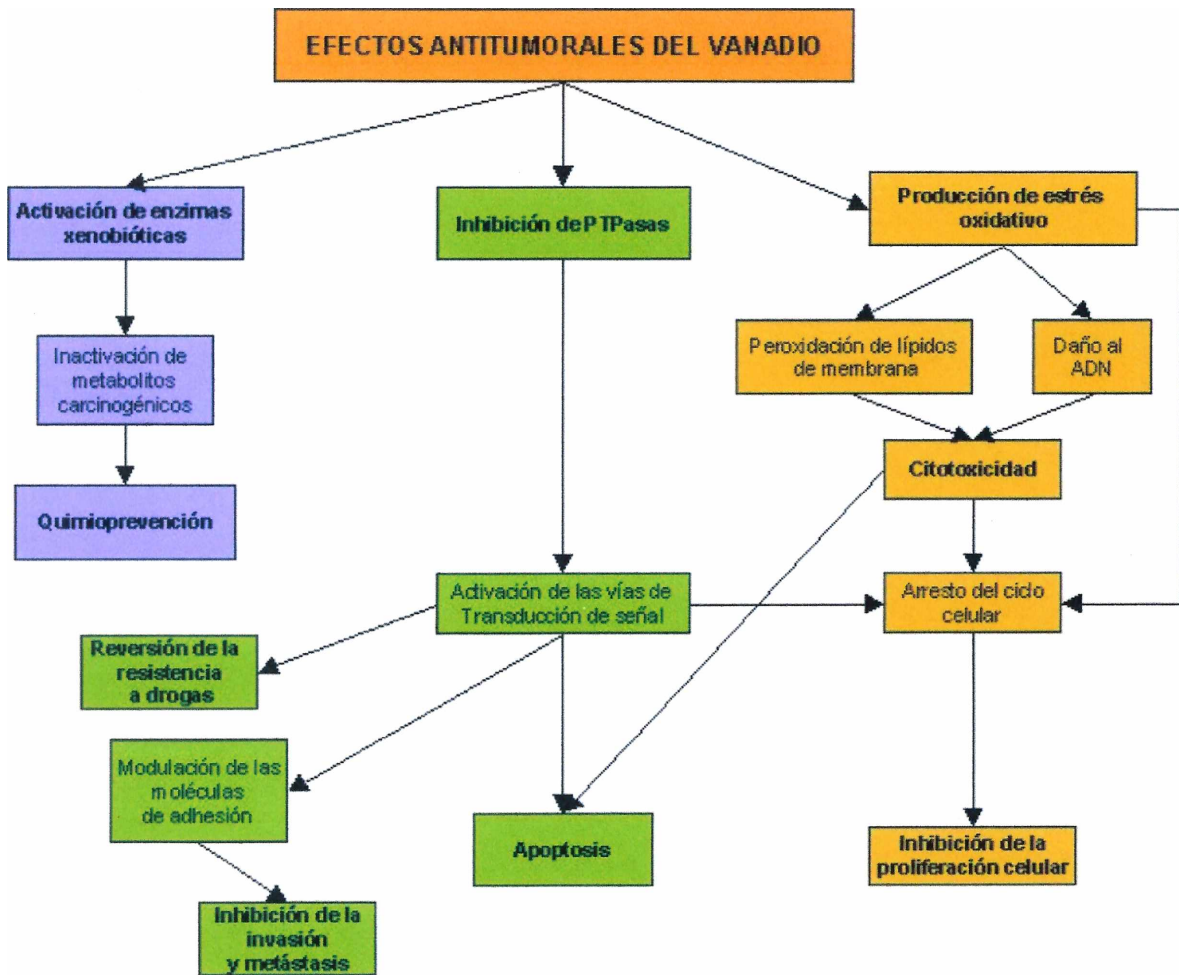


Figura 5. Esquema de los mecanismos de acción a través de los cuales los compuestos de vanadio ejercen sus efectos antitumorales. Modificado de Evangelou (2002).

## Especies de oxígeno reactivas (ROS) y de nitrógeno reactivas (RNS)

El término especies de oxígeno reactivas o ROS comprende a los radicales libres y aquellas moléculas que no siendo radicales, son capaces de su formación en ambientes extra e intra celulares tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete (Halliwell y Gutteridge 1990). Algunos metabolitos de ácidos grasos, tales como aquellos derivados del ácido araquidónico por la vía de la lipoxigenasa son también considerados ROS.

Las especies de nitrógeno reactivas (RNS) también han ganado mucha atención por su potencial oxidativo.

La primera especie reactiva de oxígeno generada en los sistemas biológicos es el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), un radical libre formado por la reducción directa e incompleta del oxígeno, por un único electrón. El  $O_2^{\bullet-}$  tiene una vida media corta y es poco reactivo. Su inestabilidad se debe a que la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  es muy favorable (Thannickal y Fanburg 2000). Esta dismutación puede ser espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque la mayoría del peróxido de hidrógeno producido en células eucariotas proviene de la reacción de dismutación, éste también puede formarse a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones, un mecanismo de reacción compartido por muchas flavoproteína oxidasas (Massey, 1994). Al contrario del  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$  es una molécula mucho más estable y puede difundir fácilmente a través las membranas biológicas, en tanto que éstas son impermeables al  $O_2^{\bullet-}$ . Por otro lado, el  $H_2O_2$  en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo  $OH^{\bullet}$  a través de la reacción de Fenton:



El  $OH^{\bullet}$  es una molécula extremadamente reactiva y tóxica. Puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados produciendo los radicales alcoxilos ( $RO^{\bullet}$ ) y peroxilos ( $ROO^{\bullet}$ ).

Las especies reactivas del nitrógeno, como el radical óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) y el altamente reactivo anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), constituyen otra familia de moléculas reactivas en los sistemas biológicos.

Los ROS/RNS pueden dañar tejidos a través de una variedad de mecanismos incluyendo daño en el ADN, peroxidación lipídica y daño de proteínas, oxidación de importantes enzimas y estimulación de citoquinas proinflamatorias liberadas por monocitos y macrófagos. Además, también están relacionados con la regulación del proceso de apoptosis o muerte celular programada (Valko y col. 2006).

Por otro lado, los ROS pueden tener un papel como mensajeros secundarios implicados en regulación génica y cascadas de transducción de señales con finalidades fisiológicas (Allen y Tresini 2000; Sastre y col. 2000). Se

sabe que cambios en los niveles celulares de ROS afectan a la actividad de quinasas activadas por mitógenos (MAPK), vías de señalización activadas por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) o dependientes de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B (Allen y Tresini 2000).

#### *Fuente de ROS y RNS en las células*

Los ROS y RNS pueden ser producidos a partir de sustancias exógenas y endógenas (Tabla 1).

Tabla 1. Fuente de ROS y RNS

<u>Endógenas</u>
Mitocondria (cadena respiratoria)
Xantina oxidasa (XO)
Citocromo p450 (reacciones de detoxificación)
Microsomas, peroxisomas
Síntesis de prostaglandinas (cicloxigenasas y lipoxigenasas)
Células fagocíticas
<u>Exógenas</u>
iones metálicos
Radiación UV
Radiaciones ionizantes

La mitocondria es el sitio más importante de la producción de ROS en todos los tipos celulares ya que genera grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Por ello, está enriquecida con antioxidantes no enzimáticos (glutatiión reducido (GSH)) y enzimáticos (SOD y glutatiión peroxidasa (GPx)), presentes en ambos lados de sus membranas para minimizar el estrés oxidativo (Cadenas y Davies 2000).

La xantina oxidasa (XO) es una enzima altamente versátil distribuida ampliamente en diversas especies (desde las bacterias al hombre) y una fuente importante de ROS. Es un miembro de un grupo de enzimas conocidas como hierro-azufre molibdeno flavina-hidroxilasas y catalizan la hidroxilación de purinas. En particular, la XO cataliza la reacción de hipoxantina a xantina y xantina a ácido

úrico. En ambos pasos, el oxígeno es reducido, formando superóxido en el primer paso y peróxido de hidrógeno en el segundo (Valko y col. 2006).

Los macrófagos activados inician un incremento en el consumo de oxígeno que dando lugar a anión superóxido, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Conner y Grisham 1996.).

A través de la inducción del complejo enzimático citocromo P450, la generación de ROS, en particular anión superóxido y peróxido de hidrógeno, surge del rompimiento o desacople del ciclo catalítico de la P450.

Los microsomas son los responsables del 80% de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido *in vivo* en sitios de hiperoxia (Gupta y col. 1997). Los peroxisomas se conocen por producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, bajo condiciones fisiológicas. La oxidación peroxisomal de ácidos grasos es también una potente fuente de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> luego de un largo período de ayuno (Valko y col. 2006).

## **Daño oxidativo a biomoléculas**

### *Daño al ADN nuclear y mitocondrial*

El OH<sup>•</sup> es conocido por reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN dañando tanto las bases de purinas como de piridiminas y también el esqueleto de desoxiribosa (Dizdaroglu y col. 2002). La modificación permanente del material genético a partir de estos incidentes representa el primer paso en la mutagénesis y carcinogénesis. Los daños mediados por ROS pueden ser cortes en el ADN de simple y doble cadena, modificaciones de purina, pirimidina o desoxiribosa y entrecruzamientos. Como consecuencia del daño, puede ocurrir un arresto o inducción de la transcripción, inducción de las vías de transducción de señales, errores en la replicación e inestabilidad genómica, todas asociadas con la carcinogénesis (Marnet 2000; Cooke y col. 2003)

Las RNS como peroxinitritos y óxidos de nitrógeno también pueden generar daño en el ADN (Brown y Borutaite 2001). Después de la reacción con guanina, el peroxinitrito forma 8-nitroguanina. Debido a su estructura, este aducto tiene el potencial para inducir transversiones de G:C→T:A

Además del daño al ADN nuclear, existe evidencia de daño oxidativo al ADN mitocondrial en procesos de carcinogénesis (Inoue y col. 2003). Mutaciones y alteraciones en los genes mitocondriales que codifican para los complejos I, III y V y regiones hipervariables del ADN, se han identificados en varios tipos de cánceres humanos (Valko y col. 2006). Se ha propuesto que el ADN mitocondrial es más susceptible a la oxidación que el nuclear debido a que: i) la mitocondria convierte ~5 % del oxígeno consumido en anión superóxido y luego en peróxido de hidrógeno; (ii) la capacidad de reparación del ADN mitocondrial es limitada ya que carece completamente de la capacidad para reparar nucleótidos por excisión; (iii) el ADN mitocondrial no está protegido por histonas (Inoue y col. 2003).

#### *Peroxidación lipídica*

Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son extremadamente sensibles a la oxidación (Esterbauer y col. 1991; Marnett 1999). Todo el proceso de peroxidación lipídica consiste en tres estadios: iniciación, propagación y terminación (Pinchuk y col. 1998; Nyska y Kohen 2002.) (figura 6).

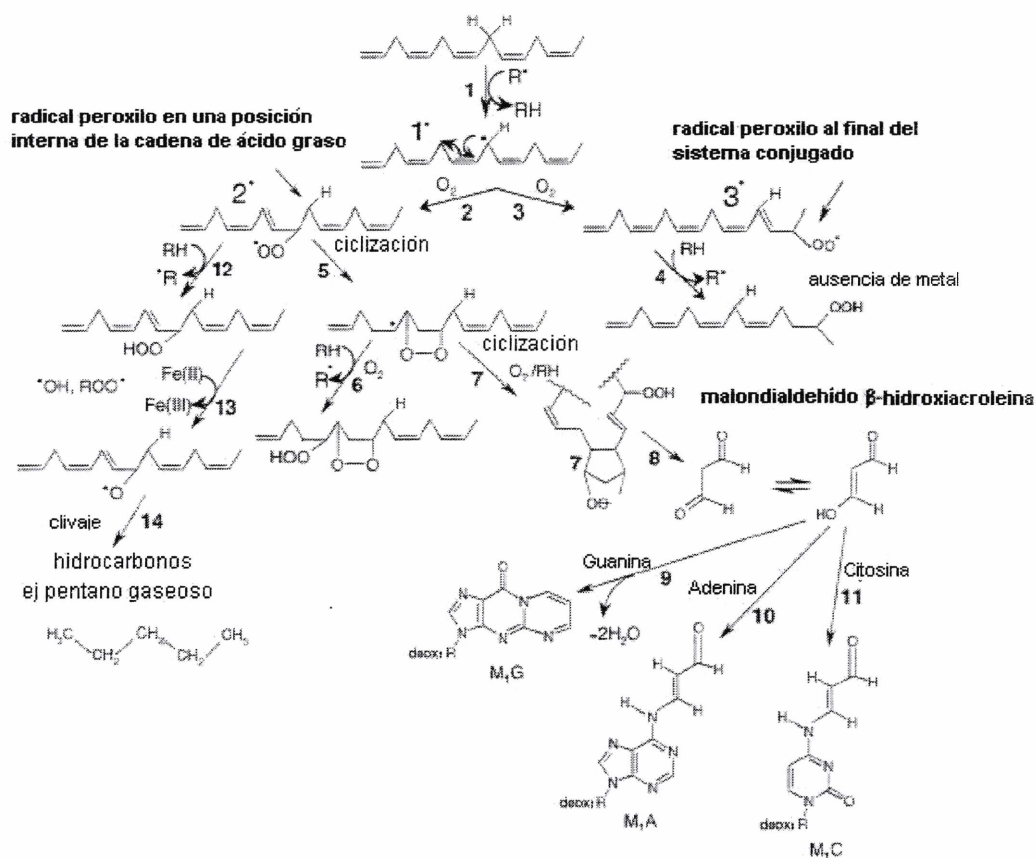


Figura 6. Vías para la peroxidación lipídica. Los grupos metílenos de los ácidos poli-insaturados son altamente susceptibles a la oxidación y sus átomos de hidrógeno, después de la interacción con el radical  $R^\bullet$ , son removidos para formar radicales con carbono central  $1^\bullet$  (reacción (1)). Estos radicales reaccionan con el oxígeno para formar radicales peroxilos (reacción (2) y (3)). Si el radical peroxilo está en uno de los extremos de la doble unión ( $3^\bullet$ ), se reduce a hidroperóxido el cual es relativamente estable en ausencia de metales (reacción (4)). Un radical peroxilo localizado en la posición interna del ácido graso ( $2^\bullet$ ) puede reaccionar por ciclización para producir un peróxido cíclico adyacente al radical con carbono en el centro (reacción (5)). Éste puede ser reducido para formar un hidroxiperóxido (reacción (6)) o a través de la reacción (7), sufrir una segunda ciclización y formar un peróxido bicíclico el cual después de acoplarse al oxígeno y reducirse, forma una molécula estructuralmente análoga al endoperóxido. El compuesto 7 es un producto intermediario de la producción de malondialdehído (reacción (8)). El malondialdehído puede reaccionar con las bases del ADN, guanina (G), adenina (A) y citosina (C) y formar aductos  $M_1G$ ,  $M_1A$  y  $M_1C$  (reacciones (9)-(11)). Los radicales peroxilos ubicados en la posición interna de los ácidos grasos ( $2^\bullet$ ) pueden, además de participar en reacciones de ciclización, quitar átomos de hidrógeno de una molécula vecina de ácido graso creando así hidroperóxidos lipídicos (reacción (12)). Éstos pueden después reaccionar con metales redox (por ejemplo, hierro) para producir radicales alcoxilos ( $RO^\bullet$ ) (reacción (13)) los cuales, después de ser clivados (reacción (14)), pueden formar pentano gaseoso; un buen marcador de peroxidación lipídica. Modificado de Valko y col. (2006).



## Proteínas

Los radicales hidroxilos promueven la abstracción de un átomo de hidrógeno del esqueleto de polipéptidos para formar un radical con carbono-centrado, el cual bajo condiciones aeróbicas reacciona rápidamente con el oxígeno para formar radicales peroxilos (Stadtman 2001) o la forma protonada del superóxido ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). Las proteínas son resistentes al daño por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por otros oxidantes simples a menos que estén presentes metales de transición. El daño catalizado por metales a proteínas implica escisión oxidativa, pérdida de residuos de histidina, entrecruzamientos bi-tirosina, la introducción de grupos carbonilos y la formación de radicales alquilo,  $\text{R}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$  en el centro de las proteínas (Stadtman 1992). Los radicales alcoxilos son capaces de clivar uniones peptídicas. El daño proteico parece ser reparable y se conoce como un evento no letal para las células. Sin embargo, existe evidencia de que dos proteínas mitocondriales (aconitasa y adenina nucleótido- translocasa) pueden ser blancos importantes de un daño oxidativo a largo plazo (Stadtman 2004).

Las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles a oxidación por radiaciones ionizantes y por la acción de ROS/RNS (Stadtman 2004), pero los residuos de cisteína y metionina son particularmente susceptibles (Levine y col. 1996). Sin embargo, esta oxidación es reversible por grupos tiol.

El anión peroxinitrito  $\text{ONOO}^-$  es capaz de nitrosar los grupos sulfhidrilos de las proteínas, nitrar los residuos de triptofano y tirosina y oxidar residuos de metionina a metiona sulfóxido. Sin embargo, el proceso de modificación de proteínas por el peroxinitrito es fuertemente inhibido por la concentración fisiológica de  $\text{CO}_2$  ya que el peroxinitrito reacciona rápidamente con  $\text{CO}_2$  para formar  $\text{ONOOCO}_2^-$  (Valko y col. 2006).

## Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes

El nivel celular de ROS dependerá del balance entre la producción y la capacidad antioxidante de la célula (figura 7). Una producción excesiva de ROS o

una disminución en la capacidad antioxidante, provoca una situación de **estrés oxidativo**. En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ROS. Entre ellos se encuentran los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente los ROS, como los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el  $O_2^{\bullet-}$  y sus metabolitos. Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos tipos: primarios y secundarios. Entre los sistemas antioxidantes primarios se encuentran aquéllos capaces de interceptar los ROS evitando la producción de nuevos radicales libres y el daño consiguiente a estructuras celulares. Ejemplos de los mismos son: la SOD, la glutatión peroxidasa, la catalasa y la tioredoxina reductasa.

Existen cuatro formas de la **superóxido dismutasa**: Cu,Zn- SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), Ni-SOD, y la SOD extracelular. Todas las superóxido dismutasas catalizan la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (Kinnula y Crapo, 2004).

La **catalasa**, que se localiza en los peroxisomas, realiza conversión del peróxido de hidrógeno, muy reactivo, a agua es una de las enzimas conocidas más eficientes ya que no se satura a ninguna concentración de  $H_2O_2$ .

El sistema **GSH** es probablemente el mecanismo de defensa celular más importante. El tripéptido GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), no solamente actúa como un secuestrante de ROS, sino que regula el estado redox intracelular. El sistema consiste en el GSH, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y otros peróxidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG). El GSSG es posteriormente reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa. En condiciones normales, más del 95% del GSH celular está en forma reducida, así que el ambiente intracelular es primordialmente reductor. Una depleción en los niveles de glutatión se ha relacionado en numerosas ocasiones con el proceso de apoptosis aunque la muerte celular no siempre va acompañada de dicha depleción (Higuchi 2004; Xu y Thornalley 2001).

Los sistemas antioxidantes secundarios son moléculas que actúan atrapando radicales libres evitando así, que éstos inicien reacciones en cadena

que podrían dañar estructuras celulares. Algunos ejemplos son la vitamina E, vitamina C,  $\beta$  caroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Valko y col. 2006).

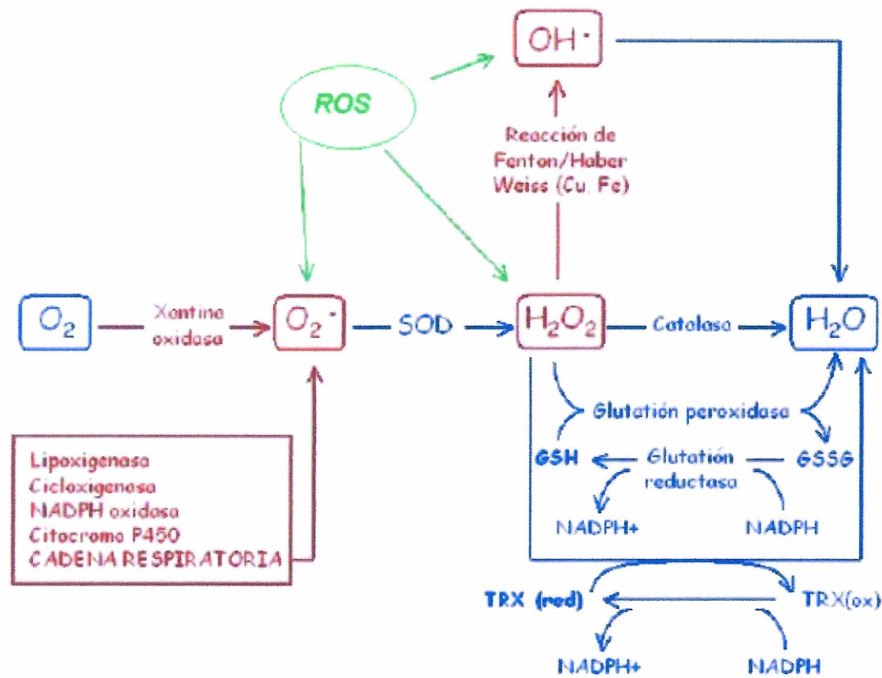
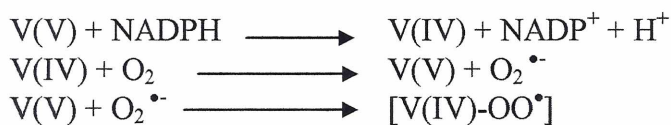


Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos de generación de ROS y sistemas antioxidantes celulares. SOD: superóxido dismutasa; GSH: glutati3n reducido, GSSG glutati3n oxidado; TRX: Tioredoxina. Modificado de Mercurio y Manning (1999).

### 1.5.2.2.1. Generaci3n de estr3s oxidativo por el vanadio

El vanadio puede participar en reacciones que generan radicales libres (figura 8). El vanadio(V) es reducido r3pidamente a vanadio(IV) en el plasma mediante enzimas y antioxidantes. Las siguientes reacciones tienen lugar dentro de las c3lulas (Valko y col. 2006):



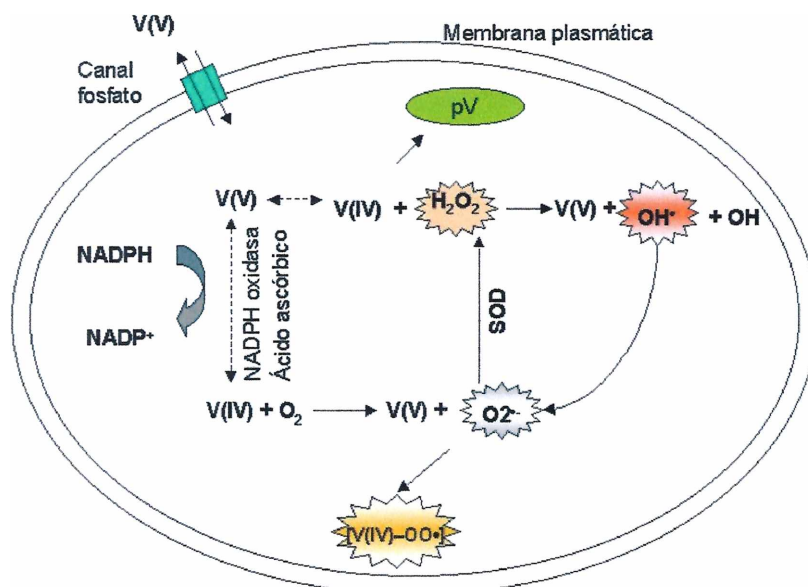


Figura 8. Esquema de la generación de ROS mediada por el vanadio

Los radicales peroxovanadilos e hidropéroxido de vanadilo son los responsables de la peroxidación de lípidos de membrana reportada para el vanadio (Evangelou 2002). El superóxido generado es posteriormente convertido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante dismutación por la SOD. Por otro lado, el vanadio(IV) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede generar especies reactivas a través de reacciones tipo Fenton mediante la siguiente reacción



La generación de OH<sup>·</sup> puede a su vez generar otros radicales como el anión superóxido el cual, como se mencionó, puede ser dismutado por la SOD regenerando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y perpetuando la generación de OH<sup>·</sup> (Valko y col. 2006). Alternativamente el par V(V)/V(IV) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede generar directamente peroxovanadilos (pV) independientemente de la reacción tipo Fenton (Capella y col. 2007).

### 1.5.2.2.2. Efectos del vanadio sobre la proliferación celular

En virtualmente todas las células, el ciclo celular se compone de cuatro fases discretas: síntesis de ADN (fase S), división celular (fase M) y las fases *gap* entre estas dos; G1 entre fase M y S, y G2 entre las fases S y M. La progresión a través de este ciclo celular depende de la integración de un largo número de señales intra y extra celulares junto con controles genéticos intrínsecos, dando como resultado diferentes puntos de control en las distintas fases del ciclo. Estos puntos de control son muy importantes ya que determinan si las células progresan en el ciclo, son arrestadas en fase quiescente G0, se diferencian o entran en apoptosis (Boonstra y Post 2004). A escala molecular, la regulación del ciclo celular está determinada por dos componentes proteicos: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (CDK en mamíferos; cdc en levaduras). Los factores de crecimiento regulan la fase G1 temprana a través del complejo ciclina D-CDK4/6. Posteriormente, la entrada y progresión a través de la fase S están reguladas por los complejos ciclina E- y ciclina A-CDK2. Por último, la transición de la fase G2/M está regulada por el complejo ciclina B-CDK1/2 (figura 8).

Los complejos de vanadio pueden estimular la proliferación, inhibirla o en algunos casos, tener un efecto bifásico: promover la proliferación celular en las bajas concentraciones e inhibir este proceso a dosis altas (Evangelou 2002). Por estas razones, los compuestos de vanadio tienen efectos contrapuestos y éstos dependerán de la dosis, de la especie de vanadio presente y del tipo celular.

Los efectos mitogénicos del vanadio pueden estar mediados por la vía de las MAPKs. El vanadio activa indirectamente quinasas como las ERKs y la PI3-K. Las ERKs a su vez estimulan distintos factores de transcripción que promueven el ingreso de la célula en el ciclo celular (Pandey y col. 1995; Pandey y col. 1999). La activación de la PI3-K también podría estar relacionada con la acción mitogénica del vanadio, probablemente por un entrecruzamiento de las vías que como resultado active a las ERKs. La PI3-K activa a PKB y por esta vía podría aportar a la acción mitogénica del vanadio (Wilkinson y Millar 2000).

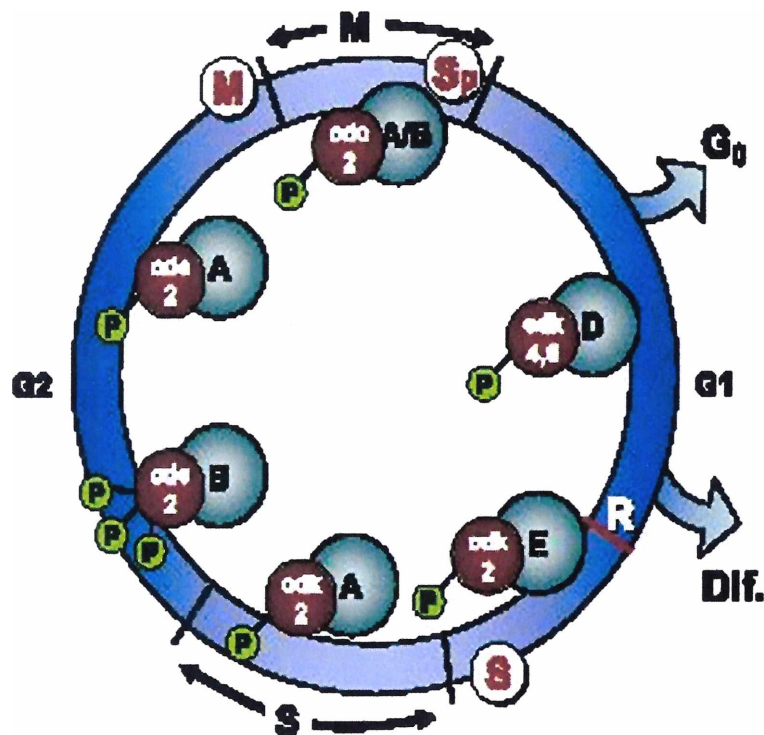


Figura 9. Ciclo celular de células de mamíferos. G<sub>0</sub>, fase quiescente; R, punto de restricción de fase g<sub>1</sub> después del cual las células no dependen de señales externas para la progresión en el ciclo celular; S punto de control de fase S; M punto de control de fase M; Sp punto de control que del huso mitótico. Tomada de Boonstra y Post (2004).

Los efectos antiproliferativos de los compuestos de vanadio en líneas normales y tumorales son producidos principalmente a través del arresto del ciclo celular mediado por la inhibición de PTPasas y generación de estrés oxidativo (Morinville y col. 1998; Evangelou 2002). El vanadio puede arrestar las distintas fases del ciclo celular, pero la fase que es detenida parece depender de la línea celular.

En fase G<sub>1</sub>, el vanadato redujo la actividad de ciclina D en células de melanoma, después de 2 h de incubación (Strasberg y Rieber 1995). En la transición G<sub>1</sub>/S, el arresto del ciclo celular por el complejo VO(acac)<sub>2</sub> ocurre a través de la disminución de la fosforilación de la proteína supresora de tumor pRb (la cual promueve el avance a fase S) y de la expresión de las ciclinas A, D y E mediada por una activación sostenida de las ERKs en células de hepatocarcinoma HepG2 (Fu y col. 2008).

En fase S, el arresto del ciclo celular involucra a la proteína p53 (una de las principales reguladoras de dicho ciclo). La p53 activa la transcripción del gen p21 aunque la activación también puede ser independiente de esta. En células epidermales de ratón C141 p53 +/+, el vanadato incrementa los niveles de p53 y de p21 y produce el arresto del ciclo (Zhang y col. 2002). La activación de p53 es producida por la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por el vanadato en células JB6 (Huang y col. 2000). El mecanismo propuesto es que al producirse daño en el ADN por ROS, se activan vías de transducción de señal como la de las MAPKs que en consecuencia producen el incremento de p53 y su fosforilación (Zhang y col. 2000).

La transición G2/M es también afectada por el vanadio y sus derivados (Faure y col. 1995; Zhang y col. 2001). El arresto del ciclo celular del vanadato en células epiteliales de pulmón A549 está mediado por la generación de ROS (particularmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y están implicadas diversas vías regulatorias: 1) activación de p21, 2) incremento de la expresión de Chk1 e inhibición de cdc25C, lo cual no permite la desfosforilación de cdc2 con la consecuente inactivación del complejo ciclina B-cdc2. En células T98 de glioma el vanadato causa arresto en G2/M e hipofosforilación de Rb (Chin y col. 1999). Los peroxovanadatos bloquean reversiblemente a bajas concentraciones e irreversiblemente a altas, la transición G2/M del ciclo celular en células tumorales (Faure y col. 1995). El arresto del ciclo celular está mediado por la inhibición de PTPasas, que desfosforilan las subunidades del complejo ciclina-B. Interesantemente, el bloqueo del ciclo celular en el estado de transición G2/M parece estar relacionado con la apoptosis (Farinelli y Greene 1996). Estos datos sugieren que el vanadio podría inhibir la proliferación de células por dos procesos: inducción de p53 e inhibición de la PTPasa cdc25.

Por último, el vanadio puede actuar en fase M inhibiendo la formación del huso mitótico y alterando el ensamblaje de los microtúbulos (Ramirez y col. 1997; Mailhes y col. 2003).

### 1.5.2.2.3. Efectos del vanadio sobre la apoptosis

Los compuestos de vanadio modulan la extensión y duración de la fosforilación de diversas proteínas como AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI3-K y NF- $\kappa$ B, las cuales son claves en las vías de señalización relacionadas con la producción de ROS y daño al ADN. (Pandey y col. 1995; Morinville y col. 1998; Huang y col. 1998; Ding y col. 1999; Chen y col. 1999),

Tanto la inhibición de fosfatasas como la activación de fosfoquinasas, producen la acumulación de proteínas fosforiladas en diferentes células, la generación de segundos mensajeros, la activación de quinasas *down stream* y la activación de varios factores entre los cuales NF- $\kappa$ B es el más importante. La activación de NF- $\kappa$ B está precedida por la fosforilación de su subunidad inhibitoria (IK $\beta$ ) en dos residuos de serina localizados en el extremo N-terminal. El IK $\beta$  enmascara, en el citoplasma, la secuencia de translocación al núcleo. La fosforilación de IK $\beta$  desencadena su degradación proteolítica y la liberación del dímero NF- $\kappa$ B el cual es translocado al núcleo en donde modula la transcripción. NF- $\kappa$ B regula la expresión de una variedad de genes cuyos productos median la respuesta inflamatoria y regulan la progresión del ciclo celular conduciendo hacia la protección de la apoptosis o hacia la muerte celular (Mercurio y Manning 1999; Bours y col. 2000).

Los compuestos de vanadio activan NF- $\kappa$ B en células normales y tumorales a través de la activación de la vía de las MAPKs, conduciendo las células a la apoptosis (Pandey y col. 1995; Zhao y col. 1996; Samet y col. 1998). En macrófagos por ejemplo, el vanadato induce la activación de NF- $\kappa$ B a través de la estimulación de JNK mediada a su vez, por estrés oxidativo (Chen y col. 1999). En células epiteliales de ovario (Pandey y col. 1995; Huang y col. 1998) y de pulmón, los compuestos de vanadio activan específicamente la p38 (Jaspers y col. 2000) lo cual conduce a la activación de NF- $\kappa$ B en el citoplasma. El vanadilsulfato produce la activación de p38 en células epiteliales humanas mediante generación de estrés oxidativo y media la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B sin afectar su translocación nuclear o unión al ADN, demostrando que el estrés oxidativo producido por V(IV) activa una vía de señalización colateral la



cual converge downstream para modular cooperativamente la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. El bisperoxovanadio (bpV), un potente inhibidor de PTPasas, activa NF- $\kappa$ B en linfocitos T humanos con la participación de la proteína quinasa p56<sup>lck</sup> de la familia src y a los efectores de p56<sup>lck</sup> como al miembro de la familia syk, proteína quinasa ZAP-70 (Oullet y col. 1999).

Existen otras vías de señalización activadas por el vanadio que conducen a la apoptosis. La producción de ROS por los compuestos de vanadio puede producir daños en la mitocondria y generar la liberación de citocromo c la cual activa a caspasas. Las caspasas activadas como caspasa-3 y caspasa-8, provocan aún más daños en la mitocondria y activan a sustratos como poli(ADP-ribosa)-polimerasa, conduciendo a la apoptosis (Green y Reed 1998; Burkle 2000.). La activación de p53 también esta implicada entre los mecanismos del vanadio para inducir apoptosis. En células epidermales de ratón, JB6 P<sup>+</sup>, la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediada por el vanadato, activa a p53 y disminuye el potencial de membrana mitocondrial induciendo la apoptosis (Huang y col. 2000).

En resumen, la evidencia indica que los compuestos de vanadio en células normales y tumorales activan diferentes vías de señalización celular actuando principalmente a través de la inactivación de PTPasas y consecuente activación de quinasas. La activación de las vías de señalización converge principalmente en la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y la transcripción tanto de genes apoptóticos como antiapoptóticos. Otro camino propuesto es la activación de la apoptosis a través de caspasas mitocondriales.

#### **1.5.2.2.4. Potencial antimetastásico de los compuestos de vanadio**

Las proteínas de adhesión (célula-célula o célula-matriz) están implicadas en la invasión y metástasis del cáncer (Cavenagh y col. 1998; Zhou y col. 2000). La fosforilación de proteínas inducida por los compuestos de vanadio puede influenciar el potencial invasivo y metastásico de las células tumorales regulando la adhesión célula-sustrato (Takenaga y col. 1996), el contacto célula-célula e induciendo cambios en la actina del citoesqueleto (Matsuyoshi y col. 1992; Dharwan y col. 1997; Lubber y col. 2000).

Se ha demostrado que los compuestos de vanadio pueden prevenir la colonización de vasos sanguíneos activando la fibrinólisis endógena inducida por tumores e inhibiendo la agregación de plaquetas, ambos eventos involucrados en la metástasis hematogénica del cáncer (Biggerstaff y col. 1999; Zhou y col. 2000). Por ejemplo, el pervanadato es capaz de inhibir la inducción de proteínas de adhesión celular ICAM-1, V-CAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales a través de la inhibición de PTPasas y consecuente regulación negativa del factor de necrosis tumoral (TNF) el cual es uno de los principales inductores de varias moléculas de adhesión en células endoteliales humanas. La inhibición de PTPasas por el pervanadato bloquea también el anclaje de monocitos a células endoteliales (Dharwan y col. 1997). Además, la potenciación de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas por el vanadato, inhibe la agregación mediada por caderinas (adhesión célula-célula) de células de rata 3Y1 transformadas (Matsuyoshi y col. 1992). El tratamiento sostenido de pervanadato provoca la pérdida del contacto célula-célula e induce cambios en la actina del citoesqueleto debido a la fosforilación de tirosina de componentes del complejo de adhesión celular en células de carcinoma gástrico (Luber y col. 2000).

#### **1.5.2.2.5. Resistencia a drogas y compuestos de vanadio**

La glicoproteína P (gl-P) es un miembro de la familia ABC de proteínas de transporte que confiere múltiple resistencia a drogas actuando en membrana plasmática como una bomba ATP dependiente de eflujo de drogas en células tumorales (Doige y col. 1992; Martin y col. 2000).

Existe evidencia de que los compuestos de vanadio pueden sensibilizar a células tumorales resistentes a múltiples drogas a los efectos citotóxicos de varios agentes antineoplásicos inhibiendo la actividad ATPasa del transportador gl-P. La inhibición de ATPasa reduce el eflujo de drogas, probablemente disminuyendo la capacidad de unión del sustrato transportado (Al-Shawi y col. 1993; Shepard y col. 1998; Martin y col. 2000). En otros casos, la sensibilización de células tumorales resistentes a múltiples drogas ocurre a través de la estimulación del

influjo de un agente citotóxico sin alterar su eflujo (Evangelou 2002). Sin embargo el vanadio también puede incrementar la resistencia a drogas de las células tumorales resistentes, estimulando la fosforilación del transportador gi-P (Evangelou 2002).

En resumen, las evidencias de los efectos del vanadio sobre la resistencia a múltiples drogas de células tumorales resultan muchas veces antagónicas y dependen del tipo celular y de la droga investigada.

### **1.5.3 El vanadio en el hueso.**

La importancia del vanadio en el hueso surge de estudios realizados para tratar de establecer la esencialidad de este elemento y de su relación con el metabolismo de la tiroides y con la formación del esqueleto (Uthus y Nielsen 1990; Nielsen 1995). Anke y colaboradores encontraron deficiencias óseas en cabras que habían sido alimentadas con dietas pobres en vanadio (Anke y col. 1990).

Por otro lado, estudios sobre la absorción, metabolismo y excreción de vanadio mostraron una acumulación preferencial en hueso, riñón e hígado (Setyawati y col. 1998). La acumulación de vanadio en el hueso puede deberse a su analogía con el fosfato, sustituyéndolo en los cristales de hidroxiapatita (Etcheverry y col. 1984; Narda y col. 1992). Se cree que la gran cantidad de vanadio en el riñón se debe a que éste es excretado por la orina (Hopkins y Tilton 1966; Nielsen 1995). La presencia de vanadio en el hígado y el bazo parece estar asociada a que el vanadio se une a en gran medida a la ferritina y transferrina, proteínas almacenadoras y transportadoras de hierro, respectivamente (Chasteen y col. 1986).

Diferentes estudios muestran la acumulación de vanadio en el hueso (10-26  $\mu\text{g/g}$ ) (Mongold y col. 1990; Ramanadham 1991; Yuen y col. 1993; Dai 1994; Setyawati y col. 1998). Estas cantidades son el doble de las encontradas en el riñón y 10 veces más altas que las encontradas en el hígado. Con el objetivo de estudiar los efectos del vanadio en el hueso se trataron ratas Zucker obesas y diabéticas con BMOV (0,8 mg/ml) examinándose luego la tibia y las vértebras de

los animales (Pouruchet y col. 1998). El tratamiento mejoró los síntomas de la Diabetes mellitus. El contenido de vanadio en los huesos de las ratas tratadas fue de 9,4 µg/g para la tibia y de 6,6 µg/g para las vértebras. El vanadio no alteró el contenido de otros minerales (K, Mg, Na, Ca y P) ni la estructura del hueso como pudo determinarse por difracción de rayos X; además tampoco se afectaron las propiedades mecánicas del hueso. Por lo tanto, la arquitectura, densidad y propiedades mecánicas del hueso no fueron modificadas por el tratamiento con vanadio en las dosis que poseen efectos insulínimiméticos (Pouruchet y col. 1998).

Estudios realizados con células fibroblásticas muestran que el vanadio estimula la síntesis de ADN y colágeno, sugiriendo que es un inductor de la proliferación y diferenciación osteoblástica (Canalis 1985; Lau y col. 1988). Además, el vanadio se comporta como factor de crecimiento mimetizando al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y a la insulina, promoviendo la formación y reparación ósea (Lau 1988). Por otro lado, la fosfatasa alcalina ósea está indirectamente implicada en el proceso de mineralización del hueso. La fosfatasa alcalina ósea está presente en la membrana plasmática de los osteoblastos y aumenta la concentración de fosfato inorgánico (**Pi**) en las zonas de mineralización, favoreciendo la precipitación de fosfato de calcio, necesario para la mineralización ósea. Se ha descrito que el vanadio es un inhibidor de la fosfatasa alcalina ósea (Cortizo y Etcheverry 1995). De lo expresado anteriormente se observa que la formación de mineral óseo es un proceso complejo que depende tanto de la formación de una matriz extracelular (MEC) como de la precipitación de cristales de hidroxapatita.

## **2. FISIOLÓGÍA DE LOS OSTEÓBLASTOS**

La mineralización del esqueleto es un proceso complejo que ocurre a través de la formación (mediada por los osteoblastos), remodelación y resorción (mediada por los osteoclastos). Los osteoblastos se originan de células mesenquimatosas o células progenitoras osteogénicas que poseen propiedades características de las células germinales, tales como el potencial de

autorreplicación y la capacidad de diferenciación. La transformación de células preosteoblásticas en osteoblastos activos, transcurre en una serie de etapas: (1) proliferación de las células precursoras, (2) diferenciación en osteoblastos maduros que producen una MEC y (3) mineralización de la misma.

Los osteoblastos son responsables de la síntesis y secreción de proteínas de la MEC que servirá como base para la formación del hueso. Las células osteoblásticas se disponen formando una lámina o monocapa sobre la superficie de formación ósea y se comunican por uniones tipo *gap*. Los osteoblastos sintetizan grandes cantidades de colágeno tipo I y fosfatasa alcalina. Algunas proteínas, como el factor de transcripción Cbfa-1 y la osteocalcina son producidas exclusivamente por los osteoblastos. Otras, como la osteopontina, son secretadas también por estas células y otros tipos celulares. Luego de formar la MEC los osteoblastos pueden quedar atrapados por el material intercelular para formar osteocitos, morir por apoptosis o convertirse en células aplanadas de revestimiento. Estas últimas son importantes en la regulación de la resorción ósea mediada por diferentes factores locales, incluyendo citoquinas, prostaglandinas y factores de crecimiento.

## 2.1. Modelos de células de tipo osteoblasto de origen murino

Las células en cultivo proveen un modelo simple en el cual se pueden estudiar diversos fenómenos biológicos. La línea de células **MC3T3-E1**, derivada de calvaria de ratón, es un modelo de preosteoblastos que pueden diferenciarse a lo largo del cultivo celular en osteoblastos que alcanzan diferentes estadios de maduración. Además, provee un sistema adecuado para examinar los procesos de formación de la MEC y las respuestas a diferentes hormonas, fármacos y metabolitos durante el desarrollo y la formación ósea. Esta línea de células, en su fase proliferativa, tiene una morfología fibroblástica y crece en monocapas, tiene la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, diferentes marcadores específicos y mineralizar la MEC formando una hidroxiapatita madura *in vitro* (Sudo y col. 1983). Durante la fase inicial de crecimiento, 1 a 9 días de cultivo, las células

MC3T3-E1 sintetizan ADN e incrementan su número, mostrando una replicación activa y manteniendo una apariencia fusiforme; no expresan fosfatasa alcalina ósea ni acumulan MEC, consistentes con un osteoblasto inmaduro. Luego de 10 días de cultivo, comienzan a tornarse cuboides, alcanzan la confluencia, y experimentan un arresto en el crecimiento. La regulación negativa de la replicación celular esta asociada con la expresión de las funciones osteoblásticas específicas. La diferenciación a osteoblastos comienza a detectarse a las dos semanas de cultivo, se expresan proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblástico maduro, incluyendo la producción de la fosfatasa alcalina ósea, procesamiento del procolágeno y acumulación de colágeno en la MEC. La mineralización de la MEC (relacionada con la expresión de osteocalcina y acumulación de calcio) comienza aproximadamente el día 16, marcando el final de la fase del desarrollo del fenotipo osteoblástico alrededor del día 30 de cultivo cuando comienzan a morir por apoptosis (Quarles y col. 1992).

La etapa proliferativa de las células MC3T3-E1 es estimulada autócrina y parácrinamente por diferentes agentes específicos e inespecíficos. Se ha descrito que esta línea celular secreta diferentes factores que se acumulan en la MEC, regulando y estimulando el crecimiento (Amarnani y col. 1993; Tremollieres y col. 1994; Thrailkill y col. 1995).

El ácido ascórbico no estimula la expresión del gen de colágeno tipo I en células MC3T3-E1, sin embargo, éste es requerido para la acumulación de colágeno en la MEC (Quarles y col. 1992). En este sistema, el ácido ascórbico incrementa la hidroxilación del procolágeno en restos de prolina ya que actuaría como un cofactor de la enzima prolilhidroxilasa. El procolágeno hidroxilado está preparado para asumir una conformación de triple hélice, la cual se secreta más rápidamente que el colágeno no helicoidal, incrementando de esta forma su secreción y acumulación en la MEC. El ácido ascórbico y el  $\beta$ -glicerofosfato parecen ser esenciales para la diferenciación osteoblástica, ya que ambos son requeridos para la expresión de la fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y la mineralización de la MEC. El  $\beta$ -glicerofosfato tiene una acción sinérgica con el ascorbato para producir la acumulación de colágeno en la MEC y la actividad de la fosfatasa alcalina ósea en los osteoblastos. La mineralización del cultivo

requiere la presencia de  $\beta$ -glicerofosfato. Así, las células MC3T3-E1 muestran una expresión de las características del desarrollo osteoblástico en función del tiempo, similares a los del hueso *in vivo* (Quarles y col. 1992; Barrio y Etcheverry 2006).

Finalmente, se puntualiza que en este trabajo de Tesis doctoral, cuando mencionamos a la línea celular MC3T3-E1 como línea normal hacemos referencia a que presenta inhibición de contacto, que es una de las características patognomónicas de las líneas celulares no transformadas.

Otro modelo utilizado en estudios *in vitro* de células de tipo osteoblasto murino es la línea **UMR106** derivada de un sarcoma osteogénico de rata, inducido con  $^{32}\text{P}$ , que fue preservado por trasplante en la misma colonia de ratas. Esta línea, a diferencia de las MC3T3-E1, tiene la característica fenotípica de un osteoblasto diferenciado, pero inmaduro: expresa altos niveles de fosfatasa alcalina y colágeno de tipo I; pero no expresa osteocalcina, ni osteonectina, ni forma mineral óseo en cultivo. Esta línea se propone como un buen modelo para el estudio de efectos mediados por hormonas y diversos compuestos químicos en osteoblastos maduros (Partridge y col. 1983; Barrio y Etcheverry 2006).

*Objetivos*



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Sintetizar complejos de vanadio(IV) y (V) a fin de obtener compuestos con potencial aplicación farmacológica, estudiar sus efectos biológicos en osteoblastos en cultivo e investigar los mecanismos que puedan mediar sus efectos citotóxicos.

### **Objetivos Específicos**

1. Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente derivados de vanadio(IV) y (V) con distintos ligandos de interés biológico y farmacológico.
2. Evaluar los efectos de los complejos de vanadio sobre la proliferación, morfología celular y proteínas del citoesqueleto.
3. Investigar los posibles mecanismos de citotoxicidad: estrés oxidativo (concentración celular de ROS y relación GSH/GSSG), apoptosis (potencial de membrana mitocondrial y externalización de fosfatidilserina) y activación de vías transducción de señales intracelulares.

## *Materiales y Métodos*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Síntesis de los compuestos de vanadio.

#### 1.1 Complejos de vanadio(IV)

##### 1.1.1 [VO(hesp)(OH)<sub>3</sub>]Na<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, VO(hesp)

Este complejo fue sintetizado por primera vez en nuestro laboratorio con la siguiente técnica:

Se prepararon 5 mL de una solución acuosa de hesperidina (1 mmol), pH 12, por agregado de NaOH concentrado. A esa solución se le adicionaron 0,5 mmol de VOCl<sub>2</sub> (solución acuosa al 50%), con agitación. Al disminuir el pH de la solución se produjo un precipitado verde. El mismo fue disuelto por agregado de gotas de NaOH 1M, llevando el pH nuevamente a 12. Se obtuvo un precipitado verde por agregado de etanol absoluto, el que se filtró y lavó varias veces con etanol absoluto frío. Se secó al aire.

##### 1.1.2 [VO(oda)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], VO(oda)

El complejo del catión vanadilo(IV) con oda=oxodiacetato, fue sintetizado de acuerdo a lo reportado por Del Rio y col. (2000). En síntesis: a una mezcla de VO(acac)<sub>2</sub> (10,6 g, 40 mmol) y O(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> (5,36 g, 40 mmol) se añadieron 100 mL de agua destilada. La mezcla se calentó a reflujo por tres horas. La solución caliente fue filtrada y concentrada, dejándose luego enfriar lentamente. Se obtuvieron cristales azules que se lavaron con acetona y éter etílico. El rendimiento fue de 80%.

## 1.2 Complejos de vanadio(V)

### 1.2.1 $V^V O_2$ (salicilaldehído semicarbazona), V(V)-Salsem

El complejo V(V)-Salsem, fue sintetizado y caracterizado por el grupo de la Dra. Dinorah Gambino de la Universidad de la república, Montevideo, Uruguay (Gambino y col. 2004). Brevemente, el complejo fue preparado por calentamiento a reflujo de  $VO(acac)_2$  (100 mg, 0,375 mmol, acac=acetilacetionato) con salicilaldehído semicarbazona (0,375 mmol) en etanol (10 mL) por 10 h. El complejo precipitó bajo la forma de un polvo microcristalino de color amarillo verdoso con un rendimiento del 70%. Por recristalización se obtuvieron cristales adecuados para la determinación estructural por difracción de rayos X.

### 1.2.2 $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ , peroxocarbonato de vanadio(V)

El peroxocarbonato de vanadio(V) fue sintetizado y caracterizado de acuerdo a la literatura (Stomberg 1985). Puede ser obtenido con alta pureza bajo la forma de pálidos cristales amarillos haciendo reaccionar una suspensión de 0,23 g de  $V_2O_5$  y 10 g de  $K_2CO_3$  en 50 mL de  $H_2O_2$  1,5% (v/v) y dejando la solución remanente por dos o tres semanas en refrigerador a temperaturas entre 5 y 10 °C.

## 2. Caracterización fisicoquímica

### 2.1 Análisis elemental

El análisis químico fue realizado mediante espectrometría de absorción atómica para V. Para C e H se utilizó un analizador de elementos EA 1108 Carlo Erba (Milán, Italia); Na fue determinado por fotometría de llama.

## 2.2 Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)

El análisis TG fue realizado bajo atmósfera de oxígeno (50 mL/min) y con una velocidad de calentamiento de 10 ° C/min. Las cantidades de muestra utilizadas estuvieron en el rango de 10-20 mg, y se empleó Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como estándar para el ATD. Se empleó para estas determinaciones un sistema termoanalítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50.

## 2.3 Espectros electrónico (UV-vis) y titulaciones espectrofotométricas

Se utilizó un espectrofotómetro UV-vis Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos) 8453 con arreglo de diodos empleando celdas de cuarzo de 1 cm. Para el caso del complejo VO(hesp), la estequiometría del mismo fue establecida por titulación espectrofotométrica mediante el método de la relación molar. Se determinó el espectro electrónico de una solución acuosa de hesperidina ( $2 \times 10^{-5}$  M) a pH 12 con el agregado de VOCl<sub>2</sub> en un rango de concentración metal-ligando de 10 a 0,2 bajo atmósfera de nitrógeno.

## 2.4 Espectros infrarrojo (FTIR)

Los espectros infrarrojos de muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup> bajo la forma de pastillas de KBr. La resolución espectral fue de  $\pm 4$  cm<sup>-1</sup>.

## 2.5 Espectros Raman

Los espectros Raman fueron medidos en un espectrofotómetro Bruker IF66 con un accesorio Raman FRA 106. Para la excitación se utilizó la radiación de un láser de estado sólido Nd:YAG (1064 nm), en el rango entre 4000 y 100 cm<sup>-1</sup>. La resolución espectral fue de  $\pm 4$  cm<sup>-1</sup>.

## 2.6 Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Para la obtención de los espectros EPR se empleó un espectrofotómetro Bruker ESP300 operando en la banda X. Una simulación computarizada de los

espectros EPR fue obtenida mediante un programa SimFonia (WINEPR SimFonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, 1996).

### **3. Medida de la actividad antioxidante**

#### **3.1 Actividad superóxidodismutasa**

La actividad de la enzimasuperóxidodismutasa (SOD) se examinó indirectamente usando el ensayo de nitroazul de tetrazolio (NBT). La determinación indirecta de la actividad de SOD, del vanadilo(IV), hesperidina y su complejo fue ensayada por su habilidad para inhibir la reducción de NBT a formazán por el anión superóxido generado por el sistema xantina/xantina oxidasa a pH 10,2 (0,05 M de buffer  $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ ) (Beauchamp y Fridovich 1979; Iwamoto y Mifuchi 1982).

A medida que avanza la reacción se desarrolla el color del formazán producido generando un incremento en el espectro de absorción en la zona de 560 nm. El sistema de reacción contiene diferentes concentraciones del flavonoide, del metal y del complejo. La reacción se inicia por el sistema xantina-xantina oxidasa en una concentración necesaria para producir un cambio de absorbancia entre 0,2 y 0,4. Se agrega una solución acuosa 0,2 mM de cloruro de cobre(II) para frenar la reducción de NBT. Como el ion cobre(II) libre puede interactuar con el anión superóxido produciendo su dismutación, se incluye en el medio ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) 0,1M, para formar el complejo de cobre (CuEDTA) que carece de actividad SOD. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y al menos tres experimentos independientes se realizaron en cada caso. La cantidad de complejo (o SOD) que produce un 50 % de inhibición ( $\text{IC}_{50}$ ) se obtiene graficando el porcentaje de inhibición en función del log de la concentración de la solución medida.

La actividad SOD fue determinada asimismo por el sistema no enzimático el que difiere del método enzimático por la forma de generar el radical superóxido. En este método, el sistema fenazina metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) produce el anión radical. El sistema contiene 0,5 mL de muestra, 0,5 mL de 1,40 mM NADH, 0,5 mL de NBT 300  $\mu\text{M}$ , en buffer 0,1

M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,5). Luego de incubar a 25° C por 15 min, se inicia la reacción por agregado de 0,5 mL de 120  $\mu\text{M}$  PMS (Kuo y col. 2001). La mezcla de reacción se incuba la mezcla de reacción por 5 min. Los resultados se determinan midiendo la absorbancia en 560 nm contra muestras del blanco.

### 3.2 Ensayos con DPPH•

La actividad antioxidante de hesperidina y VO(hesp) se midió por triplicado usando un método modificado de Yamaguchi y col. 1998. Una solución metanólica de DPPH•, radical 1-difenil-2-picrilhidrazil (4 mL, 40 ppm) se agrega a 1 mL de las soluciones antioxidantes en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 7,1) a 25°C produciendo concentraciones finales de 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ . Se midió la absorbancia en 517 nm luego de 60 min de reacción en la oscuridad y se comparó con el control preparado de manera similar pero sin la adición de los antioxidantes (a este valor se le asignó arbitrariamente un 100 %). Asimismo, se ensayó una solución 100  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico (poderoso agente antioxidante) como control de la reacción. En este caso, el color violeta del DPPH• desaparece inmediatamente.

### 3.3 Ensayo de decoloración de ABTS

La actividad total antioxidante se midió usando el coeficiente antioxidante equivalente (TEAC) de Trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). La sal del radical amónico (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolino-6-sulfónico,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ) fue generada incubando ABTS con persulfato de potasio. Los compuestos químicos que inhiben la actividad de persulfato de potasio reducen la producción de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Esta reducción resulta en un decrecimiento de la concentración total del catión radical en el sistema y contribuye a la capacidad secuestrante total de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Una solución acuosa de ABTS (2,5 mM) y persulfato de potasio (0,4 mM) se incubó en la oscuridad por 24 h. La solución se diluyó 10 veces en buffer 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  (pH 7,4). A 990  $\mu\text{l}$  de esta mezcla, se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de hesperidina, el complejo o el estándar de Trolox en buffer fosfato (concentraciones finales: 0-100  $\mu\text{M}$ ). La reducción del catión radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se registra espectrofotométricamente 6 min después de la mezcla inicial a

25°C. El decrecimiento porcentual de la absorbancia a 734 nm se calcula considerando que la condición basal (sin agregado de antioxidante) fue asignada con 100% y registrada como función de la concentración de las muestras, obteniendo la actividad total antioxidante (TAA). El TEAC se recalculó con la pendiente del gráfico del porcentaje de inhibición de la absorbancia en función de la concentración del antioxidante dividido por la pendiente del gráfico del Trolox (Pellegrini y col. 1999; Gorinstein y col. 2003).

## **4. Actividad biológica**

### **4.1 Cultivos de osteoblastos**

Se utilizaron dos líneas clonadas de células osteoblasto-símil: MC3T3-E1, línea de células no transformadas, derivada de calvaria de ratón y UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata.

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>, en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) más los antibióticos penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Una vez que los cultivos llegaron a 70-80 % de confluencia, las células se cosecharon usando tripsina-EDTA en PBS para resuspenderlas. Una fracción de células se diluyó 1:10 en DMEM con 10 % SBF para continuar el cultivo y la otra fracción se utilizó para realizar los experimentos. Para los experimentos, las células se plaquearon en microplacas. Cuando los microplacas alcanzaron la confluencia deseada según el ensayo, las células se lavaron con DMEM y se incubaron en DMEM sin suero (para evitar la influencia de los factores de crecimiento propios del suero) en presencia de distintas concentraciones de los complejos de vanadio.

### **4.2 Ensayos de viabilidad celular**

#### **4.2.1 Ensayo mitogénico**



La proliferación celular se estimó por medio del ensayo del cristal violeta descrito por Okajima y col (1992) con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la incorporación del colorante vital cristal violeta a ciertas estructuras subcelulares, en particular por las mitocondrias de las células metabólicamente activas, pero no por células inactivas. Las células fueron cultivadas en microplacas de 48 pocillos. Cuando alcanzaron 70-80 % de confluencia, se lavó la monocapa celular con DMEM sin SBF y se incubó con medio de cultivo solamente (basal) y diferentes concentraciones (2,5-100  $\mu\text{M}$ ) de los complejos o el ligando libre durante 24 h a 37°C. Posteriormente a estos tratamientos, se lavó la monocapa celular con PBS, las células se fijaron con glutaraldehído al 5 % en PBS y se colorearon con cristal violeta al 0,5 %. El colorante incorporado por las células se extrajo con buffer glicina/HCl pH3,0 que contiene 30 % de metanol. El extracto se diluyó adecuadamente con agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm. Previamente, se demostró que los valores de absorbancia obtenidos con este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas en cámara de Neubauer ( $r= 0,897$ ;  $p< 0,001$ ) (Cortizo y Etcheverry 1995).

#### 4.2.2 Ensayo de captación del rojo neutro

El ensayo de acumulación lisosomal de rojo neutro (RN) fue realizado de acuerdo a Borenfreund y col. (1984). Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  UMR106 células/pocillo o  $1,8 \times 10^4$  MC3T3-E1 células/pocillo). Los osteoblastos fueron incubados con diferentes concentraciones de complejo por 24 h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire. Luego del tratamiento, el medio fue reemplazado por otro conteniendo 100  $\mu\text{g/mL}$  de colorante RN y las células se incubaron durante 3 h adicionales. Luego se descartó el medio con colorante y las células fueron lavadas dos veces con PBS (pH 7,4) para remover el RN no incorporado. Posteriormente, los osteoblastos fueron fijados adicionando a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de etanol 50% (v/v) y ácido acético 1% (v/v) liberando el RN a la solución. Las microplacas se agitaron durante 10 min. y se leyó la absorbancia de la solución en un lector de microplacas (7530, Cambridge Technology, Inc, Estados Unidos) a 540 nm.

### 4.2.3 Ensayo de reversibilidad

Este ensayo permite evaluar el grado de toxicidad de un agente exógeno medido a través de la recuperación de las células después de la situación de estrés. Las células se plaquearon en microplacas de 48 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar 70% de confluencia. Posteriormente se incubaron con distintas concentraciones de los complejos de vanadio durante 24 h a 37°C. Al fin de este período, se dividió la población de células en dos. A una, se le realizó el ensayo de cristal violeta. A la segunda, se le cambió el medio de cultivo DMEM por uno fresco suplementado con SBF y se la incubó por otras 24 h a 37°C. Finalmente, se llevó a cabo el ensayo de cristal violeta.

## 5. Estudios morfológicos

### 5.1 Tinción con Giemsa

Las características morfológicas del citoplasma y el núcleo de las células pueden observarse por medio de una tinción con Giemsa. Se cultivaron ambas líneas celulares en microplacas de 6 pocillos. Una vez que llegaron a 60-70 % de confluencia, se las incubó con distintas concentraciones de los compuestos de vanadio 24 h a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS y se fijaron 5 minutos con metanol. Luego, se tiñeron 10 minutos con una dilución 1:10 de Giemsa. Finalmente, las microplacas se lavaron repetidamente con agua y las células fueron observadas bajo microscopio óptico. Las imágenes se registraron con una cámara de fotos adaptada al microscopio.

### 5.2 Tinción de los microfilamentos de actina

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio en microplacas de 6 pocillos. Luego de incubarlas en diferentes condiciones experimentales se lavaron con PBS y se fijaron 10 min. con *p*-formaldehído al 4 % en PBS. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con etanol absoluto a -20°C por 4 min. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y las uniones inespecíficas se bloquearon 1 h con 5% de leche descremada en PBS. A continuación, se incubaron 2 h con Pallocidina- FITC (Isotiocianato de

fluoresceína) en una relación 1:100 para visualizar las fibras de actina. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS, 7 min cada vez, en la oscuridad y con agitación suave. Las células se montaron en glicerol (80%) en PBS más una gota de ioduro de propidio (IP) (5µg/mL) el cual tiene afinidad por el material genético y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

## **6. Mecanismos de acción**

### **6.1 Estrés oxidativo**

#### **6.1.1 Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)**

La generación de ROS se midió espectrofotométricamente mediante la leuco sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123), la cual es oxidada por ROS a la molécula fluorescente rodamina 123. Las líneas osteoblásticas fueron incubadas con los complejos de vanadio por 24 h. Luego, se lavaron dos veces con solución salina tamponada de Hank (HBSS) y se incubaron 30 min con DHR (1 ug/mL) en HBSS con el fin de permitir el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación. Luego las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 0,1 % Triton-X100. Los extractos celulares fueron analizados con un espectrofluorómetro Aminco Bowman SPF ( $\lambda_{excitación}= 490 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{emisión}=520 \text{ nm}$ ), usando como estándar rodamina 0,5 µM (Cortizo y col. 2000).

A una alícuota de cada extracto celular se le determinó el contenido total de proteínas por pocillo por el método de Bradford (1976) para normalizar los resultados por mg de proteínas.

#### **6.1.2 Determinación de los niveles de GSH y GSSG**

La medición de los niveles de GSH y GSSG fue llevada a cabo siguiendo la técnica de Hissin y Hilf (1976) con algunas modificaciones. Los osteoblastos confluentes fueron incubados con distintas concentraciones de los complejos de vanadio a 37°C durante 24 h. Luego, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 250 µL de 0,1 % Tritón-X100 por 30 min. Para la determinación de GSH, se mezcló una alícuota de 100 µL del extracto celular con 1,8 mL de buffer fosfato

frío ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M-EDTA 0,005 M pH 8) más 100  $\mu\text{L}$  de o-ftaldehído (OPT) (0,1 % en metanol). Para la determinación de GSSG, se mezcló 100  $\mu\text{L}$  del extracto celular con 1,8 mL de NaOH 0,1 M pH 12 más 100  $\mu\text{L}$  de OPT. Previamente, para evitar la oxidación de GSH a GSSG los extractos para la determinación de la concentración de GSSG, se incubaron con 0,04 M de N-etilmaleimida (NEM). Las determinaciones se realizaron con un espectrofluorómetro Aminco Bowman SPF ( $\lambda_{\text{excitación}}= 350 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}}= 420 \text{ nm}$ ). Las curvas de calibración con diferentes concentraciones de GSH y GSSG fueron procesadas en paralelo. El contenido de proteínas de los extractos fue cuantificado mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976).

## 6.2 Estudios de apoptosis

### 6.2.1 Medición de la externalización de fosfatidilserina

Durante la apoptosis, uno de los primeros cambios que ocurren es la exposición del fosfolípido de membrana plasmática fosfatidil serina. La anexina V es una proteína de 35-36 kDa, calcio dependiente, con alta afinidad por la fosfatidilserina. El ensayo de anexina V-FITC/IP se basa en que las células apoptóticas muestran fluorescencia verde en su superficie. Así, las células que están en estado de apoptosis se observan con una fluorescencia verde. A medida que se incrementa la permeabilidad de membrana, en estadios posteriores de apoptosis, el IP puede atravesar la membrana plasmática y unirse al ADN. De esta manera, las células que sean anexina V positivas, IP positivas son células necróticas o se encuentran en un estadio de apoptosis tardía. Las células que no ingresaron en apoptosis, serán negativas para ambos fluorocromos.

Se incubaron las células con distintas concentraciones de complejos por 24 h a 37°C. Al término de este tiempo, se adicionó anexina V-FITC/IP al medio de cultivo según las instrucciones del fabricante y se dejó incubar por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó el exceso de los fluorocromos mediante sucesivos lavados con PBS y se cosecharon las células con una espátula siliconada. Los resultados se obtuvieron por citometría de flujo (BD FACS Calibur<sup>TM</sup>). Los datos se analizaron mediante el software FCS Express.

### 6.2.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

La alteración del potencial de membrana mitocondrial puede inducir apoptosis celular (Zou y col. 1999). Para detectar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, se empleó la sonda fluorescente rodamina 123 (Rh123). La rodamina es captada selectivamente por la mitocondria, hecho que depende del  $\Psi_m$  (Johnson et al 1980; Johnson y col. 1981). La disminución del potencial de membrana produce la liberación de la Rh123 desde la mitocondria con la consecuente disminución de la fluorescencia, lo que es un marcador de apoptosis. Las células fueron plaqueadas en microplacas de 6 pocillos a una densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo a 37 °C. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por uno fresco sin SBF y se adicionaron distintas concentraciones de los complejos de vanadio. Al final del tratamiento, las células se incubaron con Rh123 a 37 °C por 30 min a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Finalmente, las células se lavaron con PBS y se levantó la monocapa celular mediante tripsinización. Se empleó PBS como control negativo. Las alteraciones de  $\Delta\Psi_m$  se detectaron por citometría de flujo. Los resultados se analizaron mediante el software FCS Express.

### 6.3 Estudio de la vía de las Erks

Los efectos de los derivados de vanadio sobre el grado de fosforilación de las ERKs se determinó por *Western blot*. Se utilizaron extractos celulares, de diferentes condiciones experimentales, en solución reguladora de Laemmli (1970), la cual contiene Tris 62,5 mM, pH=6,80 con 2 % dodecilsulfato de sodio (SDS), 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,001 % azul de bromofenol y 10 % glicerol. Una fracción de estos extractos se sometió a una electroforesis en gel discontinuo y desnaturizante de poliacrilamida (4 % gel *stacking* y 12,5 % para el gel separador) conteniendo 10 % de SDS. Una vez realizada la corrida durante 30 min a 100 mV para el gel *stacking* y 120 mV para el desarrollo de la electroforesis separativa, las proteínas del gel se transfirieron (una noche a 50 mA) a un papel de nitrocelulosa, el cual luego se bloqueó 2 h con leche descremada al 3 % en PBS (solución de bloqueo) a temperatura ambiente con agitación suave. Las

proteínas estudiadas fueron detectadas con anticuerpos específicos Brevemente, el papel de nitrocelulosa se incubaba una noche con el primer anticuerpo diluido (1:1000 o 1:5000 dependiendo del extracto celular) en solución de bloqueo, luego se lava tres veces durante 15 min cada vez con PBS conteniendo 0,1 % de Tween y se incubaba 2 h con una dilución 1:1000 del segundo anticuerpo en solución de bloqueo a temperatura ambiente con agitación suave. Luego, se lava tres veces durante 15 min cada vez con PBS conteniendo 0,1 % de Tween y se revela por la técnica de electroquimioluminiscencia. Las bandas de la placa radiográfica se *escanearon* y con el programa *Scion Imagen* se realizó un densitograma a partir del cual se calcularon las áreas relativas de los picos.

Para poder detectar y cuantificar separadamente las proteínas fosforiladas y la proteína específica total de señalización (fosforiladas más no fosforiladas) en el mismo papel de nitrocelulosa (misma corrida) es necesario realizar un *striping* luego de la primera cuantificación. El *striping* se realizó a 55 °C durante 30 minutos con una solución que contiene solución reguladora a base de Tris 65 mM pH 6,80 con 2 % SDS y 10 %  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego, el papel de nitrocelulosa se bloqueó nuevamente y se continuó como se describió anteriormente.

#### 6.4 Ensayos con inhibidores

Con el fin de estudiar el mecanismo de acción y las vías utilizadas por los compuestos de vanadio para ejercer sus efectos, se hicieron preincubaciones de los osteoblastos con diferentes inhibidores.

Para el ensayo de viabilidad celular, se emplearon los secuestrantes de radicales libres N-acetilcisteína (NAC), una mezcla de vitaminas C y E y glutatión reducido GSH, el inhibidor de la síntesis de glutatión, L-butionina sulfoximida (BSO), el inhibidor de la vía de las ERKs, PD98059 y de la PI3K, wortmanina. Las dosis fueron las siguientes NAC, 100  $\mu$ M para los osteoblastos MC3T3-E1 y 200  $\mu$ M para los osteoblastos tumorales, durante 2 h; la mezcla de vitaminas E y C, 25  $\mu$ M para MC3T3-E1 y 50  $\mu$ M para UMR106 durante 6 h; BSO, 10  $\mu$ M para MC3T3-E1 y 40  $\mu$ M para UMR106 durante una noche, GSH, 3 mM para MC3T3-E1 y 1 mM para UMR106 durante 2 h. PD98059, 1-20  $\mu$ M y wortmanina 0,25-10

$\mu\text{M}$  durante 30 min en ambas líneas celulares, respectivamente. Después de estas preincubaciones, se agregaron distintas concentraciones de los complejos por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ .

Se estudió el papel de NAC en la generación de ROS mediada por los complejos de vanadio. Las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones que para el ensayo de viabilidad celular.

Para evaluar la influencia del estrés oxidativo en los eventos de apoptosis, se llevaron a cabo preincubaciones de 2 h con GSH. Para MC3T3-E1 se empleó 0,25 mM y para UMR106 1 mM

La vía de las ERKs se estudió con los inhibidores PD98059, wortmanina y NAC. Para estos casos, las células se incubaron durante 1 h con 1 mM de NAC y 30 min con 50  $\mu\text{M}$  de PD98059, ó 10  $\mu\text{M}$  de wortmanina previamente a la adición de los complejos.

## 7. Técnicas auxiliares

### **Determinación de proteínas por el método de Bradford.**

Se confeccionó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina; el rango de validez de la curva fue de 5 a 50  $\mu\text{g}$  de proteína por tubo. La determinación se realizó mezclando 25  $\mu\text{L}$  de muestra con 2 mL de reactivo de Bradford, luego de 5 min. se registró la absorbancia a 595 nm.

## 8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones de diferencias y en algunos casos el test *t* de Student para la comparación de dos medias. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Todos los valores con  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativo.

## *Resultados*



## RESULTADOS

### Complejo de vanadio(IV) con hesperidina, VO(hesp)

El flavonoide hesperidina está compuesto por la flavanona hesperitina y el disacárido rutinosa (compuesto por ramnosa, 6-desoxi-L-manosa, y glucosa). El mismo se halla presente en cítricos, especialmente en limones y naranjas. Posee propiedades antioxidantes, anti inflamatorias, anti alérgicas, hipolipidémicas, vasoprotectivas y acciones anticarcinogénicas. Se considera que muchas de estos efectos se deban probablemente a la acción de su aglicón hesperitina el que se muestra en el esquema de la figura 1.

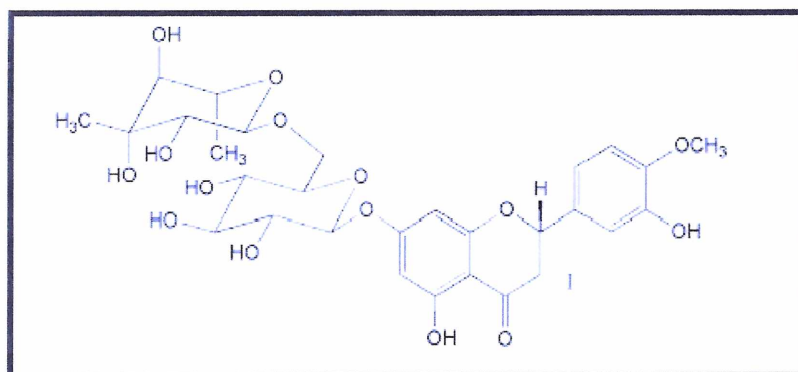


Figura 1. Estructura de la hesperidina

## 1. Caracterización Físicoquímica

### 1.1 Análisis elemental

Este análisis arrojó los siguientes porcentajes de C, H, V y Na: 38,5; 4,6; 6,0; 10,4, respectivamente. Los mismos son coincidentes con los calculados para  $C_{28}H_{30}O_{22}VNa_4$ : 38,6 de C; 4,6 de H; 5,9 de V; 10,6 de Na. Este análisis arrojó los siguientes porcentajes de C, H, V y Na: 38,5; 4,6; 6,0; 10,4, respectivamente. Los mismos son coincidentes con los calculados para  $C_{28}H_{30}O_{22}VNa_4$ : 38,6 de C; 4,6 de H; 5,9 de V; 10,6 de Na.

## 1.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Para confirmar la estequiometría del complejo formado entre el VO(IV) y la hesperidina se procedió a medir la pérdida de peso en función de la temperatura en atmósfera de O<sub>2</sub> y velocidad de flujo de 50 mL/min; utilizando una balanza termogravimétrica y sistema analítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50. Se observó un primer paso entre 20-100°C relacionado a la pérdida de 3 moléculas de H<sub>2</sub>O seguido por la generación final de NaVO<sub>3</sub> como residuo (20%). La formación de vanadato de sodio a 1000 ° C se confirmó por espectroscopía IR.

## 1.3 Espectro UV-visible y titulaciones espectrofotométricas

El espectro electrónico de la hesperidina fue determinado en una solución acuosa (pH 12) bajo atmósfera de nitrógeno. Se observaron tres bandas en el espectro del ligando a 248 nm, 288 nm y 358 nm (Horowitz y Jurd 1960; Tommasini y col. 2005). La última banda está relacionada con el anillo B (sistema cinamoilo) y las otras bandas, al anillo A (sistema bezoilo). Después de la interacción con el catión vanadilo se incrementaron las intensidades de las bandas de alta energía y se pudo observar un pequeño cambio para estas dos bandas (figura 2). La banda a 358 nm permaneció inalterada lo que indica que no existe interacción del grupo cinamoilo con el metal central (Zhou y col. 2001).

Para determinar la estequiometría de VO(hesp) se realizaron titulaciones espectrofotométricas siguiendo el incremento de las bandas a 242 nm o 288 nm a través de la adición de diferentes cantidades de VO(IV) sobre una solución acuosa de hesperidina ( $2 \times 10^{-5}$  M) a pH 12, manteniendo relaciones metal-ligando de 2 a 0,1. En ambos casos, en el gráfico de la variación de absorbancia en función de la relación molar, el punto de inflexión a  $[L]/[M]= 1$  es indicativo de la formación de un complejo con estequiometría 1:1 (figura 1 interna).

El espectro electrónico en la región del visible fue medido con soluciones frescas de complejo a una concentración  $5 \times 10^{-4}$  M (pH 12) bajo atmósfera de nitrógeno. Un hombro de alta intensidad enmascaró la región UV del espectro

hasta 500 nm. Sin embargo, se pudo observar una banda a 702 nm junto con un hombro incipiente a 520 nm.

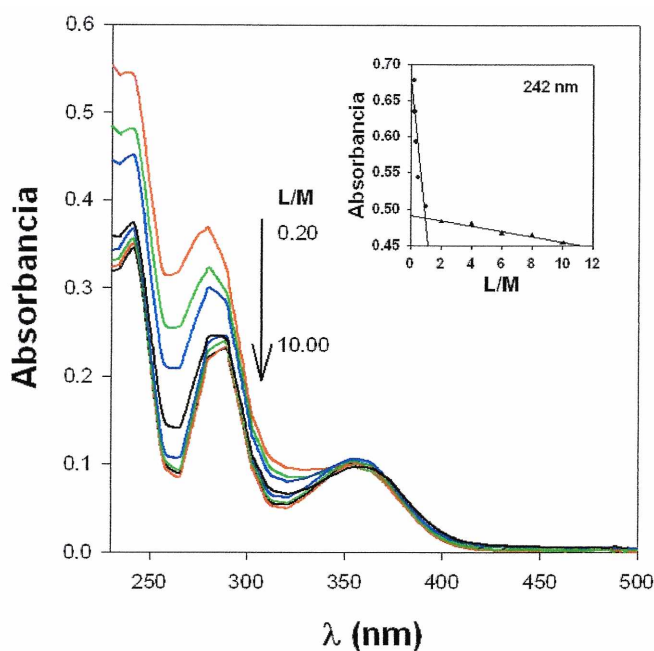


Figura 2. Espectro UV-Vis de hesperidina ( $2 \times 10^{-5}$  M) y con  $\text{VOCl}_2$  en relaciones ligando-metal (L/M) desde 10,0 a 0,2 (pH 12) bajo atmósfera de nitrógeno. La flecha indica el incremento del metal. El gráfico interno muestra la determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo a 242 nm por el método de relación molar

Los complejos de V(IV) con azúcares coordinados a través de un grupo hidroxilo en posición *cis* muestran un patrón de tres bandas a aproximadamente 420 nm, 500 nm y 700 nm (Hartley y col. 1980; Etcheverry 1997; Williams 2000). Se pudo concluir que la interacción del metal central con el ligando tiene lugar a través de grupos *cis*-OH desprotonados del disacárido de la hesperidina, en vez de la interacción típica a través del grupo 3-OH del cinamoil de la flavonona hesperitina. Este resultado está en concordancia con el obtenido por espectroscopía infrarroja (ver más abajo).

## 1.4 Espectro FTIR

La hesperidina está compuesta por la fracción hesperitina y el azúcar rutinosa. Para el análisis de los modos vibracionales del azúcar, el espectro fue dividido en las siguientes regiones a) 1500-1150  $\text{cm}^{-1}$ : vibraciones HCH,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ; b) 1150-950  $\text{cm}^{-1}$ : estiramientos CO; c) 950-700  $\text{cm}^{-1}$ : deformaciones de grupos laterales (COH, CCH, OCH) o regiones anoméricas (Etcheverry y col. 2001). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Los principales cambios en la intensidad y desplazamientos de las bandas ocurren en los picos que involucran estiramientos y deformaciones de los grupos OH. Estas modificaciones pueden deberse a la desprotonación y/o coordinación de dichos grupos del sacárido debido al medio fuertemente alcalino usado en la preparación del complejo.

Debido a la presencia de la banda de estiramiento localizada a 878  $\text{cm}^{-1}$  se puede asumir que el residuo de glucosa está unido a la hesperitina como el anómero  $\beta$  y la banda a 818  $\text{cm}^{-1}$  indica que el residuo de desoximánosa está presente como anómero  $\alpha$ .

La vibración  $\text{V}=\text{O}$  se localiza a 931  $\text{cm}^{-1}$ . La posición de la banda indica que la formación de quelatos alrededor del catión vanadilo ocurre a través de pares de grupos OH desprotonados y ubicados en posición *cis*. Lo mismo se observó para complejos con diferentes carbohidratos (Hartley y col. 1980; Etcheverry 1997; Williams 2000; Yang y col. 2001).

El estiramiento  $\text{C}(4)=\text{O}$  no sufre modificación en la posición de la banda y sólo disminuye su intensidad, por lo que se descarta la coordinación del metal a través de ese residuo. La aparición de una nueva banda en 1582  $\text{cm}^{-1}$  puede deberse a la probable desprotonación del grupo OH unido al C(5) de la hesperitina dando lugar a la deslocalización electrónica entre ambos grupos, con el consiguiente acoplamiento de las vibraciones de estos dos enlaces.

Tabla 1. Asignaciones del espectro infrarrojo de hesperidina y VO(hesp). Las posiciones de las bandas están en  $\text{cm}^{-1}$ .

Hesperidina	VO(hesp)	Asignaciones
1647 mf	1644 h	$\nu$ (C=O)
1609 f	1612 mf	$\nu$ (C=C), anillo
	1582 h	
1516 f	1539 m / 1515 h	
1447 m	1432 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1361 m	1382 d / 1370 h	$\delta$ (COH)
1285 f	1273 m	$\delta$ (COH), $\nu$ (C-O-C)
1196 f	1207 m / 1176 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1129 f	1132 m	
1090 h	1095 h	$\nu$ (C-O) <sub>endo</sub>
1072 mf	1072 mf	$\nu$ (C-O) <sub>exo</sub>
1030 h	1030 h	
975 m	971 m	
	931 h	$\nu$ (V=O)
878 h	878 md	$\delta$ (C1H), $\beta$ glucosa
818 d	828 h / 814 d	$\delta$ (C1H), $\alpha$ deoximanosa
743 d	767 h / 732 h	
671 d	679 d	

f, fuerte; mf, muy fuerte; m, mediana; d, débil; h, hombro; md, muy débil

## 1.5 Espectroscopía de EPR

La naturaleza monomérica del complejo fue determinada por espectroscopía EPR a temperatura ambiente (figura 3). El espectro cuenta con un patrón de 8 líneas ( $I=7/2$ ) lo que confirma el estado de oxidación  $d^1$  V(IV). Los parámetros de espín Hamiltonianos  $g_{\parallel}=1,940$ ;  $A_{\parallel}=167.10^3 \text{cm}^{-1}$ , concuerdan con lo

previamente publicado para los complejos de vanadilo-sacáridos (Sreedhara y col. 1996). Además, se asumió que la configuración del complejo era un patrón  $d^{1xy}$  axialmente compactado:  $g_{\parallel} < g_{\perp}$  ( $g_{\perp} = 1,974$ ) y  $A_{\parallel} = 167,10 > A_{\perp}$  ( $A_{\perp} = 55 \times 10^{-4} \text{-cm}^{-1}$ ). En tales casos los parámetros de desdoblamiento hiperfino indican la presencia de un catión VO(IV) en entorno VO(O)<sub>4</sub> con valores de  $A_{\parallel}$  y  $g_{\parallel}$  en el rango de  $149\text{-}186 \times 10^{-4}$  y  $1,93\text{-}1,96 \times 10^{-4} \text{-cm}^{-1}$ , respectivamente. En el presente caso el modo de unión de este complejo podría implicar una esfera de coordinación ecuatorial con dos grupos *cis*-OH desprotonados provenientes del azúcar y dos enlaces con aniones OH<sup>-</sup> coordinandos al vanadilo central.

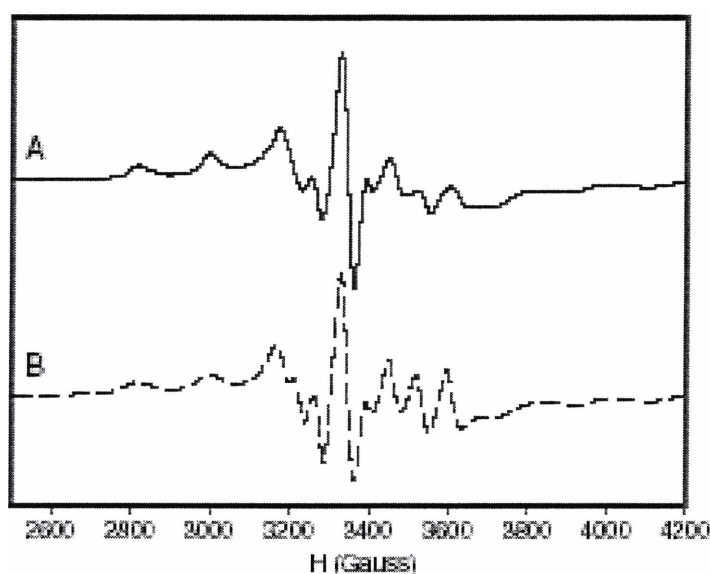


Figura 3. Espectro de EPR (A) experimental y (B) calculado a temperatura ambiente de VO(hesp) medido en la banda X (9,406 GHz).

## 2. Medida de la actividad antioxidante del complejo

### 2.1 Actividad superóxido dismutasa símil

La SOD cataliza la descomposición del anión radical superóxido, involucrado en ciertas enfermedades inflamatorias y vasculares, isquemia y diversas lesiones titulares; en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La actividad SOD se mide generando el anión radical superóxido por el sistema xantina-xantina

oxidasa (método enzimático) y el sistema PMS/NADH (método no enzimático), midiendo la inhibición que produce sobre otra reacción: la formación de formazán a partir de NBT. El ensayo enzimático no provee evidencias concluyentes cuando los compuestos probados afectan la generación de superóxido por interacción directa con xantina oxidasa (XO). En tales casos, los valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la reducción de NBT y producción de ácido úrico (a partir de xantina) son muy cercanos. Estos inconvenientes pueden ser resueltos usando sistemas de ensayo no enzimáticos (Cos y col. 1998). Los valores obtenidos con el método enzimático fueron: SOD ( $0,085 \mu\text{M}$ ), hesperidina ( $0,43 \text{ mM}$ ) y VO(hesp) ( $94 \mu\text{M}$ ). Con el método no enzimático el complejo exhibió potente actividad SOD similar ( $6 \mu\text{M}$ ), siendo los valores de  $IC_{50}$  para SOD y hesperidina,  $0,21 \mu\text{M}$  y  $2,23 \text{ mM}$ , respectivamente. Puede verse que en ambas determinaciones la complejación de la hesperidina mejora su capacidad antioxidante, siendo el método no enzimático más concluyente porque se evita la interacción directa del superóxido con la enzima xantina oxidasa, con producción de ácido úrico.

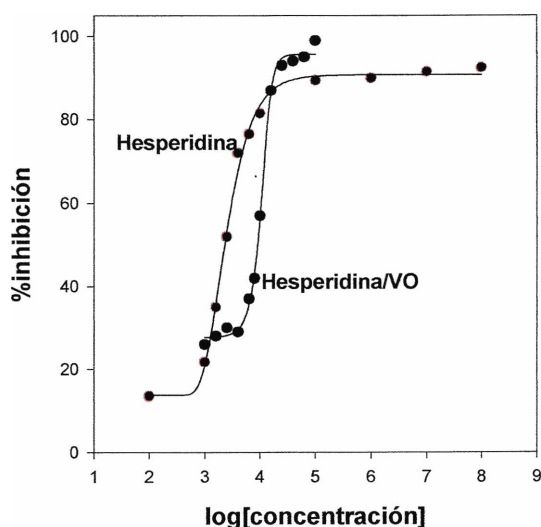


Figura 4: Efecto de hesperidina y  $[\text{VO}(\text{hesp})(\text{OH})_3]\text{Na}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en la reducción de NBT por el anión radical superóxido generado en el método enzimático (sistema xantina/xantina oxidasa).

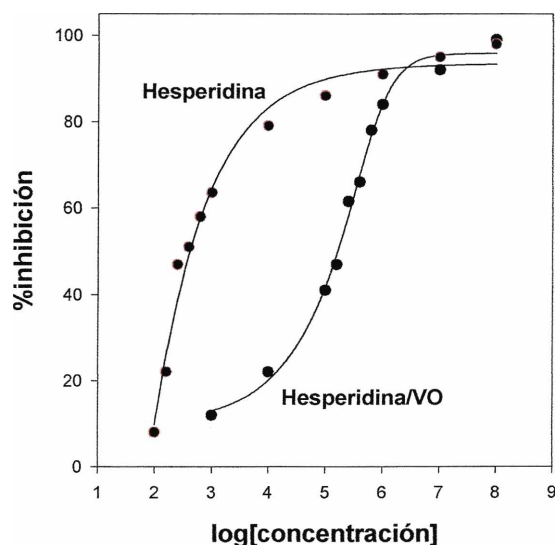


Figura 5: Efecto de hesperidina y  $[\text{VO}(\text{hesp})(\text{OH})_3]\text{Na}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en la reducción de NBT por el anión radical superóxido generado en el método no enzimático (sistema fenazina metosulfato/ NADH).

## 2.2 Capacidad para secuestrar el radical difenil picril hidracilo (DPPH<sup>•</sup>)

La habilidad de secuestrar el radical DPPH<sup>•</sup> es un ensayo químico simple aplicado para determinar la capacidad antioxidante de polifenoles. Para hesperidina se observó que esta capacidad es mayor crece con el incremento de la concentración del antioxidante. De acuerdo al análisis estadístico, el complejo en concentraciones 50 y 100  $\mu\text{M}$  presenta un efecto antiradical algo mayor pero significativo. Previamente se había establecido el valor de la actividad antioxidante de hesperidina usando el método de DPPH<sup>•</sup> (Wilmsen y col. 2005).

En este trabajo se obtuvo un menor valor (en 5 determinaciones diferentes, cada una por triplicado) en condiciones experimentales algo diferentes (25° C, ausencia de dimetilsulfóxido (DMSO) y pH 7,1). De todos modos, en este trabajo se busca determinar si las actividades de los flavonoides son mejoradas por complejación con el metal y en este aspecto, se encontró que el catión



vanadilo(IV) no alteró la capacidad antioxidante de la hesperidina, o al menos su actividad se incrementó sólo levemente (figura 6)

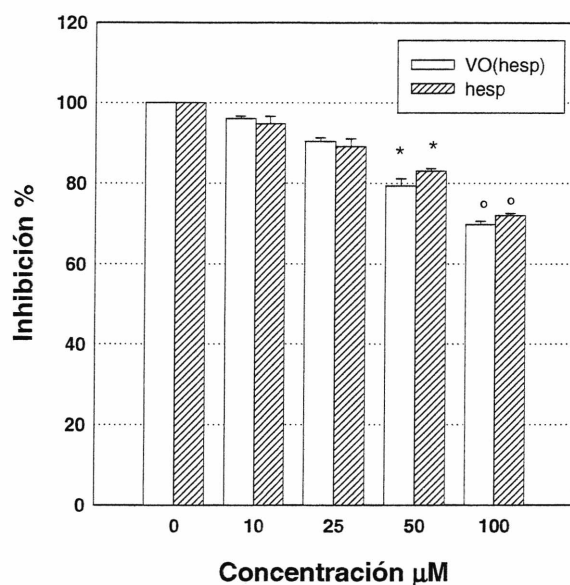


Figura 6: Efecto de hesperidina y  $[\text{VO}(\text{hesp})(\text{OH})_3]\text{Na}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , VO(hesp), en la reducción de la concentración de DPPH\*. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar medio (SEM), \* $p < 0,05$ ; <sup>o</sup> $p < 0,01$ .

### 2.3 Actividad antioxidante total (TAA) y coeficiente antioxidante equivalente Trolox (TEAC)

Las actividades antioxidantes totales de hesperidina, VO(hesp) y Trolox se muestran en la Figura 7 donde se observa la dependencia de la inhibición como función de las concentraciones de los compuestos. El porcentaje de inhibición del catión radical ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  es dependiente de la concentración. A partir de las pendientes de estos gráficos, se calcula TEAC. Las capacidades antioxidantes equivalentes Trolox de hesperidina y VO(hesp) resultaron 0,67 y 0,61, respectivamente. El valor TEAC para hesperidina es menor que para otros flavonoides debido a diferencias estructurales (Rajendran y col. 2004) y la complejación con el metal no mejoró la

capacidad antioxidante, probablemente porque el vanadilo(IV) coordina a través del azúcar y no altera la estructura del grupo hesperitina.

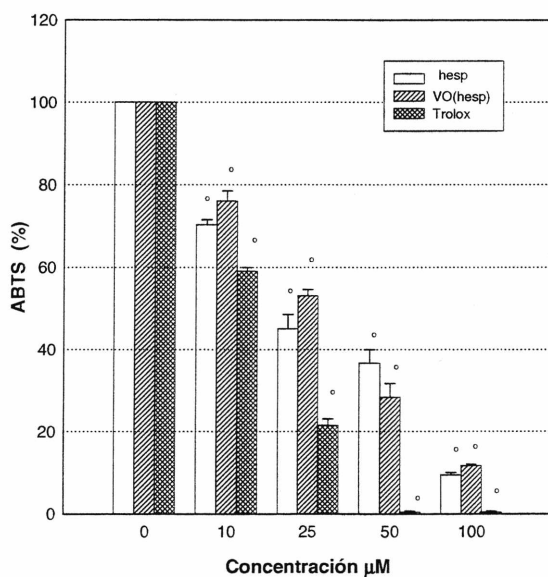


Figura 7: Actividad antioxidante total (TAA) medida como la reducción de la concentración de  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  por agregado de hesperidina, VO(hesp), y Trolox. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes,  $^{\circ}p < 0,001$ .

### 3. Actividad biológica

En los siguientes apartados, se muestran los efectos de VO(hesp) en sistemas biológicos. Como se mencionó anteriormente, se utilizaron dos tipos de líneas celulares osteoblasto símil como modelos biológicos: preosteoblastos de fenotipo normal, MC3T3-E1 y células tumorales de osteosarcoma UMR106.

#### 3.1 Ensayo mitogénico

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos después de la incubación de los osteoblastos con 2,5-100  $\mu\text{M}$  de VO(hesp) y el ligando libre (hesperidina). El complejo indujo inhibición de la proliferación en ambas líneas celulares de manera dependiente de la concentración. Para las células MC3T3-E1, esta inhibición ocurrió en todo el rango de concentración empleado. En

UMR106, la inhibición es significativa a 25  $\mu\text{M}$ . A partir de 50  $\mu\text{M}$  en adelante, el complejo tiene la misma eficacia de inhibición para ambas líneas celulares. A 100  $\mu\text{M}$ , la disminución de la proliferación celular alcanzó aproximadamente un 80 %. Por otro lado, el ligando libre tuvo un efecto inhibitorio de la proliferación celular hasta aproximadamente el 10% en el rango de concentración empleado.

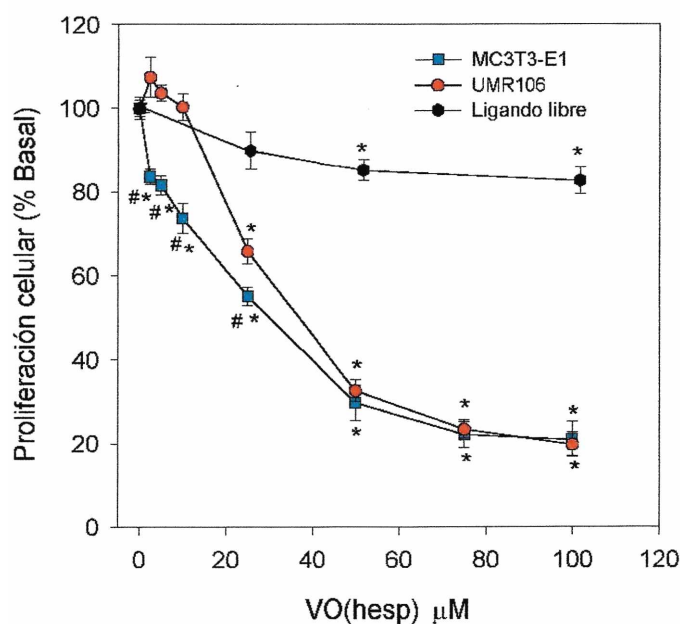


Figura 8. Efecto de VO(hesp) y el ligando libre (hesperidina) sobre la proliferación de MC3T3-E1 y UMR106. Los resultados se expresan como % basal (sin la adición de complejo), \* significativo con respecto al control; # significativo entre líneas celulares a la misma dosis empleada

### 3.2 Cambios morfológicos

Una de las primeras aproximaciones al entendimiento de los mecanismos de citotoxicidad de un agente exógeno, es la observación de las alteraciones morfológicas que causa ya que éstas permiten sugerir la forma de muerte celular que provoca (apoptosis y/o necrosis). En la figura. 9 se muestran las alteraciones morfológicas producidas por las distintas concentraciones de VO(hesp) en MC3T3-E1 y UMR106. En condiciones basales (sin el agregado de complejo), las células MC3T3-E1 poseen morfología tipo fibroblástica, su núcleo es redondo con alrededor de 3-5 nucléolos. Las células están unidas mediante conexiones celulares y pueden observarse algunas mitosis. Cuando se incubaron las células

con 50  $\mu\text{M}$  de VO(hesp) se observaron cuerpos apoptóticos (flecha azul) y condensación del citoplasma. En presencia de 100  $\mu\text{M}$ , el citoplasma colapsó casi completamente y los núcleos se volvieron picnóticos (flecha negra). Las células UMR106 en términos generales, presentan forma cuboidal con el núcleo excéntrico y de forma arriñonada. Con respecto a la línea MC3T3-E1, poseen una mayor relación núcleo/citoplasma. En presencia de 50  $\mu\text{M}$  de VO(hesp) la morfología nuclear de las células UMR106, se vio seriamente comprometida. Se observó fragmentación nuclear (flecha roja), los mencionados cuerpos apoptóticos y burbujas de membrana (flecha blanca). A 100  $\mu\text{M}$  los núcleos se volvieron redondos, se observaron cuerpos apoptóticos y condensación de la cromatina en los bordes de los núcleos.

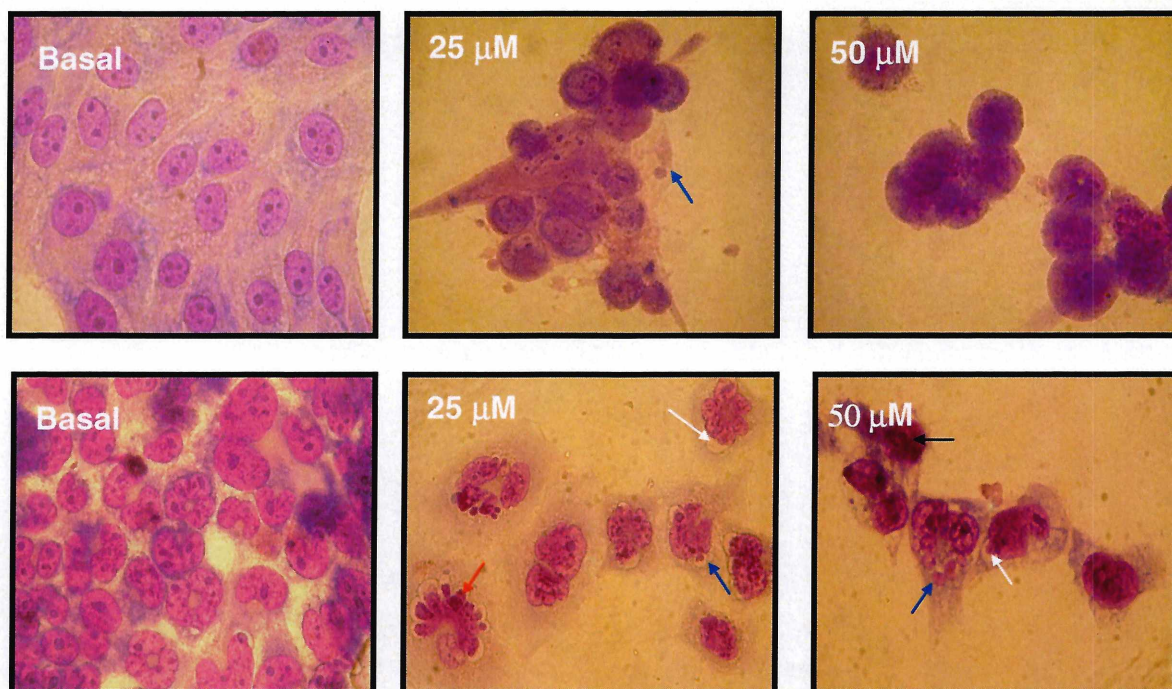


Figura 9. Efecto de VO(hesp) sobre la morfología de MC3T3-E1 y UMR106. Las células fueron incubadas durante 24 h con los compuestos. Posteriormente fueron teñidas con Giemsa y observadas bajo microscopio de luz (objetivo 100 X).

## Complejo del catión vanadilo (IV) con oxodiacetato (oda), VO(oda)

Dentro de la familia de los ligandos multidentados, oda=oxodiacetato ( $O(CH_2COO^-)_2$ ) se presenta como un versátil agente de complejación de metales. Como ligando, contiene un grupo dador OOO que puede acomplejarse con iones metálicos formando anillos quelatos.

La síntesis del complejo de oda con el catión vanadilo, VO(oda), así como la determinación de su estructura por difracción de rayos-X (figura 1) y actividad antiapoptótica en células RINm5F productoras de insulina fue previamente reportado (Del Río y col. 2000). Posteriormente VO(oda) fue sintetizado y caracterizado fisicoquímicamente por el Dr. E. J. Baran, quien gentilmente lo donó para la investigación exhaustiva de su acción biológica en osteoblastos en cultivo como parte de este trabajo de Tesis doctoral.

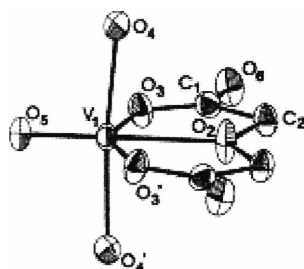


Figura 1. Estructura de VO(oda)

### 1. Estudios de viabilidad celular

#### 1.1. Ensayo mitogénico

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para los osteoblastos UMR106 y MC3T3-E1 mediante el ensayo de cristal violeta luego de incubar las células con concentraciones de VO(oda) en el rango 2,5-100  $\mu$ M durante 24 h. Hasta 10  $\mu$ M no hubo ningún efecto sobre la proliferación de MC3T3-E1 y UMR106, pero a partir de 25  $\mu$ M, puede observarse un efecto inhibitorio dependiente de la dosis ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, los osteoblastos normales son más sensibles a VO(oda) que los tumorales en este rango de concentración. El

ligando libre no ejerció efecto alguno sobre la proliferación de los osteoblastos en las dosis empleadas.

## 1.2. Efectos de VO(oda) sobre la actividad lisosomal.

Los lisosomas de células metabólicamente activas presentan la capacidad de captar el colorante rojo neutro (RN), siendo éste un ensayo usualmente empleado para determinar la citotoxicidad de diversos compuestos. La acción de un compuesto tóxico como VO(oda) en los osteoblastos no transformados afecta, entre otras, la actividad lisosomal, provocando una disminución de la capacidad lisosomal para captar colorantes. Este efecto puede ser observado en la figura 3.

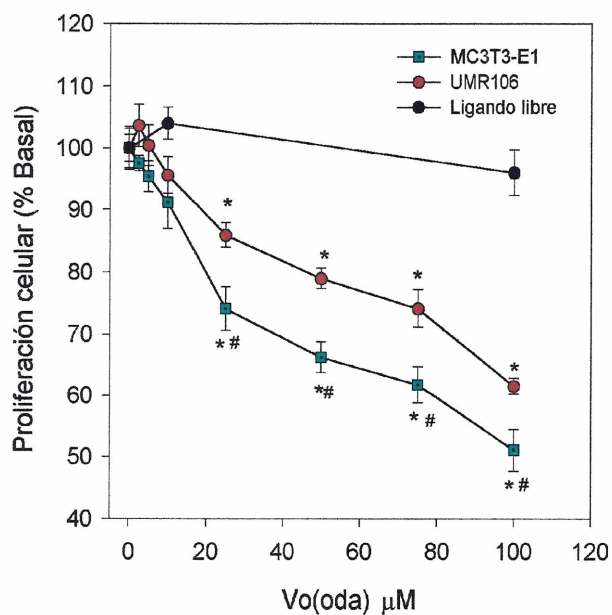


Figura 2. Efecto de VO(oda) sobre la proliferación de MC3T3-E1 y UMR106. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media  $\pm$  SEM de 3 ensayos diferentes, \*significativo con respecto al Basal, # significativo entre líneas celulares con respecto a la misma dosis empleada.

Como puede verse, la concentración más baja de complejo (2,5  $\mu\text{M}$ ) no mostró diferencias con la condición basal (sin agregado de complejo). Sin embargo, a 5 y 10  $\mu\text{M}$  se observó un aumento significativo en la captación del colorante por los lisosomas. Este aumento podría deberse a un fenómeno de

hormesis. A medida que se incrementó la concentración de VO(oda), se observó un marcado efecto citotóxico entre 25 y 100  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, en la línea tumoral UMR106, se detectó una disminución de la actividad lisosomal a partir de 25  $\mu\text{M}$  con una disminución marcada a 100  $\mu\text{M}$ , pero la disminución de la captación de rojo neutro fue estadísticamente menor en los osteoblastos tumorales que en los no transformados. Estos resultados de captación de RN correlacionan adecuadamente con los observados en el ensayo del cristal violeta (ensayo mitogénico) ya que los efectos deletéreos del complejo sobre la proliferación de las células tumorales fueron estadísticamente significativos a partir de 25  $\mu\text{M}$ .

La alteración de la actividad lisosomal puede ser uno de los factores que juega un rol en la citotoxicidad de VO(oda).

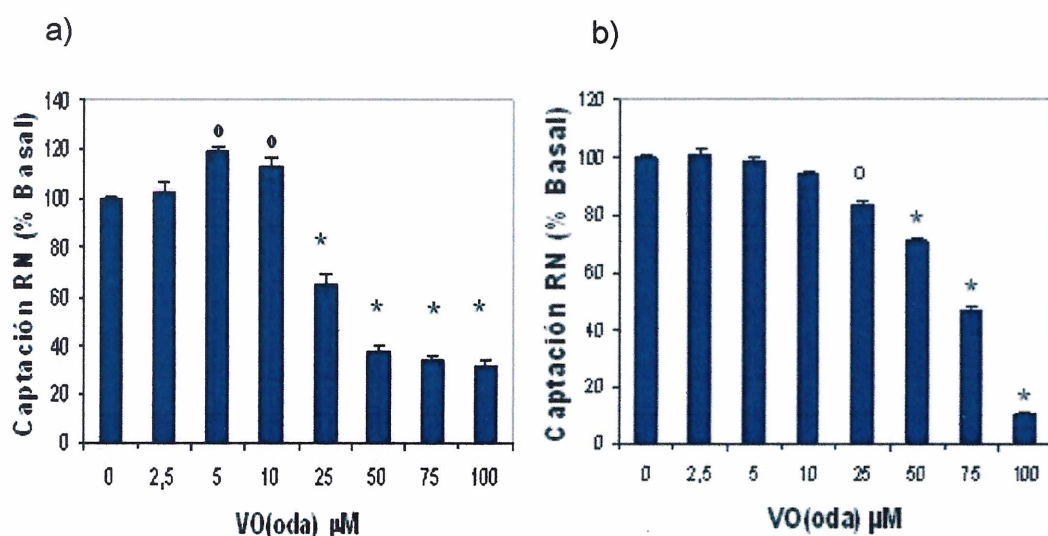


Figura 3. Captación de rojo neutro por osteoblastos en cultivo luego de 24 h de incubación con VO(oda) a 37° C. a) MC3T3-E1. b) UMR106. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM, n=16, <sup>o</sup>p<0.05; \*p<0.001

### 1.3. Ensayo de reversibilidad

Con el fin de evaluar el potencial de recuperación de los osteoblastos frente a las perturbaciones inducidas por el complejo, se determinó la viabilidad celular en presencia de DMEM suplementado con 10% de SBF posterior a la incubación con concentraciones crecientes de VO(oda). En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, no hubo reversión del efecto inhibitorio de VO(oda) en ninguna de las concentraciones en las cuales el

complejo resulta citotóxico. Más aún, después del reemplazo del medio de cultivo en presencia de VO(oda) por un medio libre del complejo suplementado con SBF, se observó una acentuación de los efectos deletéreos. Esto revela la persistencia del efecto citotóxico del compuesto una vez que se lo ha removido y que las condiciones ideales de crecimiento (DMEM más SBF), en el tiempo evaluado, no son suficientes para revertir la toxicidad iniciada por el complejo.

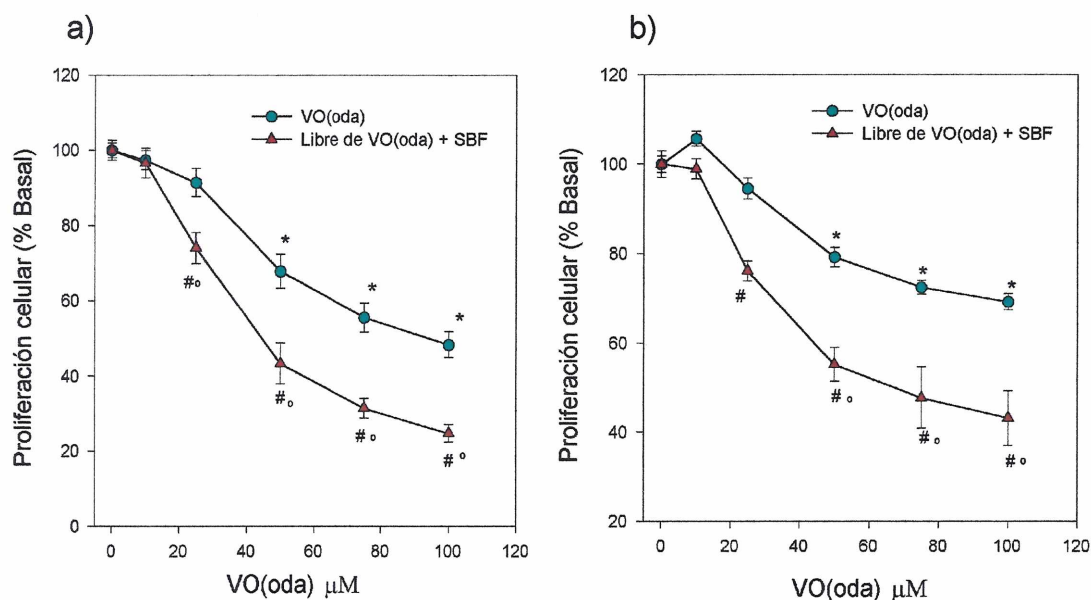


Figura 4. Potencial de recuperación de los osteoblastos a) MC3T3-E1 y b) UMR106 frente a la inhibición de la viabilidad celular por VO(oda) en medio de cultivo libre del complejo suplementado con 10 % SBF. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM, n=6, \*, # significativo con respecto al control, ° significativo entre condiciones experimentales

## 2. Cambios morfológicos

### 2.1 Tinción con Giemsa

Tomando en cuenta los efectos deletéreos de VO(oda), se investigó la acción de este complejo sobre la morfología de las células MC3T3-E1 y UMR106. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos. En condiciones basales, las células MC3T3-E1 poseen morfología tipo fibroblástica, su núcleo es redondo con alrededor de 3-5 nucléolos. Las células están unidas mediante conexiones celulares y pueden observarse algunas mitosis. Cuando se incubaron con



VO(oda), aparecieron alteraciones morfológicas típicas de apoptosis y necrosis. Con 50  $\mu\text{M}$  de complejo, pueden observarse cuerpos apoptóticos (flecha azul) y pérdida de la integridad de membrana plasmática reflejada por la pérdida de citoplasma. En presencia de 100  $\mu\text{M}$ , el citoplasma colapsó casi completamente y los núcleos se volvieron picnóticos (flecha negra).

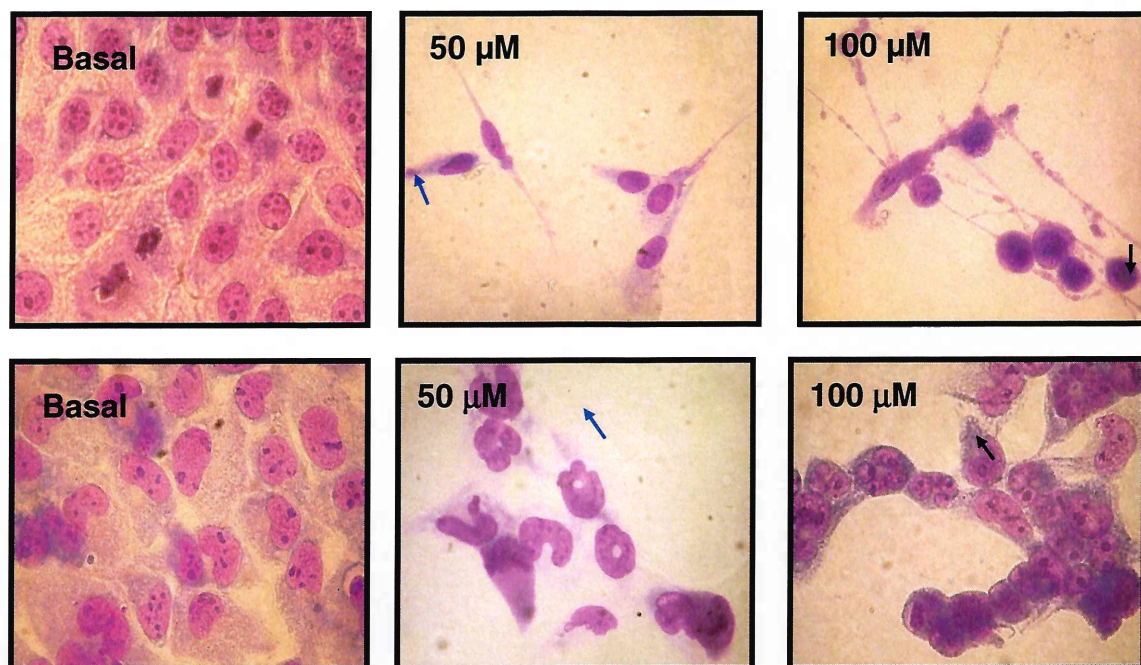


Figura 5. Efecto de VO(oda) sobre la morfología de MC3T3-E1 (panel superior) y UMR106 (panel inferior). Las células fueron incubadas durante 24 h con del complejo. Posteriormente fueron teñidas con Giemsa y observadas bajo microscopio de luz (objetivo 100 X).

La línea celular UMR106, en aspectos generales, tienen un fenotipo transformado, característico de las células tumorales, con el núcleo excéntrico y de forma arriñonada. Con respecto a la línea MC3T3-E1, los osteoblastos tumorales poseen una mayor relación núcleo/citoplasma. En presencia de 50  $\mu\text{M}$  de VO(oda), los núcleos se alargaron con forma de herradura. Puede observarse condensación citoplasmática y cuerpos apoptóticos. Con 100  $\mu\text{M}$  de complejo, se hace más evidente la constricción del citoplasma y aparecen núcleos condensados.

## 2.2. Tinción de los microfilamentos de actina

La tinción de las fibras de actina con Paloidina-FITC se empleó para visualizar la arquitectura del citoesqueleto de las células osteoblásticas, tanto en condiciones basales (sin agregado de complejo) como en presencia de diferentes concentraciones de VO(oda). La figura 6 (a,b y c) presenta la organización de los filamentos de actina de las células MC3T3-E1 en condiciones basales e incubadas con 25 y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) respectivamente. En las células control, los microfilamentos se encuentran regularmente distribuidos y ubicados en dirección al eje principal de las células. En presencia de VO(oda), los filamentos de actina se reordenan y la forma de las células se pierde a medida que se incrementa la concentración. A 100  $\mu\text{M}$  de complejo, las fibras están desintegradas y solo se observan algunos pequeños “cúmulos” de actina en los extremos citoplasmáticos. La figura 6 (c,d y e) muestra las características de los filamentos de actina de las células UMR106 en condiciones basales, con 25 y 100  $\mu\text{M}$  de complejo respectivamente.

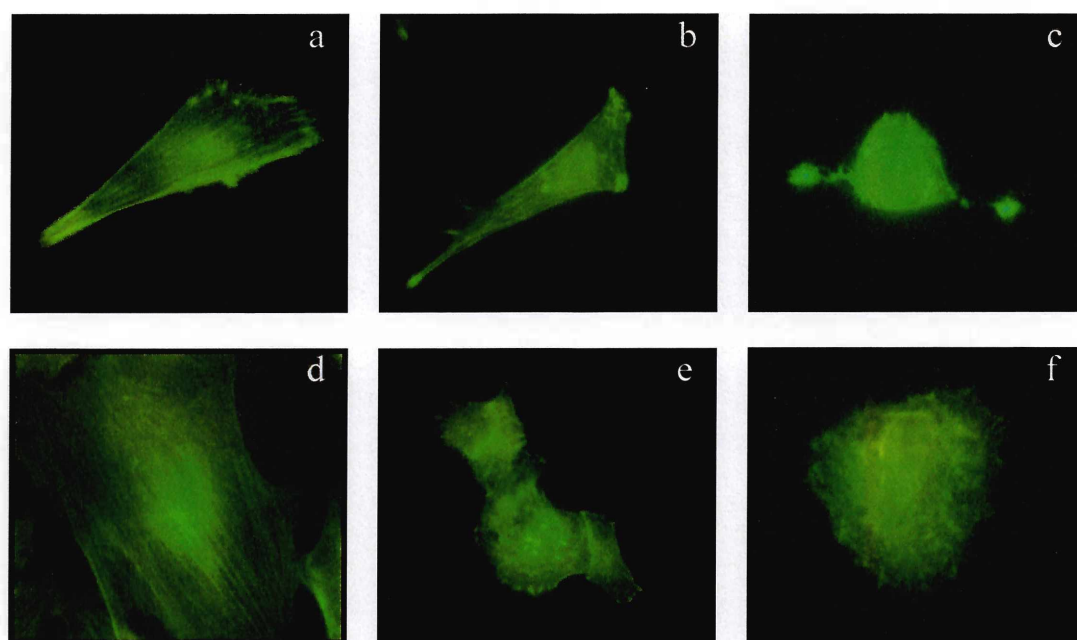


Figura 6. Efectos de VO(oda) sobre la arquitectura de los filamentos de actina de MC3T3-E1 y UMR106. Las células fueron incubadas durante 24 h con los compuestos. Posteriormente fueron teñidas con teñidas con Paloidina-FITC y observadas bajo microscopio de fluorescencia (objetivo 100 X).

En las células control, se ve una disposición estructural de las fibras similar a la observada en el control de las células MC3T3-E1. En presencia de 25 y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) la regularidad de este patrón se alteró a medida que se incrementó la concentración del compuesto. Con 100  $\mu\text{M}$  de complejo, la forma celular se alteró completamente y las fibras se dispusieron de forma desorganizada alrededor del núcleo. La intensidad de los cambios observados fue mayor en los osteoblastos con fenotipo normal con respecto a los tumorales. Estos resultados están en concordancia con las alteraciones observadas con tinción de Giemsa.

### **3. Mecanismos de acción**

Se investigaron los posibles mecanismos que podría utilizar el complejo para ejercer sus efectos tóxicos. Así se determinó el estrés oxidativo a través de la medición de los niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) y de la evaluación de los efectos del complejo sobre la cupla redox 2GSH/GSSG. Finalmente, también se investigó el efecto de VO(oda) sobre la activación de la vía de las ERKs que, como fue explicado previamente, puede mediar efectos apoptóticos.

#### **3.1. Estrés oxidativo**

##### **3.1.1 Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Uno de los principales mecanismos de citotoxicidad propuestos para el vanadio y sus derivados es la generación de estrés oxidativo (Evangelou, 2002). En este marco, se estudió el efecto de VO(oda) sobre la producción de ROS. La generación de ROS fue estimada mediante fluorimetría utilizando la sonda DHR 123. Como se mencionó anteriormente, esta sonda es un compuesto no fluorescente que permite detectar diferentes ROS, pero particularmente  $\text{H}_2\text{O}_2$

(Capella y col. 2007). En las células, la DHR se localiza principalmente en la mitocondria y es oxidada a Rodamina 123 en presencia de agentes oxidantes, emitiendo fluorescencia. El complejo VO(oda), incrementó los niveles de ROS en ambas líneas celulares de una manera dependiente de la dosis (figura 7). En la concentración más alta empleada, 100  $\mu\text{M}$ , el aumento de ROS fue aproximadamente el doble con respecto al basal. Se encontraron diferencias significativas según la línea celular. VO(oda) fue más efectivo para incrementar los niveles de ROS en MC3T3-E1 que en UMR106 cuando se trataron con 50 y 75  $\mu\text{M}$  del compuesto mientras que a 100  $\mu\text{M}$  los niveles de ROS fueron similares.

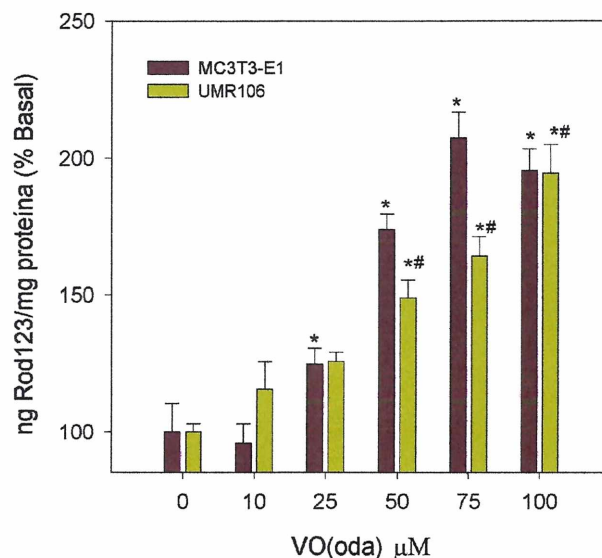


Figura 7. Generación de ROS en las líneas celulares MC3T3-E1 y UMR106 en presencia de VO(oda). Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes del complejo. La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media  $\pm$  SEM, n=6, \* significativo respecto al control; # significativo entre líneas celulares con respecto a la misma dosis empleada.

Sobre la base de este resultado, se asumió que el estrés oxidativo jugaría un rol importante en los efectos de VO(oda). Para confirmar esta hipótesis, primero se incubaron las células en presencia de VO(oda) más N-acetilcisteína (NAC) (0,1

mM para MC3T3-E1 y 0,25 mM para UMR106) durante 2 h previo a la adición del complejo y se determinaron los niveles de ROS. NAC es un precursor de la síntesis de GSH y además puede actuar como secuestrante de ROS. Como se muestra en la figura 8, en presencia de NAC, los niveles de ROS disminuyeron parcialmente en MC3T3-E1 y UMR106 de manera significativa a partir de 50  $\mu$ M.

A continuación, se evaluó la viabilidad celular en presencia de NAC. Para las células MC3T3-E1, se observó una reversión parcial de la citotoxicidad de VO(oda) a 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Para estas concentraciones, la viabilidad se incrementa desde 62 a 73 % y desde 51 a 67% respectivamente (figura 9a). En el caso de las células UMR106 (figura 9b), la inhibición de la citotoxicidad en presencia de NAC ocurrió a partir de concentración (25  $\mu$ M).

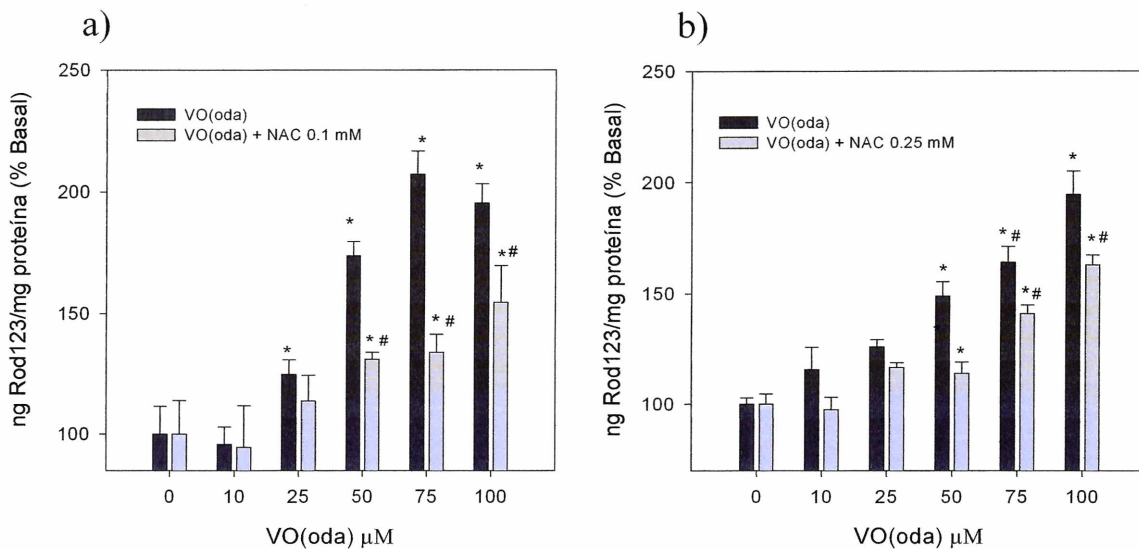


Figura 8. Efectos de VO(oda) sobre a) MC3T3-E1 y b) UMR106 sobre la producción de ROS en presencia de NAC. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de VO(oda) o VO(oda) más 0,1 mM de NAC para MC3T3-E1 y 0,25 mM para UMR106 durante 24 h. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM, n=6. Para ambas líneas celulares, \* significativo estadísticamente con respecto al control, # significativo a su correspondiente dosis en ausencia de NAC.

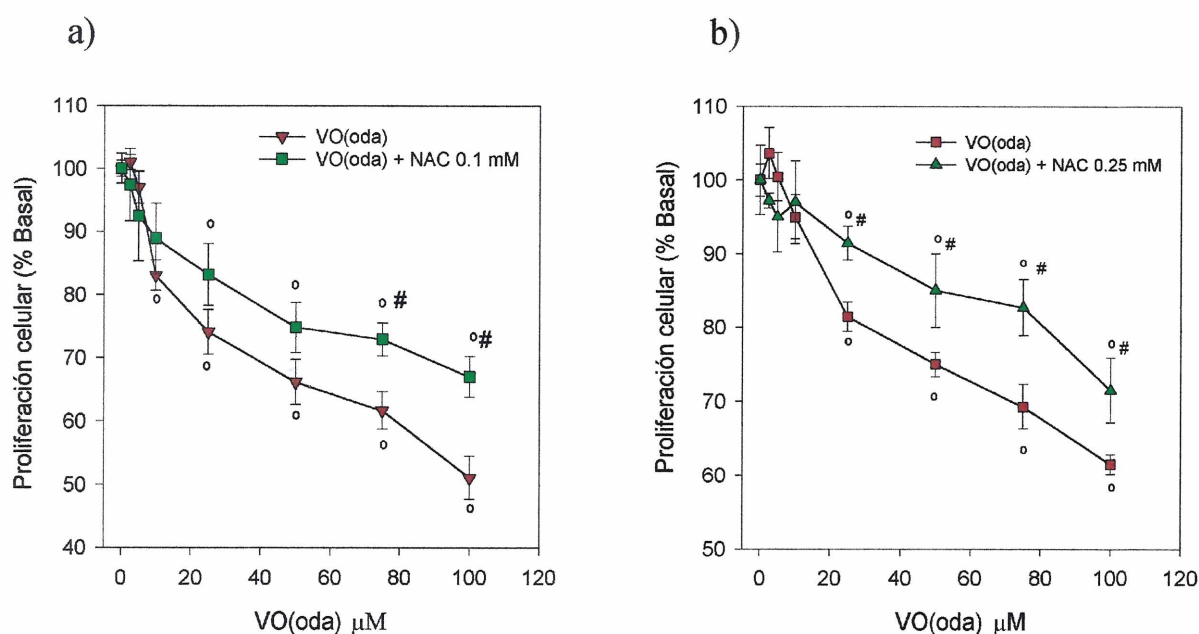


Figura 9. Efectos de VO(oda) en a) MC3T3-E1 y b) UMR106, sobre la proliferación celular en presencia de NAC. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de VO(oda) o VO(oda) más 100  $\mu\text{M}$  NAC para MC3T3-E1 y 200  $\mu\text{M}$  para UMR106 durante 24 h. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM,  $n=6$ . Para ambas líneas celulares, ° estadísticamente significativo con respecto al control, # significativo a su correspondiente dosis en ausencia de NAC.

### 3.1.2. Balance Redox

Una generación sostenida de ROS usualmente produce el desbalance del estado redox intracelular, en el cual el glutatión, el tiol más abundante en las células, juega un papel fundamental. Por esta razón se determinaron los niveles de glutatión (GSH) y la proporción GSH:GSSG después de tratar las células con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) por 24h. Los niveles GSH disminuyeron con 50 y 100  $\mu\text{M}$  de complejo en ambas líneas celulares (figura 10a). Por otro lado, el nivel de GSH encontrado en UMR106 fue aproximadamente el doble que en MC3T3-E1. Posteriormente, se investigó la relación GSH:GSSG expresada como porcentaje del basal. En este caso, hubo una disminución significativa a partir de 50  $\mu\text{M}$  del complejo en ambas líneas celulares. También se observaron diferencias en la proporción de GSH:GSSH entre ambas líneas osteoblásticas a 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) (figura 10b).

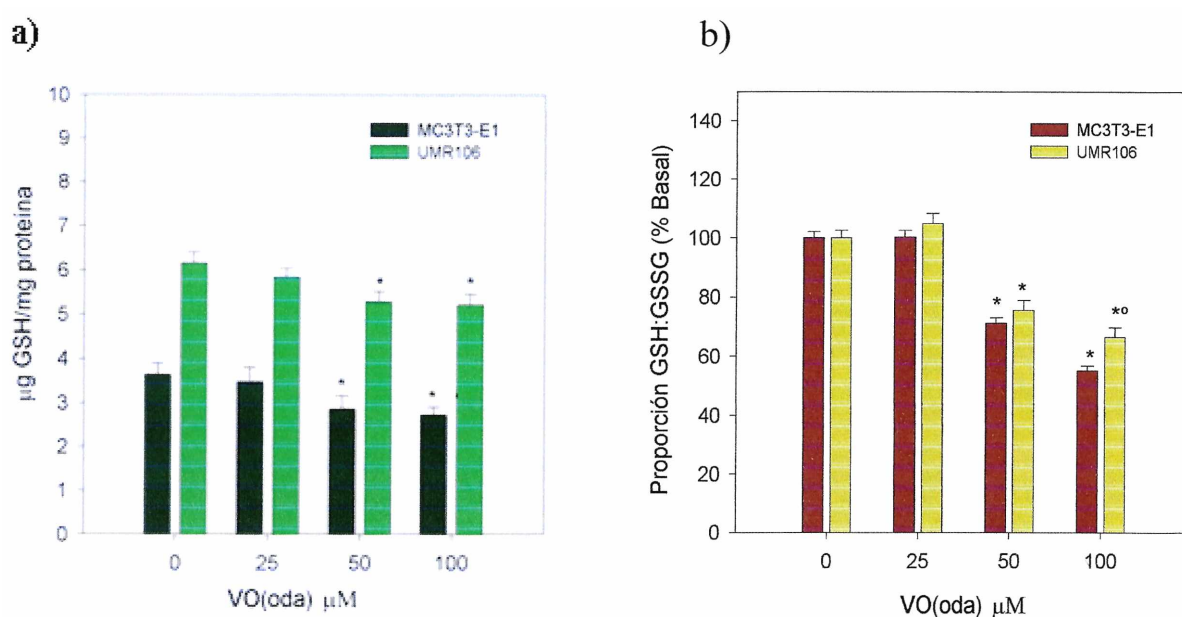


Figura 10. Contenido de GSH a) y relación GSH:GSSG b) de MC3T3-E1 y UMR106 en presencia de distintas concentraciones de VO(oda). Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes, \* significativo con respecto al basal; ° significativo entre líneas celulares a la misma concentración de complejo.

Para confirmar que la depleción del glutatión jugaba un papel importante en la citotoxicidad de VO(oda) se realizaron dos ensayos de viabilidad celular en la línea celular MC3T3-E1. En el primero, se utilizó un inhibidor de su síntesis, L-butionina sulfoximida (BSO) y en el segundo, GSH.

Para el primer ensayo, se preincubaron las células durante una noche con 10  $\mu$ M de BSO. Al término de este tiempo se adicionaron concentraciones crecientes de VO(oda) por 24 h. Para el segundo, se realizó una preincubación con 3 mM de GSH durante 2 h y luego se agregaron concentraciones de VO(oda) desde 25-100  $\mu$ M por 24 h. Los resultados se muestran en la figura 11. El efecto citotóxico de VO(oda) se incrementa de manera significativa en presencia de BSO en todas las concentraciones empleadas (Fig 11a). Cuando se incubaron las células en presencia de GSH, se observó una inhibición total del efecto antiroliferativo del complejo (Figura 11b).

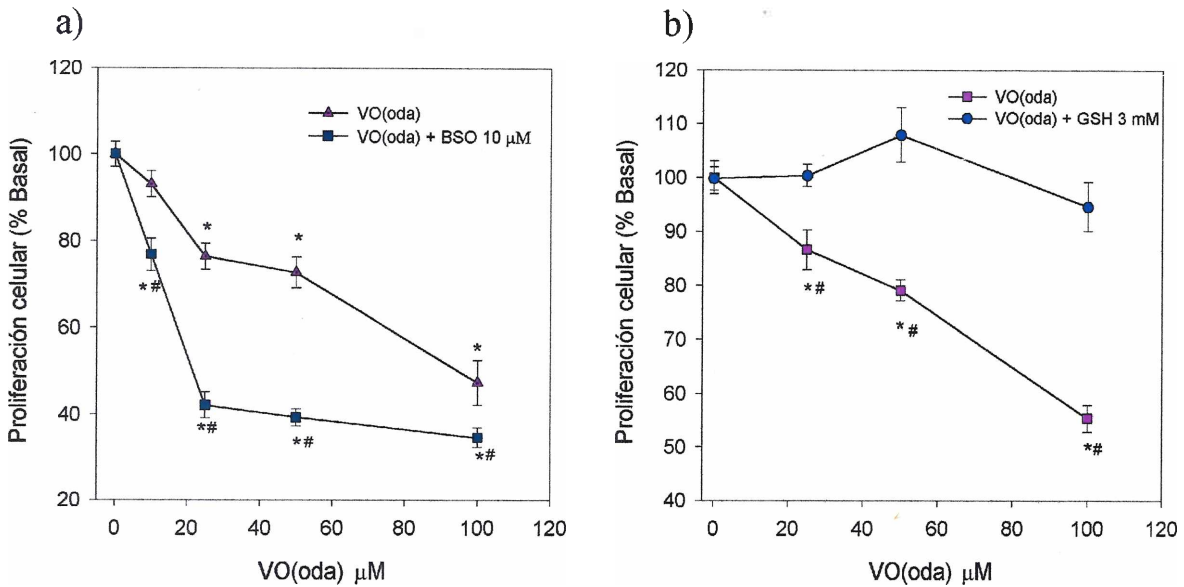


Figura 11. a) Efecto de la depleción de glutatión sobre la pérdida de viabilidad celular inducida por VO(oda) en MC3T3-E1. Las células fueron incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de BSO durante una noche y posteriormente se adicionaron concentraciones crecientes de VO(oda) durante 24 h a 37 ° C. b) Efecto de GSH sobre la pérdida de viabilidad de MC3T3-E1 en presencia de VO(oda). Se incubó las células durante 2 h con 3 mM de GSH previo a la adición de distintas concentraciones de VO(oda) durante 24 h. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM, n=9, \* significativo con respecto al control; # significativo entre tratamientos a la misma dosis empleada.

Experimentos similares realizados con los osteoblastos tumorales mostraron en primer lugar que la concentración de GSH requerida para lograr una buena reversión de la citotoxicidad fue de 1mM, la tercera parte de lo requerido por los osteoblastos normales. Posiblemente esto se deba al hecho de que las células tumorales presentan, en condiciones basales, una mayor concentración endógena de GSH en comparación con las células no transformadas. Además, los resultados también fueron también concordantes con los obtenidos al preincubar las células tumorales con BSO, ya que para llegar a niveles equivalentes de supervivencia en presencia de iguales concentraciones de complejo hubo que emplear una concentración cuatro veces mayor de BSO en los osteoblastos tumorales que en los normales. En conjunto, estos resultados indican que las células tumorales están más protegidas que las normales contra el estrés oxidativo y el desbalance del estado redox celular.



## 3.2 Estudios de apoptosis

### 3.2.1 Potencial de membrana mitocondrial

Si bien los datos obtenidos mediante la sonda DHR123 y la depleción de glutatión sugerían que alguna alteración en la mitocondria mediaba la citotoxicidad de VO(oda), ningunos de estos agentes son privativos de esta organela. En este marco, se determinó el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de MC3T3-E1 y UMR106 en presencia de VO(oda). Además, debido a que el colapso en el MMP suele estar acompañado de una alteración del estado redox celular, se exploró la relación entre el MMP y estrés oxidativo a través de la incubación de las células MC3T3-E1 en presencia de GSH.

Las células se incubaron con 50 y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) en presencia de 3 mM GSH por 24 h y se midió el cambio en el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo empleando la sonda rodamina123. En la figura 12a se muestran los resultados obtenidos para MC3T3-E1. La intensidad de fluorescencia de Rodamina 123 cambió hacia la izquierda lo que indica la pérdida de PMM. El porcentaje de células que tienen baja fluorescencia en presencia de 0, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de VO(oda) fueron 7, 35 y 41% respectivamente. Estos valores indican que los efectos ocurren de manera dependiente de la dosis. La adición de 3 mM de GSH restauró el PMM al nivel del control lo que confirma que los efectos de VO(oda) están mediados por la generación de estrés oxidativo y que el GSH juega un papel fundamental.

La figura 12b muestra los resultados obtenidos para UMR106. De manera similar al caso anterior, se observó una reducción en el PMM dependiente de la dosis. Los porcentajes de células hipofluorescentes son menores a los observados para MC3T3-E1 a las mismas dosis empleadas: 20% a 50  $\mu\text{M}$  y 27% a 100  $\mu\text{M}$  de complejo. Por otro lado, la preincubación de los osteoblastos tumorales con 1 mM de GSH produjo una muy buena reversión de la disipación del PMM. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante cristal violeta, oxidación de DHR123 y variación de la relación GSH:GSSG.

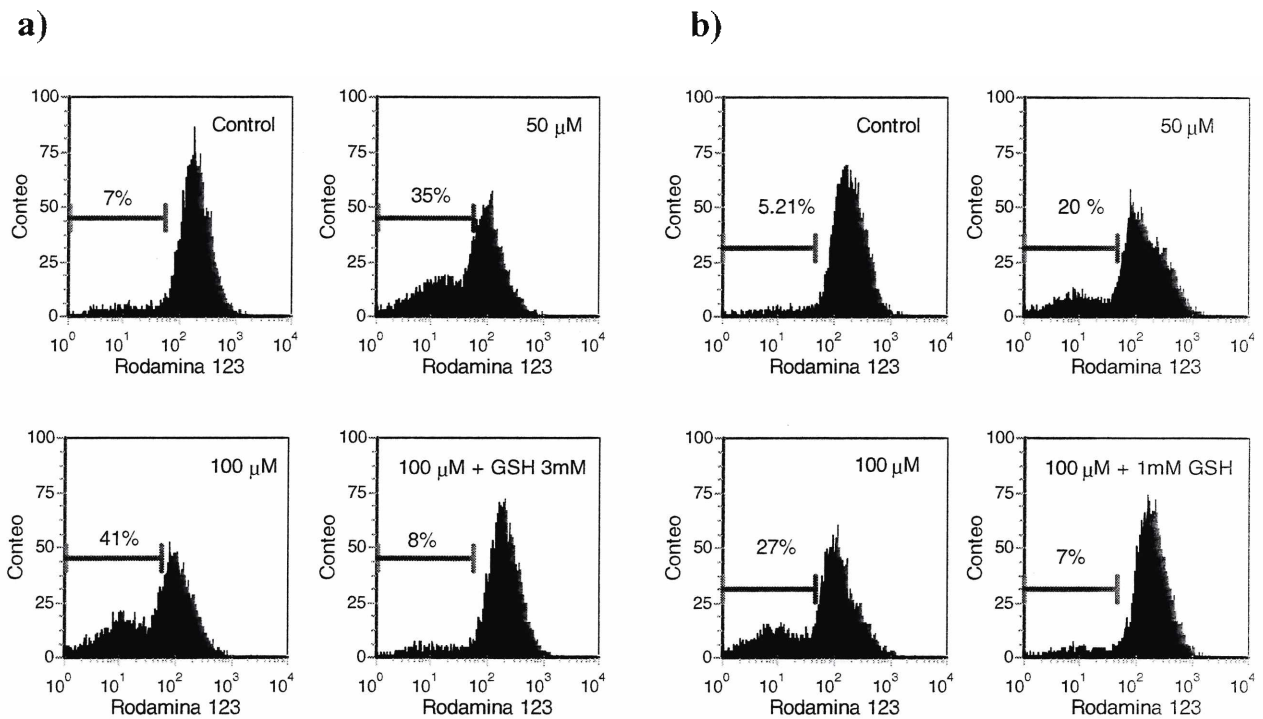


Figura 12. Efecto de VO(oda) sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en a) MC3T3-E1 y b) UMR106. Las células fueron incubadas con 50 y 100  $\mu$ M de VO(oda) o con 100  $\mu$ M de complejo más 3 mM para MC3T3-E1 o mM para UMR de GSH durante 24 h a 37° C. Cada histograma es representativo de tres experimentos independientes.

### 3.3 Estudio de los efectos de VO(oda) sobre la vía de las ERKs

La vía de las ERKs juega un rol clave en la proliferación y diferenciación celular, sin embargo se ha demostrado que también puede estar implicada en eventos de muerte celular. A fin de un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de VO(oda), se estudió la activación de las enzimas de la vía de las ERKs por el complejo mediante la técnica de Western blot. En la figura 13 se muestra un *immunoblot* representativo de los efectos de VO(oda) sobre la vía de las ERKs en células UMR106. Como puede observarse, la cascada de las ERKs se activó con en forma dosis respuesta con la concentración del complejo. Este efecto se observó también en los osteoblastos MC3T3-E1. Las intensidades relativas de las bandas de ERKs fosforiladas (pERK) con respecto a las no fosforiladas (ERK) fueron determinadas por densitometría y están representadas como porcentaje

con respecto al basal (parte inferior de la figura de la figura 13). Las intensidades relativas de pERK alcanzaron un valor máximo de 275 a 1 mM de complejo en los osteoblastos UMR106, en tanto que en las células no transformadas este máximo fue de 430 para la misma concentración de VO(oda).

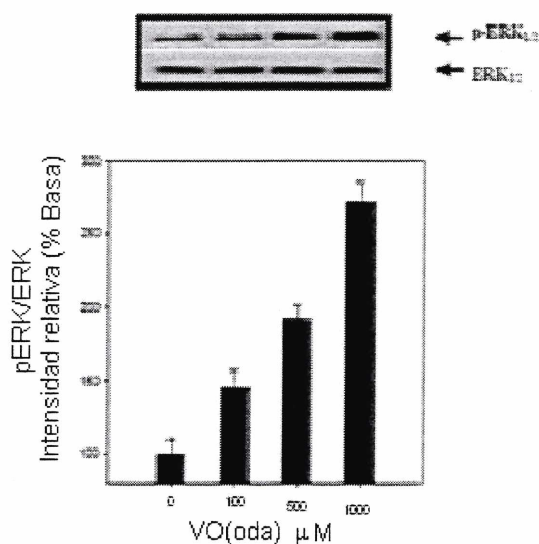


Figura 13. Dosis-respuesta de la fosforilación de las ERKs inducida por VO(oda). Las células UMR106 fueron tratadas con diferentes concentraciones de VO(oda) por 1 h. Las intensidades relativas de estimulación fueron corregidas para ERK total, por densitometría. Los resultados están expresados como % Basal y representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

A continuación se investigó la relación entre la activación de la vía de las ERKs y el estrés oxidativo inducido por VO(oda) en presencia de inhibidores específicos. Para ello, se preincubó las células UMR106 con 1 mM NAC durante 1 h, 10  $\mu$ M wortmanina (inhibidor de la vía de la PI3-K) y 50  $\mu$ M PD98059 (inhibidor específico de las ERKs) durante 30 min previo a la adición de VO(oda). Como puede observarse en la figura 14, la presencia de NAC, PD98059 o wortmanina revirtió la activación de las vías de las ERKs a niveles basales. Estos resultados sugieren fuertemente una estrecha relación entre estrés oxidativo y fosforilación de las ERKs.

Al probar el efecto de los inhibidores sobre la disminución de la toxicidad de VO(oda) sobre la proliferación celular, no se observó ninguna reversión con el empleo de wortmanina y de PD98059 ni con la mezcla de ambos. Por el contrario, el empleo de NAC permitió determinar una inhibición parcial del efecto antiproliferativo de VO(oda) en ambas líneas celulares, demostrando la relevancia del estrés oxidativo en la citotoxicidad de VO(oda).

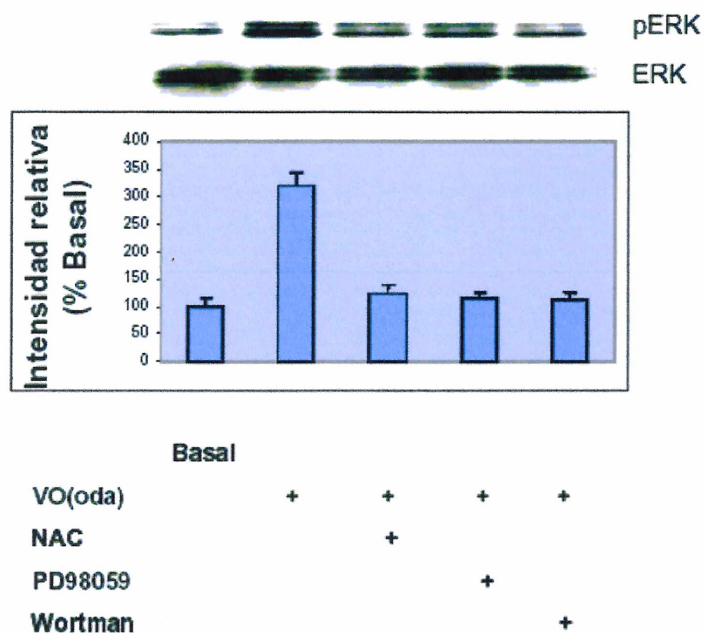


Figura 14. Efectos de VO(oda) e inhibidores en la activación de ERK-1/2. Los osteoblastos fueron preincubados con 1 mM NAC durante 1 h, 50  $\mu$ M de PD98059 y 10  $\mu$ M de wortmanina durante 30 min. Posteriormente, los cultivos se incubaron con 1 mM de VO(oda) por una hora adicional. La intensidad relativa de estimulación para ERK-1/2 fue determinada por densitometría. Los resultados se expresan como % basal y son representativos de tres experimentos independientes.

Para confirmar si el estrés oxidativo era un factor importante en el efecto citotóxico del complejo vía activación de las ERKS, se evaluó la viabilidad celular en presencia de 100  $\mu$ M de VO(oda) suplementado con PD98059 y wortmanina. En este caso, no se observó reversión de la citotoxicidad de VO(oda) (datos no mostrados), por lo que no podemos confirmar la participación de las ERKs en el efecto citotóxico de VO(oda).

## Complejo de vanadio(V) con salicilaldeído semicabazona, V(V)-Salsem

El complejo de vanadio(V) con salicilaldeído semicabazona, V(V)-Salsem (figura 1), ha sido sintetizado y caracterizado por Gambino y col. (2004). Mediante difracción de rayos-X, se determinó que el ion de vanadio(V) tiene en el complejo una geometría de coordinación de pirámide de base cuadrada distorsionada. En la base de la pirámide está coordinado a una molécula de salicilaldeído semicabazona que actúa como un ligando tridentado y a un ligando oxo. La pentacoordinación se completa con otro ligando oxo en el vértice de la pirámide.

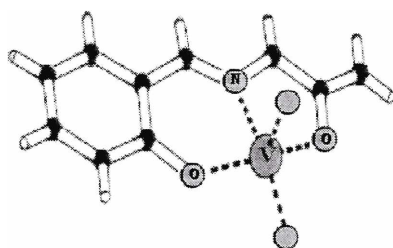


Figura 1. Estructura de V(V)-Salsem.

### 1. Ensayo mitogénico

El compuesto V(V)-Salsem indujo citotoxicidad en la proliferación de ambas líneas osteoblásticas. Los efectos del complejo y del ligando libre fueron estimados por el ensayo de cristal violeta. La figura 2 muestra que a bajas concentraciones el complejo no ejerció ningún efecto. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de V(V)-Salsem hasta 100  $\mu\text{M}$ , se observó una disminución en la viabilidad celular dependiente de la dosis. Este efecto fue estadísticamente significativo después de 10  $\mu\text{M}$  para las células no transformadas MC3T3-E1 y de 25  $\mu\text{M}$  para los osteoblastos tumorales UMR106. A la máxima concentración empleada (100  $\mu\text{M}$ ), el complejo causó una inhibición

respecto al basal de aproximadamente 48 y 38% para los osteoblastos normales y tumorales respectivamente ( $p < 0,001$ ). Además, el ligando libre no mostró ningún efecto en la supervivencia celular en todo el rango de concentraciones testeadas (datos no mostrados por no presentar cambio alguno).

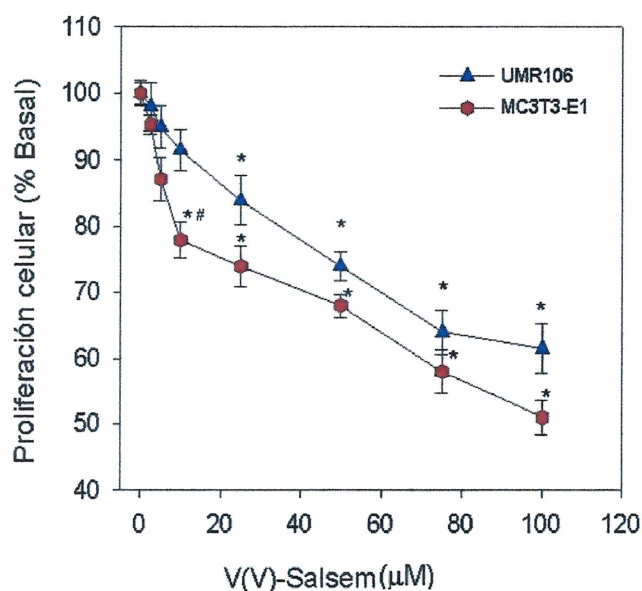


Figura 2. Efecto de V(V)-Salsem sobre la proliferación de MC3T3-E1 y UMR106. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de V(V)-Salsem a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Los resultados se expresan como % basal y representan la media  $\pm$  SEM ( $n=9$ ), \* significativo respecto al basal; # significativo entre líneas celulares a la misma dosis empleada.

## 2. Cambios morfológicos

### 2.1. Tinción con Giemsa

Para una mejor evaluación de los efectos de V(V)-Salsem sobre los osteoblastos en cultivo, se investigó la acción del complejo sobre la morfología de celular de MC3T3-E1 y UMR106. Como se mencionó anteriormente, las células MC3T3-E1 en condiciones basales, muestran un aspecto tipo fibroblasto en cultivo. Las células cuentan con núcleos redondos con 3-5 nucléolos y se conectan con sus vecinas mediante procesos lamelares (figura 3a). Los efectos deletéreos de

V(V)-Salsem, observados a partir de 10  $\mu\text{M}$ , conllevan a una condensación gradual del citoplasma y pérdida de las conexiones entre células (figura 3b). Los preosteoblastos se alargaron al igual que el núcleo y las células adoptaron forma fusiforme. A 100  $\mu\text{M}$  de V(V)-Salsem, las alteraciones morfológicas se acentuaron; las células se volvieron redondas y los núcleos se condensaron notablemente adquiriendo un aspecto picnótico. Además, un importante número de células muertas se despegaron de la monocapa (Figura 3c).

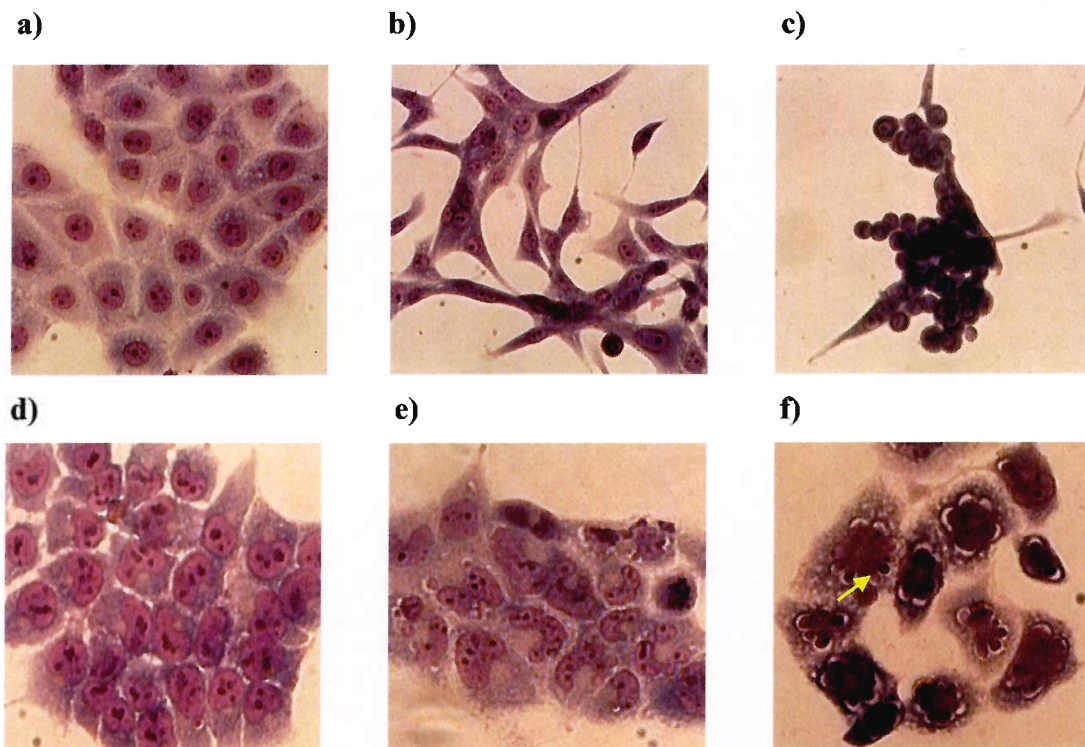


Figura 3. Efecto sobre la morfología celular después del tratamiento de los osteoblastos con V(V)-Salsem. Panel superior, MC3T3-E1, a) basal, b) 10  $\mu\text{M}$ , c) 100  $\mu\text{M}$ . Panel inferior, UMR106, d) basal, e) 25  $\mu\text{M}$ , f) 100  $\mu\text{M}$ . La flecha indica "burbujas" de membrana. Objetivo 40 X.

Las características morfológicas de las células de osteosarcoma UMR106 en condiciones basales o control pueden observarse en la figura 3d. Estas células muestran forma poligonal, núcleos bien teñidos de forma irregular y citoplasma bien definido. A 25  $\mu\text{M}$  de complejo (figura 3e), algunos núcleos muestran transformaciones típicas de apoptosis como "burbujas" de membrana

(ver flecha). Las alteraciones morfológicas de los núcleos fueron más marcadas a medida que se incrementó la concentración hasta 100  $\mu\text{M}$  (Fig 3f).

## **2.2. Alteración de los microfilamentos de actina**

La figura 4 (panel de arriba) presenta la organización de los filamentos de actina en las células MC3T3-E1 sin la adición del complejo (a), tratadas con 10  $\mu\text{M}$  (b) y 100  $\mu\text{M}$  (c). En las células control, los microfilamentos de actina se encuentran regularmente distribuidos. En los osteoblastos expuestos al complejo de vanadio, los filamentos de actina se reordenaron y la morfología celular se alteró a medida que la concentración de V(V)-Salsem se incrementó. A 10  $\mu\text{M}$  puede observarse una incipiente modificación de la disposición de los filamentos. A 100  $\mu\text{M}$  se hizo evidente la completa alteración de la forma celular. La pérdida de citoplasma fue especialmente marcada en esta última concentración lo que provocó el agrupamiento de los núcleos. En la figura 4 (panel inferior) muestra las características de los filamentos de actina en las células control de UMR106 (d). Estas células tienen una disposición de las fibras de actina similar al patrón encontrado en las células MC3T3-E1 bajo condiciones basales. Cuando las células de osteosarcoma fueron expuestas a diferentes concentraciones de V(V)-Salsem, la regularidad de este patrón se alteró de acuerdo a la dosis. Los primeros cambios en los filamentos fueron detectados a una concentración más alta que para los osteoblastos no transformados (25  $\mu\text{M}$ , e). A 100  $\mu\text{M}$  de complejo (f), pudo observarse menor intensidad de tinción de las fibras de algunas células y desensamblaje completo de la red de actina manifestada como un "punteado granular" con fragmentación nuclear en algunas células. La descomposición de las células, condensación nuclear o fragmentación y reducción de la tinción de la actina, las cuales probablemente reflejen el colapso del citoesqueleto, son característicos de apoptosis que se observa en estadios tardíos de este proceso. Estos resultados están en concordancia con las alteraciones morfológicas observadas con la tinción de Giemsa.



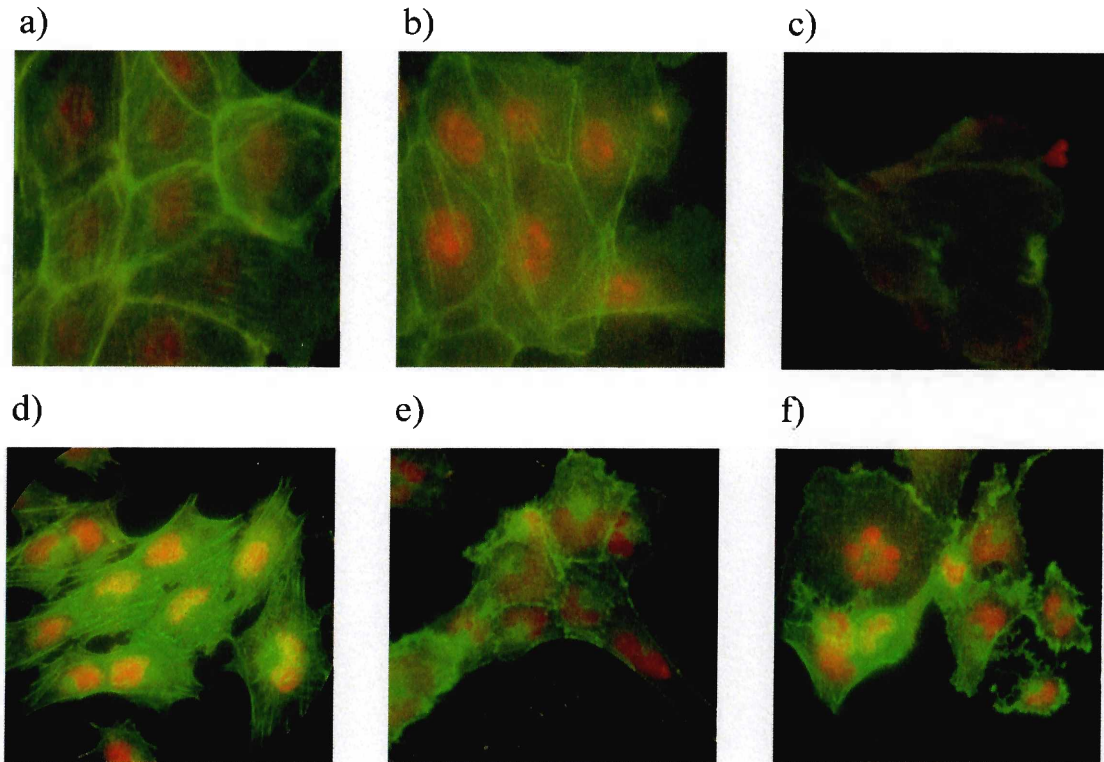


Figura 4. Efectos de V(V)-Salsem sobre los microfilamentos de actina. Panel superior, MC3T3-E1, a) basal b) 10  $\mu\text{M}$  c) 100  $\mu\text{M}$ . Panel inferior, UMR106, d) basal, e) 25  $\mu\text{M}$ , f) 100  $\mu\text{M}$ . Objetivo 100 X.

### 3. Mecanismos de acción

A continuación, para lograr un mejor entendimiento del complejo proceso de citotoxicidad, se investigó el mecanismo de acción de V(V)-Salsem desde el punto de vista molecular mediante la determinación intracelular de ROS, apoptosis e inducción de las formas fosforiladas de la vía de transducción de señales reguladas extracelularmente ERK-1/2.

#### 3.1 Estrés oxidativo

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de ROS en presencia de V(V)-Salsem utilizando la oxidación de DHR 123 al producto fluorescente rodamina. Como se mencionó anteriormente, esta sonda detecta principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Capella 2007). El complejo induce la generación de ROS en ambas líneas celulares. Las diferencias significativas con

respecto al basal pueden observarse a partir de 25  $\mu\text{M}$  y existen diferencias significativas entre ambas líneas celulares a 75  $\mu\text{M}$  de complejo. Cuando se incubaron las células con NAC, los niveles de ROS generados por el complejo disminuyeron significativamente a partir de 75  $\mu\text{M}$  en ambas líneas osteoblásticas (figura 6). Resultados similares se obtuvieron cuando los osteoblastos se preincubaron durante 6 h previas a la adición del complejo con 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de una mezcla de vitaminas E y C para MC3T3-E1 y para UMR106, respectivamente.

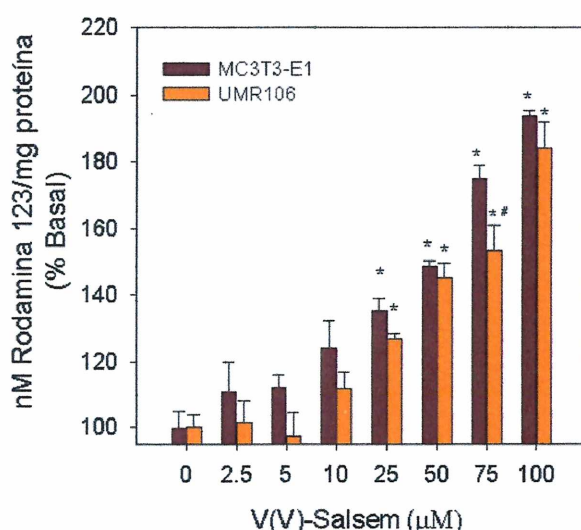


Figura 5. Efectos de V(V)-Salsem sobre la producción de ROS en MC3T3-E1 y UMR106. Los osteoblastos fueron incubados con diferentes concentraciones de complejo durante 24 h. Los valores representan la media  $\pm$  SEM,  $n=6$ , \* significativo respecto al basal, # significativo entre líneas celulares a la misma dosis.

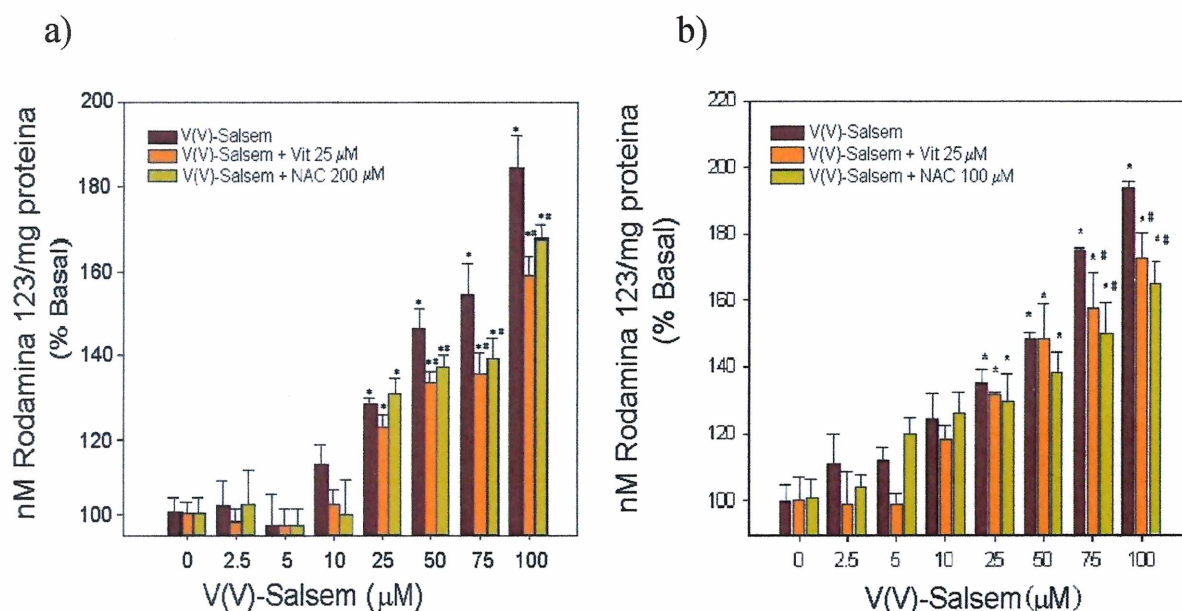


Figura 6. Efectos de V(V)-Salsem en la producción de ROS en presencia de NAC. Las células MC3T3-E1 fueron incubados con 100  $\mu\text{M}$  de NAC más concentraciones del complejo (a). Las células UMR106 fueron incubadas con 200  $\mu\text{M}$  de NAC más diferentes concentraciones de V(V)-Salsem (b). Los valores representan la media  $\pm$  SEM,  $n=6$ , \* significativo con respecto al control, # significativo entre tratamientos a la misma dosis.

Sobre la base que la sonda DHR123 detecta principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se evaluó si efectivamente los osteoblastos eran sensibles a este ROS. Para ello, se incubaron las células con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Tanto MC3T3-E1 como UMR106 fueron afectados por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de una manera dosis respuesta. Además, las células no tumorales resultaron más sensibles a este ROS dado que la primera diferencia significativa pudo ser observada a 5  $\mu\text{M}$  mientras que en las células tumorales ésta se corresponde a 10  $\mu\text{M}$ .

A continuación se llevó a cabo un estudio para investigar los efectos de los secuestrantes de ROS en la proliferación celular. Los resultados pueden observarse en la figura 8. Los secuestrantes inhibieron parcialmente los efectos antiproliferativos de V(V)-Salsem.

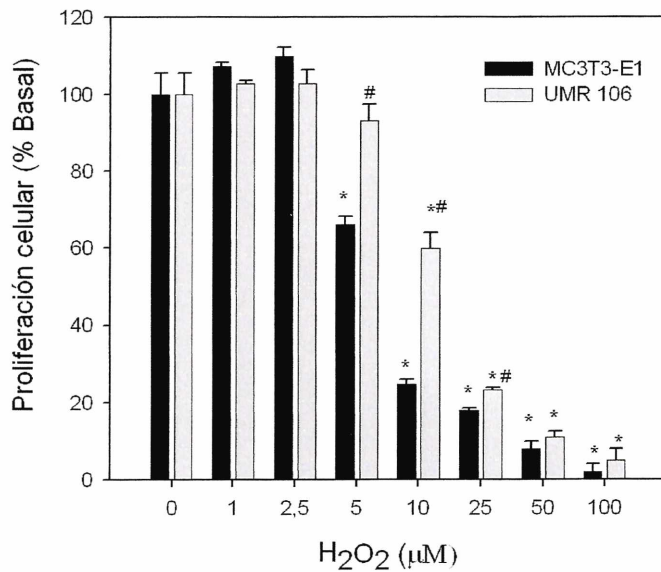


Figura 7. Sensibilidad celular al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las células fueron incubadas con varias concentraciones de peróxido de hidrógeno por 24 h. Los resultados expresan el % basal y representan la media ± SEM, n=6. \* Significativo con respecto al control, # significativo entre líneas celulares a la misma dosis.

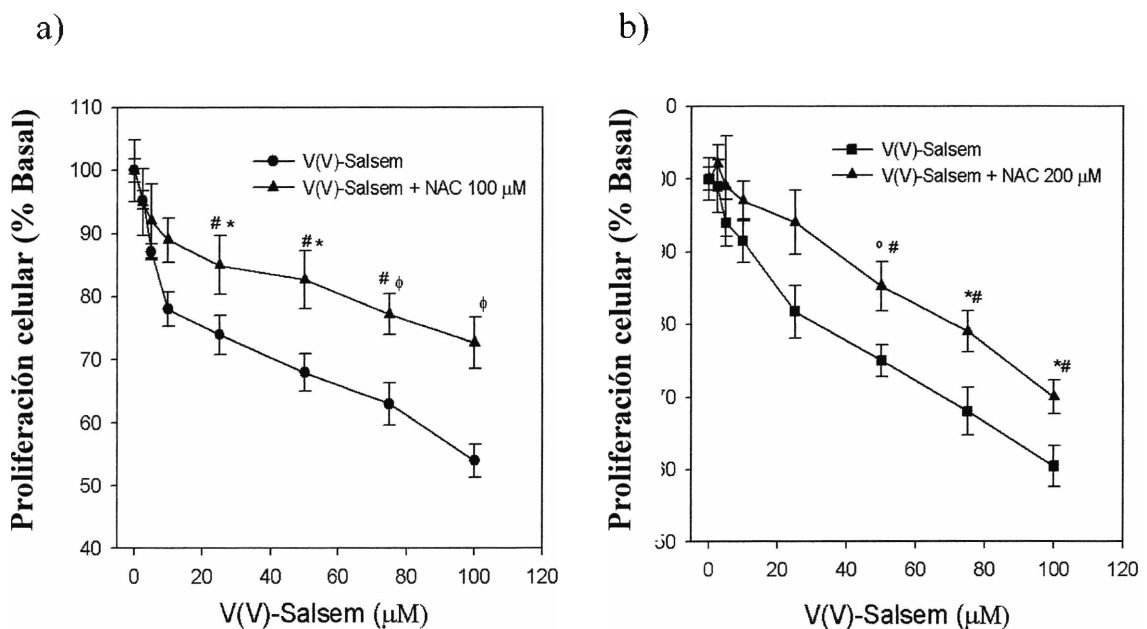


Figura 8. Efectos de V(V)-Salsem y de NAC sobre la proliferación de a) MC3T3-E1 y b) UMR106. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones del complejo más NAC 100 μM para osteoblastos normales y 200 μM para los tumorales. Los resultados se expresan como % basal y representan la media ± SEM, n=6. Para MC3T3-E1, las diferencias significativas son \* p<0,05, φ p<0,002 cuando se lo compara al control, # p<0,05, ° p<0,002 entre tratamientos a la misma dosis empleada. Para UMR106, ° p<0,002, \* p<0,001 con respecto al control, # p<0,05 cuando se compara entre tratamientos a la misma dosis.

### 3.2 Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular potenciado por la presencia de agentes injuriantes. Este proceso genera, principalmente a nivel de membranas, diversas modificaciones en la estructura de las células. Una de las primeras modificaciones que pueden ser definidas es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática. La figura 9 muestra la cuantificación de células apoptóticas determinadas por citometría de flujo en MC3T3-E1 incubadas con diferentes concentraciones de V(V)-Salsem.

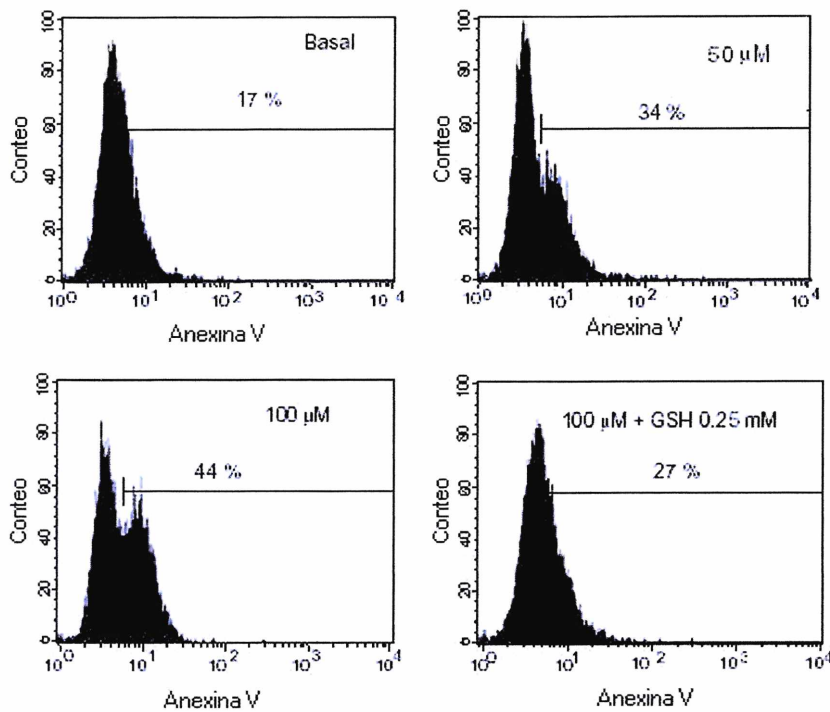


Figura 9. Efectos de V(V)-Salsem en la apoptosis celular de MC3T3-E1 determinada por citometría de flujo mediante Anexina V. Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal), 50 y 100  $\mu$ M de complejo, y con 0,25 mM de GSH más 100  $\mu$ M de V(V)-Salsem. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes. Los números indican el porcentaje de células Annexina V positivas.

Como puede observarse, bajo condiciones basales, el 17 % de las células se encuentran en apoptosis. Este porcentaje se incrementa hasta 34% a 50  $\mu\text{M}$  alcanzando un máximo de 44% a 100  $\mu\text{M}$  de complejo. En el caso de los osteoblastos tumorales (figura 10), se observó un incremento del porcentaje de células apoptóticas desde 14% en condiciones basales hasta 33% en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de V(V)-Salsem. Dado que el GSH es uno de los más importantes secuestrantes de peróxido de hidrógeno, se evaluó su efecto en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de V(V)-Salsem más 0,25 ó 1 mM para MC3T3-E1 y UMR106 respectivamente. Bajo estas condiciones experimentales, se observó un importante descenso del porcentaje de células apoptóticas en ambas líneas osteoblásticas.

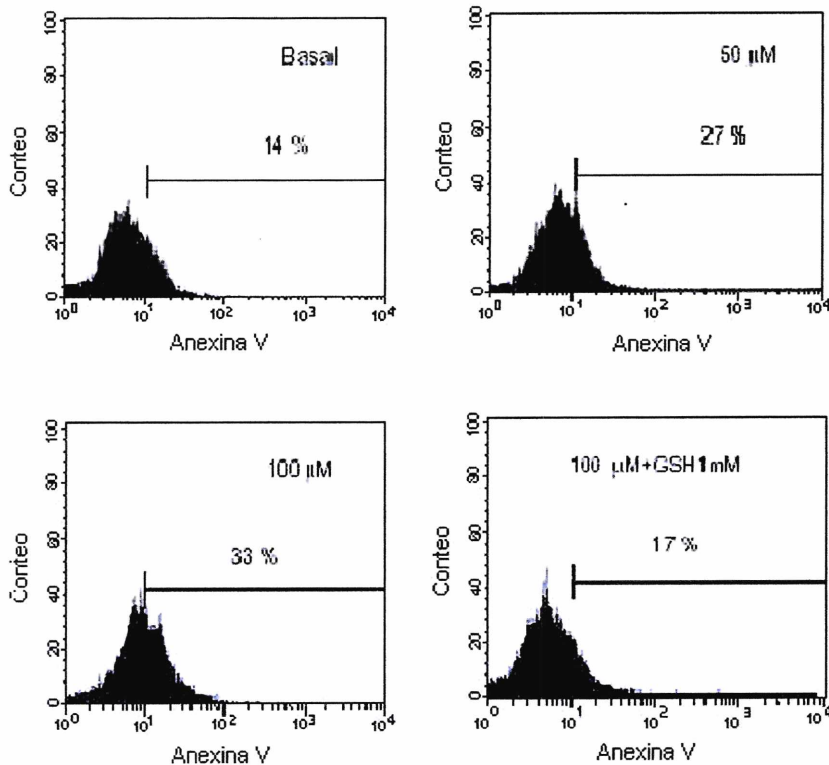


Figura 10. Efectos de V(V)-Salsem en la apoptosis celular de UMR106 determinada por citometría de flujo mediante Anexina V. Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal), 50 y 100  $\mu\text{M}$  de complejo, y con 1 mM de GSH más 100  $\mu\text{M}$  de V(V)-Salsem. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes. Los números indican el porcentaje de células Annexina V positivas.

### 3.3 Activación de las ERKs

La activación de la cascada de las ERKs por V(V)-Salsem fue evaluada por *western blot*. Un *immunoblot* de los efectos del complejo en osteoblastos UMR106 se muestra en la figura 11. Como puede observarse, las ERKs se activan fosforilándose con 1mM de V(V)-Salsem; este efecto se observó también en los osteoblastos no transformados.

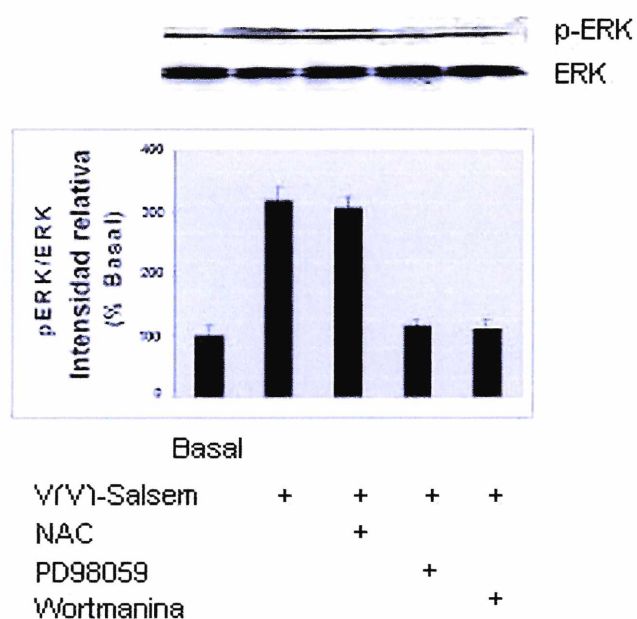


Figura 11. Efectos de V(V)-Salsem e inhibidores en la activación de ERK-1/2. Los osteoblastos fueron preincubados con 1 mM NAC durante 1 h, 50  $\mu$ M de PD98059 y 10  $\mu$ M de wortmanina durante 30 min. Posteriormente, los cultivos se incubaron con 1 mM de V(V)-Salsem por una hora adicional. La intensidad relativa de estimulación para ERK-1/2 fue determinada por densitometría. Los resultados se expresan como % basal y son representativos de tres experimentos independientes.

A fin de explorar con mayor profundidad el mecanismo involucrado en la activación de esta vía de señalización, los osteoblastos también fueron incubados con dos inhibidores de esta vía, PD98059 y wortmanina, previo a la adición de V(V)-Salsem. Por otro lado, para evaluar la participación del estrés oxidativo sobre la activación de las cascadas de las ERKs, se utilizó también la preincubación de los osteoblastos con NAC. La fosforilación inducida por 1 mM del complejo fue totalmente inhibida por PD98059 y parcialmente por wortmanina. Por otro lado, NAC no abrogó la fosforilación de las ERKs (figura 11). Con el fin de determinar si la activación de ERK-1/2 podría estar involucrada en los efectos antiproliferativos del complejo de vanadio, se determinó la proliferación celular en presencia de 100  $\mu$ M de V(V)-Salsem más PD98059. En MC3T3-E1 se observó una inhibición de los efectos antiproliferativos del complejo con 1  $\mu$ M de PD98059 (figura 12).

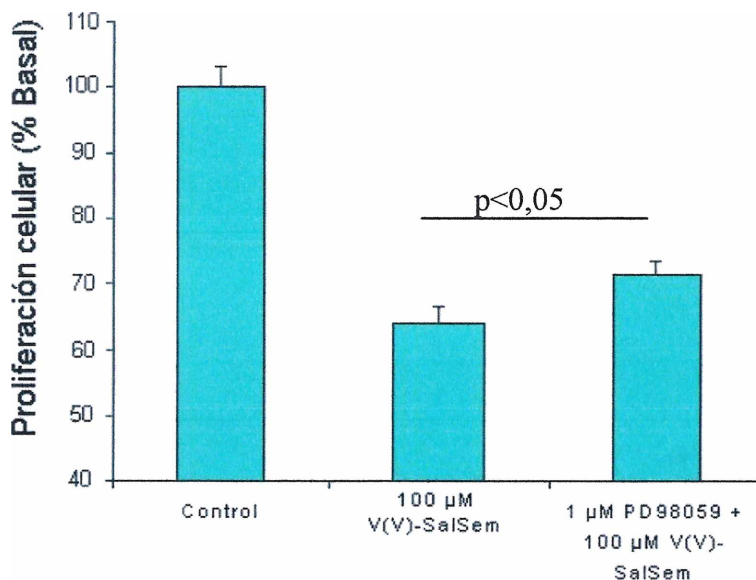


Figura 12. Efectos de V(V)-Salsem sobre la proliferación celular de MC3T3-E1 en presencia de PD98059. Las células fueron incubadas con 1  $\mu$ M de PD98059 durante 30 min previo a la adición de 100  $\mu$ M de complejo. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM, n=6.

Esta inhibición no se observó en UMR106. Por otro lado, la presencia de wortmanina no inhibió los efectos de V(V)-Salsem. En conjunto, estos resultados



indican que la vía de las ERKs se encuentra implicada, al menos en parte, en las acciones antiproliferativas del complejo de V(V).

## Complejo de vanadio(V) con peroxocarbonato, $K_3[VO(O_2)CO_3].H_2O$

Algunos peroxocomplejos de vanadio(V) han mostrado interesante actividad antitumoral en diferentes sistemas (Djordjevic y Wampler 1985; Djordjevic 1995; Baran 1997; Rehder 2008). Dos de las especies más activas fueron las sales de amonio de los aniones  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4-}$  y  $[VO(O_2)_2(C_2O_4)]^{3-}$  (Djordjevic y Wampler 1985). Por otro lado, parece razonable poder regular la actividad de estos peroxocomplejos a través de la variación de los heteroligandos unidos al centro metálico.

Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica y de la actividad biológica de osteoblastos en cultivo de  $K_3[VO(O_2)_2CO_3].H_2O$  se describen a continuación

### 1. Caracterización fisicoquímica

#### 1.1 Estructura cristalina

El compuesto cristaliza en el grupo espacial monoclinico  $C_m$  con  $Z=2$ . El vanadio(V) presenta una coordinación de bipirámide trigonal y el anión carbonato actúa como un ligando bidentado. Como se ve en el esquema de la figura 1, los dos grupos peroxo y uno de los oxígenos del anión carbonato son prácticamente coplanares, generando el plano ecuatorial del anión mientras que el otro oxígeno del carbonato y el grupo oxo ocupan posiciones axiales (Stomberg 1985).

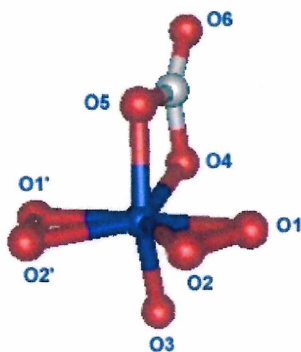


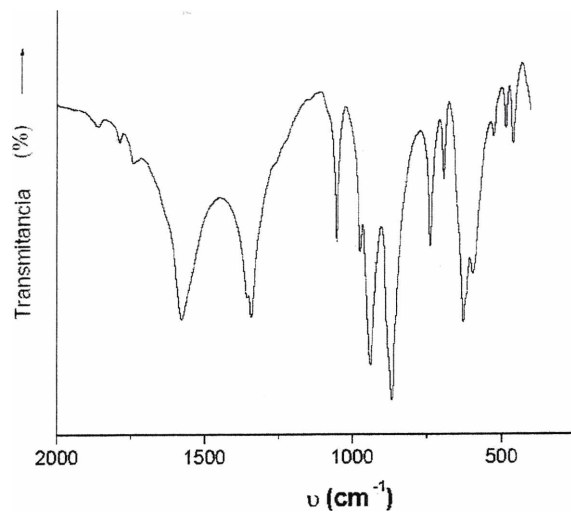
Figura. 1 Estructura esquemática del anión complejo

## 1.2 Espectro electrónico.

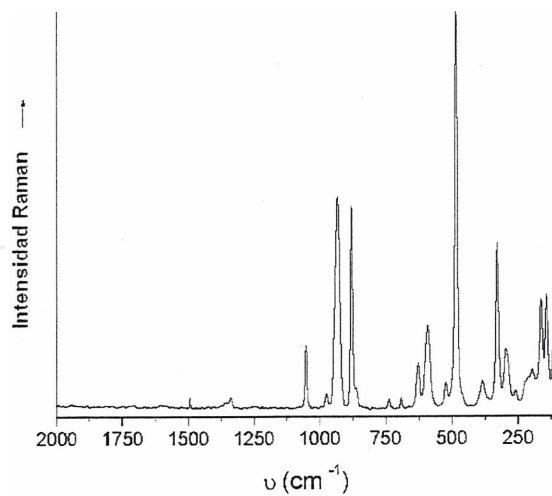
Es característico de oxodiperoxovanadatos (Evans 1957; Tótaró 2002) con una banda muy fuerte en 196 nm ( $\epsilon \sim 10.500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) que muestra un pequeño decaimiento hacia el visible y es, por lo tanto, responsable del color del complejo. Esta banda puede ser asignada a una transferencia de carga desde el grupo oxo al átomo central de vanadio(V). Por comparación, cabe mencionar que para el anión ortovanadato  $\text{VO}_4^{3-}$ , este tipo de bandas de transferencia de carga  $\text{O} \rightarrow \text{V}$  se encuentran entre 200 y 270 nm (Müller y col. 1973). La segunda banda ha sido normalmente asignada a transferencias de carga que involucran los grupos peroxo. Estas transiciones involucran a los orbitales  $\pi^*$  del grupo peroxo y a los orbitales  $d_{xy}$  y  $d_{x^2-y^2}$  del metal central (Tuck y Walters 1963; Baran 1977; Tótaró 2002). Esta "donación  $\pi$ " está favorecida por la alta carga del vanadio (Tuck y Walters 1963) y permite explicar, al menos en parte, el acortamiento observado en las uniones O-O que, en este caso, tiene un valor de 1,467 Å (Stomberg 1985) que usualmente es algo más corta que el valor generalmente observado para esta unión (1,49 Å) (Connor y Ebsworth 1964; Baran 1977).

## 1.3 Espectros FTIR y Raman

Se muestran en las figuras 2 y 3 y las asignaciones de los modos de vibración se pueden observar en la tabla 1. Las mismas fueron realizadas sobre resultados previamente reportados en la literatura para compuestos similares (Fujita y col. 1962; Griffith 1964; Drew y Einstein 1972; Nakamoto 1997).



**Figura 2.** Espectro FTIR de  $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$  entre 2000 y 400  $cm^{-1}$ .



**Figura 3.** Espectro Raman de  $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$  en el rango 2000 a 100  $cm^{-1}$ .

**Tabla 1.** Asignaciones de los espectros vibracionales de  $K_3[VO(O_2)_2CO_3].H_2O$   
(Posición de las bandas en  $cm^{-1}$ ) #)

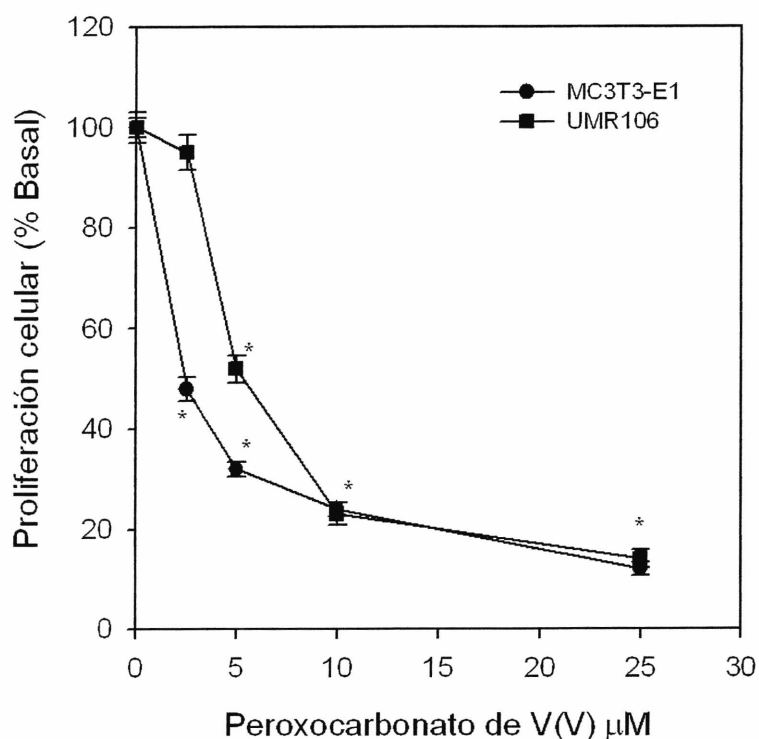
IR	Raman	Asignaciones
3185 mf, a		$\nu(OH)$
1577 mf	1492 md	$\nu(C-O_{II})$
1350 h, 1340 mf	1337 d	$\nu(C-O_I) + \delta(O_I O_{II})$
1050 f	1050 m	$\nu(C-O_I)$
972 d	973 md	
938 f	932 f	$\nu(V=O)$
868 mf	879 f	$\nu(O-O)$
738 f	736 d	$\nu(V-O_I) + \delta_{anillo}$
692 m	692 d	$\delta(O_I CO_{II}) + \nu(C-O_I) +$ $\nu(V-O_I)$
627 mf	628 d	$\nu(V-O_2)$
594 d	592 m	$\nu(V-O_2) (?)$
526 d	523 d	
485 d	484 mf	$\nu(V-O_I)$
461 m		
	384 d	$\nu(V-O_I) + \delta_{anillo}$
	329 f	$\delta(O_{II}-V-O_2)$
	295 m	$\delta(O_{II}-V-O_I)$
	265 md	
	196 d	Modos de red
	162 m, 142 m	

#)  $O_{II}$  se refiere al átomo de O libre del grupo carbonato y  $O_I$  a los átomos de o unidos al metal (Nakamoto1997)

-Intensidad y forma de las bandas: mf: muy fuerte; f: fuerte; m: mediana;  
d: débil; md: muy débil; h: hombro; a: ancha.

## 2. Actividad biológica en cultivos de osteoblastos

En la figura 4 se observa el efecto de diferentes concentraciones del complejo en cultivos de osteoblastos MC3T3-E1 y UMR106..



**Figura 4-** Efecto de  $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$  sobre la proliferación de osteoblastos MC3T3E1 y UMR106. Las células fueron incubadas en medio DMEM sin agregado de suero (basal) o con diferentes concentraciones del complejo a 37 °C por 24 h. Los resultados se expresaron como % basal y representan la media  $\pm$  SEM (n=6), \*p<0.001.

A bajas concentraciones (2,-5  $\mu$ M), el peroxoderivado es más tóxico para los osteoblastos no transformados MC3T3-E1 que para la línea tumoral UMR106. (p<0,001). En el rango de 10-25  $\mu$ M los efectos citotóxicos son similares para ambas líneas osteoblásticas. A 25  $\mu$ M, las células metabólicamente activas son 10-12% del control (condición sin agregado de complejo). Este resultado muestra el peroxocarbonato de V(V) es el complejo más tóxico probado hasta el presente en osteoblastos en cultivo.

*Discusión*

## DISCUSIÓN

Aunque la especulación de que los complejos metálicos podían poseer actividad antitumoral ha existido desde comienzos del siglo XX y la investigación de la acción antitumoral de los compuestos inorgánicos comenzó en 1931, los efectos antineoplásicos de éstos se demostraron por primera vez en 1965 (Kieler y col. 1965) mientras que en 1967, el vanadio, evaluado entre otros metales contra tumores murinos espontáneos, resultó ser inactivo (Djordjevitc 1995). La actividad antitumoral de los metales recibió fuerte atención después del descubrimiento de los efectos antitumorales del *cis*-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cisplatino) y desde entonces, resurgió el interés en los compuestos de vanadio por los descubrimientos de English y col. (1983), en el rol del metal como un inhibidor de la diferenciación terminal de células de eritroleucemia murina y por Thompson y col (1984), en la inhibición, mediante dieta con sulfato de vanadilo, de la carcinogénesis mamaria inducida químicamente. Este trabajo también proveyó evidencia de que este metal traza, podía ser un efectivo agente quimiopreventivo. Además, los efectos farmacológicos de los compuestos de vanadio como sus acciones insulinomiméticas (Tsiani y Fantus 1997; Goldwasser y col. 2000; Peters y col. 2003; Mehdi y Srivastava 2005) y la reducción de la hiperlipidemia e hipertensión, con relación a sus pequeños efectos colaterales adversos (Brichard y Henquin 1995), revelan el potencial terapéutico de estos compuestos. La evidencia acumulada de experimentos llevados a cabo en los últimos 20 años, sugiere que el vanadio podría ser considerado como un representante de una nueva clase de agentes antitumorales metálicos no derivados del platino.

Se ha propuesto que los mecanismos antitumorales ejercidos por los compuestos de vanadio incluyen la inhibición de tirosina fosfatasas, cambios en las proteínas del citoesqueleto, generación de estrés oxidativo y activación de enzimas xenobióticas (Evangelou 2002).

Los ligandos orgánicos e inorgánicos pueden potenciar las propiedades físicoquímicas de los metales a los que se unen y también, en el caso de poseer actividad propia, esa interacción puede modular la acción de los ligandos. Esto es de particular interés puesto que las cualidades deseables de un agente



farmacéutico incluyen estabilidad, biodisponibilidad oral y escasos o nulos efectos colaterales adversos. Muy pocos metales cuentan con mecanismos inherentes de transporte activo o facilitado, salvo aquellos esenciales como cobre, zinc o hierro (Rucker y col. 1994). La esencialidad del vanadio es todavía debatible y no se conoce un mecanismo de transporte activo en células de mamíferos (Nielsen 1997).

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudió el posible mecanismo de citotoxicidad de dos compuestos de vanadio(IV) y dos de V(V). Los ligandos empleados para los compuestos de V(IV) fueron un flavonoide (hesperidina) con propiedades farmacológicas propias y un carboxilado multidentado (oxodiacetato), de interés como modelo de las interacciones con ligandos naturales multidentados propios de la estructura celular. Los ligandos de vanadio(V) incluyeron a otro compuesto multidentado (salicilaldehidosemicarbazona, también con reconocida actividad farmacológica) y un peroxocarbonato, de interés en el caso de los derivados de vanadio ya que a los peroxocompuestos de vanadio se le han atribuido fuertes propiedades insulinoimiméticas.

## **Complejos de vanadio(IV)**

### **VO(hesp)**

La hesperidina es un compuesto correspondiente al grupo de los flavonoides, los cuales son polifenoles sintetizados predominantemente por plantas superiores (Bors y col. 1990; Hertog y col. 1993). Los flavonoides tienen efectos antioxidantes supuestamente debido a su actividad de secuestradores de ROS tales como anión superóxido, radicales hidroxilos y peroxilos, radical NO<sup>•</sup> y peroxonitrito (Kostyuk y col. 2004). Además los flavonoides son efectivos quelantes de metales (Ska-Kordala y col. 2001; Zhang y col. 2005), un proceso interesante en las etapas de transporte y almacenamiento de diversos metales por parte de los seres vivos. Una vez en el interior de un organismo o de una célula, un metal de transición puede iniciar un proceso de generación de radicales libres

(vía la reacción de Fenton), por lo que la quelación de metales podría ser otro mecanismo de actividad antioxidante.

La hesperidina tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas entre otras (Harbone 2000; Garg y col. 2001; Chiba y col. 2003).

La síntesis de complejos de V(IV) con flavonoides y posterior evaluación de sus efectos en sistemas biológicos ha sido reportada por otros autores con resultados alentadores. Por ejemplo, el complejo de vanadio conjugado con quercetina, bis(quercetinato)oxovanadio(IV) (BQOV) mostró actividades hipoglucemiantes y baja toxicidad en células CHO (Shukla y col. 2006). En nuestro laboratorio, se sintetizó un complejo del catión vanadilo(IV) con quercetina de fórmula  $[VO(Quer)_2EtOH]_n$  (QuerVO), que presentó propiedades antitumorales y osteogénicas (Ferrer y col. 2006).

El complejo VO(hesp) fue sintetizado y caracterizado por diferentes métodos físicoquímicos. Los mismos revelaron que el complejo formado entre el catión vanadilo(IV) y el ligando hesperidina mostró interacción del ligando a través de dos grupos O- desprotonados del disacárido y 2 grupos oxhidrilos adicionales. Estos dadores de oxígeno produjeron un campo fuerte alrededor del grupo V=O. El complejo presentó mayor poder antioxidante que el ligando libre, en su poder de dismutación del anión radical superóxido. Sin embargo, cuando se consideró la capacidad secuestrador de radicales DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup> para hesperidina y su complejo se observó que esta propiedad era similar para ambos compuestos, hallándose en el rango de la capacidad antioxidante del flavonoide. En este contexto, la complejación no mejoró el poder antioxidante de hesperidina. Este hecho podría deberse a que la coordinación del catión vanadilo(IV) ocurre sobre la parte rutinosa del ligando, permitiendo que el flavonoide actúe sin modificaciones.

El siguiente paso en el estudio de VO(hesp) fue evaluar su efecto sobre la proliferación de los osteoblastos en cultivo. Como se mencionó anteriormente se emplearon dos líneas celulares, una con fenotipo normal, MC3T3-E1, derivada de calvaria de ratón y otra línea UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata. El complejo inhibió la proliferación en ambas líneas celulares de manera

dependiente de la concentración. En las células MC3T3-E1 esta inhibición ocurrió en todo el rango de concentración empleado mientras que en las células UMR106 fue significativa recién a partir de 25  $\mu\text{M}$ . Estos resultados reflejan diferentes sensibilidades a la acción del complejo según la línea celular. Efectos similares fueron previamente publicados por nuestro grupo en estos modelos osteoblásticos (Cortizo y Etcheverry, 1995; Sálice y col. 1999; Cortizo y col. 2000). A partir de 50  $\mu\text{M}$  en adelante, el complejo VO(hesp) tuvo la misma eficacia de inhibición para ambas líneas celulares. Esto podría reflejar efectos meramente citotóxicos que ya no dependen de la línea celular sino de la concentración de complejo empleada. Por otro lado, en este caso el ligando libre tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de aproximadamente el 10%, demostrando claramente la importancia que juega el ligando en las propiedades del complejo.

Si bien la mayoría de las concentraciones empleadas en este estudio (2,5-100  $\mu\text{M}$ ) son relativamente más altas que las concentraciones séricas que se alcanzan cuando se tratan ratas con 50 mg / día de sulfato de vanadilo (10-15  $\mu\text{M}$ ) (Shechter y col. 1995; Thompson y col. 1998), debido a que el vanadio se acumula principalmente en huesos, puede alcanzar allí concentraciones relativamente más altas (26,4  $\mu\text{g/g}$  de peso seco) (Yuen y col. 1993). Así, las dosis empleadas son consistentes con las concentraciones alcanzables *in vivo* en el microambiente óseo.

La mayoría, sino todas, de las células animales tienen la habilidad de autodestruirse por activación de un programa suicida interno (apoptosis) cuando ya no son necesarias o cuando están seriamente dañadas. La apoptosis es un modo de muerte celular que se caracteriza por una serie de cambios morfológicos específicos. Estos cambios presentan características similares desde células de insectos hasta células de mamíferos, lo que sugiere que la maquinaria molecular de muerte se ha conservado durante la evolución. Si bien esta maquinaria no está claramente caracterizada, los cambios morfológicos que se producen en las células incluyen la condensación del núcleo, agregación de la cromatina en el borde de la membrana nuclear, "burbujas" de membrana sin pérdida de su integridad, clivaje de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos (Steller, 1995). Estos procesos no están asociados con la desintegración de organelas

como las mitocondrias. Los cuerpos apoptóticos son finalmente fagocitados por células adyacentes o macrófagos. La necrosis por otro lado puede ser iniciada por un daño físico o químico como el desbalance osmótico o pérdida de energía.

Al observar las figuras obtenidas al microscopio óptico de las dos líneas celulares teñidas con Giemsa se pudo notar que al incubarlas con concentraciones crecientes de VO(hesp) mostraban alteraciones morfológicas clásicas de apoptosis. En las células MC3T3-E1 las transformaciones más marcadas se hicieron evidentes inicialmente a nivel citoplasmático y ya a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  los cambios se extendieron también al núcleo celular. En las células tumorales, la morfología nuclear se vio seriamente comprometida y en las altas concentraciones también se afectó el compartimento citoplasmático.

En condiciones fisiológicas el vanadio(IV) se oxida a vanadio(V) el cual es más tóxico, por lo que se ha propuesto que este último sería el promotor e inductor de las transformaciones biológicas observadas en cultivos de células de mamíferos (Ding y col. 1999). Otras hipótesis sugieren que las transformaciones son causadas por la generación de estrés oxidativo (Ye y col. 1999). En el caso del complejo VO(hesp) la complejación no aumentó las propiedades secuestrador de radicales libres del ligando sin complejar, por lo que es probable que el estrés oxidativo esté al menos parcialmente implicado en los efectos de citotoxicidad.

### **VO(oda)**

Los ligandos fuertemente quelantes son muy importantes en medio acuoso porque ofrecen la oportunidad de atrapar diferentes especies metálicas y favorecer su ingreso, utilización y almacenamiento en los seres vivos (Harding et al, 1993). Este proceso se torna particularmente interesante en sistemas vivos, donde distintos metales son captados, transportados y almacenados por compuestos de bajo peso molecular como los ligandos multidentados dadores de oxígeno mediante grupos funcionales tales como carboxilatos, hidroxamatos y catecolatos (Lippard, 1994; Costas y col. 2004). Un ejemplo de este tipo de

ligandos, que sirve como modelo para el estudio de interacciones con metales, es el oxodiacetato (oda).

Cuando se evaluó el efecto de VO(oda) sobre la proliferación celular de los osteoblastos mediante el ensayo cristal violeta, se observó un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis. Este efecto fue mayor en las células MC3T3-E1 que en los osteoblastos tumorales UMR106.

La citotoxicidad de VO(oda) fue también investigada mediante el ensayo del rojo neutro. Esta técnica es utilizada para medir el crecimiento de una población de células en cultivo: las células viables captan el RN y lo transportan al interior de los lisosomas. La captación, transporte y almacenamiento del RN requiere energía así como estructuras celulares y lisosomales intactas. Los resultados muestran claramente un efecto citotóxico de VO(oda) en una forma dependiente de la concentración del complejo en ambas líneas celulares. En concordancia con estos resultados, una disminución de la viabilidad celular inducida por sulfato de vanadilo fue previamente reportada en líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas (Holko y col. 2008). En nuestro caso, a bajas dosis (5 y 10  $\mu\text{M}$ ), el ensayo de RN mostró un incremento en la captación del colorante por los lisosomas. Este comportamiento puede ser atribuido a artefactos de técnica causados por vacuolización del citoplasma tal como fue reportado en un modelo de células RTgill-W1 (Dayeh y col. 2009) o por un hinchamiento lisosomal producido por sustancias débilmente básicas (Ohkuma y Poole, 1981) o por sustancias osmóticamente activas tales como los polioles (Olivier y col. 1995). Pero, el incremento observado en la captación del rojo neutro a bajas dosis del complejo puede deberse al fenómeno de hormesis que consiste en el efecto estimulador asociado a bajas dosis de una sustancia potencialmente tóxica o al estrés (Lefcort y col. 2008). Un efecto similar para compuestos de vanadio, cobre y otros metales ha sido reportado también por otros autores (Stebbing 2002; Schmidt y col. 2004; Perez-Benito 2006)

Por otro lado, el complejo indujo transformaciones morfológicas típicas de apoptosis en ambas líneas de osteoblastos como pudo determinarse por tinción y observación al microscopio óptico.

Las alteraciones del citoesqueleto son un buen parámetro para estudiar la toxicidad de diferentes drogas. Se ha sugerido que la citotoxicidad del vanadio (IV) y del vanadio (V) puede ser la responsable de la destrucción de las fibras de actina, uniones celulares y adhesiones focales (Luber y col. 2000; Yang y col. 2004). La actina es una de las proteínas más altamente conservadas a lo largo del proceso evolutivo y la más abundante en todas las células eucariotas. Los microfilamentos de actina son uno de los principales componentes del citoesqueleto junto con los microtúbulos y los filamentos intermedios. Aparte de su rol estructural de mantener la forma de la célula, la actina está implicada en diversos procesos celulares tales como motilidad, formación del anillo contráctil durante la citocinesis, movimiento de organelas (Grolig 1990) y transducción de señales (Stossel 1989).

Los cambios en la organización del citoesqueleto generan importantes transformaciones malignas en diferentes tipos celulares (Ben-Ze'ev 1985; Hansell 1995). Éstos podrían deberse a cambios en los niveles de actina y a modificaciones del estado de su polimerización, indicando una alteración del equilibrio entre actina ensamblada y desensamblada. La desaparición de fibras de estrés, observada en muchos tipos celulares puede ser resultado de un defecto en las agregaciones de los microfilamentos en "paquetes", más que de la cantidad de estos microfilamentos (Osin'ska-Kro'licka y col. 2004)

Cuando se evaluaron los efectos de VO(oda) sobre la red de los filamentos de actina, se observó que el complejo indujo disrupción de las fibras de una manera dependiente de la dosis, con una mayor alteración en osteoblastos MC3T3-E1 que en UMR106. El mecanismo de esta disrupción no fue establecido en forma directa, pero probablemente sea consecuencia de la generación del estrés oxidativo similar a lo sugerido para otros complejos de V(IV) (Yang y col. 2004) y como se desprende también de nuestras investigaciones sobre la generación de especies reactivas y las alteraciones en el status redox de los osteoblastos inducidos por VO(oda), los que se discuten más adelante. Estos cambios concuerdan a su vez con las alteraciones morfológicas evidenciadas mediante la tinción de Giemsa.

Un daño, desde medio a severo, no es suficiente para matar las células aún cuando éstas sean especializadas. Sin embargo, si pierden una función vital para la supervivencia, las células pueden morir. Mucho se ha debatido sobre el “punto de no retorno” bioquímico para las células dañadas. Pareciera que el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial es un buen marcador. Este evento representa la transición desde una célula que puede repararse y recuperarse a una célula que progresará inexorablemente hacia la muerte. Lamentablemente no existe un correlato morfológico de este estadio bajo microscopía de luz (Walling 2002). Sin embargo, una estrategia para determinar el punto de daño irreversible causado o inducido por un compuesto exógeno es someter a las células a la acción del compuesto, luego eliminar el compuesto del medio e incubar las células en condiciones ideales de crecimiento. En el caso de VO(oda), este punto de no retorno; bajo las condiciones antes descritas, se ubica a 25  $\mu\text{M}$  en ambas líneas celulares. Más aún, después del reemplazo del medio de cultivo con VO(oda) por uno libre del complejo suplementado con SBF, se observó una acentuación de los efectos deletéreos lo que permitió descartar efectos citostáticos. Efectos tóxicos irreversibles se presentaron también en cultivos de células osteogénicas de médula ósea sometidas a la acción de iones componentes de diversas aleaciones utilizadas en implantes. Así, se vio que el  $\text{Cr}^{6+}$  fue fuertemente tóxico, los iones  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , y  $\text{Ni}^{2+}$  fueron moderadamente citotóxicos en tanto que los iones  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{V}^{5+}$ , y  $\text{Mn}^{2+}$  fueron mínimamente tóxicos pero irreversibles y se iniciaron tempranamente en la incubación (Puleo y Huh 2004)

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes mecanismos para explicar los efectos citotóxicos del vanadio. Entre ellos, se destacan la generación de estrés oxidativo e inducción de apoptosis (Zhang et. al, 2001; D’Cruz y Uckun, 2002). Se ha propuesto que el vanadio puede inducir la formación de ROS en sistemas biológicos a través de: 1) reacciones tipo Fenton 2) bio-reducción del vanadato mediado por GSH, flavoenzimas o NADPH oxidasas; 3) promoción indirecta de la producción de ROS, probablemente mediante interacción con las mitocondrias (Gándara y col. 2005). Existe evidencia de que el V(IV), pero no el V(V) *in vitro* es capaz de movilizar hierro desde la ferritina, lo cual es una fuente

para las reacciones oxidativas en sistemas biológicos. La liberación del hierro puede ser prevenida en presencia de excesos de glutatión o vanadato relativos a la concentración de vanadilo (Evangelou 2002). El vanadilo, pero no el vanadato, promueve la peroxidación de fosfolípidos en los peroxisomas (Monteiro y col. 1991).

Por el hecho de que la generación de ROS esté implicada en el mecanismo de citotoxicidad del vanadio, surge la pregunta de qué tipo de ROS podría mediar estos efectos. El vanadilo(IV) en presencia de  $H_2O_2$  genera radicales hidroxilos en la hidrólisis de ácidos grasos catalizada por el metal y también radicales hidroperóxidos, los cuales a su vez inician la formación de dienos conjugados durante la lipoperoxidación (Keller y col. 1988; Byckowski y Kulkarni 1991; Trudel y col. 1991). En neutrófilos humanos, el vanadilo compite efectivamente con la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el peróxido de hidrógeno para promover la formación de  $OH^\bullet$  (Fickl et al, 2005).

Existen diferentes sondas fluorescentes para determinar los niveles de ROS intracelulares, entre ellas se encuentra la sonda DHR123 que se asocia a las mitocondrias y detecta diferentes ROS, pero principalmente  $H_2O_2$  (Capella 2007; Quin y col. 2008). Los resultados obtenidos mediante la oxidación de DHR 123 en presencia de diferentes concentraciones de VO(oda) mostraron un incremento en las células de la concentración de rodamina123 que fue dependiente de la dosis del complejo. Además, se encontraron diferencias significativas según la línea celular. VO(oda) fue más efectivo para incrementar los niveles de ROS en MC3T3-E1 que en UMR106, lo cual se correlaciona con el efecto antiproliferativo observado en ambas líneas celulares, que ocurrió con mayor intensidad en los osteoblastos no transformados. Estos resultados son similares a los previamente obtenidos en nuestro laboratorio con vanadato y vanadilo no complejados para los osteoblastos en cultivo (Cortizo y col. 2000), al igual que en macrófagos en cultivo (Molinuevo y col. 2005). La generación de ROS fue inhibida parcialmente en ambas líneas celulares por NAC, un secuestrador de radicales libres y precursor de la síntesis de glutatión (Issels y col. 1988; Aruoma y col. 1989). Este efecto también se vio reflejado en los ensayos de proliferación celular en los que NAC mostró una inhibición parcial de



los efectos antiproliferativos del complejo. Sin embargo, en los estudios de proliferación en presencia de GSH y VO(oda), GSH inhibió totalmente el efecto antiproliferativo, en MC3T3-E1 mostrando un rol preponderante entre las defensas propias de las células contra las injurias del estrés oxidativo. Resultados similares fueron obtenidos por Capella y col. 2007. La diferencia observada entre antioxidantes podría deberse a que el GSH tiene mayor capacidad antioxidante que NAC ya que el GSH es la molécula activa mientras que NAC es un precursor de ésta. Por otra parte, el GSH, además de su acción antioxidante, puede regular el estado redox intracelular ayudando a mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y prevenir así la oxidación en residuos de cisteínas que ocurre bajo estrés oxidativo (Lu y Cederbaum 2007).

Una generación sostenida de ROS usualmente produce un desbalance en el estado redox intracelular. En este proceso, el glutatión juega un papel fundamental. Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tiol se debe al átomo de azufre que puede fácilmente acomodar la pérdida de un electrón (Karoui y col. 1996). Los radicales tiol que se generan pueden luego dimerizarse para formar GSSG. Este glutatión oxidado puede acumularse en el interior celular por lo que la proporción GSH/GSSG es un buen indicador del estrés oxidativo (Hwang y col. 1992; Giovannini y col. 2008).

Las principales funciones del glutatión contra el estrés oxidativo son: 1) el glutatión es un cofactor de diferentes enzimas detoxificantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatióntransferasa y otras; 2) GSH participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; 3) GSH sustrae directamente radicales hidroxilos y oxígeno singlete, detoxificando peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos por la acción catalítica de la glutatión peroxidasa; 4) regenera antioxidantes como la vitamina C a su forma activa vía la reducción del semidehidroascorbato a ascorbato. La capacidad del glutatión de regenerar los antioxidantes más importantes está ligada con el estado redox de la dupla 2GSH/GSSG (Jones y col. 2000), que a su vez, tiene un alto impacto en todo el ambiente redox celular. Los valores del potencial de reducción medio de las células para la dupla 2GSH /GSSG dependen del ambiente redox en el cual la dupla está funcionando. Por ejemplo, el potencial redox en el retículo

endoplásmico es  $-180$  mV, mientras que en citosol es de  $-232$  mV (Jones y col. 2000). Así, la compartimentalización del GSH está ligada con el diferente ambiente redox en estos compartimentos. Para la dupla 2GSH/GSSG, el potencial de reducción es dependiente no sólo de la proporción de GSH/GSSG, sino también de la concentración total de GSH. Esto significa que cuanto más alto nivel de GSH tenga una célula, mayor será el potencial de reducción y por ende, mayor será su capacidad antioxidante. La diferencia en los niveles de GSH determinada entre MC3T3-E1 y UMR106 podría explicar por qué las células tumorales son más resistentes al daño oxidativo generado por VO(oda). Un incremento en la concentración de GSH cambia el potencial de reducción medio de la célula hacia valores más altos. El contenido intracelular de glutatión se debe a factores ambientales y es una función del balance entre su uso y su síntesis. Se ha sugerido que la exposición a ROS o RNS puede incrementar los niveles de GSH estimulando su síntesis (Kurozumi y col. 2005) como una forma de adaptación al estrés. Sin embargo también existe evidencia de que los ROS deplecionan los niveles de GSH en diferentes tipos celulares (Lu y Cederbaum 2007; Giovannini y col. 2008). En MC3T3-E1 y UMR106, distintas concentraciones de VO(oda) disminuyeron los niveles de GSH. Por otro lado, el potencial redox del glutatión es un parámetro más relevante para el estado redox celular que los niveles de GSH por sí mismo. En presencia de VO(oda) la proporción GSH/GSSG disminuye de manera dependiente de la dosis en ambas líneas celulares lo que claramente indica inducción de estrés oxidativo. Efectos similares fueron reportados por Giovannini y col. 2008 en células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2.

Una estrategia para el estudio de las consecuencias de la depleción de glutatión en distintos sistemas celulares es inhibir su síntesis. Un agente inhibidor ampliamente usado es el BSO, el cual como se mencionó anteriormente inhibe la síntesis de novo de GSH por inactivación de una enzima limitante de la velocidad, la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa. Las células MC3T3-E1 fueron incubadas con  $10$   $\mu$ M de BSO por una noche para deplecionar los niveles de GSH. La depleción de GSH potenció la citotoxicidad del complejo posiblemente porque al disminuir los niveles de GSH, disminuyó también la capacidad antioxidante de las células. Experimentos similares realizados con los osteoblastos tumorales mostraron que

para obtener en esta línea un nivel equivalente de inhibición de la proliferación asociado a la inhibición de la síntesis de GSH, se requirió una concentración cuatro veces mayor que en los osteoblastos no transformados. En conjunto, estos resultados indican que las células tumorales están más protegidas que las normales contra el estrés oxidativo y el desbalance del estado redox celular. Además, en la línea tumoral, la preincubación de las células con 1 mM de GSH (una concentración tres veces menor que la empleada con los osteoblastos normales) fue suficiente para lograr una buena disminución de los efectos antiproliferativos de VO(oda), siendo este resultado posiblemente debido a la mayor concentración basal de GSH en las células UMR106 en comparación con los osteoblastos normales. Resultados similares fueron obtenidos por Capella y col. (2002) en células Ma104 tratadas con vanadato. Estos resultados confirman que el mecanismo de acción de VO(oda) es a través de la generación de estrés oxidativo que posiblemente lleva a una modificación del equilibrio 2GSH/GSSG y del estado redox celular.

La mitocondria es una de las organelas más importantes en la regulación de la muerte celular por apoptosis (Herr y Debatin, 2001; Grebenova y col. 2003). Las mitocondrias de las células normales bombean  $H^+$  desde la matriz hacia el exterior de membrana interna durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. De tal forma, puede generarse un gradiente electroquímico entre el interior y exterior de la membrana mitocondrial, debido a un gradiente de concentración de  $H^+$  que genera un potencial de transmembrana. Este potencial de membrana mantiene la integridad y función de las mitocondrias. Cuando un estímulo genera cambios en la mitocondria como disipación del potencial de membrana, disminución del ATP producido o la reducción de la transcripción y transducción, esos eventos pueden resultar en apoptosis o necrosis (Mayer y Oberbauer 2003). Existen observaciones previas que indican que el vanadio se acumula en las mitocondrias intactas, específicamente en el espacio intermembrana, bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo c1 y el citocromo c sin afectar significativamente la fosforilación oxidativa. Por otro lado, cuando las mitocondrias están dañadas, el vanadio puede entrar en un ciclo redox que puede generar radicales libres (Byzckowski y Kulkarni 1998).

En la mayoría de las células, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial (PMM) usualmente precede a la degradación del ADN (Marchetti y col. 1996). Los cambios en la función de la membrana interna de la mitocondria incrementan la permeabilidad de la membrana externa (la mitocondria es una organela de doble membrana con distintas permeabilidades) promoviendo la liberación de factores apoptogénicos como el citocromo c (Kim y col. 2002). Se han propuesto diversos métodos para estimar las modificaciones del PMM, uno de ellos es el empleo de sondas lipofílicas (Darzynkiewicz y col. 1982) las cuales, de acuerdo a la ecuación de Nerst son secuestradas en la matriz mitocondrial. Entre éstas, la rodamina 123 es una de las más usadas por su baja toxicidad (Lopez-Mediavilla y col. 1995).

Se ha demostrado que el vanadato induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediada por la generación de  $H_2O_2$  en células epidermales de ratón promoviendo la apoptosis (Huang y col. 2000). Resultados similares fueron reportados por D´Cruz y col. (1998) y D´Cruz y col. (1999) para diferentes complejos de vanadio(IV) con ligandos orgánicos (vanadocenos) que indujeron apoptosis en células germinales. En los osteoblastos MC3T3-E1 y UMR06 se encontró que el tratamiento con distintas concentraciones de VO(oda) también indujo la pérdida del PMM mientras que la presencia de GSH inhibió totalmente esa pérdida en MC3T3-E1.

Hasta aquí, estos resultados en conjunto, indican que VO(oda) ejerce su actividad citotóxica mediante la alteración de propiedades fundamentales de las mitocondrias a través de la generación de ROS *upstream* del sistema regulatorio del PMM.

Por otra parte, otro mecanismo posiblemente involucrado en los efectos deletéreos de un complejo metálico esté relacionado con la activación y los tiempos de activación de la vía de transducción de señales intracelulares de las MAPK. Las MAPKs incluyen cuatro subfamilias ERKs, JNKs, p38-MAPK y la gran MAPK-1 (BMAPK-1), de las cuales las mejores caracterizadas son las tres primeras. Las mismas pueden ser activadas por una variedad de estímulos. Cada subfamilia de MAPK se compone de tres módulos de quinasas que actúan secuencialmente, MEKK, MEK y MAPK, activando a la siguiente vía mediante

fosforilación. Sus sustratos se localizan en el citoplasma y en el núcleo e incluyen a otras quinasas, factores de transcripción, fosfatasas y proteínas del citoesqueleto (Kefaloyianni y col. 2006).

Se ha propuesto que los compuestos de vanadio pueden activar muchas proteínas efectoras claves de las vías de señalización como AP-1, MEK-1, ERK, JNK, PI3-K y NF- $\kappa$ B. La activación de estas vías está también relacionada con la formación de ROS y daño al ADN (Chen y col. 1999; Fu y col. 2008).

Las ERK-1/2 son proteínas de 42 y 44 kDa que se expresan ubicuamente en los tejidos. La vía de las ERKs es clásicamente reconocida por jugar un rol fundamental en la proliferación y diferenciación (Wang y col. 2000). Sin embargo, existe evidencia de que una activación excesiva de ERK-1/2 puede mediar el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Blazquez y col. 2000; Barrio y col. 2003).

La mayoría de los investigadores concuerdan en que la activación de las ERKs por el vanadio tiene lugar a través de la inhibición de tirosina fosfatasas las cuales pueden estar ubicadas en etapas previas a la fosforilación de las ERKs activando la vía ras/ERKs, o ser fosfatasas que actúan directamente sobre las ERK fosforiladas. Se proponen dos mecanismos fundamentales para la inhibición de las PTPasas por los compuestos de vanadio, uno es a través de la generación de ROS y el otro a través de la inhibición directa de la actividad enzimática de las PTPasas por el vanadio ya que es un análogo estructural del fosfato que puede actuar como un inhibidor competitivo de PTPasas (Wang y col. 2003). En particular, se ha demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede modificar proteínas claves en el proceso de transducción de señales. Las reacciones biológicas redox catalizadas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involucran la oxidación de residuos de cisteína de proteínas lo que puede afectar la función de las mismas. La fosforilación de restos de tirosina en proteínas está gobernada por las actividades opuestas de las proteínas quinasas y las proteína tirosina fosfatasas (PTPasas). La familia de las PTPasas posee un motivo común en el sitio activo Cys-X-X-X-X-X-Arg (donde X es cualquier aminoácido). Como resultado de la presencia de una invariable Arg, el sitio catalítico de la Cys posee un bajo pK<sub>a</sub> (donde K<sub>a</sub> es la constante de disociación ácida) y existe como anión tiolato con aumentada sensibilidad a la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La oxidación de la Cys esencial suprime la actividad fosfatasa que puede

recuperarse por acción de tioles celulares. La inactivación oxidativa de las PTPasas es dependiente de la producción de  $H_2O_2$ . En células estimuladas por  $TNF-\alpha$  el  $H_2O_2$  inactiva a las fosfatasa de las MAPK. Esto a su vez resulta en la activación sostenida de la quinasa N terminal de c-Jun, una subfamilia de las MAPK, lo que a su vez inicia una serie de respuestas celulares específicas.

El  $H_2O_2$  también parece promover la fosforilación en restos de tirosina por activación de proteínas quinasas. Por ejemplo, luego de la adhesión de las células a la matriz extracelular, y asociada con la generación de  $H_2O_2$ , la tirosina quinasa Src se oxida en dos residuos Cys y así es activada (Giannoni y col. 2005; Rhee 2006)

VO(oda) indujo la fosforilación de ERK-1/2 en ambas líneas osteoblásticas en forma dosis respuesta. Resultados similares fueron obtenidos con el complejo de V(IV) bis-acetilacetonato de vanadilo ( $[VO(acac)_2]$ ) en células de hepatoma HepG2 en las cuales inducía el arresto del ciclo celular (Fu y col. 2008).

Tanto el PD98059, inhibidor de MEK, como la wortmanina, inhibidor de la PI3-K, bloquearon totalmente la activación de las ERKs por 1 mM de VO(oda). Estos datos sugieren que al menos hay dos vías de transducción de señales involucradas en la activación de las ERKs por el complejo VO(oda): la vía de la PI3-K y la vía de las MEKs. Además el estrés oxidativo generado por el complejo también está implicado en la fosforilación o activación de las ERKs en ambas líneas celulares. Esto pudo ser demostrado mediante el empleo de NAC que no sólo revirtió la fosforilación de las ERKs sino que además, como se mencionó anteriormente, produjo un mejoramiento en la actividad antiproliferativa de VO(oda). Resultados similares se encontraron en nuestro laboratorio para otros complejos de vanadio(IV) (Barrio y col. 2006)

A pesar de los resultados obtenidos, el uso de los inhibidores de las vías de señalización (PD98059 y wortmanina) no inhibió los efectos antiproliferativos de VO(oda). Esto podría explicarse a través de un efecto directo de los ROS en la activación de las ERKs, tal como fue previamente reportado (Rhee 2006).

Un modelo del posible mecanismo por el cual VO(oda) ejerce sus efectos citotóxicos en los osteoblastos se muestra en la figura A. Según este modelo, VO(oda) conduce a la apoptosis utilizando la vía mitocondrial. Una vez que el

complejo ingresa a la célula, induce la generación de  $H_2O_2$  y posiblemente otro tipo de ROS principalmente en la mitocondria. El aumento en los niveles de ROS sería la causa tanto de la depleción de los niveles de GSH, alterando el balance redox intracelular (GSH:GSSG) como del desensamblaje de las fibras de actina. La consecuencia de este desbalance provoca la pérdida de PMM el cual representaría un “punto de no retorno” que conduce las células a la muerte por apoptosis. Por otro lado, la generación de ROS induce la fosforilación de las ERKs mediante un mecanismo oxidativo sin utilizar las vías MEK y PI3K.

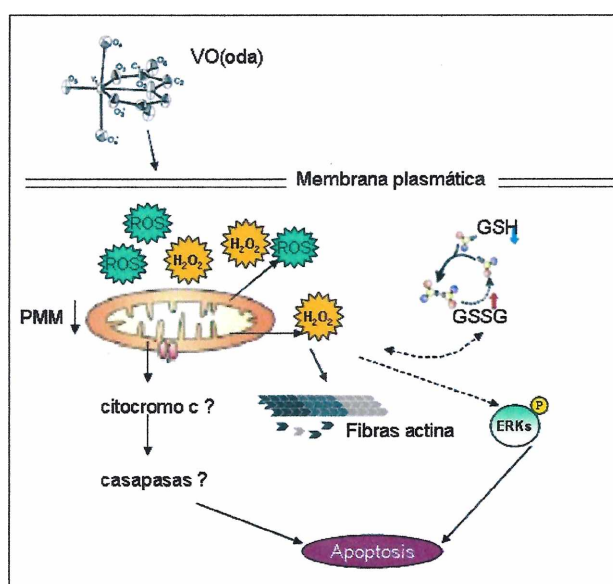


Figura A. Posible mecanismo de citotoxicidad de VO(oda).

## Compuestos de Vanadio(V)

### V(V)-Salsem

Las semicarbazonas y tiosemicarbazonas son compuestos versátiles de considerable interés por su química y actividades biológicas y farmacológicas tales como efectos antitumorales, antibacterianos, antivirales y antimaláricos (Beraldo y Gambino 2004). Las actividades biológicas de estos ligandos están relacionadas con su habilidad para formar quelatos con metales. Aunque algunos

complejos de vanadio-tiosemicarbazonas han sido sintetizados y caracterizados, existen pocos ejemplos de vanadio-semicarbazonas (Gresser 1990).

El complejo por nosotros estudiados, V(V)-Salsem fue reportado previamente con propiedades insulinoiméticas en adipocitos de ratas (Gambino y col. 2004). Además, otros efectos farmacológicos interesantes han sido publicados para derivados de vanadio con semicarbazonas en diferentes líneas celulares (Noblía y col. 2004; Noblía y col. 2005). En estos estudios, V(V)-Salsem (100  $\mu$ M) tuvo un gran efecto citotóxico en células TK-10 (carcinoma de riñón humano), mientras que otras líneas celulares fueron menos afectadas por este complejo (Noblía y col. 2005). En nuestros estudios con osteoblastos MC3T3-E1 y UMR106, V(V)-Salsem mostró efectos antiproliferativos.

Cuando se evaluó la morfología celular en presencia de V(V)-Salsem se encontró que el complejo indujo alteraciones típicas de apoptosis similares a las descritas por VO(hesp) y VO(oda), lo cual apoya la hipótesis de que la maquinaria molecular de muerte se ha conservado durante la evolución (Simm y col. 1997). Otros autores demostraron previamente que el vanadato inducía cambios morfológicos en diversas líneas celulares (Klarlund 1985, Mountjoy 1990). Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar estos cambios. Algunos autores sugieren que las alteraciones morfológicas inducidas por el vanadio(V) son dependientes de la biorreducción, proceso que a su vez depende del nivel de GSH capaz de reducir el vanadio(V) a vanadio(IV) en células BALB/3T3 (Sabbioni y col. 1991).

La ocurrencia secuencial de los cambios morfológicos y la apoptosis puede reflejar una interacción entre la reorganización de la actina del citoesqueleto y la maquinaria de la apoptosis. La disrupción de la actina del citoesqueleto daña a la membrana mitocondrial, lo que a su vez causa la liberación de citocromo c y la activación de caspasas con el clivaje de proteínas *down stream* incluyendo la actina del citoesqueleto (Yamazaki y col. 2000). En células intactas, los filamentos de actina unen y secuestran DNasa I, una endonucleasa que cliva el ADN genómico. La alteración de la actina del citoesqueleto libera a la DNasa I causando fragmentación nuclear (Yuan y col. 2007).



El vanadato puede tener efectos diferentes sobre los filamentos de actina. Se ha reportado que estabiliza los filamentos a través de la formación de complejos actina-ADP.Vi (Combeau y Carlier 1988) e induce su polimerización a través de la inhibición de tirosina fosfatasas específicas (Brenner y col. 2003). En células Caco-2 donde el vanadato tiene efectos deletéreos, induce la condensación de los filamentos de actina (Yang y col. 2004). Por otro lado, los oligómeros de vanadato también tienen efectos sobre la actina. Se ha reportado que el decavanadato puede interactuar con la actina-G monomérica lo cual a su vez estabiliza las especies decaméricas del vanadato e inhibe la polimerización a actina-F, mediando así sus efectos citotóxicos (Ramos y col. 2006).

El arreglo de los filamentos de actina también se alteró en presencia de distintas concentraciones de V(V)-Salsem. Sin embargo, en este caso la mayoría de los filamentos literalmente se disgregaron y en la concentración más alta empleada, desaparecieron algunas uniones entre células. Debido a que los filamentos de actina están íntimamente asociados con las proteínas de las uniones estrechas (Yang y col. 2004), las perturbaciones de las fibras podrían haber afectado también la función de estas uniones.

La generación de estrés oxidativo como mecanismo de toxicidad del vanadio(V) ha sido demostrada en múltiples ocasiones para distintas líneas celulares (Ding y col. 1999; Zhang y col. 2001; Huang y col. 2000; Capella y col. 2002; Zhang y col. 2003). La toxicidad del vanadato se ha atribuido a la formación de radicales hidroxilos vía una reacción tipo Fenton (Shi y Dalal 1993). Por el contrario, se sugirió que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era el que mediaba la citotoxicidad (Capella y col. 2001). Otros autores también encontraron resultados concordantes con el anterior. Ye y col. (1999) observaron que la SOD, NADPH y el formiato de sodio (inhibidor del OH<sup>\*</sup>) potenciaban la apoptosis mediada por el vanadato en células epidermales JB6 P<sup>+</sup>, mientras que la catalasa la inhibía. Zhang y col. (2001) demostraron que la catalasa disminuía la expresión de Ras y ejercía un efecto protector contra el arresto del crecimiento de células epiteliales cancerígenas A549, pero la SOD y el formiato de sodio eran inefectivos. Huang y col. (2001) observaron que la SOD incrementaba la activación de NFAT (factor de transcripción nuclear que se activa frente a incrementos en los niveles de Ca<sup>+2</sup>

citoplásmicos) inducida por el vanadato en células T, aunque estos antioxidantes disminuyeron la generación del estrés oxidativo mediado por el vanadio.

El efecto de V(V)-Salsem en la generación de ROS fue determinado por la oxidación de la sonda DHR 123, la cual como se mencionó anteriormente detecta diferentes ROS principalmente niveles intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados mostraron un incremento en la concentración de ROS en las células dependiente de la dosis del complejo. En presencia de NAC o una mezcla de vitaminas C y E, los niveles de ROS intracelulares disminuyeron parcialmente en ambas líneas celulares. Similares resultados se obtuvieron cuando se emplearon estos secuestradores en experimentos de proliferación celular. Dado que los secuestradores no son específicos para la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino que son empleados en forma general para distintos radicales libres, no se puede establecer fehacientemente que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sea el único ROS implicado en el mecanismo de acción de V(V)-Salsem. Por otro lado, si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está realmente implicado en la citotoxicidad de V(V)-Salsem, se podría esperar que las células sean sensibles a este ROS. Este hecho que aparentemente parece lógico fue refutado por Capella y col. (2007). Nuestros resultados mostraron que ambas líneas celulares efectivamente son sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, las células MC3T3-E1 son más sensibles a este ROS que las UMR106. Esta diferencia puede deberse al mayor nivel de GSH con el que cuentan las células tumorales con relación a las no transformadas en condiciones basales. Por otro lado, la protección de los antioxidantes no fue total lo que sugirió que otro mecanismo, aparte del estrés oxidativo, jugaría un papel en los efectos observados para V(V)-Salsem.

La apoptosis es considerada un mecanismo de muerte, inherente al desarrollo celular, la cual se origina a través de la acción de diferentes factores endógenos o exógenos (Silvestri y col. 1995). Estos factores pueden ser reconocidos por receptores de membrana y causar una activación en cadena de proteínas citoplasmáticas. Como consecuencia, un programa genético que conduce a la muerte celular es activado. Este proceso es acompañado por cambios morfológicos característicos en el núcleo y en el citoplasma.

Independientemente del tipo celular y de la naturaleza del agente “disparador”, la externalización del fosfolípido de membrana plasmática, fosfatidilserina (PS), es un hecho en eventos apoptóticos tempranos. La anexina V-FITC es una sonda fluorescente con alta afinidad por la PS permitiendo la determinación de apoptosis temprana. Los resultados obtenidos en nuestros estudios mediante citometría de flujo, mostraron un incremento en el porcentaje de células apoptóticas sobre el nivel basal en presencia de V(V)-Salsem en ambas líneas celulares, con las células MC3T3E1 presentando el mayor porcentaje de células en apoptosis. Por otro lado, un hecho interesante es que no se pudieron detectar células necróticas en ninguna de las dos líneas osteoblásticas. Resultados similares han sido previamente reportados por otros autores (van Engeland y col. 1996, Mogi y col. 2004). Debido a que la población de células necróticas no pudo detectarse, este resultado indicaría que la pérdida de la integridad de membrana de las células no ocurre significativamente bajo las condiciones presentadas. Sin embargo, la necrosis podría ocurrir en un estadio tardío de apoptosis. Dado que este proceso se midió este proceso en células adherentes, es altamente probable que las células muertas por necrosis se hayan despegado de la superficie del plato (van Engeland y col. 1996).

La apoptosis está asociada en muchos casos con la generación de ROS, como fue reportado para un amplio rango de tipos celulares. Actualmente quedan preguntas sin responder concernientes a la relación entre apoptosis y la generación de ROS, como por ejemplo, cuáles ROS están implicados en la apoptosis, qué mecanismos y “dianas” son relevantes y si la apoptosis es activada por estrés oxidativo o si es generada como consecuencia de la disrupción que ocurre durante la muerte celular. Se ha demostrado que la inducción del estrés oxidativo por el vanadio conduce a la muerte en diferentes tipos celulares por procesos apoptóticos y/o necróticos (Molinuevo y col. 2004; Chien y col. 2006; Caicedo 2008) al igual que lo observado por nosotros para V(V)-Salsem.

Para obtener un mejor conocimiento del rol del estrés oxidativo en la apoptosis causada por V(V)-Salsem, se analizó el efecto de 1 mM de GSH el cual como se mencionó anteriormente es uno de los principales detoxificantes de  $H_2O_2$  (Baigi y col. 2008). Se observó un efecto beneficioso del GSH en ambas líneas

osteoblásticas al igual que fue establecido para otras líneas celulares (Capella y col. 2002), pero la inhibición de la apoptosis por el tiol no fue total, lo que apoya la hipótesis de que existiría un mecanismo independiente del estrés oxidativo en la acción tóxica de V(V)-Salsem. La confirmación de esta hipótesis se obtuvo cuando se evaluó el rol de la activación de la vía de las ERK-1/2 en la citotoxicidad del complejo. V(V)-Salsem indujo la fosforilación de ERK-1/2 en ambas líneas osteoblásticas. La incubación con PD98059 (inhibidor específico de MEK-1/2) o wortmanina (inhibidor específico de PI3-K) provocó una disminución en la fosforilación de las ERK-1/2. Por otro lado, a diferencia de lo observado con VO(oda), NAC no inhibió el nivel de fosforilación lo que estaría indicando que en este caso el estrés oxidativo no juega un rol en la activación de las ERK. En presencia de PD98059, la viabilidad celular mostró una ligera mejoría, demostrando la implicancia parcial de la vía de las ERKs en los efectos citotóxicos de V(V)-Salsem en los osteoblastos no transformados. Por otra parte, la incubación con wortmanina no indujo ningún efecto sobre la viabilidad celular. Este hecho podría deberse a que la inhibición de la PI3-K bloquea la captación de glucosa (Bolander 2004). Este efecto colateral podría explicar por qué la incubación con wortmanina no pudo inhibir ni siquiera parcialmente el efecto de V(V)-Salsem sobre la proliferación de los osteoblastos. En la figura B se muestra un esquema del posible mecanismo de acción de V(V)-Salsem. Una vez que el complejo ingresa a la célula, induce la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posiblemente otros ROS. Este incremento de especies oxidantes conduce a los osteoblastos a la muerte celular por apoptosis sin fenómeno de necrosis.

El aumento en los niveles de agentes oxidantes también podría ser la causa del desensamblaje de las fibras de actina. Alternativamente, el complejo fosforila las ERKs utilizando la vía de las MEKs y posiblemente la de la PI3-K para inducir sus efectos antiproliferativos.

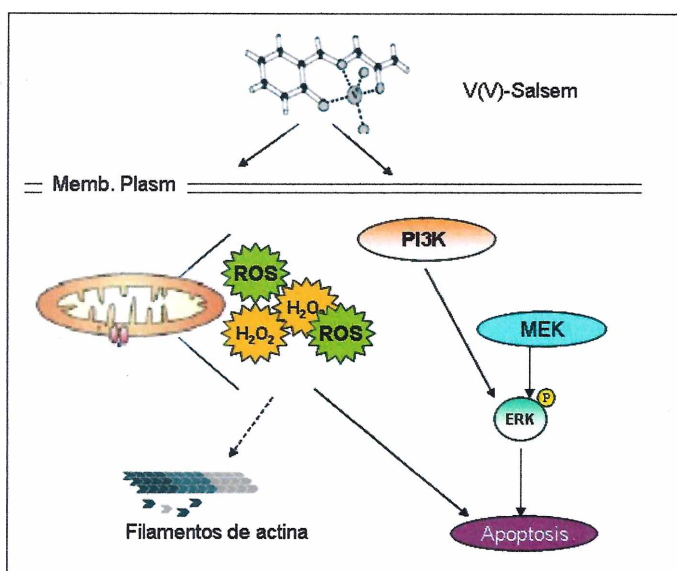


Figura B. Esquema del posible mecanismo de acción de V(V)-Salsem

## Peroxocarbonato de vanadio(V)

A fines de 1980 y principios de 1990 surgió el interés en los peroxo derivados de vanadio después de que se demostró que algunos de estos complejos tenían mayores propiedades insulinomiméticas tanto *in vitro* como *in vivo* que las sales de vanadio (Shaver y Posner 1995).

Los complejos de peroxovanadato son 100-1000 veces más efectivos *in vitro* para inhibir tirosina fosfatasa que el vanadato de sodio (Morinville y Shaver 1998). Esta propiedad parece ser la más relevante para explicar sus efectos insulinomiméticos. Se ha establecido que el vanadato y los complejos de peroxovanadio tienen un mecanismo de inhibición de PTPasas diferente. Mientras que el vanadato actúa como un inhibidor competitivo de estas fosfatasa, los peroxovanadato oxidan la cisteína del sitio activo de esas enzimas actuando como inhibidores irreversibles de las mismas y promoviendo de esta manera un alto nivel de fosforilación en residuos de tirosina.

Algunos peroxocomplejos de vanadio(V) también han mostrado interesante actividad antitumoral en diferentes sistemas (Djordjevic y Wampler 1985;

Djordjevic 1995; Baran 1997; Rehder 2008). Se supone que el mecanismo de acción de este tipo de sistemas es marcadamente diferente del de otros sistemas metálicos antitumorales, sugiriendo para los peroxocompuestos la relevancia de la generación de radicales libres (Djordjevic y Wampler 1985). Como se mencionó anteriormente, los complejos de vanadio pueden ejercer efectos proliferativos o antiproliferativos, dependiendo tanto del compuesto, de su concentración o del tipo celular. Con respecto a los complejos de peroxovanadio(V), se ha demostrado que pueden inhibir la proliferación en distintas líneas tumorales (Faurer y col. 1995). Por otro lado, en fibroblastos de ratón C3H10T1, los peroxovanadatos formados *in situ* estimularon la proliferación (Kradly y col. 1997). El pervanadato también estimuló la proliferación de los osteoblastos UMR106 a bajas concentraciones no mostrando ningún efecto en el rango de las altas concentraciones. (Cortizo y Etcheverry 1995). En nuestra experiencia, el compuesto  $K_3[VO(O_2)_2CO_3].H_2O$  es el compuesto de vanadio más tóxico que haya sido probado en células osteoblásticas en cultivo. En un futuro se podría profundizar las investigaciones sobre el mecanismo de acción de este compuesto. Algunos peroxo compuestos de vanadio inducen arresto del ciclo celular y apoptosis activando la vía de las ERK (Blázquez y col. 2000). Estos compuestos son también potentes inhibidores de las PTPasas de células de neuroblastoma NB41 y de glioma C6. (Posner y col. 1994). Esto determina una disminución marcada en la velocidad de la proliferación celular y una progresiva acumulación de células en la etapa G2/M del ciclo celular. Este efecto fue dependiente de la concentración, del tipo celular y del compuesto de vanadio empleado (Faure y col. 1995). Otro mecanismo implicado sería la generación de radicales libres (Djordjevic y Wampler 1985).

Por todo lo expuesto, en base a los resultados preliminares reportados en esta tesis doctoral, el complejo  $K_3[VO(O_2)_2CO_3].H_2O$  no se presenta como un candidato prometedor para su inclusión en pruebas destinadas a encontrar compuestos antitumorales alternativos, pero sí atrae la atención de los investigadores al dilucidar su mecanismo de toxicidad dado el elevado poder deletéreo del mismo (el mayor observado hasta el presente) en cultivos de osteoblastos.

*Conclusiones*

## CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y caracterizaron dos complejos del catión vanadilo(IV) con los siguientes ligandos orgánicos: oxodiacetato (oda) y con el flavonoide hesperidina, y dos complejos de vanadio(V), uno de ellos con el ligando salicilaldehído semicarbazona (Salsem) y el otro, un complejo inorgánico de peroxo carbonato.
- Los ensayos mitogénicos muestran que todos los complejos estudiados fueron citotóxicos en ambas líneas osteoblásticas. Sin embargo, existen diferencias dependiendo del complejo estudiado y la línea celular empleada. El peroxocarbonato de vanadio(V) resultó ser el compuesto más tóxico estudiado hasta el presente en cultivos de osteoblastos en nuestro laboratorio, razón por la cual no se lo considera un compuesto promisorio para futuros ensayos biológicos.
- La morfología de las células se alteró luego de 24 horas de tratamiento con los complejos, observándose características propias de la apoptosis tales como condensación nuclear y citoplasmática, cromatina condensada sobre los bordes de la membrana nuclear, así como la formación de “burbujas de membrana”.
- La técnica de microscopía de fluorescencia permitió comprobar que el complejo V(oda) y V(V)-Salsem producen una disrupción de la arquitectura de los microfilamentos de actina que componen el citoesqueleto.
- Nuestros estudios sugieren que los procesos citotóxicos de los complejos de vanadio estudiados estarían mediados por la generación de ROS y por una alteración de la relación GSH/GSSG, así como a través de una alteración del potencial de membrana mitocondrial dado que la utilización de diversos antioxidantes permitió obtener una reversión parcial o total del efecto antiproliferativo del complejo en los osteoblastos en cultivo.



- Los estudios de la acción de los complejos sobre la vía de transducción de señales indican que el efecto de los complejos depende del tipo del estado de oxidación del metal y del tipo ligando. Así, mediante el uso de inhibidores específicos se pudo determinar la participación de esta vía tanto en los efectos citotóxicos de VO(oda) como de V(V)-Salsem en ambas líneas celulares. Dado que la vía de las ERKs puede ser activada también a través del estrés oxidativo, el uso de sustancias antioxidantes permitió determinar que VO(oda) activa esta vía a través del estrés oxidativo además de hacerlo en forma directa, en tanto que V(V)-Salsem sólo induce una activación de esa vía de transducción de señales mediante la acción del complejo sobre quinasas *up stream* en esa vía.
- En resumen, los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral indicarían que los complejos de vanadio(IV) y (V) ejercen sus efectos citotóxicos a través de alteraciones morfológicas y de las fibras de actina. Este efecto está fundamentalmente mediado a través del estrés oxidativo que altera el estado redox de las células, activan la vía de las ERKs y conducen a la muerte celular por apoptosis.

## *Referencias*

## REFERENCIAS

- Alberico E., Micera G., 1994. Phosphate complexation of oxovanadium(IV). Evidence of bidentate chelation of orthophosphate. *Inorg. Chim. Acta* 215: 225-227.
- Allen D.L., Linderman J.K., Roy R.R., Bigbee A.J., Grindeland R.E., Mukku V., Edgerton V.R., 1997. Apoptosis: A Mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle In response to Hindlimb Unweighting. *Am. J. Physiol* 273: C579- C587.
- Al-Shawi M.K., Senior A.E., 1993. Characterization of the adenosine triphosphate activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J Biol Chem* 268:4197-41206.
- Amarnani S., Merriman H.L, Linkhart T.A, Baylink D.J., Mohan S., 1993. Autocrine regulators of MC3T3-E1 cell proliferation. *J Bone Miner Res* 8:157-165.
- Anke M., Groppe B., Krause U., 1991. In *Trace Elements in Man and Animals*, Momcilovic B Ed. IMI, Zagreb, Vol 7, 11.9 - 11.10.
- Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J., 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 6:593-597.
- Aubrecht J., Narla R.K., Ghosh P., Stanek J., Uckun F.M., 1999. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 154:228-235.
- Baes J., Charles F., Mesmer R.E., 1976. *The hydrolysis of Cations*. Eds.; John Wiley & Sons: New York.
- Baigi MG, Brault L, Néguesque A, Beley M, Hilali RE, Gaüzère F, Bagrel D., 2008. Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. *Toxicol In Vitro.* 6:1547-54.
- Baran E.J., 1977. Spektroskopische Untersuchung von Ammonium-Oxidiperoxoamminovanadat(V). *Monatsh. Chem.* 108: 989-995 .
- Baran E.J., 1997. La nueva farmacoterapia Inorgánica. XVII. Compuestos de vanadio. *Acta Farm. Bonaerense* 16: 43-52.
- Baran E.J., 2000. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 80: 1-10.

- Barrio D.A., Williams P.A., Cortizo A.M. and Etcheverry S.B., 2003. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): Insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8: 459–468.
- Barrio D.A., Cattáneo E.R., Apezteguía M.C., Etcheverry S.B., 2006. Vanadyl(IV) complexes with saccharides. Bioactivity in osteoblast-like cells in culture. *Can J Physiol Pharmacol.* 84: 765-775.
- Barrio D.A., Etcheverry S.B., 2006. Vanadium and bone development: putative signaling pathways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 677-686.
- Beauge L.A., Glynn I.M., 1977. A modifier of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase in commercial ATP. *Nature* 268: 355–356.
- Ben-Zé'ev A., 1985. *Biochim. The cytoskeleton of cancer cells.* *Biophys. Acta* 780: 197–212.
- Bergamashi G, Rosti V, Danava M, Ponchio L, Lucotti C, Cazzola M., 1993. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. *Leukemia* 7:2012–2018.
- Bernheim F., Bernheim. M.L.C., 1939. The action of vanadium on the oxidation of phospholipids by certain tissues. *J. Biol. Chem.* 127: 353–360.
- Bevan A.P., Drake P.G., Yale J.F., Shaver A., Posner B.I., 1995. Peroxovanadium compounds: biological actions and mechanism of insulin mimesis. *Mol. Cell. Biochem.* 153: 49-58.
- Biggerstaff J.P, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, et al., 1999. Soluble fibrin augments platelet tumor cell adherence in vitro and in vivo and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17:723–730.
- Bishayee A, Karmakar R, Mandal A, Kundu SN, Chatterjee M. Vanadium mediated chemoprevention against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:58–70.
- Bishayee A., Chatterjee M., 1995. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethyl nitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br. J. Cancer.* 71: 1214–1220.
- Bishayee A., Oinam S., Basu M., Chatterjee, M., 2000. Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. *Breast Cancer Res. Treat.* 63: 133–145.
- Blazquez C., Galve-Roperh I., Guzmán M., 2000. The novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* 14:2315-2322.

- Bond C.S., White M.F., Hunter W.N., 2002. Mechanistic implications for Escherichia coli cofactor-dependent phosphoglycerate mutase based on the high-resolution crystal structure of a vanadate complex. *J. Mol. Biol.* 316:1071.
- Boonstra J., Post J.A., 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1 – 13.
- Borenfreund E., Puerner J.A., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for Cytotoxicity assay (HTD/NR-90) *J Tiss Cult Meth* 9:7-9.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186:334–355.
- Bours V., Bentires-Alj M., Hellin A-C., et al., 2000. Nuclear factor-kB, cancer and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 60:1085–1090.
- Boyd D. W., Kustin K., 1984. Vanadium: a versatile biochemical effector with an elusive biological function. *Adv. Inorg. Biochem.* 6: 311–363.
- Boyd, D.W., Kustin, K., Niwa M., 1985. Do vanadate polyanions inhibit phosphotransferase enzymes? *Biochim. Biophys. Acta* 827: 472-475.
- Bradford M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Branca M., Micera, G., Dessi, A., Sanna D., 1992. Oxovanadium(IV) complex formation by simple sugars in aqueous solution. *J. Inorg. Biochem.* 45: 169-177.
- Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H., 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 68: 837-845.
- Brichard S.M., Henquin J-C., 1995. The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci.* 16:265–270.
- Brown G.C., Borutaite V., 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52:189–195.
- Buglyo P., Kiss E., Fábian I., et al., 2000. Speciation and NMR relaxation studies of VO(IV) complexes with several O-donor containing ligands: oxalate, malonate, maltolate and kojate. *Inorg. Chim. Acta* 306: 174-183.

- Burkle A., 2000. Poly(ADP-ribosyl)ation, genomic instability and longevity. *Ann NY Acad Sc.* 908:126–132.
- Byckowski J.Z., Kulkarni A.P., 1991. Vanadium redox cycling, lipid peroxidation and coxygenation of benzo( )pyrene,7,8-dihydrodiol. *Biochim Biophys Acta* 1125:136–141.
- Byczkowski J.Z y Kulkarni A.P., 1998. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In *Vanadium in the environment Part 2*. Edited by JO Nriagu 235-264.
- Cadenas E., Davies K.J.A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Rad. Biol. Med.* 29:222–230.
- Caicedo M., Jacobs J.J, Reddy A., Hallab N.J., 2008. 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>. *J Biomed Mater Res A* 86:905-913.
- Canalis E., 1985. Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein syntheses in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 116:855-862.
- Cantley L. C Jr, Josephson L., Warner R., Yanagisawa M., Lechene C., Guidotti G., 1977. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J Biol Chem.* 252:7421-7423.
- Cantley L. C Jr., Cantley L.G., Josephson L., 1978. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253: 7361-7368.
- Cantley L.C., Resh M., Guidotti G., 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na,K)ATPase from the cytoplasmic side. *Nature*:27:552–554.
- Capella L.S., Gefé M.R., Silva E.F., Affonso-Mitidieri O., Lopes A.G., Rumjanek V.M., Capella A.M., 2002. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406: 65–72.
- Capella M.A.M., Capella L.S., Valente R.C., Gefé M., Lopes. A.G., 2007. Vanadate-induced cell death is dissociated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Cell Biol Toxicol* 23:413–420.
- Carrington A., Symons M.C.R., 1963. Structure and Reactivity of the Oxyanions of Transition Metals. *Chem.Rev.* 63: 443–460.
- Caughlan C. N., Smith H.M., Watenpaugh K., 1966. The Crystal and Molecular Structure of Methyl Vanadate, VO(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. *Inorg. Chem.* 5: 2131–2134.

- Cavenagh J.D., Cahill M.R., Kelsey S.M., 1998. Adhesion molecules in clinical medicine. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 55:415–459.
- Chasteen N.D., 1983. The Biochemistry of Vanadium. *Struct. Bond* 53: 103 – 136.
- Chasteen N.D., Grady, J.K., Holloway C.E., 1986. Characterization of the binding, kinetics, and redox stability of vanadium(IV) and vanadium(V) protein complexes in serum. *Inorg. Chem.* 25:2754-2760.
- Chasteen N.D., Lord E.M., Thompson H.J., Grady J.K., 1986. Vanadium complexes of transferrin and ferritin in the rat. *Biochim Biophys Acta* 884:84-92.
- Chasteen ND., 1990. Vanadium in Biological Systems: physiology and biochemistry. Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Chen F., Demers L.M., Vallyathan V., et al., 1999. Vanadate induction of NF- $\kappa$ B involves I  $\kappa$ B kinase  $\beta$  and SARK/ERK kinase in macrophages. *J Biol Chem.* 274: 20307–20312.
- Chen F., Vallyathan V., Castranova V., Shi X., 2001. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem.* 222:183-188.
- Chiba H., Uehara M., Wu J., Wang X, Masuyama R., Suzuki K., Kanazawa K., Ishimi Y., 2003. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr* 133:1892–1897.
- Chien P.S., Mak O.T., Huang H.J., 2006. Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:562-528.
- Chin L.S, Murray S.F., Harter D.H., Doherty P.F., Singh S.K., 1999. Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB. *J. Biomed. Sci.* 6: 213-218.
- Clarkson P.M., Rawson E.S., 1999. Nutritional supplements to increase muscle mass. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 317–328.
- Combeau C., Carlier M.F., 1988. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF-3 and A1F-4. *J Biol Chem.* 263:17429-17436.
- Conner E.M., Grisham M.B., 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants, *Nutrition.* 12: 274–277.
- Connor J.A., Ebsworth E.A.V., 1964. Peroxy compounds of transition metals. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 6: 279-381.

- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195–1214.
- Cortizo A.M. and Etcheverry S.B., 1995. Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145: 97–102.
- Cortizo A.M., Bruzzone L., Molinuevo S., Etcheverry S.B., 2000. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3-E1 osteoblast and UMR 106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145: 89-99.
- Cortizo A.M., Molinuevo M.S., Barrio D.A., Bruzzone L., 2006. Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1171-80.
- Costas M., Meh, M.P., Jensen M.P., Que, L., 2004. Dioxygen Activation at mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates.
- Crans D.C., Harnung S.E., Larsen E., Shin P.K., Theisen L.A., Trabjerg I., 1991. NMR, CD and MCD studies of vanadate-nucleoside complexes. *Acta Chem Scand.* 45:456-462.
- Crans D.C., Simone C.M., Holz R.C., Que L Jr., 1992. Interaction of porcine uterine fluid purple acid phosphatase with vanadate and vanadyl cation. *Biochemistry.* 31: 11731-1179.
- Crans D.C., Chen H., Anderson O.P., Miller M.M., 1993. Vanadium(V)-protein model studies: solid-state and solution structure. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 6769-6776.
- Crans, D.C., 1994. Aqueous Chemistry of Labile Oxovanadates: Relevance to Biological Studies. *Comments Inorg. Chem.* 16: 1-33.
- Crans D. C., Keramidis A.D., Drouza., 1996. Organic Vanadium Compounds-Transition State Analogy With Organic Phosphorus Compounds. *C. Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* 109-110: 245-248.
- Crans D.C y Tracey A.S., 1998. The chemistry of vanadium in aqueous and non-aqueous solution. In *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications*. Edited by AS Tracey y DC Crans. 1: 2-29.
- Crans D.C., Smee J.J., 2004. Vanadium. En *Comprehensive Coordination Chemistry*, 2nd ed. Chap 4. 175 –239.
- Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E., Yang L., 2004. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem. Rev.* 104: 849902.



- Crans D.C., 2005. Fifteen years of dancing with vanadium. *Pure Appl. Chem.* 77: 1497–1527.
- Cruywagen J.J., Heyns J.B., Westra A.N., 1996. Protonation Equilibria of Mononuclear Vanadate: Thermodynamic Evidence for the Expansion of the Coordination Number in VO(2)(+). *Inorg Chem.* 35:1556-1559.
- Curran G.L., Azarnoff D.L., Bolinger R.E., 1959. Vanadium inhibition of cholesterol biosynthesis. *J. Clin. Invest.* 38:1251–1261.
- Dai S., Thompson K.H., McNeill J.H., 1994. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 74(2):101-109.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J., Melamed M.R., 1982. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 42:799-806.
- Day V.W., Klemperer W., Yagasaki G., 1990. Synthesis and structure of the new organometallic polyoxovanadates,  $\{[(\eta\text{-C}_8\text{H}_{12})\text{Ir}]_2(\text{V}_4\text{O}_{12})\}^{2-}$  and  $(\eta\text{-C}_8\text{H}_{12})\text{Ir}(\text{V}_4\text{O}_{12})^{3-}$ . *A. Chem. Lett.* 1267-1270.
- Dayeh V.R., Schirmer K., Bols N.C., 2009. Ammonia-containing industrial effluents, lethal to rainbow trout, induce vacuolisation and Neutral Red uptake in the rainbow trout gill cell line, RTgill-W1. *Altern Lab Anim.* 37: 77-87.
- D'Cruz O.J, Ghosh P., Uckun Fatih M., 1998. Spermicidal activity of chelated complexes of bis(cyclopentadienyl)vanadium(IV). *Molecular Human Reproduction* 4 683–693.
- D'Cruz O.J., Donga Y., Uckun F.M., 1999. Spermicidal Activity of Oxovanadium(IV) Complexes of 1,10-Phenanthroline, 2,2'-Bipyridyl, 5'-Bromo-2'-Hydroxyacetophenone and Derivatives in Humans. *Biology of Reproduction* 60: 435-444.
- D'Cruz O.J., Uckun F.M., 2002. Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1829-1836.
- Del Rio D, Galindo A., Tejedó J., Bedoya F.J., Ienco A., Mealli A., 2000. Synthesis, antiapoptotic biological activity and structure of an oxo-vanadium(IV) complex with an OOO ligand donor set. *Inorganic Chemistry Communications* 3: 32–34.
- Deng, H., Callender, R., Huang, Z, Zhang, Z.Y., 2002. Is the PTPase-Vanadate complex a true transition state analogue? *Biochemistry* 41: 5865-5872.
- Dharwan S., Singh S., Aggarwal B.B., 1997. Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein

- tyrosine phosphatase inhibitors: role of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Eur Immunol* :27:2172–2179.
- Dimond E.G., Caravaca J., Benchimol A., 1963. Vanadium, Excretion, toxicity, lipid effect in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 12: 49–53.
  - Ding M, Li J.J, Leonard S.S, et al., 1999. Vanadate-induced activation of activator protein-1. Role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*: 20:663–668.
  - Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Rad. Biol. Med.* 32:1102–1115.
  - Djordjevic C., 1995. Antitumor Activity of Vanadium Compounds. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 595-615. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
  - Djordjevic C., Wampler G.L., 1985. Antitumor activity and toxicity of peroxo heteroligand vanadates(V) in relation to biochemistry of vanadium. *J. Inorg.Biochem.* 25: 51-55.
  - Dodge R.P., Templeton D., Zalkin A., 1961. Crystal Structure of Vanadyl Bisacetylacetonate. *Geometry of Vanadium in Fivefold Coordination.* *J. Chem. Phys.* 35: 55–67
  - Doige C.A, Yu X., Sharom F.J., 1992. ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*: 109:149–160.
  - Dubyak G.R., Klienzer A., 1980. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 255: 5306-5312.
  - Eady, R.R., 2003. Current status of structure function relationships of vanadium nitrogenase. *Coord. Chem. Rev.* 237: 23-30.
  - Elberg G., He Z., Li J., Sekar N., Shechter Y., 1997. Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes* 46: 1680-1690.
  - Elberg G., Li J., Leibovitch A., Shechter Y., 1995. Non-receptor cytosolic protein tyrosine kinases from various rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1296: 299-306.
  - Elinder C.G, Gerhardsson L., Oberdoerster G.,1988. Biological monitoring of toxic metals—overview. Clarkson TW Friberg L Nordberg GF Sager PR eds. *Biological monitoring of toxic metals.* 1-71 Plenum Press New York.

- English L., Macara J.G., Cantley L.C., 1983. Vanadium stimulates (Na,K)ATPase in friend erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. *J Cell Biol.* 97:1299–1302.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81–128.
- Etcheverry S.B., Apella M.C., Baran E.J., 1984. A model study of the incorporation of vanadium in bone. *J Inorg Biochem* 20:269-274.
- Etcheverry S.B., Crans D.C., Keramidas A.D., Cortizo A.M., 1997. Insulin-mimetic action of vanadium compounds on osteoblast-like cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 338: 7-14.
- Etcheverry S.B., Barrio D.A., 2007. Vanadium and bone. En *Relevance of vanadium compounds in bone cells*. A.C.S. symposium series vol. 974, pp. 204-216. American Chemical Society, Washington, DC.
- Evangelou A.M., 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42: 249-265.
- Evans D.F, 1957. Blue perchromic acid. *J. Chem. Soc.* 4013-4018.
- Fain J.N., 1968. Stimulation by insulin and prostaglandin E1 of glucose metabolism and inhibition of lipolytic action of theophylline on fat cells in the absence of K<sup>+</sup>. *Endocrinology* 83 548-554.
- Fantus I.G., Deragon G., Lai R, Tang S., 1995. Modulation of Insulin Action by Vanadate: Evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 153: 103-112.
- Farinelli S. E., Greene L. A., 1996. Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. *J Neurosci.* 16:1150-62.
- Faure, R., Vincent, M., Dufour, M., Shaver, A. and Posner, B. I., 1995. Arrest of the G2/M transition of the cell cycle by protein tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J. Cell. Biochem.* 58: 389–401.
- Fawcett, J.P., Farquhar, S.J., Thou, T., Shand, B.I., 1997. Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol. Toxicol.* 80, 202–206.
- Ferrer E.G., Salinas M.V., Correa M.J., Naso L., Barrio D.A., Etcheverry S.B., Lezama L., Rojo T., Williams P.A.M., 2006. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV). *J Biol Inorg Chem* 11:791–801.

- Fickl H., Theron A.J., Grimmer H., Oommen J., 2006. Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine* 40: 146 – 155.
- Fu Y, Wang Q, Yang X-G., Yang X-D., Wang K., 2008. Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J Biol Inorg Chem* 13:1001–1009.
- Fujita J., Martell A.E., Nakamoto K., 1962. Infrared spectra of metal chelate compounds. VIII. Infrared spectra of Co(III) carbonato complexes. *J. Chem.Phys.* 36: 339-345.
- Gândara R.M., Soares S.S., Martins H., Gutiérrez-Merino C., Aureliano M., 2005. Vanadate oligomers: in vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *J Inorg Biochem.* :1238-1244.
- Garg A., Garg S., Zaneveld L.J., Singla AK., 2001. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 15:655–669.
- Garribba E., Lodyga-Chruscinska E., Sanna D., Micera G., 2001. Oxovanadium(IV) binding to ligands containing donor sites of biological relevance. *Inorg. Chim. Acta* 322: 87-98.
- Geraldes, C.F.G.C., Castro, M.M.C.A., 1989. Multinuclear NMR study of the interaction of vanadate with mononucleotides ADP, and ATP. *J. Inorg. Biochem.* 37: 213-232.
- Ghosh P., D’Cruz O.J, Narla R.K, Uckun F.M., 2000. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin Cancer Res.* 6:1536-45.
- Giannoni E., Buricchi F., Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P., 2005. Intracellular Reactive Oxygen Species Activate Src Tyrosine Kinase during Cell Adhesion and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Molecular and Cellular Biology* 25: 6391-6403.
- Giovannini C., Scazzocchio B., Matarrese P., Varì R., D’Archivio M., Di Benedetto R., Casciani S., Dessì M.R., Straface E., Malorni W., Masella R., 2008. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J Nutr Biochem.* 19:118-28.
- Goldwasser I., Gefel D., Gershonov E., Fridkin M., Scheckter Y., 2000. Insulin like effects of vanadium. Basic and clinical implications. *J Inorg Biochem.* 80:21–25.
- Gorinstein S., Moncheva S., Katrich E., Toledo F., Arancibia P., Goshev I, Trakhtenberg S., 2003. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus*

- galloprovincialis) as an indicator of Black Sea coastal pollution. *Mar Pollut Bull* 46:1317–1325.
- Grebenova D., Kuzelova K., Smetana K., Pluskalova M., Cajthamlova H., Marinov I, et al., 2003. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 69:71-85.
  - Green D.R, Reed J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309–1312.
  - Gresser M. J., Tracey A.S., 1985. Vanadium(V) oxyanions: the esterification of ethanol with vanadate. *J. Am. Chem. Soc.*107: 4215-2220.
  - Gresser M.J.; Tracey, A.S., Stankiewicz P.J., 1987.The interaction of vanadate with tyrosine kinases and phosphatases. In: *Advances in Protein Phosphatases*. Vol. 4: 35-59. Editors: Merlevede, W., Di Salvo, J., Leuven University Press, Leuven.
  - Gresser, M. J., Tracey, A. S., 1990. Vanadate as phosphate analogs in biochemistry. In Chasteen ND (Ed) *Vanadium in Biological Systems*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 63-67.
  - Grolig F., 1990. Actin-based organelle movements in interphase *Spirogyra* *Protoplasma*, 155:29–42.
  - Guidotti L.C. Cantley, L. Josephson, R. Warner, M. Yanigasawa, Lechene C. G., 1977. Vanadate is a potent (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421-7423.
  - Gupta M., Dobashi K., Greene E.L., Orak J.K., Singh I., 1997. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 176: 337–347.
  - Habashi F., 2002. Two hundred years of vanadium. In: Tanner, M.F. *Ann. New York Acad. Sci.* 928: 22–38.
  - Hamilton E.E., Fanwick P.E., Wilker J.J., 2002. The elusive vanadate (V(3)O(9))(3-): isolation, crystal structure, and nonaqueous solution behavior. *J Am Chem Soc.* 124:78-82.
  - Hansell E.J., Frisch S.M., Tremble P., Murnane J.P, Werb Z., 1995. Simian virus 40 transformation alters the actin cytoskeleton, expression of matrix metalloproteinases and inhibitors of metalloproteinases, and invasive behavior of normal and ataxia-telangiectasia human skin fibroblasts. *Biochem. Cell Biol.* 73: 377–389.

- Harborne J.B., Williams C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481–504.
- Harding C.J., Henderson R.K., Powell A.K., 1993. *Angewandte Chemie International edition in English*. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32: 570-572.
- Heath E., Howarth O.W., 1981. Vanadium-51 and oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of vanadate(V) equilibria and kinetics. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1105-1110.
- Henderson R.A., Hughes D.L., Janas Z., et al., 1998. Preparation And Crystal Structures Of The Mononuclear Vanadium Phenoxide Complexes  $VCl(Oc6h3pr2i-2,6)2(C4h8o)2$  And  $Vo(Oc6h3pr2i-2,6)3$ : Procatalysts F Or Ethylene Polymerisation. *S. J. Organomet. Chem.* 554: 195-201.
- Henze M., 1911. Untersuchungen über das Blut der Ascidien. I. Mitteilung. Die Vanadiumverbindung der Blutkörperchen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 72:494–501.
- Herr I., Debatin K.M., 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614.
- Hertog M.G., Hollman P.C, Katan M.B., Kromhout D., 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20:21–29.
- Higuchi Y., 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell Mol. Med.* 8: 455-464.
- Hinnemann B., Norskov J. K., 2003. Modeling a central ligand in the nitrogenase FeMo cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1466-1467.
- Hissin P.J., Hilf R., 197. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226.
- Holko P., Ligeza J., Kisielewska J., Kordowiak A.M, Klein A., 2008. The effect of vanadyl sulphate ( $VOSO_4$ ) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines. *Pol J Pathol.* 59:3-8.
- Holtz K.M., Stec B., Kantrowitz E.R., 1999. A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J Biol Chem.* 274:8351-8354.
- Hopkins L.L Jr., Tilton B.E., 1966. Metabolism of trace amounts of vanadium 48 in rat organs and liver subcellular particles. *Am J Physiol* 211:169-172.
- Hopkins L.L. Jr., Mohr H.E., 1974. Vanadium as an essential nutrient. *Fed. Proc.* 33: 1773–1775.
- Hopkins L.L. Jr., Tilton B.E., 1966. Metabolism of trace amounts of vanadium 48 in rat organs and liver subcellular particles. *Am J. Physiol.* 211: 169–172.

- Huang C., Chen N., Ma W.Y., Dong Z., 1998. Vanadium induces AP-1 and NF-kappaB dependent transcription activity. *Int J Oncol*;13:711–715.
- Huang C., Ding M., Li J., Leonard S.S., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Ju G., Shi X., 2001. Vanadium-induced nuclear factor of activated T cells activation through hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 276:22397-22403.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., et al., 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 32516–32522.
- Hulley P.A., Conradie M.M., Langeveldt C.R., Hough F.S., 2002. Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. *Bone* 31:220-229.
- Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F., 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum, *Science* 57: 1496–1502.
- Iannuzzi, M.M., Rieger, P.H., 1975. Nature of vanadium(IV) in basic aqueous solution. *Inorg. Chem.* 14: 2895-2899.
- Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, *Curr. Med. Chem.* 10: 2495–2505.
- Issels R.D., Nagele A., Eckert K.G., Wilmanns W., 1988. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol.* 37:881-888.
- Iwamoto I., Mifuchi I., 1982. Superoxide dismutase activity of lactobacilli. *Chem Pharm Bull* 30:237–241
- Jaspers I, Samet J.M, Erzurum S, Reed W., 2000. Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:95–102.
- Johnson L.V., Walsh M.L., Bockus B.J, Chen L.B., 1981. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 88:526-535.
- Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J.Y., Lynn M.J., Sternberg P., 2000. Redox state of glutathione in human plasma, *Free Rad. Biol. Med.* 28: 625-635.
- Josephson L., Cantley L.C. Jr., 1977. Isolation of a potent (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitor from striated muscle. *Biochemistry* 16: 4572–4578.

- Karoui H., Hogg N., Frejaville C., Tordo P., Kalyanaraman B., 1996. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite-ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.* 271: 6000–6009.
- Kefaloyiannia E., Gaitanakia C., Isidoros B., 2006. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- $\kappa$ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cellular Signalling* 18: 2238-2251.
- Keller R.J., Sharma R.P., Grover T.A., Piette H., 1988. Vanadium lipid peroxidation: evidence for involvement of vanadyl and hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 265:524–533.
- Kieler J., Gromek A., Nissen N.I., 1965. Studies on the antineoplastic effect of vanadium salts. *Acta Chir Scand.* 343: 154–164.
- Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H., Toge T., 2002. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:343-352.
- Kinnula V.L. and Crapo J.D., 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *free radic. Biol. Med.* 36:718-744.
- Kiss T., Kiss E., Micera G., Sanna D., 1998. The formation of ternary complexes between VO(maltolate)<sub>2</sub> and small bioligands. *Inorg. Chim. Acta* 283: 202-210.
- Klarlund J.K., 1985. Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins. *Cell.* 41:707-717.
- Komura A., Hayashi M., Imanaga H., 1977. Hydrolytic behavior of Oxovanadium(IV) ions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50: 2927-2931.
- Köpf-Maier P., Köpf H., 1994. Organometallic titanium, vanadium, niobium, molybdenum and rhenium complexes – early transition metal antitumor drugs. In: Fricker SP (ed) *Metal Compounds in Cancer Therapy*, Chapman & Hall, London, pp 109-146.
- Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev IBA. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. 2001. *Arch Biochem Biophys* 385:129–137.
- Krejsa C.M., Schieven G.L., 1998. Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Environ Health Perspect.* 5:1179- 1184. Review.



- Kresja C.M., Nadler S.G., Esselstyn J.M, Kavanagh J.T, Ledbetter J.A, Scieven GL., 1997. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *J Biol Chem.* 272: 11541–11549.
- Kuo C.C, Shih M., Kuo Y., Chiang W., 2001. Antagonism of Free-Radical-Induced Damage of Adlay Seed and Its Antiproliferative Effect in Human Histolytic Lymphoma U937 Monocytic Cells *J Agric Food Chem* 49:1654–1570.
- Kurozumi R, Takahashi M, Kojima S., 2005. Involvement of Mitochondrial Peroxynitrite in Nitric Oxide-Induced Glutathione Synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 779-785.
- Lachowicz A., Höbold W., Thiele K.-H., 1975. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung von Trialkylorthovanadaten. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 418: 65-71.
- Ladner J.E., Wladkowski B.D., Svensson L.A., Sjölin L., Gilliland G.L., 1997. X-ray structure of a ribonuclease A-Uridine Vanadate complex at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallogr. D* 53: 290-301.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5.
- Lau K.H., Tanimoto H., Baylink D.J., 1988. Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 123: 2858-2867.
- Lefcort H., Freedman Z., House S., Pendleton M., 2008. Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good? *Ecohealth.* 5: 10-7.
- Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E.R., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 15036–15040.
- Li J., Elberg G., Crans D.C, Shechter Y. 1996. Evidence for the distinct vanadyl(+4)-dependent activating system for manifesting insulin-like effects. *Biochemistry.* 35:8314-8318.
- Li J., Elberg G., Sekar N., bin He Z., Shechter Y., 1997. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocrinology* 138 : 2274–2279.
- Lindqvist Y., Schneider G., Vihko P., 1994. Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. *Eur J Biochem. Apr* 221:139-142.

- Liochev S.I., Fridovich I., 1990. Vanadate-stimulated oxidation of NADPH in the presence of biological membranes and other sources of  $O_2^-$ . Arch Biochem Biophys 1:1-7.
- Lippard S.J. y Berg J. M.. 1994. Principles of Bioinorganic Chemistry. University Science Books, Mill Valley, CA.
- Littlechild J., Garcia-Rodriguez E., Dalby A., Isupov M., 2002. Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. J. Mol. Recognit.15: 291-296. Review.
- Lopez-Mediavilla C., Orfao A., Garcia M.V., Medina J.M., 1995. Changes in adult rat liver mitochondrial populations at different energy states analyzed by flow cytometry. Biochim Biophys Acta 1232:27-32.
- Luber B., Candidus S., Handsbusch G., et al., 2000. Tumor derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. Cell Adhes Commun. 7:391-408.
- Lyonnet B. M y Martin E. 1899. L'emploi therapeutique des derives du vanadium. Presse Med. 1:191-192.
- Macara I.G., 1980. Vanadium--an element in search of a role. Trends Biochem Sci. 5: 92-94.
- Mailhes J.B., Hilliard C., Fuseler J.W., London S.N., 2003. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. Mutat Res 538:101-107.
- Marchetti P., Susin S.A., Decaudin D., Gamen S., Castedo M., Hirsch T., et al., 1996. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. Cancer Res 56:2033-2038.
- Marnett L.J., 1999. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. Mut. Res.-Fund. Mol. Mech. Mutagen. 424: 83-95.
- Marnett L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 21361-21370.
- Martin C., Berrige G., Mistry P., Higgins C., Charlton P, Callaghan R., 2000. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binidng prior to nucleotide hydrolysis. Biochemistry 39:11901-11906.
- Marzban L., Rahimian R., Brownsey R.W. McNeill J.H., 2002. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. Endocrinology 143: 4636-4645.

- Massey V., 1994. Activation of Molecular Oxygen by Flavins and Flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Matsuyoshi N., Hamagushi M., Tanigushi S., Nagafuchi A., Tsukita S., Tackeishi M., 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by the v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118:703–714.
- Mayer B. y Oberbauer R., 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci.* 18:89-94.
- McNeill J.H., Yuen V.G., Dai S., Orvig C., 1995. Increased potency of vanadium using organic ligands. *Mol Cell Biochem* 153:175-80.
- Mehdi M., Z., Srivastava A. K., 2005. Organo-vanadium compounds are potent activators of the protein kinase B signaling pathway and protein tyrosine phosphorylation: Mechanism of insulinomimesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440: 158–164.
- Mercurio F., Manning A. M., 1999. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol.*11:226–32.
- Messerschmidt L. Prade R. Wever A., 1998. Vanadium Compounds: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications, ACS Symp. Ser. 711, ed. by A. Tracey, D. Crans, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 186.
- Micera G., Sanna D., Dess, A., Kiss T., Buglyo P., 1993. Complex-forming properties of  $\alpha$ -hydroxycarboxylic acids with oxovanadium(IV)-ion. *Gazz. Chim. Ital.* 123: 573-577.
- Micera G., Sanna D., Kiss E., Garribba E., Kiss T., 1999. Oxovanadium (IV) complexes of phosphates of biological relevance:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  and thiamine mono- and diphosphate. *J. Inorg. Biochem.* 75: 303-309.
- Michibata H. y H. Sakurai. 1990. Vanadium in ascidians. En “Vanadium in Biological Systems”. Ed by Chasteen, N. D., editor. Kluwer Acad Publ. Dortrecht. 153–171.
- Michibata H., Uyama T., Ueki T., Kanamori K.m 2002. Vanadocyte is a cell holding the key to resolve the highly selective accumulation and reduction of vanadium in ascidians. *Microsc. Res. Technol.* 56:421-434.
- Mogi M., Ozeki N., Nakamura H., Togari A., 2004. Dual roles for NF-kappaB activation in osteoblastic cells by serum deprivation: osteoblastic apoptosis and cell-cycle arrest. *Bone* 35:507-516.
- Molero J.C., Martinez C., Andres A., Satrustegui J., Carrascosa J.M., 1998. Vanadate fully stimulates insulin receptor substrate-1 associated phosphatidyl

- inositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Lett* 425:298-304.
- Molero J.C., Pérez C., Martínez C., Villar M., Andrés A., Fermín Y., Carrascosa JM., 2002. Activation of MAP kinase by insulin and vanadate in adipocytes from young and old rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189: 77–84.
  - Molinuevo M.S., Barrio D.A., Cortizo A.M., Etcheverry S.B., 2004. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53:163-72.
  - Molinuevo M.S., Etcheverry S.B., Cortizo A.M., 2005. Macrophage activation by a vanadyl-aspirin complex is dependent on L-type calcium channel and the generation of nitric oxide. *Toxicology.* 210: 205-212.
  - Mongold J.J., Cros G.H., Vian L., Tep A., Ramanadham S., Siou G., Diaz J., McNeill J.H., Serrano J.J., 1990. Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium levels and pancreatic B-cell morphology. *Pharmacol Toxicol* 67:192-198.
  - Monteiro H.P., Winterbourn C.C., Stern A., 1991. Tetravalent vanadium releases ferritin ion which stimulates vanadium-dependent lipid peroxidation. *Free Rad Res Commun.* 1:125–129.
  - Morinville A., Maysinger D., Shaver A., 1998. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends Pharmacol Sci.*; 19: 452-460.
  - Mosseri R., Waner T., Shefi M., Shafrir E., Meyerovitch J., 2000. Gluconeogenesis in non-obese diabetic (NOD) mice: in vivo effects of vandadate treatment on hepatic glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Metabolism* 49: 321–325.
  - Mountjoy K.G., Flier J.S., 1990. Vanadate regulates glucose transporter (Glut-1) expression in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Endocrinology.* 4:2025-2034.
  - Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., B Pratik., Tiwari A., Chatterjee M., 2004. Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters* 150 135–143.
  - Müller A., Diemann E., Jørgensen C.K ., 1973. Electronic spectra of tetrahedral oxo- thio- and seleno complexes formed by elements of the beginning of the transition groups. *Struct. Bonding* 14: 23-47.
  - Narda G.E., Vega E.D., Pedregosa J.C, Etcheverry S.B, Baran E.J., 1992 Über die wechselwirkung des vanadyl (IV)-kations mit calcium hydroxylapatit. *Naturforsch* 47b, 395 - 398.
  - Nielsen F.H., 1995. Vanadium in Mammalian Physiology and Nutrition. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 543 - 573. Eds: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.

- Nielsen F.H., Vanadium, in: B.L. O'Dell, R.A., 1997. Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Sunde (Eds.). Marcel Dekker, New York (chap. 22).
- Noblía P., Baran E.J., Otero LDraper., P., Cerecetto H., Gonzalez M., Piro O.E., Castellano E, Inohara T., Adachi Y., Sakurai H., Gambino D., 2004. New Vanadium(V) Complexes with Salicylaldehyde Semicarbazone Derivatives: Synthesis, Characterization, and in vitro Insulin-Mimetic Activity-Crystal Structure of  $[V^VO_2(\text{salicylaldehyde semicarbazone})]$ . Eur. J. Inorg. Chem. 2: 322–328.
- Noblía P., Vieites M., Parajón-Costa B.S., Baran E.J., et al., 2005. Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of  $[V^VO_2(5\text{-bromosalicylaldehyde semicarbazone})]$ . J Inorg Biochem. 99:443-451.
- Nour-Eldeen A.F., Craig M.M., Gresser M.J., 1985. Interaction of inorganic vanadate with glucose-6-phosphate dehydrogenase. Nonenzymic formation of glucose 6-vanadate. J Biol Chem. 260:6836-6842.
- Nriagu JO. 1998. History, Occurrence, and Uses of Vanadium. Vanadium in the Environment. Chemistry and biochemistry, 30: 1 - 24. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC.
- Nxumalo F., Glover N. R., Tracey A. S., 1998. Kinetics and molecular modelling studies of the inhibition of protein tyrosine phosphatases by N,N-dimethylhydroxylamine complexes of vanadium(V). J. Biol. Inorg. Chem. 3: 534-542.
- Nxumalo F., Tracey A.S., 1998. Reactions of vanadium(V) complexes of N N -dimethylhydroxylamine with sulfur-containing ligands: implications for protein tyrosine phosphatase inhibition. J. Biol. Inorg. Chem. 3: 527-533.
- Nyska A., Kohen R., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, Toxicol. Pathol. 30: 620–650.
- Ohkuma S. y Poole B. 1981. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. Journal of Cell Biology 90: 656-664.
- Olivier P., Testard P., Marzin D. and Abbott D., 1995. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hep-atocytes in primary culture. Toxicology in Vitro 9: 133-138.
- Osin´ska-Kro´licka, I., Podsiadly, H. , Bukietyn´ska K., Zemanek-Zboch, M., Nowak, D., Suchoszek-Lukaniuk, K., Malicka-Blaszkiwicz, M. (2004)

Vanadium(III) complexes with L-cysteine – stability, speciation and the effect on actin in hepatoma Morris 5123 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98: 2087–2098.

- Oullet M., Barbeau B., 1999. Tremblay M. p56lck, ZAP-70, SLP-76, and calcium-regulated effectors are involved in NF- $\kappa$ B activation by bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphate inhibitors in human T-cells. *J Biol Chem.* 49:35029–36.
- Pandey S. K., Anand-Srivastava M. B., Srivastava A. K., 1998. Vanadyl sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 37:7-14.
- Pandey S.K., Théberge J.F., Bernier M., Srivastava A.K., 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70(s6k) signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. *Biochemistry* 38: 14667–14675.
- Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Mol Cell Biochem* 1995;153:69–78.
- Partridge N.C., Alcorn D., Michelangeli V.P., Ryan G., Martin T.J., 1983. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res* 43: 4308-4314.
- Perez-Benito JF, 2006. Effects of chromium(VI) and vanadium(V) on the lifespan of fish. *J Trace Elem Med Biol.*20:161-170.
- Perron L., 2001. Vanadium, Natural Resources. Canada, Minerals & Resources Sector, Canada Minerals Yearbook 59.1–59.7.
- Pessoa C.J., Tomaz I., Kiss T., Kiss E., Buglyó P., 2002. The systems V/VO<sup>2+</sup>-glutathione and related ligands: a potentiometric and spectroscopic study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 225-240.
- Pessoa J.C., Tomaz I., Kiss T., Buglyó P., 2001. The system VO<sup>2+</sup> + oxidized glutathione: a potentiometric and spectroscopic study. *J. Inorg. Biochem.* 84: 259-270.
- Peters K, Davis M., Howard B.W., et al. 2003. Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); unliganded vanadium (VO<sub>4</sub>) as the active component. *J Inorg Biochem* 96:321-30.
- Pinchuk I., Schnitzer E., Lichtenberg D., 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL, *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 1389: 155–172.
- Pope M.T., Dale B.W., 1968. Isopoly-vanadates, -niobates, and -tantalates.

Q. Rev. Chem. Soc. 22: 527–548..

- Posner B.I, Faure R., Burges J.W., et al., 1994. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem.* 269:4596–604.
- Poucheret P., Verma S., Grynepas M.D., McNeil, J.H., 1998. Vanadium and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 188:73–80.
- Pribsch W., Rehder D., 1985. Preparation and  $^{51}\text{V}$  NMR characteristics of oxovanadium(V) compounds. Relation between metal shielding and ligand electronegativity. *Inorg. Chem.* 24: 3058-3062.
- Pribsch W., Rehder D., 1990. Oxovanadium alkoxides: structure, reactivity and vanadium-51 NMR characteristics. Crystal and molecular structures of tris (2-chloroethoxy)oxovanadium and aquadichlorooxobis(tetrahydrofuran) vanadium. *Inorg. Chem.* 29: 3013–3019.
- Puleo DA. y Huh W.W., 2004. Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells. *Journal of Applied Biomaterials* 6: 109 – 116.
- Qin Y., Lu M., Gong X., 2008. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biology International* 32: 224-228.
- Quarles L.D., Yohay D.A., Lever L.W., Caton R., Wenstrup R.J., 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7:683-692.
- Ramanadham S., Heyliger C., Gresser M.J., Tracey A.S., McNeill J.H., 1991. The distribution and half-life for retention of vanadium in the organs of normal and diabetic rats orally fed vanadium(IV) and vanadium(V). *Biol Trace Elem Res* 30:119-124.
- Ramasarma T., Crane F.L., 1981. Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr. Top. Cell. Reg.* 20: 247–301.
- Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegmann P., 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mut Res* 386:291–298.
- Ramos S., Manuel M., Tiago T., Duarte R., Martins J., Gutiérrez-Merino C, Moura J.J, Aureliano M., 2006. Decavanadate interactions with actin: inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decameric vanadate. *J Inorg Biochem.* 11:1734-1743.

- Rao S., Ushida T., Tateishi T., Okazaki Y., Asao S., 1996. Effect of Ti, Al, and V ions on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells. *Biomed Mater Eng.* 6:79-86.
- Ray W.J Jr., Post C.B., 1990. The oxyvanadium constellation in transition-state-analogue complexes of phosphoglucomutase and ribonuclease. Structural deductions from electron-transfer spectra. *Biochemistry.* 29:2779-2789.
- Re R., Pellegrini R.N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237.
- Reese R.G. Jr., 2001. Vanadium, domestic survey tables by A.A. Wario and world data by R.G. Coleman, pp. 81.1–81.2.
- Rehder, D. 1992. Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals.* 5:3–12.
- Rehder D., 1999. The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coord. Chem. Rev.* 182: 297-322.
- Rehder D., 1999. The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coordination Chemistry Reviews* 182: 297–322.
- Rehder D., Schulzke C., Dau H., Meinke C., Hanss J., Epple M., 2000. Water and bromide in the active center of vanadate-dependent haloperoxidases. *J. Inorg. Biochem.* 80:115-121.
- Rehder D. 2008. *Bioinorganic vanadium chemistry.* J. Wiley, Chichester.
- Reiter N.J., White D.J., Rusnak F., 2002. Inhibition of Bacteriophage  $\lambda$  protein phosphatase by organic and oxoanion inhibitors. *Biochemistry* 41: 1051-1059.
- Reul B.A., Amin S.S., Buchet J.P., Ongemba L.N, Crans D.C, Brichard S.M., 1999. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 126: 467–477.
- Rhee S.G., 2006.  $H_2O_2$ , a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science:* 312: 1882-1883.
- Rigden D.J., Littlejohn J., Jedrzejewski M.J., 2003. Structures of phosphate and trivanadate complexes of *Bacillus stearothermophilus* phosphatase PhoE: structural and functional analysis in the cofactor-dependent phosphoglycerate mutase superfamily. *J. Mol. Biol.* 325:411–420.



- Riveros, P.A., Dutrizac, J.E., Gattrell, M., Perron, L. (Eds.), Vanadium, Geology, Processing and Applications, Proceedings of the International Symposium on Vanadium, Conference of Metallurgists, Montreal.
- Robson R. L.; Woodley P. R.; Pau R. N.; Eady R. R., 1989. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *EMBO J.* 8: 1217-24.
- Rubinson K.A., 1981. Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 212: 65–84.
- Rucker R.B., Lonnerdal B., C.L. Keen, 1994. Intestinal absorption of nutritionally important trace elements, in: L.R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., Raven Press, New York, (chap. 66).
- Rusnak F., 2000. In *Manganese and Its Role in Biological Processes*; Sigel, A., H., S., Eds.; Marcell Dekker: New York, Vol.37.
- Sabbioni E., Fischbach M., Pozzi G., Pietra R., Gallorini M., Piette J.L., 1991. Cellular retention, toxicity and carcinogenic potential of seafood arsenic. I. Lack of cytotoxicity and transforming activity of arsenobetaine in the BALB/3T3 cell line. *Carcinogenesis.* 12:1287-1291.
- Sakurai H., 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: Implication for vanadium toxicity and biological effects. *Envir Health Perspect.* 3:35–36.
- Sakurai H., Shimomura S., Ishizu K., 1981. Cysteine methylester-oxovanadium (IV) complex, preparation and characterization. *Inorg. Chim. Acta* 55: L67–L69.
- Sállice V.C., Cortizo A.M., Gomez Dumm C.L., Etchevery S.B., 1999. Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Mol Cell Biochem.* 198:119–28.
- Samet J.M, Graves L.M, Quay J, Dailey L.A, et al., 1998. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Pneumonol.* 75: 551–558.
- Sastre J., Pallardo F.V., Vina J., 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Jubmb. Life* 49: 427-435.
- Schmidt C.M. Cheng C.N., Marino A., Konsoula R., Barile F.A., 2004. Hormesis effect of trace metals on cultured normal and immortal human mammary cells.. *Toxicol Ind Health.* 20:57-68.
- Schroeder H.A., Balassa J.J., Tipton I.H., 1963. Abnormal. Trace Metals in Man: Vanadium. *J. Chron. Dis.* 16: 1047–1071.

- Schwarz K., Milne D.B., 1971. Growth effects of vanadium in the rat. *Science* 174: 426–428.
- Seglen P.O., Gordon P.B., 1981. Vanadate inhibits protein degradation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 15:7699-701.
- Sekar N., Li J., He Z., Gefel D., Shechter Y., 1999. Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes. *Endocrinology* 140: 1125-1131.
- Selbin J., 1965. The chemistry of oxovanadium(IV). *Chem. Rev.* 65: 153–175.
- Setyawati I.A., Thompson K.H., Yuen V.G, Sun Y., Battell M., Lyster D.M., Vo C., Ruth T.J., Zeisler S, McNeill J.H., Orvig C., 1998. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of <sup>48</sup>V-labeled compounds in rats. *J Appl Physiol* 84:569-575.
- Shapiro H. M., 2000. Membrane Potential Estimation by Flow Cytometry. *Methods* 21, 271–279.
- Shechter Y., Karlisch S.J.D., 1980. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. *Nature* 284: 556-558.
- Shechter Y., Shisheva, A., 1993. Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endavour* 17: 27-31.
- Shechter Y., Li J., Meyerovitch J., Gefel D., Bruck R., Elberg G., Miller D.S, Shisheva A., 1995. Insulin-like actions of vanadate are mediated in an insulin-receptor-independent manner via nonreceptor protein tyrosine kinases and protein phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* 153:39-47.
- Shechter Y., Goldwasser I., Mironchik M., Fridkin M., Gefel D., 2003. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coordination Chemistry Reviews* 237:3-11.
- Shepard R.L., Winter M.A., Hsaio S.C., Pearce H.L., Beck W.T., Dantzig A.H., 1998. Effects of modulators on the ATPase activity and vanadate nucleotide trapping of human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 56:719–727.
- Shi X., Dalal N.S., 1993. Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 307: 336-341.
- Shisheva A., Shechter Y., 1992. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry* 31:8059-8063.

- Shisheva A., Shechter Y., 1993. Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin-activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect. *J. Biol. Chem.* 268: 6463-6468.
- Shukla R., Barve V., Padhye S., Bhonde R., 2006. Reduction of oxidative stress induced vanadium toxicity by complexing with a flavonoid, quercetin: a pragmatic therapeutic approach for diabetes. *Biometals* 19:685-693.
- Shukla R y Bhonde R. R., 2008. Adipogenic action of vanadium: a new dimension in treating diabetes. *BioMetals* 21: 205-210.
- Silvestri F., Ribatti D., Nico B., Silvestri N., Romito A., Dammacco F., 1995. Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms. *Ann Ital Med Int* 10:7-13.
- Simm A., Bertsch G., Frank H., Zimmermann U., Hoppe J., 1997. Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis. *J Cell Sci.* 110 :819-828.
- Simons T.J.B., 1979. Vanadate - a new tool for biologists. *Nature* 281: 337-338.
- Ska-Kordala M.S., Kowska A.B., Ski J., Gabrielska J.O., 2001.. *Cell Mol Biol Lett* 6:277–281.
- Slebodnick., C., Hamstra B.J., Pecoraro V.L., 1997. Modelling the Biological Chemistry of Vanadium: Structural and Reactivity Studies Elucidating Biological Function. *Structure and Bonding*, P. Sadler, Ed.,89, 57
- Somerville J., Davies B., 1962. Effect of vanadium on serum cholesterol. *Heart J.* 64: 54–56.
- Srivastava A.K., 1990. Non-receptor protein tyrosine kinases of normal tissues *Int. J. Biochem.* 22:1229-1234.
- Stadtman E.R., 1992. Protein oxidation and aging, *Science* 257: 1220–1224.
- Stadtman E.R., 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases.
- Stadtman E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11: 1105–1112.
- Stankiewicz P.J., Gresser, M.J., 1988. Inhibition of phosphatase and sulfatase by transition-state analogs. *Biochemistry* 27: 206-212.
- Stebbing A.R., 2002. Tolerance and hormesis--increased resistance to copper in hydroids linked to hormesis. *Mar Environ Res.* 54:805-809.

- Steller H., 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-9 Review.
- Stomberg R., 1985. The crystal structure of potassium carbonatooxodiperoxovanadate(V),  $K_3[VO(O_2)CO_3]$ . *Acta Chem. Scand.* A39: 725-731.
- Stossel T.P., 1989. From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 5: 18261-18264.
- Strasberg R. M., y Rieber, M. 1995. Suppression of cyclin D1 but not cdk4 or cyclin A with induction of melanoma terminal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 422-427.
- Sudo H., Kodama H.A, Amagai Y., Yamamoto S., Kasai S., 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96:191-198.
- Takenaga K., 1996. Suppression of metastatic potential of highmetastatic Lewis lung sarcoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis*:16:97-106.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L1005-L1028.
- Thompson D., Beckwith S.V.W., Fockenbrock R., et al 1999. The Surface Density Of Extremely Red Objects. *The Astrophysical Journal.* 523:100-106.
- Thompson H.J., Chasteen D.N, Neeker L., 1984. Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*: 5:849-851.
- Thompson K.H., Leichter J., McNeil J.H., 1993. Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1549-1555.
- Thompson K.H., Battell M., McNeill J.H., 1998. Toxicology of vanadium in mammals. In *Vanadium in the environment Part 2*. Edited by JO Nriagu, 21-38.
- Thompson K.H., 1999. Vanadium and diabetes. *Biofactors* 10:43-51.
- Thompson K.H., McNeill J.H., Orvig C., 1999. Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem. Rev.* 99: 2561-2571.
- Thompson K.H., McNeill J.H., Orvig C., 1999. Vanadium-containing insulin biomimetic drugs. In: Clarke MJ, Sadler PJ (eds) *Metallopharmaceuticals II*, Springer, Berlin, pp 139-158.

- Thompson K.H., Orvig C., 2006. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I *Journal of Inorganic Biochemistry* 100:1925–1935.
- Thrailkill K.M., Siddhanti S.R., Fowlkes J.L., Quarles L.D., 1995. Differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF-I and IGFBPs. *Bone* 17: 307-313.
- Tótaró R., M., 2002. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Tracey A.S., Gresser M.J. 1986. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 609-613.
- Tracey A.S., Gresser M.J., Galeffi B., 1988. Vanadium(V) oxyanions. Interactions of vanadate with methanol and methanol/phosphate. *Inorg. Chem.* 27: 157-161.
- Tracey A.S., 2000. Hydroxamido vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatases and cell cultures. *J Inorg Biochem.* 80: 11-16. Review.
- Tremollieres F., Mohan S., Baylink D.J., Ribot C., 1994. [Autocrine regulation of cell proliferation and secretion of insulin-like growth factor I (IGF-I) in osteoblastic cell line MC3T3-E1]. *Ann Endocrinol (Paris)* 55: 95-102.
- Trudel S., Paquet M.R., Grinstein S., 1991. Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem J.* 276:611–619.
- Tsiani E., Fantus I.G.. 1997. Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol Metab.* 8:51–58.
- Tuck D.G., Walters R.M., 1963. The structure of perchromic acid. *Inorg. Chem.* 2: 428-429.
- Uthus E.O., Nielsen F.H., 1990. Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magnes Trace Elem* 9:219-226.
- Valko M., Rhodes 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.
- Van Engeland M., Ramaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P., 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 24:131-139.
- Van Etten R.L., Waymack P.P., Rehkop D.M., 1974. Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Am. Chem.Soc.* 96: 6782-6785.

- Vilas Boas L.V. y Costa Pessoa J., 1987. In *Comprehensive Coordination Chemistry*. 3: ch. 33. Eds: Wilkinson, G., Sir, Gillard, R.D., McCleverty, J.A. Pergamon Press: New York.
- Vilter H., 1984. Peroxidases from phaeophyceae: A vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23:1387-1390 .
- Vilter H., 1995. Vanadium-dependent haloperoxidases. *Met Ions Biol Syst.*;31:325-362. Review.
- Wang Y.Z., Bonner J.C., 2000. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase ERK-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22, 590- 596.
- Wang YZ, Ingram JL, Walters DM, Rice AB, Santos JH, Van Houten B, Bonner JC., 2003. Vanadium-induced STAT-1 activation in lung myofibroblasts requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and P38 MAP kinase. *Free Radic Biol Med.* 35:845-855.
- Wever R.; Kustin K., 1990. Vanadium: a biologically relevant element. *Adv. Inorg. Chem.* 35:81-115.
- Wilden P.A., Siddle K., Haring E., Backer J.M., White M.F, Kahn C.R., 1992. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J. Biol. Chem.* 267:13719-13727.
- Wilkinson M.G, Millar J.B., 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J.* 14:2147-57.
- Williams P.A.M., Baran E.J., 1992. A spectrophotometric study of the interaction of VO<sup>2+</sup> with adenine in nucleotides. *J. Inorg. Biochem.* 48: 15-19.
- Williams P.A.M., Etcheverry S.B., Baran E.J., 1996. A spectrophotometric study of the interaction of VO<sup>2+</sup> with cytosine in nucleotides. *J. Inorg. Biochem.* 61: 285-289.
- Willsky G.R, White D.A, McCabe B.C., 1984. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259: 13273–13281.
- Xu K. and Thornalley P.J., 2001. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T.C., Terao J., 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:1201–1204.

- Yamazaki Y., Tsuruga M., Zhou D., Fujita Y., Shang X., Dang Y., Kawasaki K., Oka S., 2000. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 259: 64-78.
- Yang X., Wang K., Lu J., Crans D.C., 2003. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chemistry Reviews.* 237:103-111.
- Yang X-G., Yang X-D., Yuan L., Wang K., Crans D.C., 2004. The Permeability and Cytotoxicity of Insulin-Mimetic Vanadium Compounds. *Pharmaceutical Research* 21: 1026-1033.
- Ye J., Ding M., Leonard S.S., Robinson V.A., Millecchia L., Zhang X., Castranova V, Vallyathan V., Shi X.,1999. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxidemediated reactions. *Mol Cell Biochem.* 202:9-17.
- Yongke L., Cederbaum A., 2007. The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1-overexpressing HepG2 cells: Modulation by ERK, ROS, glutathione, and thioredoxin. *Free Radical Biology & Medicine* 43: 1061–1075.
- Yuan B.Z., Jefferson A.M., Millecchia L., Popescu N.C., Reynolds S.H., 2007. Morphological changes and nuclear translocation of DLC1 tumor suppressor protein precede apoptosis in human non-small cell lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 313:3868-3880.
- Yuen V.G, Orvig C., Thompson K.H., McNeill J.H., 1993. Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol.* 71:270-276.
- Yuen V.G., Orvig C., McNeill J.H., 1993. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 71:263-269.
- Yuen V.G., Orvig C., McNeill J.H., 1993. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 71:263-269.
- Yuvaniyama J., Denu J.M., Dixon J.E., Saper M.A., 1996. Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase. *Science* 272: 1328-1331.
- Zhang J., Brodbelt J.S., Wang J., 2005. Threshold dissociation and molecular modeling of transition metal complexes of flavonoids. *J Am Soc Mass Spectrom* 16:139–151.

- Zhang M., Zhou M., Van Etten R. L., Stauffacher C. V., 1997. Crystal Structure of Bovine Low Molecular Weight Phosphotyrosyl Phosphatase Complexed with the Transition State Analog Vanadate. *Biochemistry* 36: 15-23.
- Zhang Z., Huang, C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X., 2001. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 311-320.
- Zhang Z., Huang C., Li J., and Shi X., 2002. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg. Biochem.* 89:142–148.
- Zhang Z, Leonard SS, Huang C, Vallyathan V, Castranova V, Shi X., 2003. Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest. *Free Radic Biol Med.* 34:1333-1342.
- Zhang Z.Y., Wang Y., Dixon J.E., 1994. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1624-1627.
- Zhao Z., Tan Z., Diltz C.D., You M., Fisher E.H., 1996. Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem.* 271:22251–22255.
- Zhou J, Sargiannidou I, Tuszynski GP., 2000. The role of adhesive proteins in the hematogenous spread of cancer. *In Vivo.* 14:1999–2080.
- Zick Y., Sager-Eisenberg R., 1990. A combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate concomitantly stimulates protein tyrosine phosphorylation and polyphosphoinositide breakdown in different cell lines. *Biochemistry* 29:10240–10245.
- Zou H., Li Y., Liu X., Wang X., 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 274:11549-115456.



## Publicaciones a las que dio origen este trabajo de Tesis

- 1. Spectroscopic Characterization of a  $VO^{2+}$  Complex of Oxodiacetic Acid and its Bioactivity on Osteoblast-Like Cells in Culture.** Rivadeneira J, Barrio DA, Etcheverry SB, Baran EJ. *Biol Trace Elem Res* (2007) 118:159-166.
- 2. Antioxidant effects of the VO(IV) Hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention.** Etcheverry S. B., Ferrera E G, Naso L, Rivadeneira J, P M Williams. *J Biol Inorg Chem* (2008) 13:435-447.
- 3. Biological effects of a complex of vanadium(V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: Mechanism of action.** J. Rivadeneira, D. Barrio, G. Arrambide, D. Gambino, L. Bruzzzone, S.B. Etcheverry. *J Inorg Biochem* (2008) 103:633-42.
- 4. Spectroscopic Behavior and Biological Activity of  $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ .** G. Arrambide, J. Rivadeneira, S.B. Etcheverry, B.S. Parajón-Costa, D. Gambino E. J. Baran (2009). *Biol Trace Elem Res.* (en prensa).