

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y
ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE VANADIO Y
APORTACIONES AL MECANISMO DE ACCIÓN “*IN VITRO*”**

Por

M.C. ADELA SÁNCHEZ OSEGUERA

**Como requisito para obtener el Grado académico de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación
en Farmacia**

MONTERREY, N. L., 2021.

Revisión de tesis
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y
ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE VANADIO Y
APORTACIONES AL MECANISMO DE ACCIÓN “*IN VITRO*”

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Director

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Co-Director interno

Dr. Raúl Lucio Porto
Co-Director externo

Dr. Isaías Balderas Rentería
Comité tutorial

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago
Comité tutorial

Aprobación de Tesis
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y
ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE VANADIO Y
APORTACIONES AL MECANISMO DE ACCIÓN “*IN VITRO*”

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería
Secretario

Dr. Omar González Santiago
Vocal

Dr. Fabián Eliseo Olazarán Santibañez
Vocal

Dr. Christian Tadeo Badillo
Vocal

Dra. Ma Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT

por la beca otorgada durante el tiempo que duraron mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León

A la Facultad de Ciencias Químicas

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** por brindarme la oportunidad de formar parte de esta gran Universidad y por poder desarrollarme profesionalmente.

A la **Facultad de Ciencias Químicas**, sus directivos y en particular al laboratorio de FMyMB por brindarme la oportunidad de continuar cumpliendo mis metas.

A los Doctores Eder U. Arredondo Espinoza, Isaías Balderas Rentería, Omar González Santiago, Myrna L. Yeverino Gutiérrez y Lucía Cantú Cárdenas, gracias por compartir sus conocimientos, apoyo incondicional para lograr terminar mis estudios.

En especial a mis asesores de tesis y grandes personas la Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera y el Dr. Raúl Lucio Porto
Gracias infinitas por confiar su proyecto para su desarrollo, por dirigirme y apoyarme durante el estudio del Doctorado.
Ustedes son un gran ejemplo laboral-científico y personal.

A las Facultades que colaboraron con este proyecto, a la Facultad de Ingeniería Mecánica y electrónica y a la Facultad de Medicina.
A la Dra. Gloria González González gracias por el tiempo y ayuda para el mejoramiento de este proyecto.

Agradezco a la Facultad de la Habana, Cuba, por recibirme para realizar la estancia de investigación al IMRE, ISTEAC, CEAC.

A los Doctores Abel Fundora Cruz y Yorexis González Alfaro.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero dedicarles este éxito en mi vida a mis padres:
Juana Oseguera G. y Fulgencio Othón Sánchez R.
ustedes con su amor, cariño, comprensión y
su guía de vida, entre tantas cosas que me brindaron,
para poder guiarme por el mejor camino,
de las difíciles decisiones de mi vida.

A mi Hermano Jesús Sánchez O.
Que siempre eres mi ejemplo a seguir
y un pilar importante en la familia,
porque gracias a ti,
estoy cumpliendo una meta más en la vida,
que hace tiempo se veía muy lejos y
hoy lo estoy culminado.

A mi hermanito menor Juan Iyair Sánchez O.
por su ayuda incondicional
que siempre me brinda su entusiasmo y alegría.

A mi hermanito adoptado Jorge Mora R.
porque tiene las ocurrencias más locas
y siempre me hace sentir como su ejemplo a seguir.

A mi abuelito Mucio Oseguera
porque siempre estuvo al pendiente de mi formación profesional,
por su apoyo y sus consejos.

A mis amigos Ana María, Daniela Meza, Paty,
Miguel, Carlos y Viri.
gracias por su apoyo en todo este tiempo,
ustedes me dieron consejos para seguir adelante,
por su apoyo incondicional y su cariño.

A mis amigos y colegas
Zacatecas, Jesús, Yuridia, Eli, Liz, Zulem y Brayan

Con cariño y amor Ade.

ÁREA DE TRABAJO

La síntesis y caracterización de las nanopartículas se realizó en el Laboratorio de espectrometría del CIIDIT de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME), U.A.N.L. La actividad citotóxica se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), U.A.N.L. La actividad antimicrobiana se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Medicina (FM), U. A. N. L.

El análisis de patrón de expresión génica diferencial se realizó mediante la técnica de microarreglo de ADN, en la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), U.A.N.L., y se envió la muestra a la Universidad Autónoma de México.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
ÁREA DE TRABAJO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
SÍMBOLOS	xvi
ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. El cáncer	3
2.1.1. Características genéticas del cáncer	3
2.1.2. Quimioterapia, sus efectos adversos y mecanismos de resistencia del cáncer	6
2.1.3. Estrategia molecular para la expresión génica	8
2.2. Infecciones causadas por microorganismos patógenos y emergentes	9
2.2.1. Infecciones causadas por bacterias patógenas	9
2.2.2. Características morfológicas de Bacterias Gram positivas y Gram negativas	10
2.2.3. Tratamiento contra las bacterias patógenas, sus efectos adversos y mecanismos de resistencia	11
2.2.4. Infecciones causadas por hongos y levaduras emergentes	14
2.2.5. Características morfológicas de hongos y levaduras	14
2.2.6. Tratamiento contra los hongos y levaduras emergentes, sus efectos adversos y mecanismos de resistencia	15
2.3. Estrategias para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas	17

2.3.1. Nanopartículas	17
2.3.2. Métodos de síntesis y caracterización de nanopartículas	18
2.3.3. Ventajas de las nanopartículas	19
2.3.4. Nanopartículas en el área de la Salud	19
2.3.5. Vanadio	20
2.3.6. Actividad anticancerígena del sulfato de vanadio	21
2.3.7. Actividad antimicrobiana del sulfato de vanadio	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. ESTRATEGIA GENERAL	27
6. MÉTODOS	28
6.1. Síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio	28
6.1.1. Caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio	29
6.2. Actividad citotóxica y anticancerígena	30
6.2.1. Cultivo de las líneas celulares no cancerígena	30
6.2.2. Cultivo de las líneas celulares cancerígenas	30
6.2.3. Exposición de las líneas celulares con las nanopartículas de fosfato de vanadio.....	30
6.2.4. Evaluación de la viabilidad celular mediante la técnica de MTT ..	34
6.3. Actividad antimicrobiana	35
6.3.1. Cultivo de bacterias	35
6.3.2. Cultivo de hongos y levaduras	35
6.3.3. Técnica de microdilución en placa	35
6.4. Mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio en las células cancerígenas	37
6.4.1. Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglos).....	37
6.4.2. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno	39

6.5. Disposición de residuos generados	41
7. RESULTADOS	42
7.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio ..	42
7.2. Actividad citotóxica	47
7.3. Actividad anticancerígena	53
7.4. Actividad antimicrobiana	61
7.5. Mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio en las células cancerígenas	61
7.5.1. Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglos)	62
7.5.2. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	67
8. DISCUSIÓN	69
8.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio ..	69
8.2. Actividad citotóxica	71
8.3. Actividad anticancerígena	72
8.4. Actividad antimicrobiana	74
8.5. Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglos)	76
8.6. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno	78
9. CONCLUSIONES	80
10. PERSPECTIVAS	82
LITERATURA CITADA	83
ANEXO A	91
ANEXO B	93
ANEXO C	95
RESUMEN BIOGRÁFICO	98
LOGROS ALCANZADOS	100

LISTA DE TABLAS

1. Genes involucrados en el cáncer	5
2. Síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h, V13, V17 y V21	44
3. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC ₅₀) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO ₄ en la línea celular CCL-81	47
4. Viabilidad celular (%) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO ₄ en la línea celular CCL-81	48
5. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC ₅₀) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17 y V21 en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 Y 55X	49
6. Viabilidad celular (%) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17 y V21 en la línea celular CCL-13, CCL-81 y 55X	49
7. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC ₅₀) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO ₄ en las líneas celulares HTB-35 Y HTB-22	53
8. Viabilidad celular (%) de la actividad anticancerígena de las nanopartículas VPI-2h, VOSO ₄ y vincristina en la línea celular HTB-35 y HTB-22	54
9. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC ₅₀) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17, V21 y vincristina en las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177	56
10. Viabilidad celular (%) de la actividad anticancerígena de las nanopartículas V13, V17, V21 y vincristina en la línea celular HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177	57
11. Resultados de Concentración mínima Inhibitoria (MIC) de la actividad antimicrobiana en las nanopartículas de fosfato de vanadio V13, V17 y V21	61

12. Vías biológicas reprimidas en el tratamiento de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21	64
13. Vías biológicas sobre-expresadas en el tratamiento de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21	65
14. Producción de ROS (%) de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en CCL-81 y HTB-22	67
15. Antibiograma de los aislados clínicos de las bacterias fármacorresistentes	91
16. Antibiograma de los aislados clínicos de los hongos fármacorresistentes	92

LISTA DE FIGURAS

1. Vías metabólicas involucradas en el cáncer.	4
2. Estructura y composición de los tipos de bacterias	11
3. Morfología de los hongos y levaduras	15
4. Tipos de nanopartículas	18
5. Compuestos de oxovanadio (IV) (VO(mal) ₂)	21
6. Síntesis de nanopartículas de fosfato de vanadio	28
7. Esquema de las nanopartículas VPI-2h y los controles de la determinación para la actividad citotóxica en CCL81	31
8. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas VPI-2h y los controles para la determinación de la actividad anticancerígena en HTB-35 y HTB-22	32
9. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para la determinación de la actividad citotóxica en CCL- 13, CCL-81 y 55-X	33
10. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para la determinación de la actividad anticancerígena en HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177	33
11. Principio de la técnica de MTT	34
12. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para determinar la actividad antimicrobiana	36
13. Generación de diclorofluoresceína DCFH por acción de ROS	39
14. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V21 y los controles para la cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno en CCL-81 y HTB-22	40
15. Prueba de estabilidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio	42
16. Nanopartículas de fosfato de vanadio	42

17. Difractogramas de rayos X de las nanopartículas VPI-2h, V13, V17 y V21	43
18. Espectros de FTIR de las nanopartículas VPI-2h, V13, V17 y V21	
19. Nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h	45
20. Nanopartículas de fosfato de vanadio V13	45
21. Nanopartículas de fosfato de vanadio V17	46
22. Nanopartículas de fosfato de vanadio V21	46
23. Espectros UV-Vis de las nanopartículas de fosfato de vanadio	47
24. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular CCL-81	48
25. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular CCL-13	50
26. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular CCL-81	50
27. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular 55-X	50
28. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55X	52
29. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular HTB-35	54
30. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular HTB.22	55
31. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-35	57
32. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-22	58
33. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-38	58

34. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-177	59
35. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177	60
36. Extracción de ARN y microarreglo de ADN	62
37. Todos los genes del microarreglo de ADN	63
38. Rutas metabólicas de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 sobre HTB-22	66
39. Cuantificación de la producción de ROS de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 en las líneas celular CCL-81	67
40. Cuantificación de la producción de ROS de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 en las líneas celular HTB-22	69
41. Etapas de desarrollo de un fármaco	94

SÍMBOLOS

α	Alfa
cm^{-1}	Centímetros a la menos uno
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50
CO_2	Dióxido de Carbono
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
h	Hora
λ	Lambda
L	Litro
\pm	Más o menos
$>$	Mayor que
m	Metro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
μg	Microgramo
mA	Miliamperes
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
%	Porcentaje
%V	Porcentaje de viabilidad
p	Probabilidad
rpm	Revoluciones por minuto
θ	Theta

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ATP	Adenosina trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
LTA	Ácidos lipoteicoicos
WTA	Ácidos teicoicos de pared
SDA	Agar sabouraud dextrosa
PDA	Agar papa dextrosa
H ₂ O	Agua
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
EMB	Azul de metileno
Mex-AB-PprD	Bombas de expulsión
PBS	Buffer salino de fosfatos
KBr	Bromuro de potasio
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
ADNc	Cadena complementaria del ADN
HTB-35	Células de carcinoma escamoso de cérvix
HTB-38	Células de adenocarcinoma colorrectal
HTB-22	Células de adenocarcinoma mamario
HTB-177	Células de carcinoma de pulmón de células grandes
CCL-13	Células de hígado
CCL-81	Células de riñón de mono verde
55-X	Células de pulmón
P450	Citocromo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DRX	Difracción de rayos x
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EMEM	Eagle's Medio Esencial Mínimo
D-OXA	Enzima involucrada en la formación de biopelículas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FTIR	Espectrómetro de Infrarrojo
TNF	Factor de necrosis tumoral

K_2HPO_4	Fosfato dibásico de potasio
$VOHPO_4$	Fosfato de vanadio
PLs	Fosfolípidos
VO^{2+}	Ion vanadilo
LP	Lipoproteína
LPS	Lipopolisacáridos
CM	Membrana citoplasmática
OM	Membrana externa
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
miARN's	Micro ARN
$VOHPO_4 \cdot 2H_2O$	Nanopartículas de fosfato de vanadio
$VOHPO_4 \cdot 2H_2O$ VPI-2h	Nanopartículas de fosfato de vanadio # 1
$VOHPO_4 \cdot 2H_2O$ V13	Nanopartículas de fosfato de vanadio # 13
$VOHPO_4 \cdot 2H_2O$ V17	Nanopartículas de fosfato de vanadio # 17
$VOHPO_4 \cdot 2H_2O$ V21	Nanopartículas de fosfato de vanadio # 21
OMS	Organización Mundial de la Salud
CW	Pared celular
PG	Peptidoglicano
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
pH	Potencial de hidrógeno
OprD	Porina D
H^+	Protón de hidrógeno
PBP	Proteína fijadora de penicilina
BCL-2	Proteína de linfoma tipo 2
OMP	Proteína de membrana externa
IMP	Proteína de membrana interna
OmpA, BAX, BAK y BOK	Proteínas proapoptóticas
p53	Proteína supresora de tumor
CAP	Proteína unida covalentemente
SCWP	Polímeros de pared celular secundaria
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
PBS	Solución buffer de fosfatos
$VOSO_4$	Sulfato de vanadio
SFB	Suero fetal bovino
O_2^-	Superóxido

UV-Vis
kV
XO

Ultravioleta-Vis
Voltaje
Xantina Oxidasa

RESUMEN

Diversos estudios del sulfato de vanadio demuestran actividades biológicas, entre las cuales se mencionan las actividades anticancerígena y antimicrobiana. Debido a que los tratamientos actuales generan mecanismos de resistencia en las células cancerosas y microbianas, este material es una alternativa terapéutica para el desarrollo de fármacos no convencionales como las nanopartículas, dirigidos a combatir las enfermedades como cáncer e infecciones. En este proyecto, se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de fosfato de vanadio mediante DRX, FTIR, SEB y UV-Vis, se evaluaron el efecto citotóxico en CCL-13, CCL-81 y 55-X y el efecto anticancerígeno en HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177, ambos mediante la técnica de MTT. Se determinó la actividad antimicrobiana de aislados clínicos farmacorresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, mediante la técnica de microdilución en placa. Finalmente se realizó el microarreglo de ADN en HTB-22 expuesta a nanopartículas de fosfato de vanadio V21 y la producción de especies reactivas de oxígeno con la prueba de diacetato de 2',7'-diclorofluoreceína. Se demostró la composición de las nanopartículas de fosfato de vanadio por XRD, FTIR, y se obtuvieron nanopartículas esféricas con diámetros promedio de 40, 55, 70 y 75 nm, mediante UV-Vis se confirmó la liberación del ion VO^{2+} en medio ácido; mostraron baja toxicidad en CCL-13 y CCL-81 y alta toxicidad en 55-X; presentaron actividad anticancerígena en HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177; tuvieron actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Lomentospora prolificans*. Las nanopartículas V21 expuestas en HTB-22 inhibieron vías de señalización importantes en la supervivencia y en la proliferación celular; generaron estrés oxidativo en la mitocondrial e indujeron apoptosis; se confirmó que el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno es la causa del daño celular.

ABSTRACT

Several studies of vanadium sulfate demonstrate biological activities, among the anticancer and antimicrobial activities are mentioned. Because current treatments generate resistance mechanism in cancer and microbial cells, this material is a therapeutic alternative for the development of nonconventional drugs such as nanoparticles, aimed at fighting diseases such as cancer and infection. In this project, vanadium phosphate nanoparticles were synthesized and characterized by XRD, FTIR, SEM and UV-Vis, the cytotoxic effect were evaluated in CCL-13, CCL-81 and 55-X and the anticancer effect in HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177, both using the MTT technique. The antimicrobial activity was determined in drug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, using the microdilution plate technique. Finally, the DNA microarray was carried out in HTB-22 exposed to nanoparticles vanadium phosphate V21 and the production of reactive oxygen species with the 2',7'-dichlorofluorocein diacetate test. The composition of the vanadium phosphate nanoparticles was demonstrated by XRD, FTIR and were obtained spherical nanoparticles with average diameters of 40, 55, 70 and 75 nm; the release of the VO²⁺ ion in acid medium was confirmed by UV-Vis; they showed low toxicity in CCL-13 and CCL-81 and high toxicity in 55-X; they showed anticancer activity in HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177; had antimicrobial activity on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Lomentospora prolificans*. The V21 nanoparticles exposed in HTB-22 inhibited important signaling pathway in cancer cell survival and proliferation, generated oxidative stress in the mitochondria and induced apoptosis; increased production of reactive oxygen species was confirmed to be the cause of cell damage.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial; en el 2018 se presentaron 17 millones de nuevos casos de cáncer y 9.8 millones de muertes. Los principales tipos de cáncer son pulmón, colon; mama y cérvix. El tratamiento más común en esta enfermedad es la quimioterapia, este utiliza fármacos que actúan en las células tumorales durante el ciclo celular de la mitosis y otros actúan en la fase de reposo o cíclica. Sin embargo, no son específicos para células cancerosas, por lo que limita la efectividad del tratamiento, dando lugar a una gama de efectos secundarios y provoca el desenlace de mecanismos de resistencia en las células cancerosas.

Las infecciones son provocadas por patógenos oportunistas, afectan a personas con inmunodeficiencias, en el caso de las bacterias causan enfermedades principalmente nosocomiales, mientras que los hongos y levaduras afectan piel, mucosas, sistema respiratorio, e incluso se diseminan a otros órganos ocasionando la muerte al huésped. Debido a la aparición de cepas de microorganismos farmacorresistentes la Organización Mundial de Salud (OMS) estima que para el año 2050 este padecimiento será la principal causa de muerte. Algunos de los agentes causales son *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. Desde 1928, existen diferentes tratamientos antimicrobianos, para combatir bacterias se usan las cefalosporinas, los carbapenémicos, las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos, los beta-lactámicos y las tetraciclinas; para los hongos y levaduras se utilizan los macrólidos poliénicos y los triazoles. Sin embargo, estos fármacos provocan distintos efectos adversos, y desarrollan mecanismos de resistencia en las células microbianas.

Considerando que los tratamientos en dichos padecimientos generan efectos adversos y desarrollan mecanismos de resistencia, se necesita el desarrollo de nuevos tratamientos

en los que se destaca el uso de fármacos no convencionales, producidos con tecnologías innovadoras como la síntesis de nanopartículas. Para la síntesis de dichos nanomateriales se podría utilizar el sulfato de vanadio debido a que se demuestran en distintos estudios actividades biológicas, entre las cuales se mencionan las actividades anticancerígena y antimicrobiana; mostrando ser efectivas sobre las células cancerosas (cáncer de mama, cérvix, pulmón y colon), presentado mecanismos de acción como la generación de especies reactivas de oxígeno, daño al ADN (Ácido desoxirribonucleico) y apoptosis. En el caso de la actividad antimicrobiana el sulfato de vanadio posee efecto sobre *Streptococcus pneumoniae* en la biosíntesis del ADN y ARN (Ácido ribonucleico).

En la bibliografía se sugiere que las nanopartículas como forma farmacéutica no convencional tienen algunas ventajas sobre los compuestos farmacológicos ya conocidos, pueden atravesar barreras biológicas debido al tamaño nanométrico y de esta forma se podrían utilizar dosis menores de los compuestos activos y la liberación de las moléculas podría ser controlada en un largo periodo, al variar la constitución de las nanopartículas, logrando una mejor respuesta farmacológica y menos efectos adversos.

Por todo lo anterior, en este proyecto se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de fosfato de vanadio ($\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y por primera vez se determinó el efecto citotóxico, anticancerígeno y antimicrobiano “*in vitro*”, además, se aportó al mecanismo de acción de las nanopartículas fosfato de vanadio V21 al exponerlas sobre las células HTB-22. Con el fin de establecer información relevante para que pueda ser usada para el desarrollo de una terapia anticancerígena o antimicrobiana.

2. ANTECEDENTES

2.1 . El cáncer

Las cifras epidemiológicas reportadas en el 2018 fueron 17 millones de nuevos casos de cáncer y 9.8 millones de decesos (Torre *et al.*, 2018). En el caso particular de México en el 2014, se informó una mortalidad de 65 mil casos, esto nos indica que se tienen sumas altas de gran impacto a la salud.

En términos generales los principales tipos de cáncer en el género masculino son: próstata, pulmón, estómago, hígado y colon; en el género femenino los principales tipos de cáncer son: mama, cérvix, hígado, estómago y pulmón (OMS, 2018). Por esta causa se redoblan los esfuerzos para investigar, desarrollar y obtener una cura a esta enfermedad.

2.1.1. Características genéticas del cáncer

El cáncer es desarrollado por células que generan alteraciones genéticas en su sistema metabólico, para la formación de tumores, invasión de tejidos y finalmente una producción de metástasis (Bray *et al.*, 2018, Vogelstein y Kinzler, 1993, Hanahan y Weinberg, 2011).

Las principales vías metabólicas involucradas en la progresión de este padecimiento son succinato, glutaminólisis, pentosas fosfato, síntesis de lípidos, difusión mitocondrial (estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, ROS), activación de oncogenes (BLC-2, BLC-XL, ciclina y CDK-2) e inactivación de genes supresores (p53, p16/INKa, p14/ARF, RBI, APC, DPC4, BRCA1, BRCA2 y WNT-7B), estas vías se ven alteradas durante la fase de crecimiento, replicación, metabolismo y muerte celular, para cada tipo de cáncer (figura 1, Tabla 1) (Kurmar *et al.*, 2010; Schuwab,

2008; Arredondo-Espinoza, 2010, Swietach *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2010, Hancock *et al.*, 2001, Wishart, 2019).

Debido a todos los mecanismos modificados, las células cancerígenas requieren una gran demanda de energía y mayor consumo de oxígeno. Lo que obliga a la célula a reprogramar su metabolismo en condiciones anaeróbicas, este tipo de respiración hace que las células secreten H^+ (protón de hidrógeno), creando un microambiente extracelular ácido (Teicher, 2009, Semenza, 2007, Persi *et al.*, 2018, Reshkin *et al.*, 2014). Este microambiente extracelular ayuda a la propagación del cáncer a otros órganos en poco tiempo, provocando la muerte del paciente (figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2000; Weinberg, 2008).

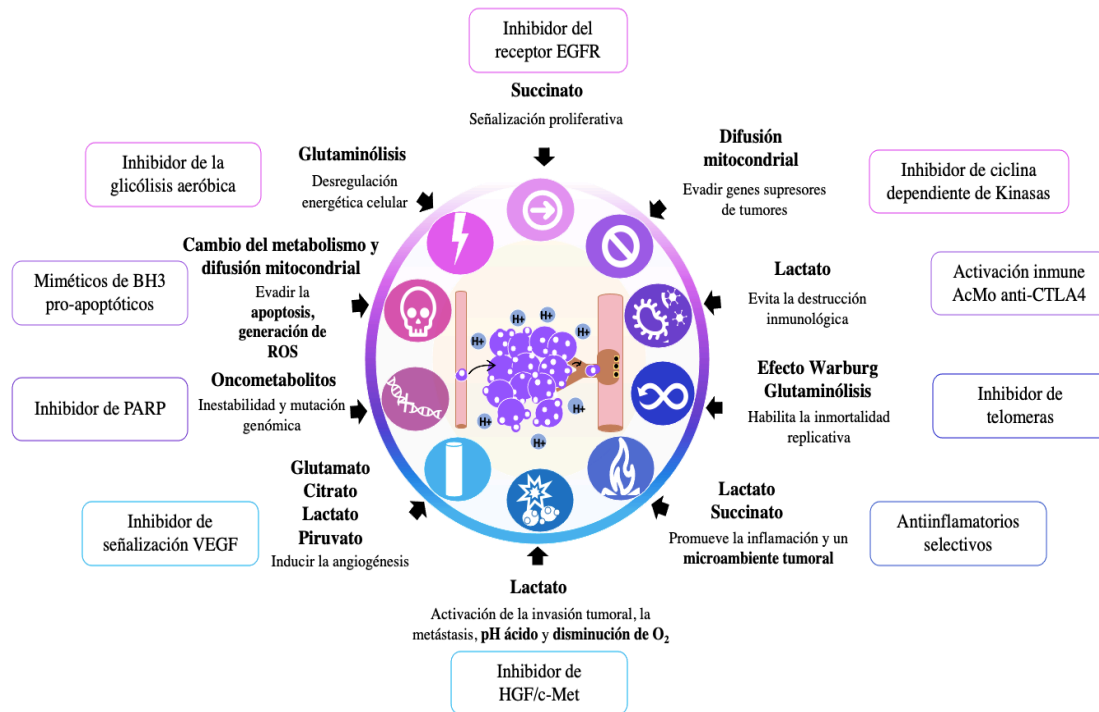


Figura 1. Vías metabólicas involucradas en el cáncer. Las vías metabólicas alteradas son: glutaminólisis, pentosas fosfato, síntesis de lípidos, difusión mitocondrial (estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, ROS), activación de oncogenes e inactivación de genes supresores (adaptado de Lu *et al.*, 2018, Wong, 2011, Hanahan y Weinberg, 2000 and 2011, Wishart, 2019).

Tabla 1. Genes involucrados en el cáncer.

Gen	Tipo de cáncer	Función
<u>Activación de oncogenes</u>		
BCL-2	En la mayoría	Inhibe la apoptosis
BCL-XL	En la mayoría	Inhibe la apoptosis
Ciclinas	En la mayoría	Amplificación génica
CDK-2	En la mayoría	Regulador del ciclo celular
<u>Inactivación de genes supresores</u>		
p53	En la mayoría	Factor de transcripción
p16/INKa	En la mayoría	Regulador del ciclo celular
p14/ARF	En la mayoría	Activador de p53 y antagonista de MDM2
RB1	Retinoblastoma	Co-represor transcripcional
APC	Colorrectal	Ayuda a la señalización
DPC4	Pancreático y colorrectal	Participa en la transcripción
BRCA1	Mama y ovario	Reparación del ADN
BRCA2	Mama y ovario	Reparación del ADN
WNT-7B	Mama y colorrectal	Señalización de proteínas secretadas

La apoptosis es el mecanismo predeterminado genéticamente para la muerte celular, este proceso es indispensable para la regulación a nivel genético, la remodelación tejidos y el mantenimiento de la homeostasis tisular de las células sanas o en ocasiones para las células dañadas (Kerr *et al.*, 1972). Los cambios morfológicos que se generan en la célula son condensación celular y nuclear, fragmentación del ADN, fragmentación celular y formación de cuerpos apoptóticos (Kroemer *et al.*, 2005). En el proceso de apoptosis se ven implicadas diferentes vías moleculares: la vía intrínseca (o mitocondrial) y la vía extrínseca (o de receptores de muerte celular).

En la vía intrínseca de apoptosis se inicia con factores de estrés o daño al ADN, es regulada por la familia de proteínas BCL-2 (esta proteína se ve alterada en el cáncer), conformadas de las proteínas anti-apoptóticas (BCL-, BCL-X_L, MCL-1, BCL-w y A1) y las proteínas pro-apoptóticas (BAX, BAK y BOK). El citocromo c sale de la mitocondria y junto con la procaspasa-9 promueven las caspasas 3, 6 y 7, estas últimas caspasas dan lugar a la apoptosis.

En la vía extrínseca participan receptores transmembranales como Fas (CD95/APO-1), TRAIL y TNF (factor de necrosis tumoral) (en el cáncer estos receptores se encuentran alterados), estos factores convergen en la activación de caspasa 8 y 10, finalmente promueven la vía de caspasa 3 para la apoptosis (Willis *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Igney *et al.*, 2002).

Las ROS se producen como consecuencia del metabolismo fisiológico aeróbico normal, estas sustancias químicas contienen oxígeno con propiedades reactivas las más comunes son O_2^- (superóxido) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno). Las fuentes más importantes de la producción de ROS son la mitocondria, la membrana plasmática, citosol y el retículo endoplásmico, a través de la cadena de transporte de electrones, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, la sintetasa desacoplada del óxido nítrico, el sistema del citocromo P450 y enzimas b5 (Klaunig y Kamendulis, 2004; Meo *et al.*, 2016, Akhtar *et al.*, 2107, García-Bermúdez y Cueva, 2016, Vives-Bauza *et al.*, 2010, Casemet, 2016, Rönn *et al.*, 2008). La cadena de transporte de electrones está asociada al proceso de la fosforilación oxidativa del metabolismo, cuando se produce una sobreproducción de la cadena respiratoria se induce las ROS provocando estrés oxidativo. Estas acciones potencia el daño directo al ADN, proteínas y lípidos de peroxidación induciendo directamente a la muerte celular (Singh *et al.*, 2010, Dickinson y Chang, 2011, Wang *et al.*, 2010).

2.1.2. Quimioterapia, sus efectos adversos y mecanismos de resistencia del cáncer

Existen diferentes tratamientos dependiendo el tipo de cáncer, localización y características, como la quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia génica, terapia fotogénica y terapia hormonal, sin embargo éstas últimas son usadas en casos específicos y son costosas.

La quimioterapia utiliza fármacos que actúan en las células tumorales durante el ciclo celular de la mitosis y otros actúan en la fase de reposo o cíclica (OMS, 2018).

Los mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos son los siguientes:

- Los agentes alquilantes (carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida y clorambucilo) actúan mediante la formación de enlaces covalentes entre su grupo alquilo, que interactúa con las bases nitrogenadas del ADN e impiden la replicación al reaccionar con los grupos fosfatos y alquilando bases del ARN.
- Los antimetabolitos (metotrexato, fluorouracilo, mercaptopurina y citarabina) inhiben la síntesis de ADN o ARN, al inhibir la función del ADN polimerasa y limitar la síntesis de aminoácidos y bases nitrogenadas.
- Los inhibidores de la mitosis o alcaloides vegetales (etopósido, tenipósido, paclitaxel, doxetaxel, vinblastina y vincristina) son inhibidores de la división celular, debido a que se fijan de manera reversible a la subunidad beta de la tubulina e impiden la polimerización de microtúbulos, deteniendo así la metafase.
- Los antibióticos (bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, dactinomicina y mitomicina) inhiben la replicación intercalándose entre los pares de bases adyacentes del ADN, impiden la transcripción, inhibiendo la topoisomerasa II, altera la membrana e inhiben la fosforilación oxidativa de las mitocondrias.
- Los agentes misceláneos (procarbazina y hidroxiurea) inhiben la síntesis de ADN y ARN e inactivan la ribonucleótido-reductasa; las hormonas (tamoxifeno y toremifeno) bloquean los receptores de estrógenos (Benedí y Gómez-Del Río, 2006; Goodman Gilman, 2002; Jermal *et al.*, 2011).

En algunos tipos de cánceres se usa uno o más tratamientos y/o combinaciones de fármacos, esto con el fin de obtener mejores resultados y erradicarlo (Capaccio, 2013; Yap, 2010). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos farmacológicos no son específicos para células cancerosas, por lo que limita la efectividad en el tratamiento contra el cáncer, dando lugar a una gama de efectos secundarios como hipertensión, problemas cardíacos, pulmonares, óseos y articulaciones, endócrinos, cerebrales, médula espinal, nerviosos, dentales, visuales, digestivos, pérdida de cabello, neutropenia o leucopenia (Bar-Zeev *et al.*, 2017; Torres-Martínez, 2017).

Estos fármacos quimioterapéuticos desencadenan en las células cancerígenas una serie de mecanismos de resistencia. La resistencia a los medicamentos es la capacidad de las células cancerosas para sobrevivir en presencia de agentes tóxicos, desarrollando múltiples procesos:

- En los agentes alquilantes, se aumenta la reparación del ADN.
- En los inhibidores mitóticos, las hormonas y los antimetabolitos se generan cambios en enzimas o en receptores blanco.
- En los antimetabolitos, análogos de pirimidinas y purinas, se activan p-glicoproteína para disminuir la acumulación del fármaco en la célula (Katzung y Trevor, 2007).

Debido a todo esto se necesita el desarrollo e investigación de nuevos fármacos anticancerígenos con menos efectos secundarios, mayor selectividad y mas efectivos.

2.1.3. Estrategia molecular para la expresión génica

En la actualidad existen técnicas de análisis que ayudan al estudio del mecanismo de acción de nuevos fármacos como los chips de ADN, microarreglos. La tecnología de hibridación y lectura de microarreglos es una herramienta de alto rendimiento para el análisis de expresión de genes en el tratamiento de cierta molécula, esto lo hace en unión de un material biológico y un soporte sólido de distinta naturaleza.

Los microarreglos pueden clasificarse en dos grupos: biomicroarreglos (biochips) y los microarreglos químicos (constituidos de ácidos nucleicos, enzimas, anticuerpos, células, etc.). Las principales etapas del microarreglo se pueden dividir en cuatro: 1) Selección del tipo de microarreglos y de las secuencias que se colocará en el soporte. 2) Obtención de la muestra biológica. 3) Amplificación del material genético reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 4) Hibridación de los ácidos nucleicos con una sustancia fluorescente (captura y análisis de resultados) (Torres-Martínez, 2017, Pioquinto-Ávila, 2017, Arredondo-Espinosa *et al.*, 2016, Arredondo-Espinosa *et al.*, 2014, Olazarán-Santibáñez, 2013, Napoli *at al.*, 2003; Xu y Lam, 2003; Liu *et al.*, 2006).

2.2 Infecciones causadas por microorganismos patógenos y emergentes

Las infecciones provocadas por bacterias farmacorresistentes provocan un aumento en las cifras de prevalencia y mortalidad, por esta razón la OMS estima que para el año 2050 la principal causa de muerte será esta enfermedad. Asimismo, las infecciones provocadas por hongos y levaduras tomaron importancia, debido a que presentan una tasa elevada de prevalencia dirigida a causar estragos en el sector salud, por la aparición de cepas resistente a los tratamientos existentes.

Las infecciones son provocadas por patógenos oportunistas, afectan a personas con inmunodeficiencias, en el caso de las bacterias causan enfermedades principalmente nosocomiales, mientras que los hongos y levaduras afectan piel, mucosas, sistema respiratorio, e incluso se diseminan a otros órganos ocasionando la muerte (Puente-De León, 2016).

2.2.1. Infecciones causadas por bacterias patógenas

Algunos de los patógenos causales de infecciones oportunistas son *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Acinetobacter baumannii causa infecciones nosocomiales y mueren el 40% de pacientes infectados por este microorganismo (Almasaudi, 2016). *A. baumannii* es un cocobacilo Gram negativo, aerobio estricto, no fermentador, catalasa positiva, oxidasa negativo e inmóvil (Jung y Park, 2015). La patogenicidad de esta bacteria es debida a la capacidad de producir toxinas (verotoxina), enzimas extracelulares, permeabilidad vascular secretada y formación de biopelículas (Álvarez-Fraga *et al.*, 2018).

Pseudomonas aeruginosa provoca daño a las personas inmunodeprimidas, causa enfermedades nosocomiales y la mortalidad es del 40% al 50% (Weingarten *et al.*, 2003). Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, aerobio, oxidasa positivo, altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno y puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en un rango de temperatura de 4 a 42 °C. Esta bacteria causa infecciones en las vías urinarias, esta bacteria es capaz de desarrollar biopelículas y tiene

un flagelo corto, el cual le confiere a la bacteria mayor patogenicidad y adhesión a superficies (Ochoa *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus es causante de enfermedades nosocomiales y la mortalidad es de 8.3 a 36%. Esta bacteria es un coco Gram positivo que mide cerca de 1 µm de diámetro, no es móvil, es aerobio facultativo y fermentador de glucosa. Esta especie de *Staphylococcus* es catalasa positiva, coagulasa positiva, crece a temperaturas de 25 a 43 °C, en un pH de 4.8 a 9.4. Este microorganismo puede causar bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico. Existen factores que se ven implicados en la virulencia como: la capacidad de adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, evasión del sistema inmune del huésped con la producción de enterotoxinas estafilocócicas (la toxina 1 del síndrome de choque tóxico, proteína A y algunos polisacáridos capsulares del tipo 1, 5 y 8), la producción de biopelículas y la capacidad de penetrar en tejidos (con la producción de la alfa-toxina y hemolisinas) (Lister y Horswill, 2014; Velázquez-Meza, 2005). Es importante saber la clasificación de las bacterias, para tener un mejor enfoque del tipo de tratamiento o quimioprofilaxis utilizar.

2.2.2. Características morfológicas de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Existen dos tipos de bacterias, según la estructura de la pared celular dada por la tinción Gram: Gram positivas y Gram negativas. Estos tipos de bacterias tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares (figura 2). En la tinción Gram las bacterias positivas tiñen la pared celular desde el uso del colorante básico de cristal violeta (la pared tiene más peptidoglicano y menos lípidos), el colorante se une a los polisacáridos de la membrana, el lugol sella el colorante, la capa de peptidoglicano retiene el color violeta y al usar solvente lipídico alcohol-acetona no hay decoloración. Mientras que las bacterias negativas se decoloran, al usar safranina se une a la pared celular y se tiñen de color rojo (Fernandes y Sao-José, 2018).

Las bacterias Gram positivas poseen pared celular bacteriana de una capa gruesa de peptidoglicano y una cápsula que envuelve toda la célula. Además, muchas bacterias

de este tipo tienen ácidos teicoicos anclados a la membrana citoplasmática a través de la pared celular y ácidos lipoteicoicos. Las bacterias Gram negativas tienen una estructura celular más compleja, tienen múltiples capas: una membrana citoplasmática, una pared celular con una delgada capa de peptidoglicano, en la membrana externa contiene fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas, y tiene una cápsula. Además, entre las membranas y la pared existe un espacio llamado espacio periplásmico (Goosens *et al.*, 2014; Chagnot *et al.*, 2013; Fernandes y Sao-José, 2018).

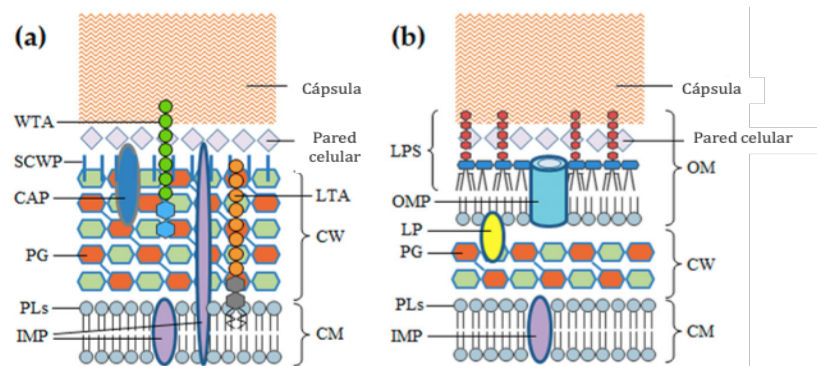


Figura 2. Estructura y composición de los tipos de bacterias. (a) Bacteria Gram positiva, (b) Bacteria Gram negativa; CM (membrana citoplasmática), CW (pared celular), OM (membrana externa), IMP (proteína de membrana interna), PLs (fosfolípidos), PG (peptidoglicano), LP (lipoproteína), CAP (proteína unida covalentemente), OMP (proteína de membrana externa), SCWP (polímeros de pared celular secundaria), LPS (lipopolisacáridos), WTA (ácidos teicoicos de pared), LTA (ácidos lipoteicoicos), envuelto de una capa s y una cápsula (Fernandes y Sao-José, 2018).

2.2.3. Tratamiento contra las bacterias patógenas, sus efectos adversos y mecanismo de resistencia

Existen diferentes tratamientos para las bacterias, clasificados por el mecanismo de acción del fármaco y el tipo de bacterias sensibles, para tener una mejor orientación eficaz en la quimioprofilaxis.

- Las cefalosporinas (cefepime, ceftazidima, cefazolina, cefalotina y cefalexina), estos fármacos inhiben la síntesis de la pared celular con la unión de anillo dihidrotiazínico con el anillo beta-lactámico.
- Los carbapenémicos (meropenem e imipenem) son tratamientos que inhiben la síntesis de la pared celular.

- Las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) son medicamentos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos.
- Los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina) son antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (Peleg *et al.*, 2008).
- Los beta-lactámicos (metecilina y penicilina) estos fármacos inhiben la síntesis de la pared celular.
- Las tetraciclinas (Doxiciclina) estos antibióticos inhiben la síntesis proteica; la vancomicina inhibe la síntesis de peptidoglicano (Rayner y Munckhof, 2005; David y Daum, 2017).

Los fármacos contra las bacterias provocan distintos efectos adversos, debido a que en ciertos casos se administran altas dosis para combatir estos microorganismos.

Las cefalosporinas, las penicilinas, los carbapenémicos, las fluoroquinolonas y las tetraciclinas causan gran variedad de reacciones alérgicas o de hipersensibilidad y reacciones gastrointestinales como: náuseas, diarrea e infecciones oportunistas. En el caso particular de los carbapenémicos en altas dosis puede causar convulsiones; los aminoglucósidos provocan nefrotoxicidad, ototoxicidad y dermatitis; las fluoroquinolonas afectan el metabolismo del colágeno; la vancomicina incluye toxicidades con reacciones de nefrotoxicidad y las tetraciclinas provocan irregularidades del crecimiento óseo y con la sobre dosis aparece daño hepático. Como se puede observar la mayoría de los fármacos por efectivos que sean para combatir a los microorganismos, causan un daño toxicológico en el organismo del huésped (Katzung y Trevor, 2007).

Los tratamientos específicos para *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* son:

- En *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*: cefalosporinas (cefepime, ceftazidima), los carbapenémicos (meropenem, imipenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina). Para *Pseudomonas aeruginosa* también se utiliza aztreonam (Ochoa *et al.*, 2013).

- *En Staphylococcus aureus*: beta-lactámico (metecilina, penicilina), cefalosporinas (cefazolina, cefalotina, cefalexina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina), las tetraciclinas (Doxiciclina) (Rayner y Munckhof, 2005; David y Daum, 2017).

Durante los últimos años paralelamente al desarrollo de nuevos antibióticos, las bacterias patógenas desarrollaron mecanismos de resistencia para la mayoría de los tratamientos. La resistencia a los fármacos es la habilidad de los microorganismos para multiplicarse o para sobrevivir en presencia de concentraciones de un fármaco que normalmente lo erradica. Existen dos tipos de resistencia: 1) la resistencia intrínseca está relacionada con la capacidad de las bacterias para resistir la quimioprofilaxis, y 2) la resistencia adquirida se presenta cuando los microorganismos son sensibles a un determinado antibiótico, pero adquirió la capacidad de ser resistente mediante diversos mecanismos obteniendo variabilidad genética. Algunos de los mecanismos de resistencia son:

1. Mutación de porinas OprD y proteínas de membrana OmpA.
2. Modificación de las bombas de flujo Mex-AB-PprD.
3. Mutación de la proteína de unión a penicilinas (PBP).
4. Adquisición de plásmidos con mecanismos de resistencia insertados Amp C, P99, FOX-1, ACT-1, MIR-1, TEM-1 y 2.
5. Mutación de ADN-girasas.
6. Mutaciones puntuales en las dianas en las topoisomerasas gyrA y parC (Gordon y Wareham, 2010, Bonomo y Szabo, 2006, Ochoa *et al.*, 2013, Velázquez-Meza, 2005, Carmeli *et al.*, 2015; Puente-De León, 2016).

En consecuencia, la generación de los mecanismos de resistencia a los tratamientos y los diferentes efectos adversos, se activó una alerta en el sector salud por el desabasto en el mercado de antibióticos efectivos y con un mejor índice terapéutico, en consecuencia, se requieren nuevos agentes farmacológicos antimicrobianos.

2.2.4. Infecciones causadas por hongos y levaduras emergentes

Algunos de los agentes causales de las micosis sistémicas o localizadas son: *Aspergillus niger*, *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides immitis*, *Rhizopus spp*, *Fusarium oxysporum*, *Histoplasma*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, etc. (Puente-De León, 2016).

Lomentospora prolificans es un hongo filamentoso oportunista, causa el 77% de mortalidad de las personas que presentan infección. Este microorganismo crece en Agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días a 30°C. Se presenta en personas con cirugías o en condiciones de inmunodeficiencia, causa infecciones cutáneas y se puede diseminar a otros órganos (Wangchinda *et al.*, 2018; Jeffrey *et al.*, 2018).

Candida glabrata y *Candida krusei* son levaduras saprófitas, que tienen una prevalencia del 15 al 30% y 2% respectivamente, aunque el porcentaje es bajo se considera de interés clínico debido a que estos microorganismos desarrollan mecanismos de resistencia al tratamiento (Modrzewska y Kurnatowski, 2013). Crecen en agar Sabouraud Dextrosa (SDA) a 37 °C, provocan candidiasis, meningitis, entre otras enfermedades. *Candida glabrata* no posee filamentos en comparación de otras especies, sin embargo, produce proteínas que presentan hidrofobicidad en su superficie celular la cual confiere patogenicidad (Modrzewska y Kurnatowski, 2013).

2.2.5. Características morfológicas de hongos y levaduras

Los hongos y levaduras son parte del reino Fungi, presentan alto porcentaje de quitina y glucosa en su pared celular. La estructura más importante es la formación de hifas, o pseudohifas en el caso de levaduras (figura 3).

Las hifas son una red de filamentos tipo tubular con paredes celulares septadas o no septadas, presentan gran cantidad de núcleos. Al conjunto de hifas se conoce como micelio, el cual se puede observar macroscópicamente. Generalmente en el extremo de las hifas, en algunos hongos tienen conidios o conidióforos, que son estructuras cuya función es la producción de esporas en hongos filamentosos.

Las pseudohifas son pequeñas de forma unicelular las cuales se generan por gemación, forman levaduras de 2 a 4 μm que al unirse entre si asemejan hifas denominadas blastoporas. Las levaduras son ovaladas, esféricas o cilíndricas y su proceso de reproducción es de forma binaria. La membrana celular de los hongos está compuesta por proteínas transmembrana, tiene quitina alrededor, seguido de betaglucano y monoproteínas que cubren toda la célula (Pazouki y Panda, 2000; Modrzewska y Kurnatowski, 2013).

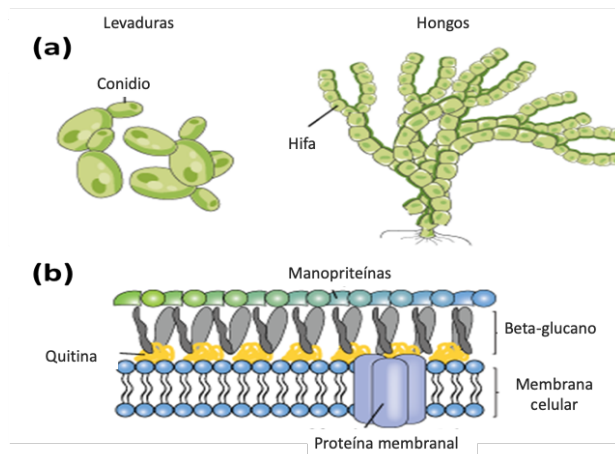


Figura 3. Morfología de los hongos y levaduras. (a) Morfología característica de las levaduras y de los hongos filamentosos, (b) representación de la membrana de los hongos (Pazouki y Panda, 2000).

2.2.6. Tratamiento contra los hongos y levaduras, sus efectos adversos y mecanismos de resistencia

En los tratamientos para los hongos en general se destacan los siguientes fármacos:

- Los macrólidos poliénicos (nistatina, anfotericina B) se fijan al ergosterol de la membrana celular del hongo formando poros, a través de los cuales se produce la pérdida de constituyentes celulares y permitiendo el paso de otros compuestos que resultan tóxicos para el hongo.
- Los triazoles (fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol) son fármacos que inhiben la síntesis de los lípidos de la membrana celular. Sin embargo, los hongos también han generado resistencia a los antimicóticos existentes (Puente-De León, 2016; Wangchinda *et al.*, 2018).

Existe gran variedad de efectos adversos de los medicamentos utilizados para combatir las micosis, por ejemplos: los macrólidos poliénicos provocan hipotensión, escalofríos, fiebre y rigidez, a dosis altas nefrotoxicidad, acidosis tubular, desequilibrio electrolítico o anemia; los triazólicos producen malestar gastrointestinal, difusión visual y hepática, erupciones cutáneas y cefaleas (Katzung y Trevor, 2007).

En los últimos años, los tratamientos contra las infecciones micóticas no tienen la misma efectividad, debido a la aparición de hongos y levaduras capaces de desarrollar un mecanismo de resistencia a los antibióticos. Aunado a esto, la prescripción y el uso irracional del tratamiento como profilaxis y el aumento de dosis terapéuticas, empeoran la situación.

Los posibles mecanismos de resistencia desarrollados en hongos y levaduras son:

1. La resistencia a la anfotericina B es debida a la disminución de los niveles de esteroides o por cambios estructurales de estos.
2. La resistencia a los triazoles se presenta por el cambio de sensibilidad a este fármaco, que interfiere en la síntesis de la pared celular mediante la inhibición de la enzima CYP450, la cual convierte el lanosterol en ergosterol.

Cabe mencionar que la resistencia a los tratamientos, los efectos adversos que estos provocan generan la necesidad de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de infecciones micóticas (Perea y Patterson, 2002; Katzung y Trevor, 2007; Sharma y Chowdhary, 2017).

2.3. Estrategias para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas

En los últimos años, distintos investigadores proponen estrategias para la investigación de terapias para combatir el cáncer y las infecciones provocadas por diferentes microorganismos, ambos casos con resistencia al tratamiento e importantes efectos adversos.

- Dosis mayores de los fármacos, pero esto provoca una mayor toxicidad en el paciente.
- Combinaciones dos o más medicamentos, disminuye la susceptibilidad de los efectos de los tratamientos, causando multirresistencia.
- Síntesis de nuevos compuestos, sin embargo, estas alternativas solo ofrecen soluciones a corto plazo.
- Síntesis de fármacos no convencionales un ejemplo de esto son las nanopartículas (Patil *et al.*, 2010, Carmeli *et al.*, 2015).

2.3.1. Nanopartículas

Las nanopartículas son nanomateriales o nanoestructuras que presentan un tamaño de 2 a 100 nm (al menos una de sus dimensiones) y parte de una manipulación e interacción a nivel de átomos y moléculas (Jahangirian *et al.*, 2019, Desai, 2012). Estos nanomateriales son formados mediante tecnologías innovadoras como la nanociencia y la nanotecnología, prometen una aplicación en nuevas alternativas terapéuticas no convencionales (Borm *et al.*, 2006, Jia *et al.*, 2013, Da Silva *et al.*, 2017).

Las nanopartículas se producen a partir de diversos materiales orgánicos e inorgánicos: 1) las nanopartículas orgánicas son de polímeros biodegradables o lípidos: liposoma, micelas, dendrímero, nanoesferas, nanocápsulas, conjugados polímero-fármaco; 2) las nanopartículas inorgánicas son materiales como: oro, plata, titanio, hierro, carbón, silicio, zinc, platino, rutenio, bismuto, cobre, galio, cobalto, estaño y vanadio (figura 4) (Da Silva *et al.*, 2017, Ramírez-Cabrera, 2010, Jia *et al.*, 2013). Sin embargo, no todo ha sido ampliamente estudiado.

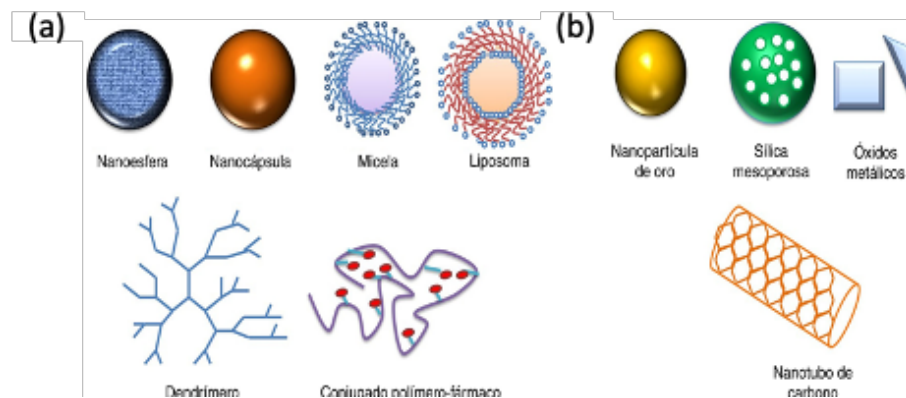


Figura 4. Tipos de nanopartículas. (a) Nanopartículas orgánicas, (b) Nanopartículas inorgánicas (Jia *et al.*, 2013).

2.3.2. Método de síntesis y caracterización de nanopartículas

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas, químicos, físicos y biológicos, que generan diferentes morfologías de nanotubos, nanodiscos, nanofibras, nanoplatos y nanoesferas (Bhatia, 2016).

Uno de los métodos químicos es la síntesis por precipitación, la cual consta de dos procesos: el primer proceso es la nucleación, en donde el precursor y el precipitante forman núcleos de átomos de forma homogénea mediante la agitación y la temperatura constante. El segundo proceso es el crecimiento, en donde la concentración de especies precursoras se reduce, se agrega el agente surfactante y se incorpora por difusión a la superficie de los núcleos modificando el crecimiento de las nanopartículas. En algunos casos para la síntesis se agregan agentes reductores de borohidruro de sodio, hidracina, dimetilformamida y citrato de sodio; los agentes precursores podrían ser sulfato de vanadio, tetracloroaurato, nitrato de plata y óxido de zinc; los agentes precipitantes son fosfato de dibásico de potasio, fosfato de zinc (Thanh *et al.*, 2014 y Polte, 2015).

La caracterización de las nanopartículas se realiza por los métodos de difracción de rayos X (DRX), espectrometría de Infrarrojo (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEB). La DRX es una técnica que emplea rayos catódicos con calentamiento, lo cual permite que los electrones se difracten rodeando los átomos de la materia, generando picos o señales de la forma cristalina o amorfa del material.

El FTIR es un método que utiliza radiación infrarroja para la adsorción de las moléculas generando movimientos vibraciones y rotacionales en distintas frecuencias, que permite identificar estructuras moleculares o grupos funcionales presentes en una muestra.

El MEB es una técnica capaz de producir imágenes a nanoescalas con resolución de las superficies, con diferentes sensores y la generación de un haz de electrones dispersos en un campo eléctrico con movimientos ondulatorio y la emisión de rayos x, los electrones se enfocan a las lentes condensadoras y objetivas, se logra la obtención de la imagen plana del material en escalas nanométricas (Douglas *et al.*, 2008; Pal *et al.*, 2007; Sárkay *et al.*, 2005; Kéki *et al.*, 2000).

2.3.3. Ventajas de las nanopartículas

Las nanopartículas tienen ventajas comparadas con los fármacos convencionales, por sus características físicas y químicas.

- Menor cantidad de compuestos utilizados en la síntesis para la integridad del núcleo y área superficial, utilizando a su vez dosis menores en los tratamientos.
- El tamaño de escala nanométrica atraviesa con mayor facilidad barreras biológicas.
- Tienen una controlada liberación de las moléculas por un largo periodo y con ello obteniendo menos efectos adversos (Da Silva *et al.*, 2017, Badwaik *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2010).

2.3.4 Nanopartículas en el área de la Salud

La Nanomedicina es una disciplina en la que se utilizan nanopartículas en diversos procesos del área médica; como el diseño y la evaluación de sistemas biológicos complejos a nivel molecular, formados por un principio activo o moléculas biológicamente activas, lo que permite un mejor diagnóstico, tratamiento o prevención de distintas enfermedades, como es el caso del cáncer o enfermedades infecciosas provocadas

por microorganismos (Medina *et al.*, 2007, Keskinbora y Jamel, 2018, Singh, *et al.*, 2010; Licciardi *et al.*, 2013).

Existen diversos estudios de la actividad biológica y toxicológica de las nanopartículas de distintos materiales (Badwaik *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2010; Torres-Martínez, 2017). Las nanopartículas más reportadas para la actividad anticancerígena son de plata, oro, platino con paclitaxel, hierro, rutenio, bismuto, cobre, galio, ferrita de cobalto y estaño; se reportan diferentes mecanismos de acción biológica como daño al ADN, inhabilitación del ciclo celular, daño a la mitocondria, producción de ROS e inducción de apoptosis, entre otros (Torres-Martínez, 2017; Ahamed *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Aderibighe, 2015). Estos mecanismos biológicos se generan por las características bioquímicas de las células cancerígenas, como el pH ácido del medio extracelular y la interacción electroquímica de la superficie de las nanopartículas principalmente metálicas (Akhtar *et al.*, 2017).

Las nanopartículas con actividad antimicrobiana son de oro y plata (bacterias), zinc y plata (hongos), se reportan diferentes mecanismos de acción toxicológico como muerte celular, producción de ROS, entre otros (Badwaik *et al.*, 2013; Jerez-Urrilagoitia *et al.*, 2006; Bryaskova *et al.*, 2011; Lipovsky *et al.*, 2011; Pérez-Salas, 2006).

Aparte de los metales preciosos existen evidencias de las actividades biológicas de metales de transición, tal es el caso del vanadio con actividades anticancerígena y antimicrobiana (Holko y cols., en el 2008, Wozniak y Blasiak., en el 2004, Sharma y Sharma., en el 2013, Fukuda y Yamase., en el 1997, Abakumova *et al.*, 2012, Evangelou, 2002, Novotny y Kombian, 2014).

2.3.5. Vanadio

El vanadio es un metal de transición del grupo 5d de la tabla periódica, tiene tres estados de oxidación (III, IV y V). Se encuentra en la corteza terrestre (21° elemento más abundante), absorbido por las plantas, que a su vez son consumidos por animales, seres humanos, y es el segundo elemento más abundante en el agua del mar (Evangelou, 2002; Goc, 2006).

En los últimos 10 años, se ha considerado al vanadio con importancia farmacológica, debido a reportes que demuestran que el oxovanadio IV, monovanadato, vanadato y sulfato de vanadio (VOSO_4) presentan distintas actividades: anticonceptiva, antiobesidad, antidiabética, anticancerígena y antimicrobiana (Goc, 2006; Shioda *et al.*, 2008; Novotny y Kombian, 2014, Srivatava, 2000; Fawcett *et al.*, 1997).

2.3.6. Actividad anticancerígena del sulfato del vanadio

En la actualidad no hay reportes de la actividad anticancerígena de nanopartículas de fosfato de vanadio, sin embargo, existen estudios de diferentes compuestos de vanadio que son efectivos para esta actividad.

Abakumova y cols., en el 2012 estudiaron la actividad anticancerígena y citotóxica de VOSO_4 y oxovanadio (IV) $\text{VO}(\text{mal})_2$ (figura 5) sobre las líneas celulares: L929 (fibrosarcoma de ratón), PC12 (feocromocitoma de ratón), HepG2 y NIH/3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), las concentraciones utilizadas fueron de 0.5 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 48 h a 37 °C, el ensayo lo realizaron con la técnica de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol). Los resultados de las células L929 mostraron una viabilidad del 50% a las concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; en las células PC12 la viabilidad fue del 50% a las concentraciones de 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; las células NIH/3T3 mostraron una viabilidad del 50% a la concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y no se observó toxicidad en las células HepG2 a las concentraciones evaluadas. Este estudio le atribuye la toxicidad al ion (VO^{2+}) y sugiere que se induce la fragmentación del ADN indirectamente a través de la formación de ROS por la vía de apoptosis.

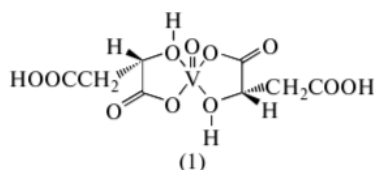


Figura 5. Compuestos de oxovanadio (IV) ($\text{VO}(\text{mal})_2$).

Holko y cols., en el 2008 analizaron la actividad anticancerígena y la citotoxicidad de VOSO_4 en las líneas celulares A549 (carcinoma de pulmón), DU145 (carcinoma de próstata), BEAS-2B (células de pulmón) y PNT-2 (epitelio de próstata), las concentraciones utilizadas fueron de $24.45 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$ a $48.9 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$, durante 72 h a 37°C , se evaluó la viabilidad con la técnica de MTT. Los resultados de las células A549 y DU145 mostraron una viabilidad del 50% a la concentración de $24.45 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$; en las células BEAS-2B la viabilidad fue del 50% a la concentración de $48.9 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$ y en el caso de las células PNT-2 no se observó toxicidad en el rango de exposición. Este estudio reporta que el VOSO_4 indujo apoptosis y necrosis celular, analizados por la técnica de tinción HOECHST 33258.

Wozniak y Blasiak., en el 2004 determinaron la actividad anticancerígena de VOSO_4 sobre las líneas celulares HeLa (carcinoma de cérvix) y linfocitos, las concentraciones utilizadas fueron de 815 a $1630 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$., durante 72 h a 37°C , analizaron esta actividad con la técnica de azul de tripano y con la técnica de ELISA se investigó el daño al ADN. Se obtuvo como resultado en ambas líneas celulares una viabilidad del 50% a la concentración de $815 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$.

2.3.7. Actividad antimicrobiana del sulfato del vanadio

En la actualidad no hay actividad antimicrobiana de nanopartículas de fosfato de vanadio, sin embargo, existen evidencia de la actividad antimicrobiana de VOSO_4 .

Sharma y Sharma., en el 2013 analizaron la actividad antimicrobiana de VOSO_4 sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, *Byssochlamys fulva* y *Mucor circinelloides*, las concentraciones utilizadas fueron de 7.81 a $250 \mu\text{g/mL}$, durante 24 h a 37°C , analizaron esta actividad con la técnica de microdilución. Para todas las bacterias obtuvieron una MIC de $250 \mu\text{g/mL}$, para *Aspergillus niger* y *Byssochlamys fulva* se reportó una MIC de $62.5 \mu\text{g/mL}$ y para *Mucor circinelloides* la MIC fue de $15.62 \mu\text{g/mL}$.

Fukuda y Yamase., en el 1997 determinaron la actividad antimicrobiana de **VOSO₄** sobre *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las concentraciones utilizadas fueron de 2 a 8000 µg/mL, durante 20 h a 37°C, analizaron esta actividad con la técnica de microdilución. Se reportó la actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* con una MIC de 8-16 µg/mL y atribuyen el efecto tóxico al daño en la biosíntesis del ADN y ARN.

3. HIPÓTESIS

1. Las nanopartículas de fosfato de vanadio presentarán mayor citotoxicidad en las líneas celulares cancerígenas: HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177, en comparación con las células no cancerígenas: CCL-13, CCL-81 y 55X.
2. Las nanopartículas de fosfato de vanadio inhibirán el crecimiento de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

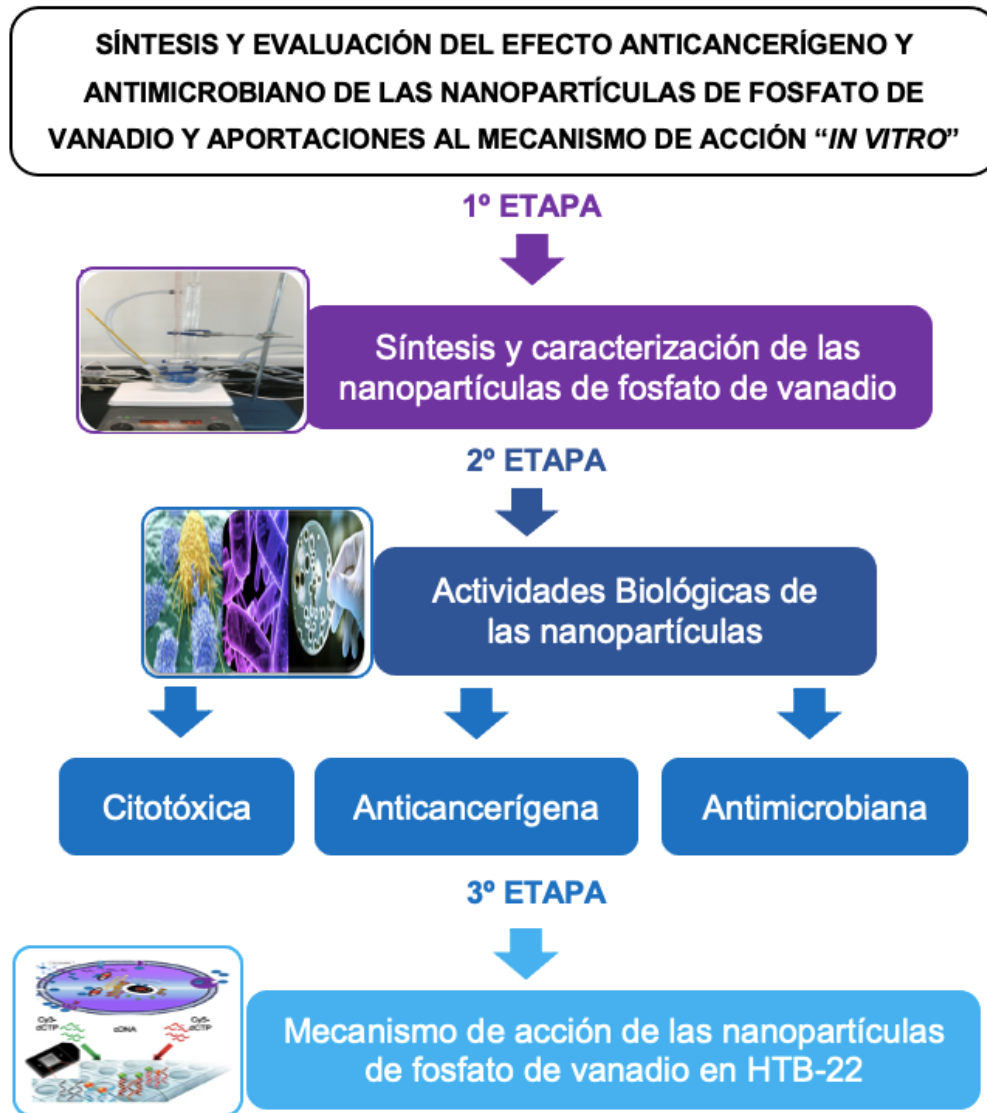
Sintetizar, caracterizar y evaluar el efecto citotóxico, anticancerígeno y antimicrobiano de nanopartículas de fosfato de vanadio, y determinar algunos mecanismos de acción “*in vitro*”.

4.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de fosfato de vanadio.
2. Caracterizar las nanopartículas de fosfato de vanadio por Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Espectroscopia Ultravioleta visible (UV-Vis).
3. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio sobre las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55-X.
4. Determinar la actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio sobre las líneas celulares: HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177.

5. Determinar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de fosfato de vanadio contra *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
6. Analizar el efecto antimicótico de las nanopartículas de fosfato de vanadio contra *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*.
7. Realizar el análisis del microarreglo de las nanopartículas de fosfato de vanadio sobre la línea celular HTB-22 y determinar el patrón de expresión génica.
8. Cuantificar la producción de las especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de fosfato de vanadio en líneas celulares CCL-81 y HTB-22.

5. ESTRATEGIA GENERAL



6. MÉTODOS

6.1. Síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio

La síntesis de nanopartículas de fosfato de vanadio se realizó por el método de precipitación (Lucio Porto, 2012), para controlar el tamaño y la morfología de las nanopartículas se utilizó dodecilsulfato de sodio (SDS) en soluciones acuosas a distinta concentración. El precursor fue sulfato de vanadio (VOSO_4) que aportó los iones VO^{2+} , se utilizaron diferentes relaciones molares de SDS/VOSO_4 . Se usó como precipitante fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) que aportó los aniones HPO_4^{2-} . Se utilizaron diferentes relaciones molares de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{VOSO}_4$ y se colocaron en una bureta a un flujo constante. Las temperaturas utilizadas en las reacciones fueron de $30\text{ }^\circ\text{C}$ o $70\text{ }^\circ\text{C}$, el tiempo de las reacciones fueron de 30 min o 120 min en un sistema de reflujo con agitación constante de 360 rpm. Las soluciones obtenidas se filtraron a vacío con H_2O desionizada y los precipitados se secaron a $30\text{ }^\circ\text{C}$, se pulverizaron y se almacenaron en viales de 5 mL de capacidad (figura 6).

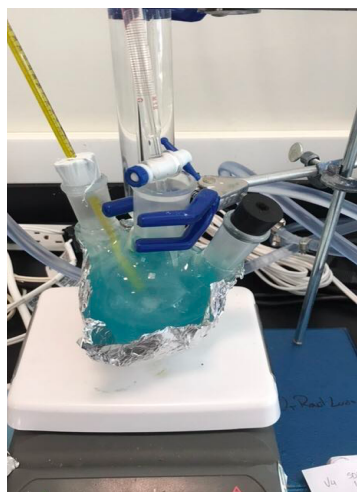
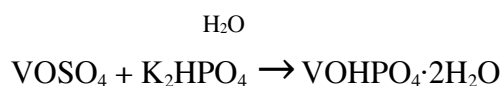


Figura 6. Síntesis de nanopartículas de fosfato de vanadio.

6.1.1. Caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio

Se realizó una prueba de estabilidad a las nanopartículas de fosfato de vanadio durante 3 meses, la cual consistió en dispersar 10 μ g de las nanopartículas de fosfato de vanadio en diferentes medios (EMEM, PBS y agua estéril) a 2 temperaturas (25 °C y 4 °C). Después de esta prueba se eligieron las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h, V13, V17 y V21, por mostrar estabilidad en cuanto a la dispersión y sin cambio de color, para su posterior caracterización y la determinación de ensayos biológicos.

Se caracterizaron las nanopartículas de fosfato de vanadio mediante DRX, FTIR, MEB y UV-Vis. El estudio de DRX permitió determinar la estructura cristalina de las nanopartículas de fosfato de vanadio, se empleó una radiación CuK α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) operando a 45 kV y 40 mA. El barrido se realizó en un rango de 2θ de 5 a 90° con pasos de 0.02° y 1 s por paso en un modo continuo.

El análisis de FTIR permitió determinar los grupos funcionales de las nanopartículas sintetizadas, se preparó un pellet de KBr y muestra en una porción de 1:50 (fosfato de vanadio:KBr). El espectro se recogió con una resolución de 4 cm⁻¹ y 32 escaneos en un rango de barrido de 400-3500 cm⁻¹.

La morfología de las nanopartículas se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y se determinó su distribución de tamaño de las nanopartículas. Las muestras de las nanopartículas se prepararon dispersando agua por medio de ultrasonido aplicado por 30 segundos, se colocó una gota de las dispersiones en el soporte y se dejó secar a temperatura ambiente.

La disolución de las nanopartículas de fosfato de vanadio se identificó mediante el UV-Vis, se prepararon soluciones de PBS con pH=6.4 y 7.4. En estas soluciones se dispersaron las nanopartículas de fosfato de vanadio y VOSO₄ para obtener el ion VO²⁺, como control el V₂O₅ se disolvió en HCl para obtener el ion VO₂⁺, se mantuvo a 37 °C durante 1 h, los espectros de UV-Vis se corrieron en el rango de 300 a 800 nm.

Para las pruebas biológicas se preparó la dispersión de las nanopartículas de fosfato de vanadio. Las nanopartículas se dispersaron en agua estéril a una concentración de 10

µg/mL sin ningún tipo de estabilizante. La dispersión se sometió a un baño de ultrasonido a 40 watts durante 30 min en temperatura ambiente.

6.2. Actividad citotóxica y anticancerígena

6.2.1. Cultivo de las líneas celulares no cancerígena

Para la evaluación de la actividad citotóxica se utilizaron las líneas celulares CCL-13 (células de hígado, Chang), CCL-81 (células de riñón de mono verde, Vero) y 55X (células de pulmón, IRR-MRC-5) obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), se cultivaron con medio EMEM (Medio esencial mínimo de Eagles) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y 1% de ampicilina/estreptomicina. Los frascos con las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

6.2.2. Cultivo de las líneas celulares cancerígenas

Para determinar la actividad anticancerígena se trabajó con las líneas celulares cancerígenas HTB-35 (carcinoma escamoso de cérvix de segundo grado, SiHa), HTB-22 (adenocarcinoma mamario, MCF-7), HTB-38 (adenocarcinoma colorrectal, HT-29) y HTB-177 (carcinoma de pulmón de células grandes, H460), se cultivaron en frascos T25 usando como medio EMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de ampicilina/estreptomicina. Los frascos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa, hasta alcanzar la confluencia necesaria.

6.2.3. Exposición de las líneas celulares con las nanopartículas de fosfato de vanadio

Una vez que las células estaban listas y que se observó un 80 % de confluencia se le retiró el medio, se lavaron las células con PBS (buffer salino de fosfatos) y se añadieron 500 µL de tripsina al 0.25% y se incubó nuevamente el frasco durante 5-10 min para que la monocapa se desprendiera. Al fin de este tiempo todo el contenido del frasco se traspasó

a un tubo cónico con medio EMEM y se centrifugó para retirar el medio y recuperar las células. Posteriormente se añadieron 3 mL de medio fresco y se contaron las células en un hemocitómetro para determinar la concentración celular, se ajustó a una densidad de 1×10^4 células/mL en cada pocillo de la placa de 96 celdas con 100 μ L de medio EMEM y se incubó por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% humedad relativa para la formación de la monocapa.

La evaluación biológica se realizó en dos partes: en la primera parte la actividad citotóxica fue evaluada en la línea celular CCL-13 y la actividad anticancerígena en las líneas celulares HTB-35 y HTB-22, las cuales se expusieron a las nanopartículas de fosfato de vanadio VOHPO₄·2H₂O con clave VPI-2h, en un rango de concentración de 0.78-25 μ g/mL. Se utilizaron células sin tratamiento (control negativo), medio solo (blanco), y los controles positivos se utilizó tritón al 1% para la citotoxicidad y la actividad anticancerígena se usó vincristina (Vin) a las mismas concentraciones que las nanopartículas. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% humedad relativa (figura 7 y 8).

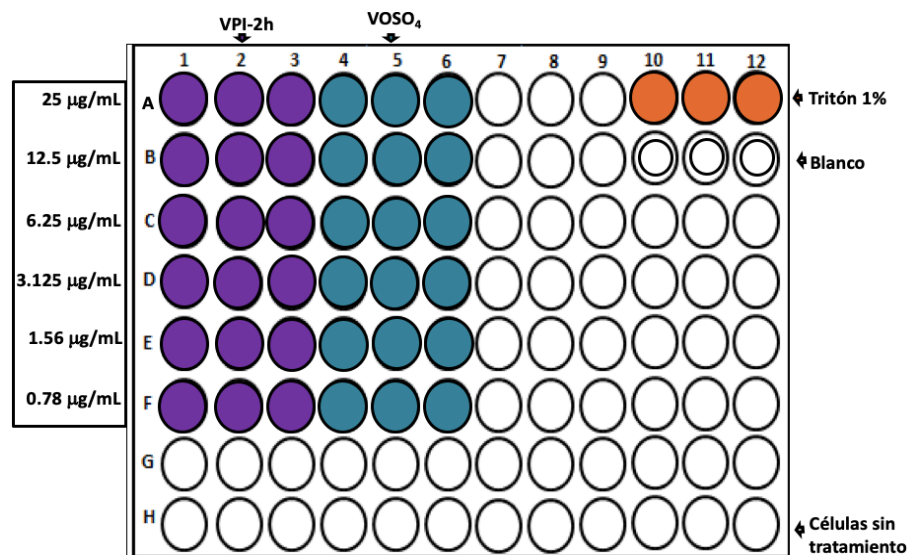


Figura 7. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas VPI-2h y los controles para la determinación de la actividad citotóxica en CCL-81.

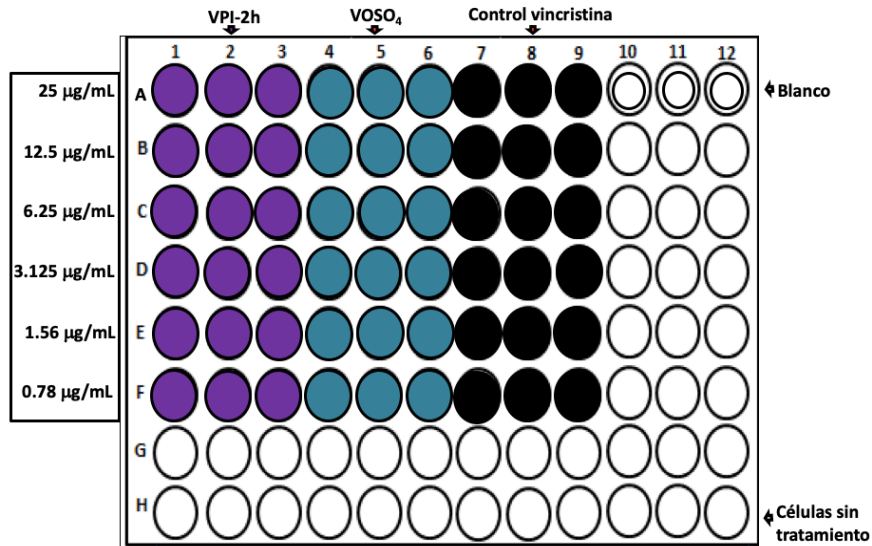


Figura 8. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas VPI-2h y los controles para la determinación de la actividad anticancerígena en HTB-35 y HTB-22.

En la segunda parte la actividad citotóxica fue evaluada en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55X y para la actividad anticancerígena se utilizaron las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177, las cuales se expusieron a las nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con clave V13, V17 y V21, se utilizó un nuevo rango de concentración de 3.125-200 $\mu\text{g/mL}$. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento, medio solo (blanco), y los controles positivos se utilizó tritón al 1% para la citotoxicidad y la actividad anticancerígena se utilizó vincristina (Vin) a las mismas concentraciones que las nanopartículas y se añadió el VOSO_4 a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, todo se analizó a las mismas condiciones antes mencionadas (figura 9 y 10).

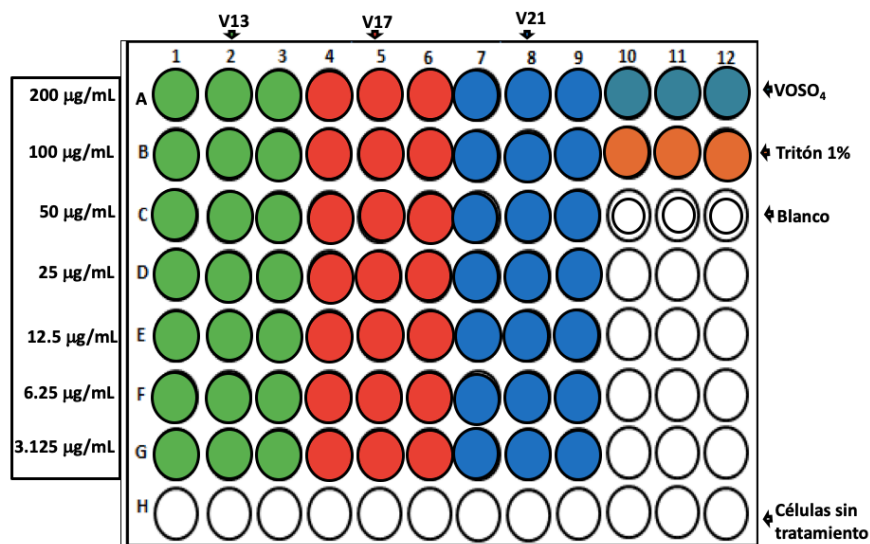


Figura 9. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para la determinación de la actividad citotóxica en CCL-13, CCL-81 y 55-X.

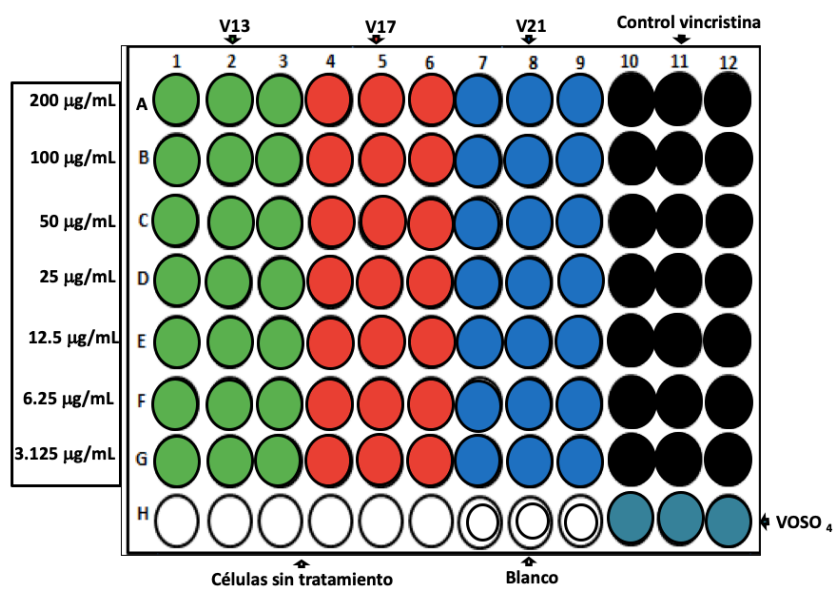


Figura 10. Esquema de la placa de 96 pocillos de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para la determinación de la actividad anticancerígena en HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177.

6.2.4 Evaluación de la viabilidad celular mediante la técnica de MTT

La evaluación biológica se realizó mediante la prueba de MTT, la cual se fundamenta en el análisis de la viabilidad celular mediante la capacidad de las deshidrogenasas succínicas mitocondriales para reducir el metiltetrazolio a formazán, el cual, en el medio de cultivo con células vivas, vira de un color amarillo a morado y es detectado en un espectrofotómetro (Mosman, 1983, figura 11).

Al transcurrir el tiempo de exposición de las nanopartículas de fosfato de vanadio, las células se lavaron con PBS, se añadió a cada pocillo 100 μL de MTT (0.5 mg/mL) diluido en medio EMEM y se incubaron nuevamente las placas por 3 h; una vez transcurrido el tiempo se retiró el medio, se agregaron 100 μL de isopropanol/HCl para disolver los cristales producidos por las células vivas y se incubaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas, todos los ensayos fueron por triplicado en días distintos. Los resultados del porcentaje de viabilidad se lograron determinar mediante la siguiente fórmula:

$$\% V = \frac{\text{Absorbancia de células con tratamiento} - \text{Absorbancia del analito}}{\text{Absorbancia de células sin tratamiento}} * 100$$

La concentración media (IC_{50}) se estimó en cada una de las viabilidades celulares mediante la ecuación de la recta en las gráficas con una regresión lineal.

El análisis estadístico de varianza ANOVA y la prueba t se determinó entre las nanopartículas, VO_4 y vincristina, donde se asigna * para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$.

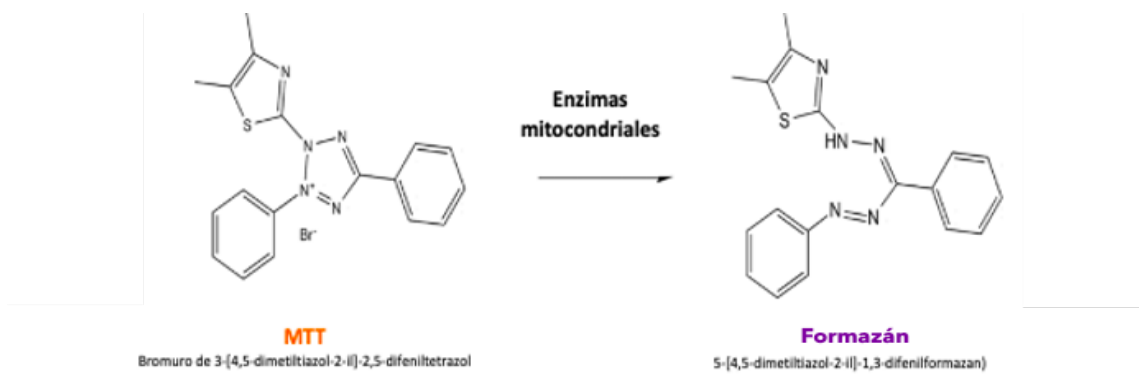


Figura 11. Principio de la técnica de MTT.

6.3. Actividad antimicrobiana

6.3.1. Cultivo de bacterias

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizaron las bacterias fármacorresistentes *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (ambas resistentes a ceftazidima) y *Staphylococcus aureus* (resistente a cefoxitina); obtenidos por aislados clínicos y cultivados en medio Mueller-Hinton durante 24 h a 37 °C.

6.3.2. Cultivo de hongos y levaduras

Para evaluar la actividad antimicótica se utilizaron microorganismos fármacorresistentes como *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* (resistentes a fluconazol); obtenidos por aislados clínicos y cultivados en distintos medios de cultivo: el hongo en agar Papa Dextrosa (PDA) durante 7 días a 30 °C y las levaduras en agar Sabouraud Dextrosa (SDA) durante 24 h a 37°C.

6.3.3. Técnica de microdilución en placa

La actividad antimicrobiana se realizó mediante la técnica de microdilución en placa (Zgoda *et al.*, 2001, Manual de procedimientos en Microbiología clínica). En una placa de 96 celdas de fondo redondo, se colocaron 100 µL de medio (Mueller-Hinton y PDA) para cada microorganismo, se agregaron las nanopartículas de fosfato de vanadio V13, V17 y V21 mediante diluciones obteniendo las concentraciones de 6.25-400 µg/mL; se usaron células sin tratamiento (control negativo), $VOSO_4$ a 400 µg/mL (control), blanco (medio solo), los controles positivos para bacterias benzatina-bencilpenicilina, y para el hongo y las levaduras fluconazol a las mismas concentraciones que las nanopartículas. Se colocaron 100 µL de inóculo de los microorganismos en una densidad de 0.5 en escala de McFarland. Finalmente se incubaron por 24 h a 37°C y 30°C de acuerdo a la temperatura de crecimiento de cada microorganismo, todos los ensayos fueron por triplicado en días diferentes cada uno (figura 12).

El criterio de interpretación de resultados fue de forma visual de la siguiente manera: los pocillos que tuvieron un precipitado blanco (crecimiento del microorganismo) fueron considerados como resultado negativo para la actividad antimicrobiana y los que no tuvieron un precipitado blanco (sin crecimiento bacteriano) fueron tomados como resultado positivo de la actividad antimicrobiana y se utilizaron para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).

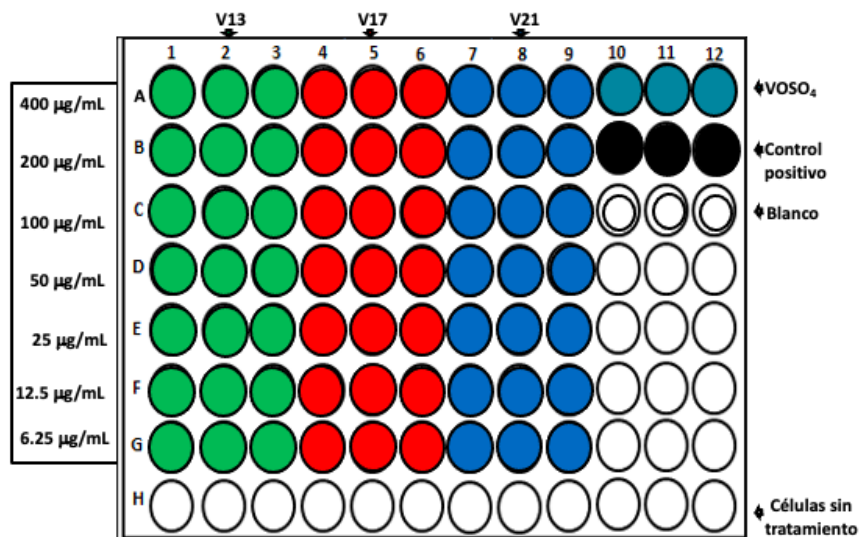


Figura 12. Esquema de las nanopartículas V13, V17, V21 y los controles para determinar la actividad antimicrobiana.

6.4. Mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio en las células cancerígenas

6.4.1 Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglo)

El análisis de expresión génica diferencial se realizó mediante la técnica de microarreglos, para buscar el mecanismo de acción diferenciando los genes sobreexpresados y reprimidos. Se determinó por el nivel de expresión de cada gen y por el número de copias de ARN mensajeros existentes en las muestras (Arredondo Espinosa, 2014).

Este estudio fue hecho en la línea celular cancerígena HTB-22 expuestas a las nanopartículas de fosfato de vanadio V21, comparado con un control de células sin tratamiento. Para cada caso se utilizó una densidad celular de 2×10^6 células/mL con 3 mL de medio EMEM y se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% humedad relativa, para la formación de monocapa.

Una vez formada la monocapa se retiró el medio y a uno de los frascos se le agregó medio con las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 a la concentración de 6.25 µg/mL y al otro frasco únicamente medio fresco. Ambos frascos se incubaron por 6 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Después del tiempo transcurrido se retiró el medio, se realizaron 3 lavados con PBS y se les añadieron 500 µg/mL tripsina al 0.25% durante 5-10 min. Al fin de este tiempo se colocaron las células en tubos cónicos con medio EMEM y se centrifugaron para retirar el medio con tripsina.

Enseguida se realizó la extracción del ARN con la técnica de trizol, de manera convencional. Se le agregaron 500 µL de trizol a las células tratadas con las nanopartículas y a las células sin tratamiento, se homogenizó con vórtex 16 s y se dejaron reposar 2 min a temperatura ambiente. Se añadieron 400 µL de cloroformo, se homogenizaron con vórtex 16 s y se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 13,300 rpm, se obtuvo la parte acuosa y se pasó a un nuevo tubo eppendorf. El ARN se precipitó con 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 13,300 rpm, se decantó y se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente 10 min a 13,300 rpm, se decantó, se dejó

secar durante 5 min a temperatura ambiente y finalmente se le añadieron 50 μL H_2O MiliQ.

Se analizó la integridad del ARN mediante una corrida de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con TAE 1X a 80 V durante 5 min y 120 V durante 25 min. Además, se cuantificó en un espectrofotómetro la densidad óptica de 260/280 (valores aceptables para el ARN de calidad de 1.8-2.0). Para el transporte se añadió 5 μL de acetato de sodio 3M a pH de 5.2, se homogenizó con vórtex, se agregaron 138 μL de etanol puro, se mezcló por inversión y se guardó a -70°C para su posterior uso.

Para síntesis del ADNc, el ARN total, junto a OligodT con moléculas fluorescentes Alexaflour 555 (rojo) para muestras tratadas y 647 (verde) para muestras no tratadas. Se realizó la PCR con transcriptasa inversa, se purificó el ADNc en una columna Qiagen y se analizó su integridad.

El ADNc de HTB-22 expuestas a las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 y de células sin tratamiento, fue hibridado en el microarreglo humano H10KA. Se realizó un pretratamiento a la laminilla para hidratar, se aplicó la muestra, se lavaron con distintas soluciones y se dejó secar el microchip.

Se escaneó el microarreglo para cuantificar y obtener los genes, se empleó un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al ADNc. Las imágenes de las células con tratamiento a las nanopartículas y sin tratamiento se combinaron para obtener valores cuantificables de cada señal de fluorescencia. Se analizaron las señales mediante el software GenArise, el criterio de aceptación en el análisis bioinformático para los genes sobreexpresados e inhibidos fue de un Z-core ± 2 DS. Finalmente, los valores obtenidos fueron analizados con la herramienta bioinformática DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis) en <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> y se determinaron las posibles rutas metabólicas, que se encuentran involucradas en la sobreexpresión o inhibición de los genes que participaron en la actividad biológica.

6.4.2. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Para darle continuidad a los resultados del microarreglo, se realizó la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la prueba de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA). La DCFDA se une a las enzimas de la membrana celular, se concentra en el citoplasma y las esterasas oxida de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína a 7' diclorofluoresceína en presencia de ROS. La intensidad de la fluoresceína es proporcional a los niveles de ROS y la lectura se realiza en el fluorómetro (Bass y Parce, 1983, figura 13).

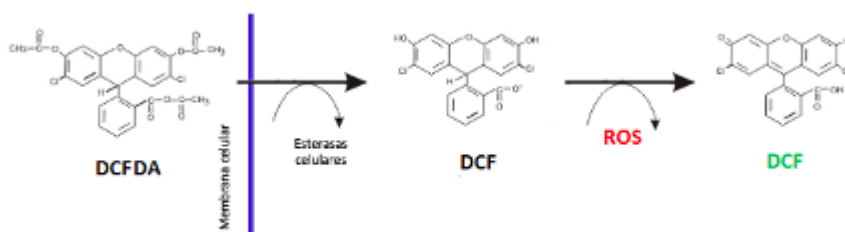


Figura 13. Generación de diclorofluoresceína DCFH por la acción de ROS.

Para esta prueba se utilizaron las líneas celulares CCL-81 y HTB-22 expuestas a las nanopartículas fosfato de vanadio V21, se sembraron 1×10^4 células/mL por pocillo, se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa para la formación de la monocapa. Después se retiró el medio y se colocaron 100 µL de las nanopartículas en un rango de concentraciones de 3.125-200 µg/mL y se agregaron 100 µL de DCFDA. Se usaron células sin tratamiento (control negativo), un blanco (medio solo), en el caso de los controles positivos se utilizó xantina oxidasa (XO) a la concentración de 3.25 µg/mL. Se cuantificaron las ROS en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm, a los tiempos 0 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h, durante el proceso se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (figura 14).

$$\% \text{ Producción} = \frac{\text{Fluorescencia de células con tratamiento} - \text{células st}}{\text{Fluorescencia control XO} - \text{células st}} * 100$$

st= sin tratamiento

Los ensayos se realizaron por triplicado, se determinó el ANOVA y la prueba *t* entre los diferentes tratamientos.

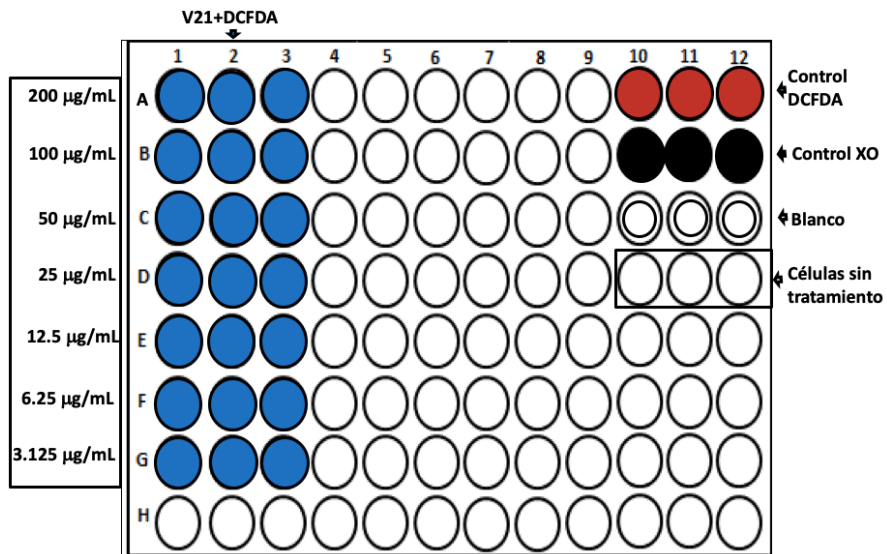


Figura 14. Esquema de la placa de 96 pocillos las nanopartículas V21 y los controles para la cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno en CCL-81 y HTB-22.

6.5. Disposición de residuos generados

Los residuos generados durante la fase de experimentación fueron dispuestos de acuerdo con el manual del Procedimiento para la Recolección de Residuos Peligrosos del Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la FCQ de la UANL y a la norma mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

- Colector A: soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
- Colector B: sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
- Colector C: tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos, no halogenados.
- Colector D: orgánico: muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
- Colector E: inorgánico: muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
- Colector F: reciclado de sales de metales preciosos.
- Colector G: combinaciones orgánicas sólidas.
- Colector H: oxidantes.
- Colector de residuos de cianuro. Colector de colorantes y lugol.
- Colector de vidrio Impregnado con Sustancias Peligrosas: Contenedores o Frascos vacíos de vidrio que contuvieron reactivos o residuos peligrosos.
- Colector de plástico Impregnado con Sustancias Peligrosas: Contenedores o frascos vacíos que contuvieron reactivos peligrosos.
- Colector de basura Industrial: Arena o diáper (sanitas, papel, magitel) impregnado con residuos peligrosos. Guantes de plástico y látex.
- Colector de Residuos biológicos: el desecho de residuos mediante el estándar de clasificación de los RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos):
 - i. Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso.
 - ii. Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico- infecciosas). y finalmente, se almacena para su posterior disposición final.
 - iii. Bolsa roja: Residuos biológico-infeccioso.

7. RESULTADOS

7.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio

Las nanopartículas de fosfato de vanadio se obtuvieron de un tono azul celeste lo que indica la presencia de iones VO^{2+} . En la prueba de estabilidad de fosfato de vanadio se descartaron las que tuvieron colores amarillo, verde y negro (figura 15). Las nanopartículas que pasaron la prueba para realizar la caracterización y los estudios biológicos fueron las que tenían la clave VPI-2h, V13, V17 y V21 (figura 16).

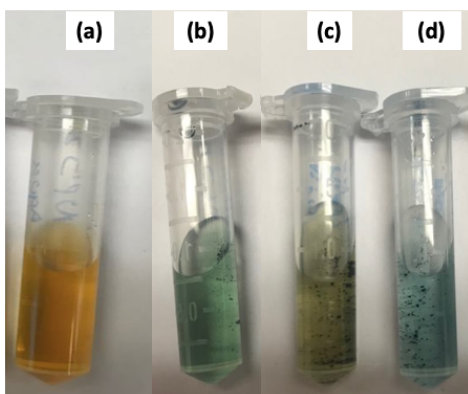


Figura 15. Prueba de estabilidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio. Las nanopartículas descartadas a) amarillo, b) verde y c) negro. Las nanopartículas con tono aceptable d) azul.

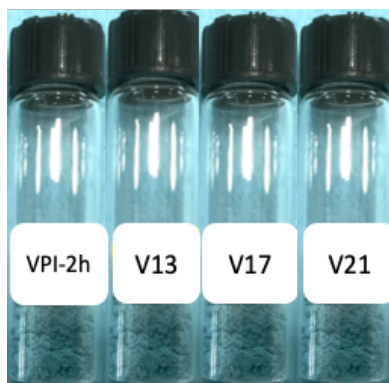


Figura 16. Nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h, V13, V17 y V21.

En la caracterización de DRX de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h, V13, V17 y V21. El patrón de difracción de las nanopartículas VPI-2h muestran picos que corresponden a fosfato de vanadio ($\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (JCPDS 01-084-1885), que pertenece a un sistema cristalino triclinico con un grupo espacial P-1 y con una densidad teórica de 2.50 gcm^{-3} . Para las nanopartículas V13, V17 y V21 se obtuvieron unos picos anchos centrados en 2θ igual a 30° (JCPDS 00-048-1158). Esto indica que el tamaño de las partículas del fosfato de vanadio se encuentra del orden de nanómetros (figura 17). Estos resultados nos indican que las muestras preparadas son nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

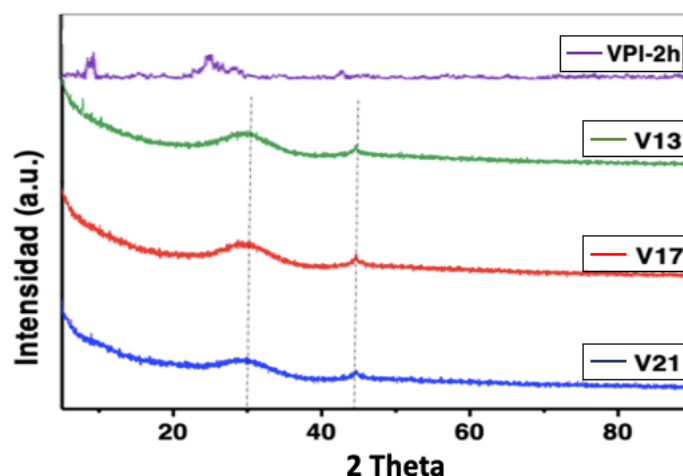


Figura 17. Diffractogramas de rayos X de las nanopartículas VPI-2h, V13, V17 y V21. Se visualizó la diferencia en el difractograma, en la VPI-2h y las V13, V17 y V21.

En la caracterización de espectroscopia de FTIR de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ VPI-2h, V13, V17 y V21. Se obtuvieron las bandas en $3401\text{-}3388 \text{ cm}^{-1}$ que pertenecen al grupo OH, las bandas en $1617\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ pertenecen a las vibraciones de las moléculas de H_2O , las bandas en $1035\text{-}1084 \text{ cm}^{-1}$ pertenecen al grupo PO_4^{3-} , las bandas en $954\text{-}984 \text{ cm}^{-1}$ pertenecen al grupo $\text{V}=\text{O}$ y las bandas en $420\text{-}441 \text{ cm}^{-1}$ pertenecen al grupo O-P-O (figura 18). Los espectros de infrarrojo confirman la obtención de fosfato de vanadio en las cuatro muestras sintetizadas. Es importante notar que los espectros de infrarrojo no muestran bandas asociadas a los grupos funcionales del SDS como $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ y SO_4^{2-} . Esto no indica que el surfactante fue removido durante el proceso de lavado de las nanopartículas. Lo cual es muy importante para los ensayos biológicos.

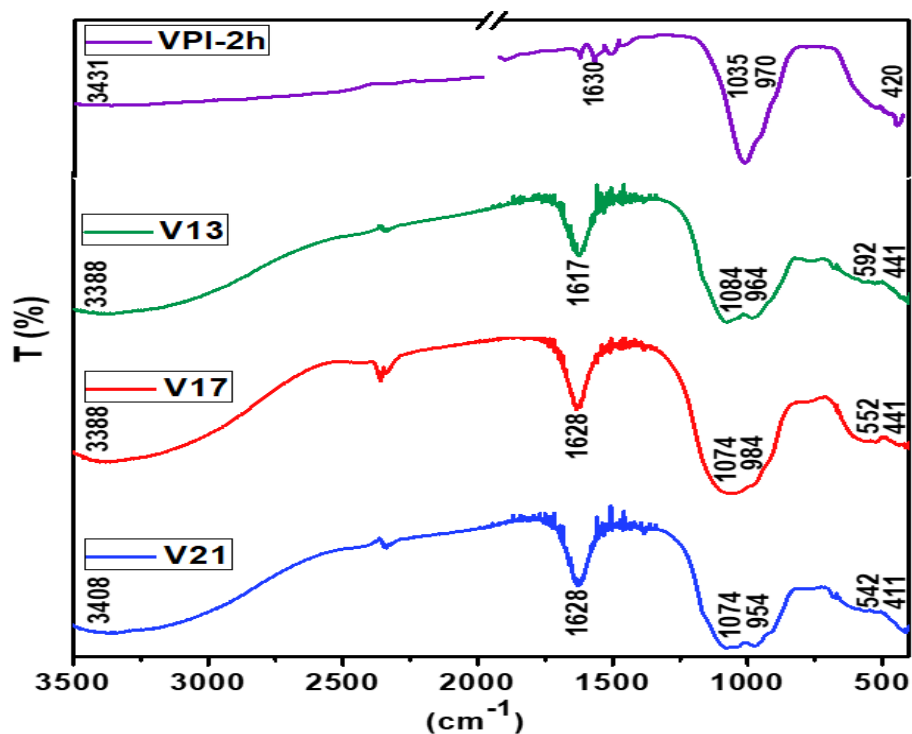


Figura 18. Espectros de FTIR de las nanopartículas VPI-2h, V13, V17 y V21. Se visualizan las señales características de VOHPO_4 .

En la caracterización por MEB de las cuatro nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se encontró una morfología esférica (tabla 2). Las nanopartículas VPI-2h mostraron un diámetro promedio de 75 nm, en la V13 se disminuyó el diámetro promedio a 55 nm al reducir el tiempo de reacción, en la V17 se aumentó el porcentaje de SDS obteniendo un diámetro promedio de 70 nm, en la V21 se disminuyó el porcentaje de SDS y la temperatura determinándose un tamaño de diámetro promedio de 40 nm (figura 19-22).

Tabla 2. Condiciones finales para la síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h, V13, V17 y V21.

Clave	% SDS	Relación SDS/ VOSO_4	Relación $\text{VOSO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
VPI-2h	5	1	1	120	70
V13	5	1	1	30	70
V17	10	1	1	30	70
V21	9.5	1	1	30	30

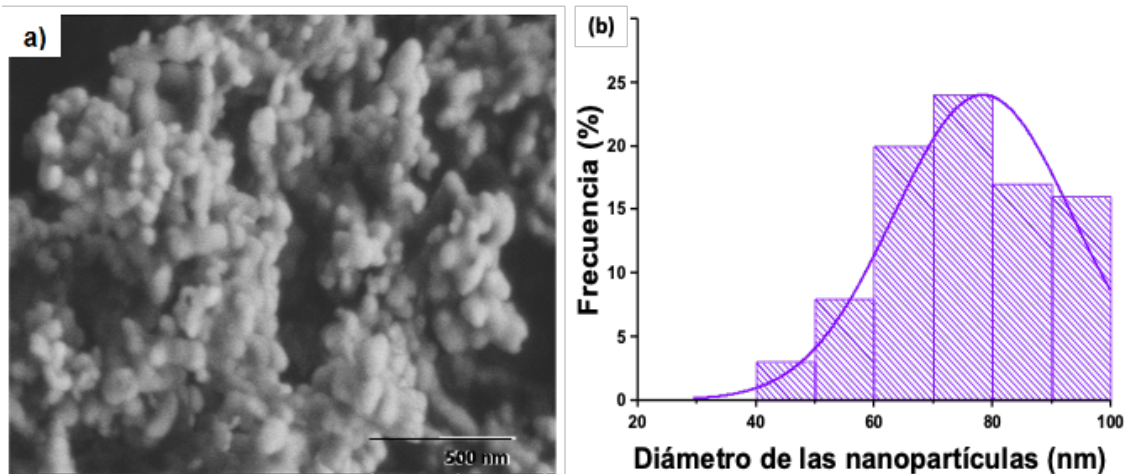


Figura 19. Nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h. (a) Microscopía de MEB de las nanopartículas de morfología esférica, obtenidas con 5% de SDS. (b) Diagrama de la distribución del tamaño de nanopartículas, con un promedio de diámetro de 75 nm.

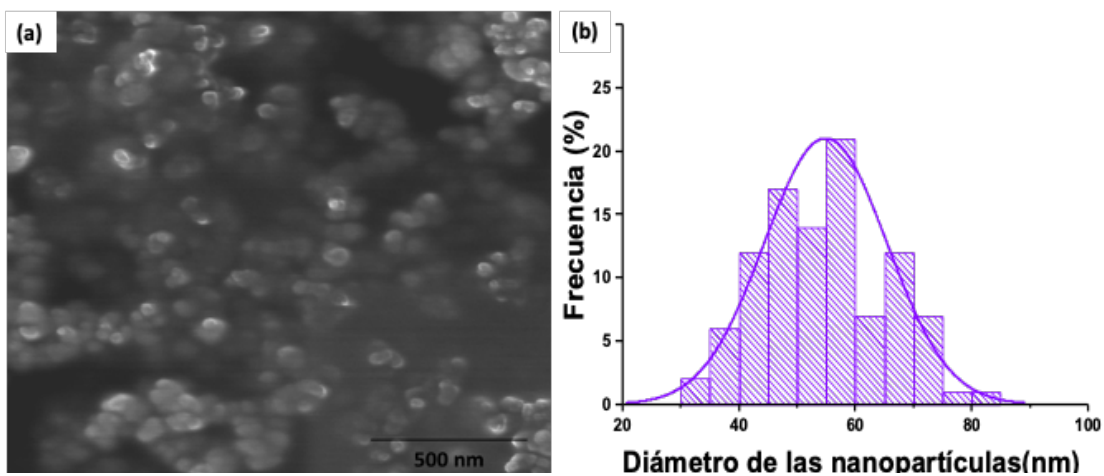


Figura 20. Nanopartículas de fosfato de vanadio V13. (a) Microscopía de MEB de las nanopartículas de morfología esférica, obtenidas con 5% de SDS. (b) Diagrama de la distribución del tamaño de nanopartículas, con un promedio de diámetro de 55 nm.

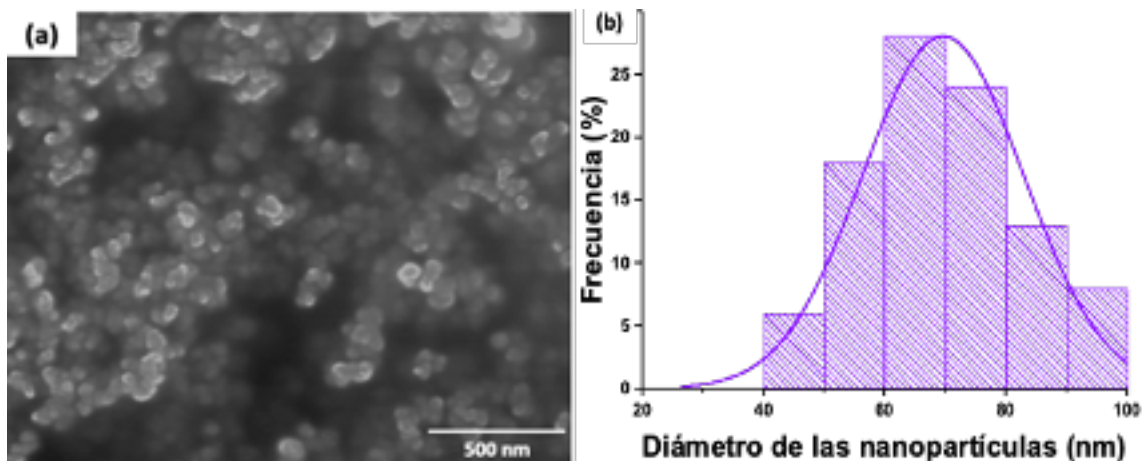


Figura 21. Nanopartículas de fosfato de vanadio V17. (a) Microscopía de MEB de las nanopartículas de morfología esférica, obtenidas con 10% de SDS. (b) Diagrama de la distribución del tamaño de nanopartículas, con un promedio de diámetro de 70 nm.

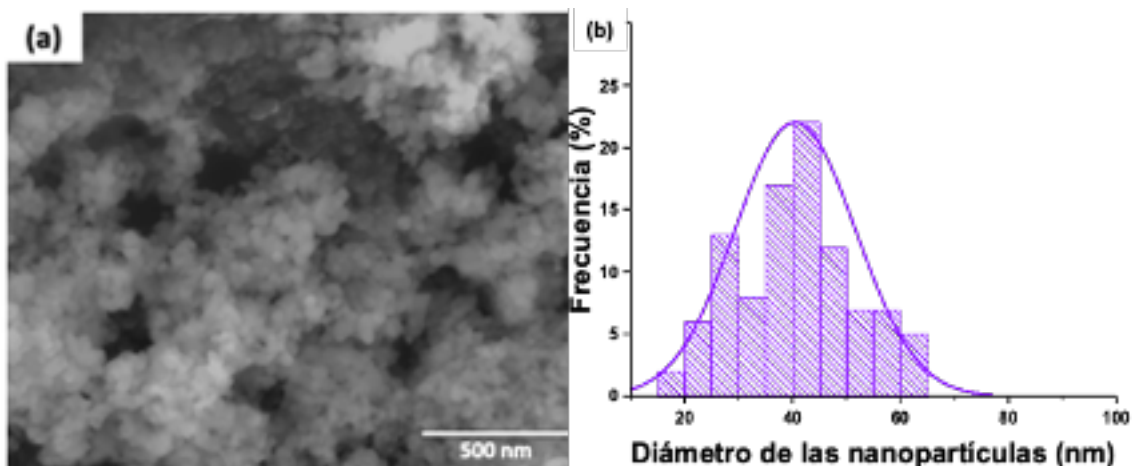


Figura 22. Nanopartículas de fosfato de vanadio V21. (a) Microscopía de MEB de las nanopartículas de morfología esférica, obtenida con 9.5% de SDS. (b) Diagrama de la distribución del tamaño de nanopartículas, con un promedio de diámetro de 40 nm.

En la caracterización por UV-Vis de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se muestra la presencia del ion VO^{2+} a 766 nm disueltas en PBS con pH 6.5 e incluso existe una menor absorbancia a pH 7.4. Lo que indicaría que el grado de liberación del ion es mayor en medios ácidos. Se identificó el ion VO_2^+ control de V_2O_5 a 345 nm en ambos medios (figura 23).

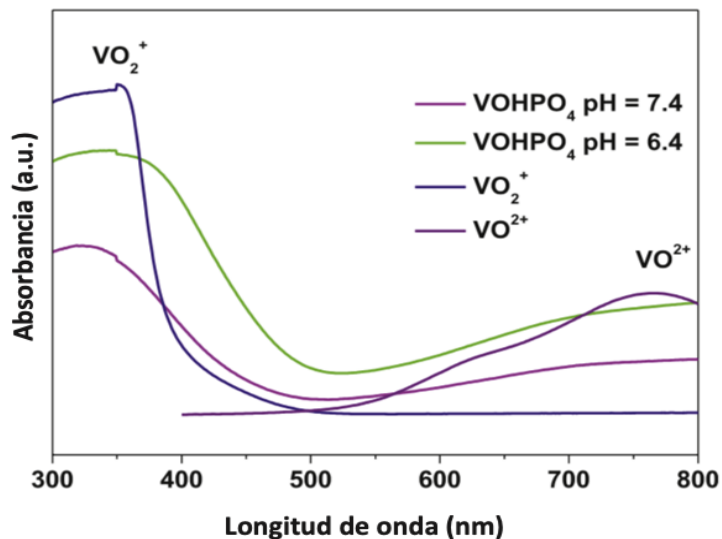


Figura 23. Espectros UV-Vis de las nanopartículas de fosfato de vanadio. Se identificó el ion VO^{2+} de las nanopartículas de fosfato de vanadio y VOSO_4 a 766 nm, el ion VO_2^+ de V_2O_5 a 345 nm.

7.2. Actividad citotóxica

La primera parte de la evaluación de la actividad citotóxica de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se utilizaron VPI-2h y VOSO_4 sobre la línea celular CCL-81. En la concentración de $0.78 \mu\text{g/mL}$ se observó el 100% de viabilidad, y a la concentración de $25 \mu\text{g/mL}$ la viabilidad celular fue de 85% y 82% respectivamente, por lo que se determinaron las IC_{50} de ambas exposiciones fueron mayor a $25 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados sirvieron para aumentar la concentración de las nanopartículas V13, V17 y V21 en los siguientes estudios con otras líneas celulares (tabla 3, 4 y figura 24).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC_{50}) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO_4 en la línea celular CCL-81.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	VPI-2h	VOSO_4
CCL-81	>25	>25

Tabla 4. Viabilidad celular (%) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO₄ en la línea celular CCL-81.

	Concentración (µg/mL)					
	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
CCL-81						
VPI-2h	106 ± 6	100 ± 2	92 ± 10	90 ± 13	87 ± 8	85 ± 7
VOSO ₄	104 ± 3	100 ± 3	93 ± 12	87 ± 14	83 ± 13	82 ± 13

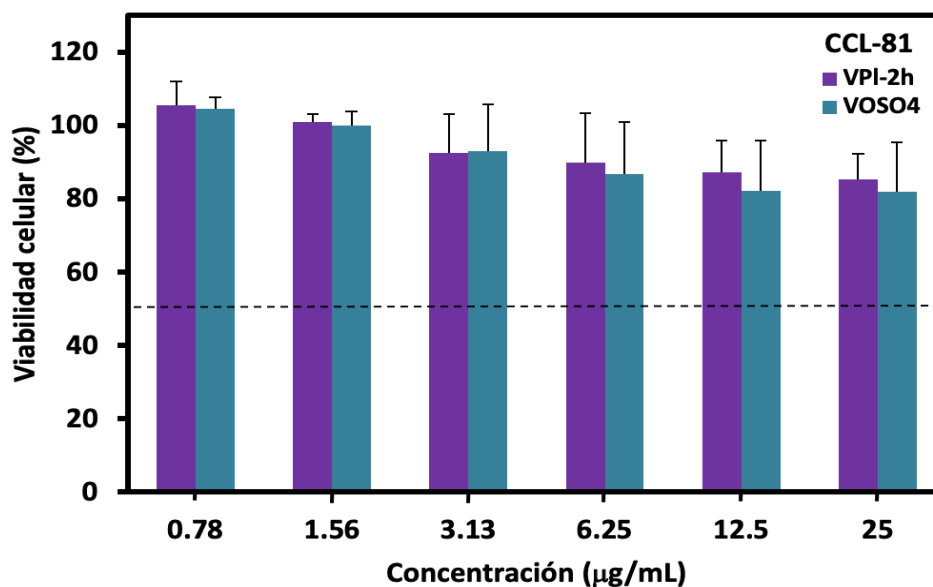


Figura 24. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular CCL-81. A la concentración de 25 µg/mL de nanopartículas VPI-2h hay una viabilidad del 82-85%.

Para la segunda parte de la actividad citotóxica de las nanopartículas VOHPO₄·2H₂O se usaron V13, V17 y V21 sobre las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55X. La línea celular CCL-13 expuesta a la menor concentración de 3.125 µg/mL mostraron una viabilidad aproximadamente del 100%, y a la mayor concentración utilizada de 200 µg/mL se observó un 70%, 68% y 72% de viabilidad respectivamente de cada una (tabla 6 y figura 25).

En la línea celular CCL-81 expuesta a la concentración de 3.125 µg/mL presentó una viabilidad de 94%, 100% y 96% respectivamente, y a la concentración de 200 µg/mL la viabilidad fue de 77%, 76% y 68% respectivamente (tabla 6 y figura 26). En las dos líneas celulares se determinaron las IC₅₀ de las 3 nanopartículas las cuales fueron mayor a 200 µg/mL (tabla 6).

En el caso de la línea celular 55-X expuesta a la menor concentración obtuvieron viabilidades de 80%, 75% y 60%, y a la concentración mayor se observó una viabilidad de 46%, 48% y 45% respectivamente de cada una de las nanopartículas (tabla 6 y figura 27, por lo que se determinaron las IC₅₀ de las nanopartículas V13 fue de 100 µg/mL, V17 fue de 145 µg/mL y V21 fue de 109 µg/mL. La línea celular 55-X fue la más susceptible a las nanopartículas de fosfato de vanadio.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC₅₀) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17 y V21 en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 Y 55X.

	IC ₅₀ (µg/mL)		
	V13	V17	V21
CCL-13	>200	>200	>200
CCL-81	>200	>200	>200
55X	100	145	109

Tabla 6. Viabilidad celular (%) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17 y V21 en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55X.

	Concentración (µg/mL)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
CCL-13							
V13	104 ± 14	102 ± 14	94 ± 7	87 ± 7	79 ± 6	76 ± 6	70 ± 9
V17	106 ± 15	104 ± 14	93 ± 14	84 ± 18	77 ± 13	72 ± 11	68 ± 7
V21	108 ± 17	101 ± 14	92 ± 18	88 ± 19	83 ± 18	75 ± 9	72 ± 10
CCL-81							
V13	94 ± 10	84 ± 4	81 ± 8	77 ± 7	79 ± 6	78 ± 3	77 ± 1
V17	100 ± 13	87 ± 4	86 ± 4	82 ± 3	81 ± 3	80 ± 3	76 ± 4
V21	96 ± 16	90 ± 13	76 ± 4	74 ± 6	71 ± 4	70 ± 3	68 ± 3
55X							
V13	80 ± 8	64 ± 10	60 ± 12	57 ± 11	52 ± 9	49 ± 9	46 ± 6
V17	75 ± 5	67 ± 5	62 ± 4	58 ± 2	54 ± 2	52 ± 1	48 ± 4
V21	60 ± 1	57 ± 1	55 ± 1	54 ± 0.1	51 ± 0.8	50 ± 0.5	45 ± 5

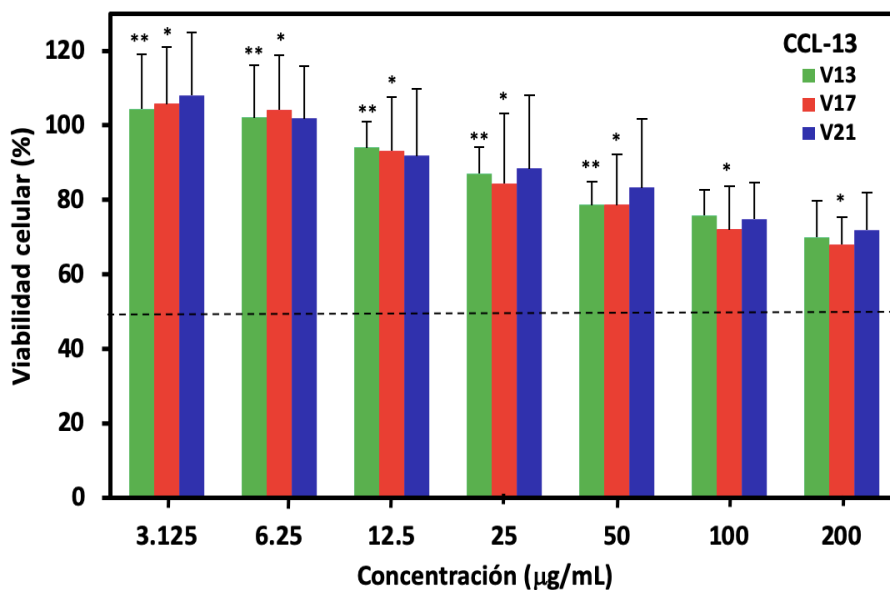


Figura 25. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular CCL-13. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad del 68-72%, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

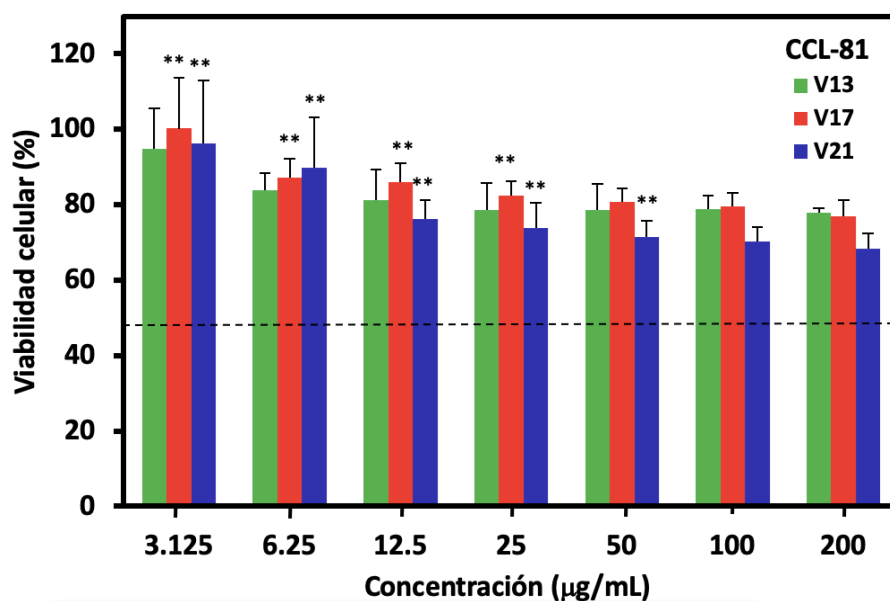


Figura 26. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular CCL-81. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad del 68-77%, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

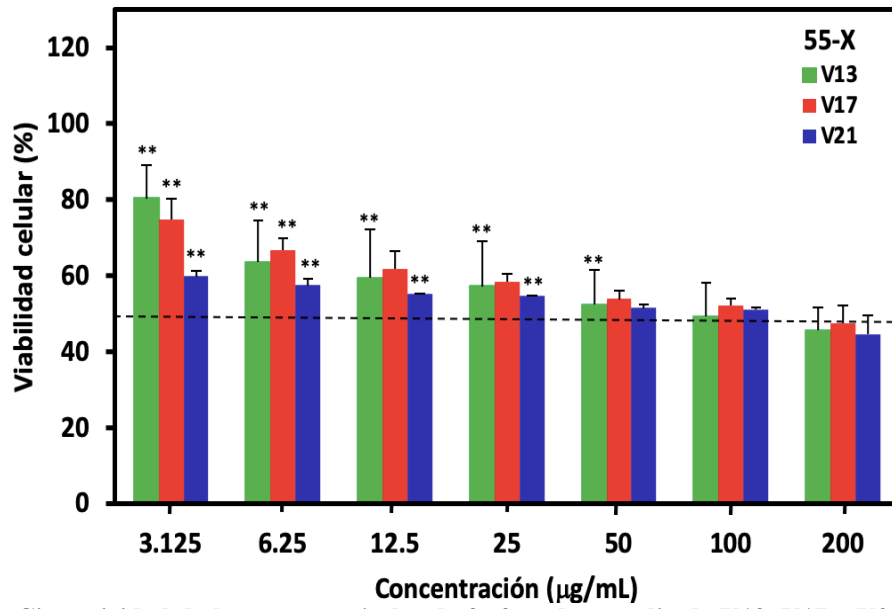
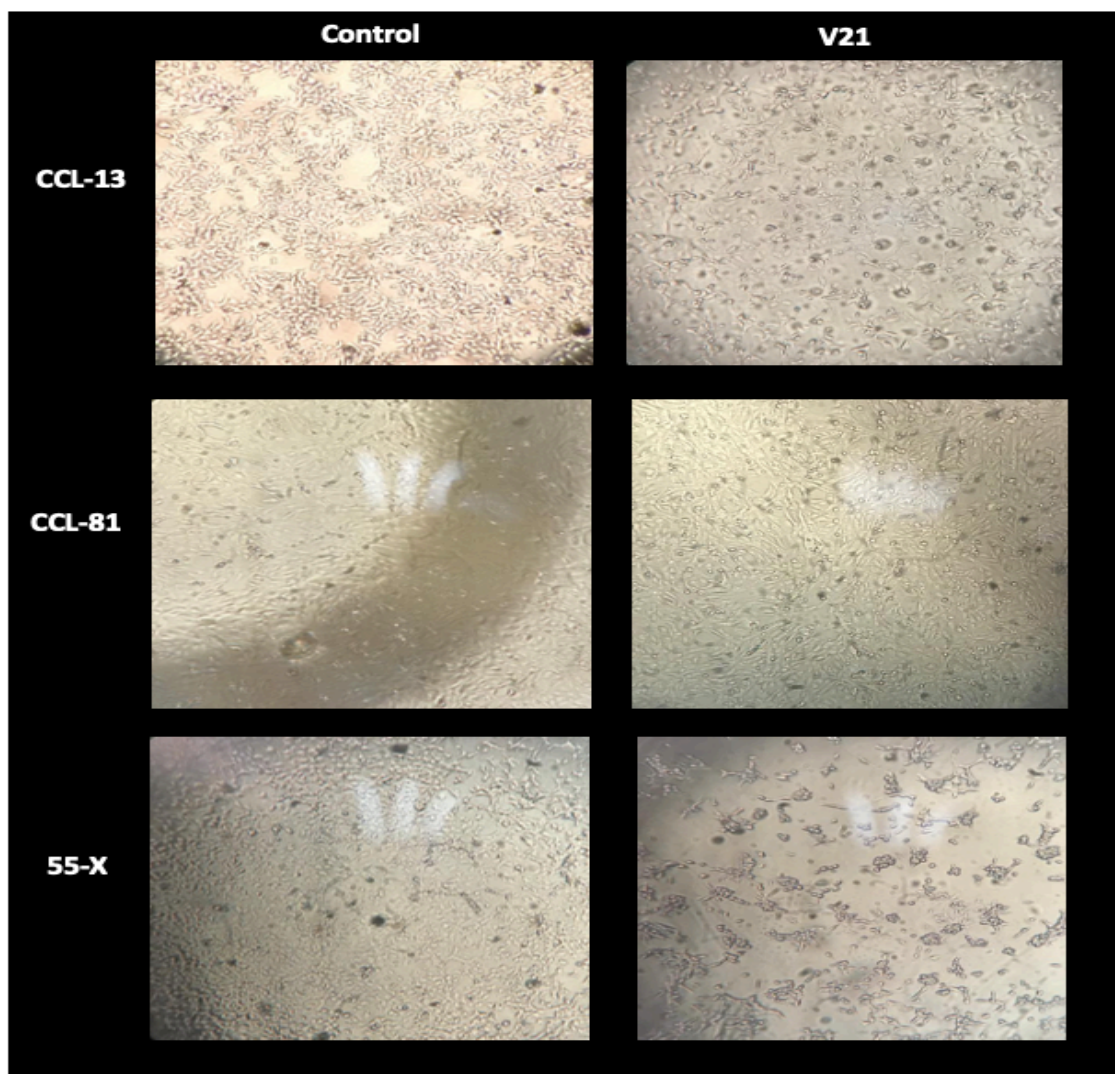


Figura 27. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular 55-X. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad del 45-48%, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

En la figura 28, se puede visualizar cambios morfológicos de la monocapa de células CCL-13, CCL-81 y 55X expuestas a las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ V21.



28. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y 55X. En la imagen se observan las células control en la izquierda y en la derecha las células expuestas con las nanopartículas V21 a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.3. Actividad anticancerígena

La primera parte de la actividad anticancerígena de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se realizó exponiendo VPI-2h sobre las líneas celulares HTB-35 y HTB-22, utilizando los controles VOSO_4 y vincristina. La línea celular HTB-35 expuesta a $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ VPI-2h, VOSO_4 y vincristina a la concentración menor de 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad fue de 88%, 85% y 89% respectivamente, y a la concentración mayor de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo una viabilidad de 61%, 63% y 76% para las nanopartículas y los controles (figura 29 y tabla 8).

La línea celular HTB-22 expuesta a la concentración menor presentó una viabilidad del 82%, 75% y 90% respectivamente, y a la concentración mayor mostraron una viabilidad de 56%, 56% y 78% de cada exposición (figura 30 y tabla 9). En las células HTB-35 y HTB-22 se determinaron las IC_{50} de las nanopartículas las cuales fueron mayor a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tabla 7). Por lo tanto, la línea celular más susceptible fue la HTB-22, no existió diferencia significativa de la viabilidad celular en VPI-2h y VOSO_4 , e incluso las viabilidades de vincristina fueron más altas que con VPI-2h y VOSO_4 .

Estos resultados sirvieron para aumentar la concentración de las $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ V13, V17 y V21 en los siguientes estudios con otras líneas celulares.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC_{50}) de la actividad citotóxica de las nanopartículas VPI-2h y VOSO_4 en las líneas celulares HTB-35 Y HTB-22.

	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	VPI-2h	VOSO_4
HTB-35	>25	>25
HTB-22	>25	>25

Tabla 8. Viabilidad celular (%) de la actividad anticancerígena de las nanopartículas VPI-2h, VOSO₄ y vincristina en la línea celular HTB-35 y HTB-22.

	Concentración (µg/mL)					
	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
HTB-35						
VPI-2h	88 ± 2	83 ± 5	80 ± 7	78 ± 9	73 ± 11	61 ± 2
VOSO ₄	85 ± 6	84 ± 11	82 ± 12	81 ± 9	76 ± 10	63 ± 6
Vincristina	89 ± 18	86 ± 6	85 ± 5	85 ± 7	83 ± 7	76 ± 3
HTB-22						
VPI-2h	82 ± 5	75 ± 10	67 ± 12	63 ± 11	58 ± 11	56 ± 7
VOSO ₄	75 ± 8	74 ± 6	64 ± 10	62 ± 14	57 ± 16	56 ± 10
Vincristina	90 ± 1	87 ± 3	86 ± 4	86 ± 4	80 ± 0.6	78 ± 1.3

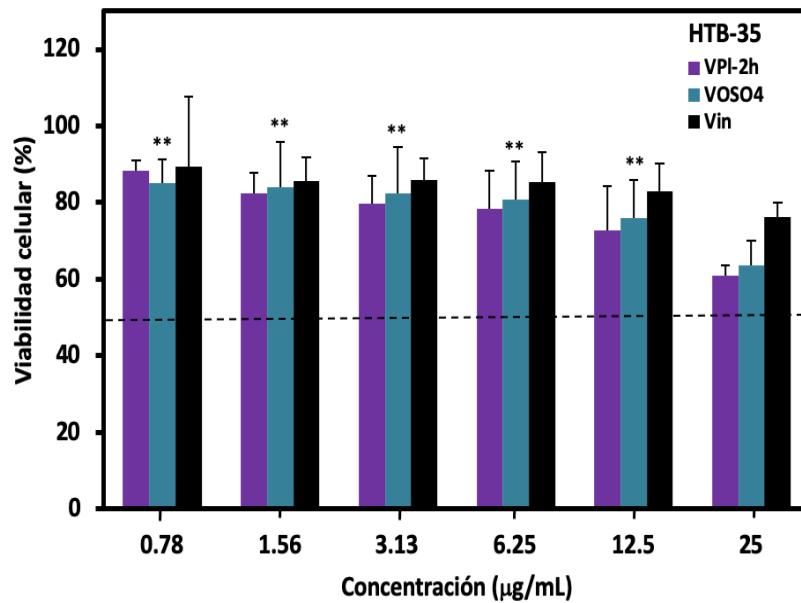


Figura 29. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular HTB-35. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas VPI-2h hay una viabilidad del 61-76%, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

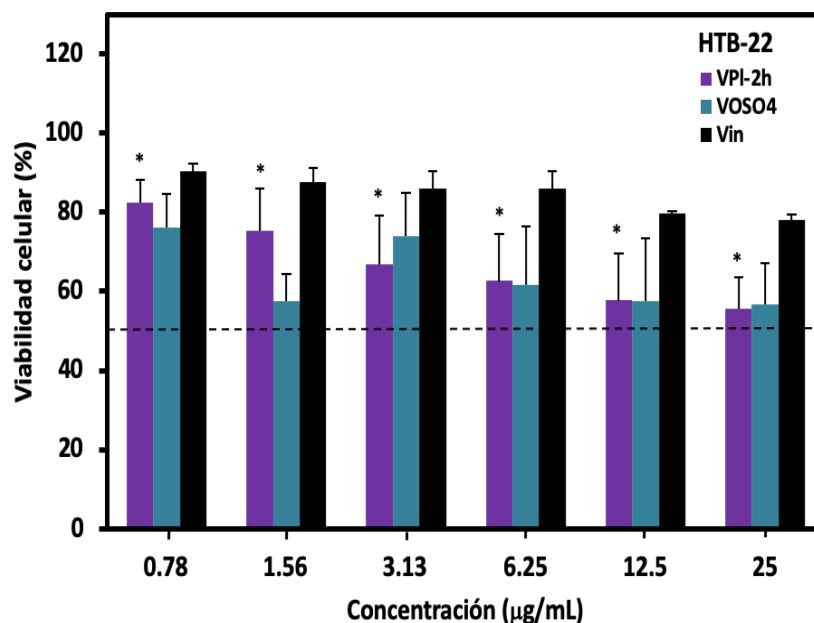


Figura 30. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio VPI-2h en la línea celular HTB-22. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas VPI-2h hay una viabilidad del 56-78 * $p < 0.05$.

En la segunda parte se determinó la actividad anticancerígena de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ exponiendo V13, V17 y V21 sobre las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177, utilizando el control vincristina. La línea celular HTB-35 expuesta a la concentración menor de 3.125 µg/mL presentó una viabilidad de 74%, 77%, 74% y 94% respectivamente de cada nanopartícula y el control, y a la concentración mayor de 200 µg/mL se observó una viabilidad de 54%, 52%, 50% y 49% respectivamente (figura 31 y tabla 11), por lo que se calcularon las IC_{50} para V13, V17, V21 las cuales fueron mayor a 200 µg/mL y vincristina fue de 200.5 µg/mL (tabla 10).

La línea celular HTB-22 expuesta a la concentración de 3.125 µg/mL mostraron una viabilidad de 61%, 56%, 60% y 94% respectivamente, y a la concentración de 200 µg/mL presentó una viabilidad de 48%, 49%, 47% y 58% respectivamente (figura 32 y tabla 11), se determinaron las IC_{50} para V13, V17, V21 y vincristina las cuales resultaron de 124 µg/mL, 55 µg/mL, 53 µg/mL y mayor a 200 µg/mL (tabla 10).

La línea celular HTB-38 expuesta a la concentración menor la viabilidad fue de 82%, 85%, 77% y 103% respectivamente de cada nanopartícula y el control, y a la concentración mayor obtuvieron viabilidades de 49%, 48%, 49% y 77% respectivamente, demostraron que son más tóxicas las nanopartículas para esta línea celular que el fármaco

control (figura 33 y tabla 11), se calcularon las IC_{50} de las nanopartículas V13, V17, V21, y de vincristina las cuales fueron de 155 $\mu\text{g/mL}$, 154 $\mu\text{g/mL}$, 167 $\mu\text{g/mL}$ y mayor a 200 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 10).

La línea celular HTB-177 expuesta a la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ presentaron viabilidades de 85%, 95%, 93% y 101% respectivamente, y a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ se identificaron viabilidades de 48%, 49%, 51% y 87% respectivamente, demostrando que son más tóxicas las nanopartículas para esta línea celular que el fármaco control (figura 34 y tabla 11), para esta línea celular se determinaron las IC_{50} de V13, V17 las cuales fueron de 172 $\mu\text{g/mL}$, 161 $\mu\text{g/mL}$, V21 y vincristina fueron mayor a 200 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 9).

Al final de los resultados concluimos que la línea celular más susceptible fue la HTB-22 y al analizar la viabilidad celular entre las nanopartículas obtuvimos que no existió diferencia significativa.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria 50 (IC_{50}) de la actividad citotóxica de las nanopartículas V13, V17, V21 y vincristina en las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	V13	V7	V21	vincristina
HTB-35	>200	>200	>200	200.5
HTB-22	124	55	53	>200
HTB-38	155	154	167	>200
HTB-177	172	161	>200	>200

Tabla 10. Viabilidad celular (%) de la actividad anticancerígena de las nanopartículas V13, V17, V21 y vincristina en la línea celular HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177.

	Concentración (µg/mL)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
HTB-35							
V13	74 ± 12	72 ± 12	67 ± 10	64 ± 11	62 ± 11	58 ± 10	54 ± 10
V17	77 ± 9	74 ± 11	73 ± 11	71 ± 9	61 ± 5	57 ± 8	52 ± 11
V21	74 ± 6	71 ± 3	70 ± 2	65 ± 3	62 ± 4	58 ± 8	50 ± 11
Vincristina	94 ± 5	91 ± 8	90 ± 8	84 ± 0.8	78 ± 3	76 ± 5	49 ± 5
HTB-22							
V13	61 ± 19	55 ± 16	54 ± 16	52 ± 15	51 ± 15	50 ± 15	48 ± 14
V17	56 ± 17	54 ± 15	53 ± 14	52 ± 15	51 ± 15	51 ± 15	49 ± 14
V21	60 ± 11	57 ± 8	53 ± 12	52 ± 13	49 ± 11	48 ± 12	47 ± 11
Vincristina	94 ± 12	90 ± 11	84 ± 10	79 ± 9	67 ± 8	60 ± 7	58 ± 7
HTB-38							
V13	82 ± 19	73 ± 15	70 ± 17	61 ± 10	55 ± 5	53 ± 6	49 ± 1
V17	85 ± 15	83 ± 17	76 ± 19	71 ± 16	59 ± 7	51 ± 1	48 ± 0.6
V21	77 ± 19	73 ± 17	67 ± 17	62 ± 16	57 ± 9	56 ± 5	49 ± 2
Vincristina	103 ± 7	95 ± 5	96 ± 5	93 ± 6	92 ± 6	85 ± 11	77 ± 6
HTB-177							
V13	85 ± 3	82 ± 4	77 ± 3	72 ± 0.3	70 ± 1	57 ± 3	48 ± 1
V17	95 ± 8	90 ± 5	87 ± 4	69 ± 1	61 ± 5	51 ± 3	49 ± 2
V21	93 ± 7	88 ± 6	87 ± 4	82 ± 13	80 ± 12	60 ± 11	51 ± 5
Vincristina	101 ± 2	100 ± 2	99 ± 1	95 ± 4	93 ± 4	89 ± 3	87 ± 4

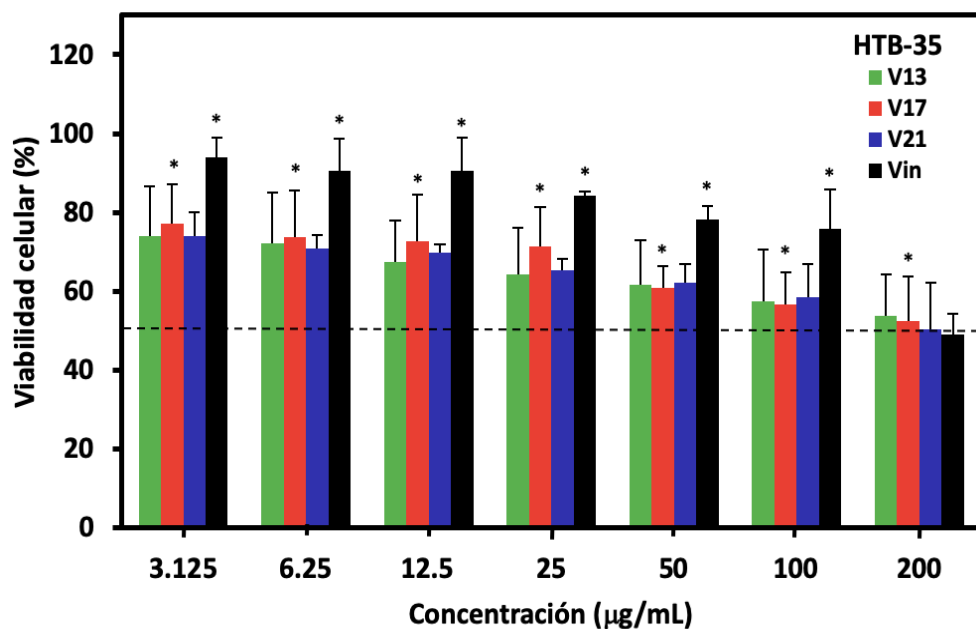


Figura 31. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-35. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad alrededor del 49-54%, * $p < 0.05$.

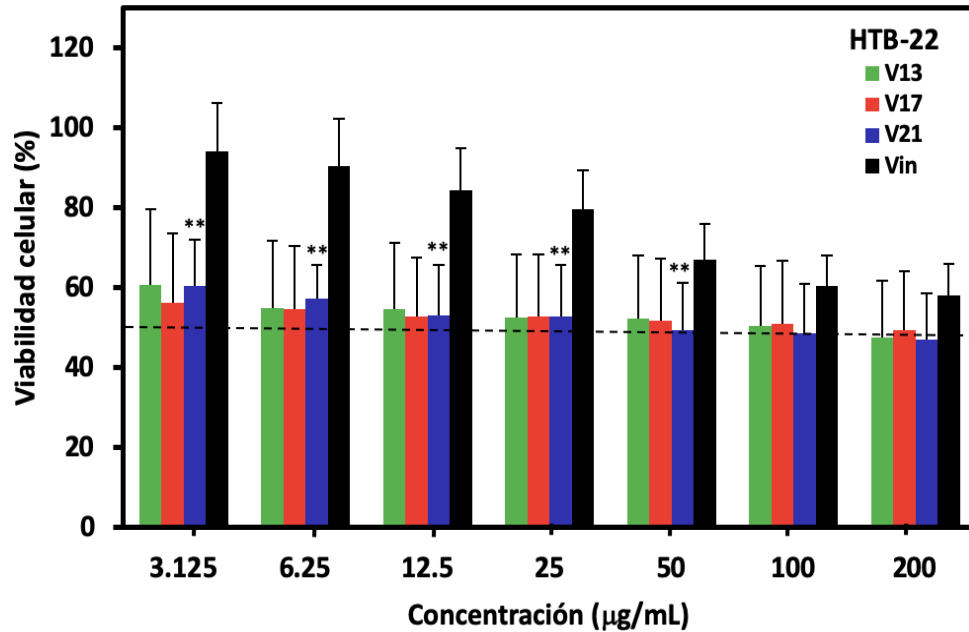


Figura 32. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-22. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad alrededor del 47-58%, $**p < 0.01$.

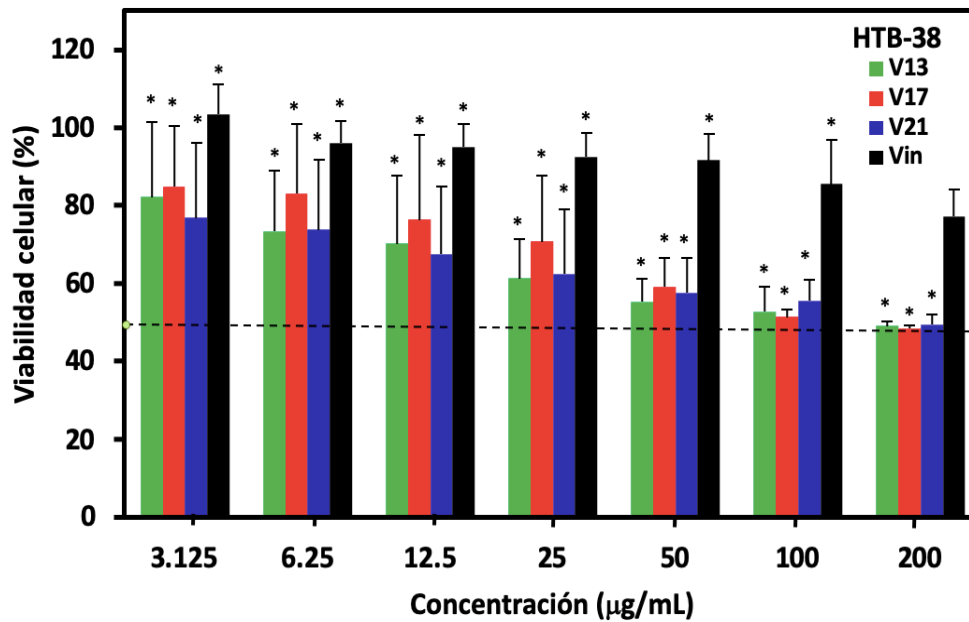


Figura 33. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-38. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad alrededor del 48-77%, $*p < 0.05$.

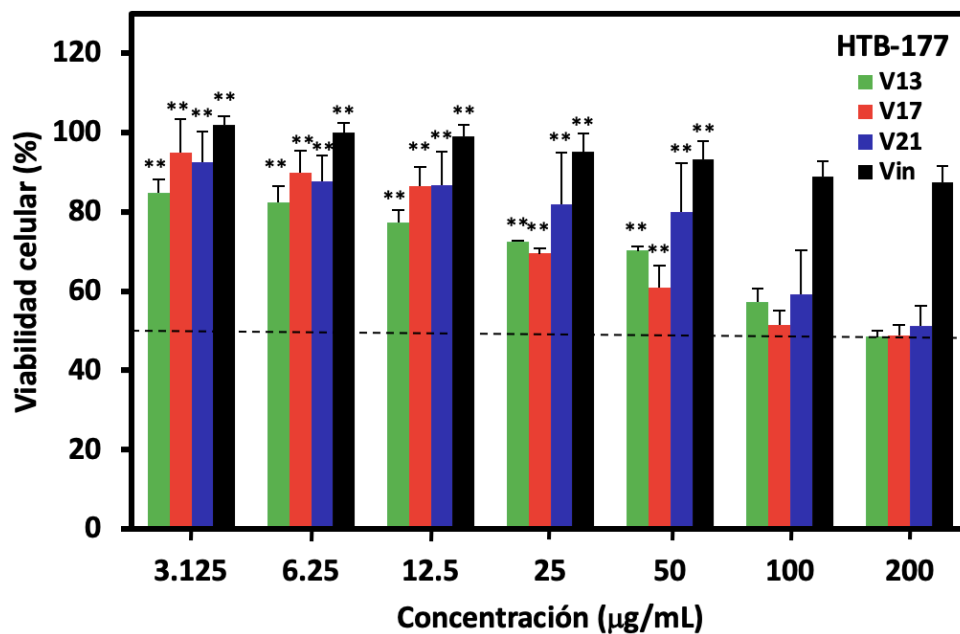


Figura 34. Actividad anticancerígena de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V13, V17 y V21 en la línea celular HTB-177. A la concentración de 200 µg/mL de nanopartículas hay una viabilidad alrededor del 48-87%, ** $p < 0.01$.

En la figura 35 se puede visualizar la actividad anticancerígena las nanopartículas de $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con clave V21 en las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177.

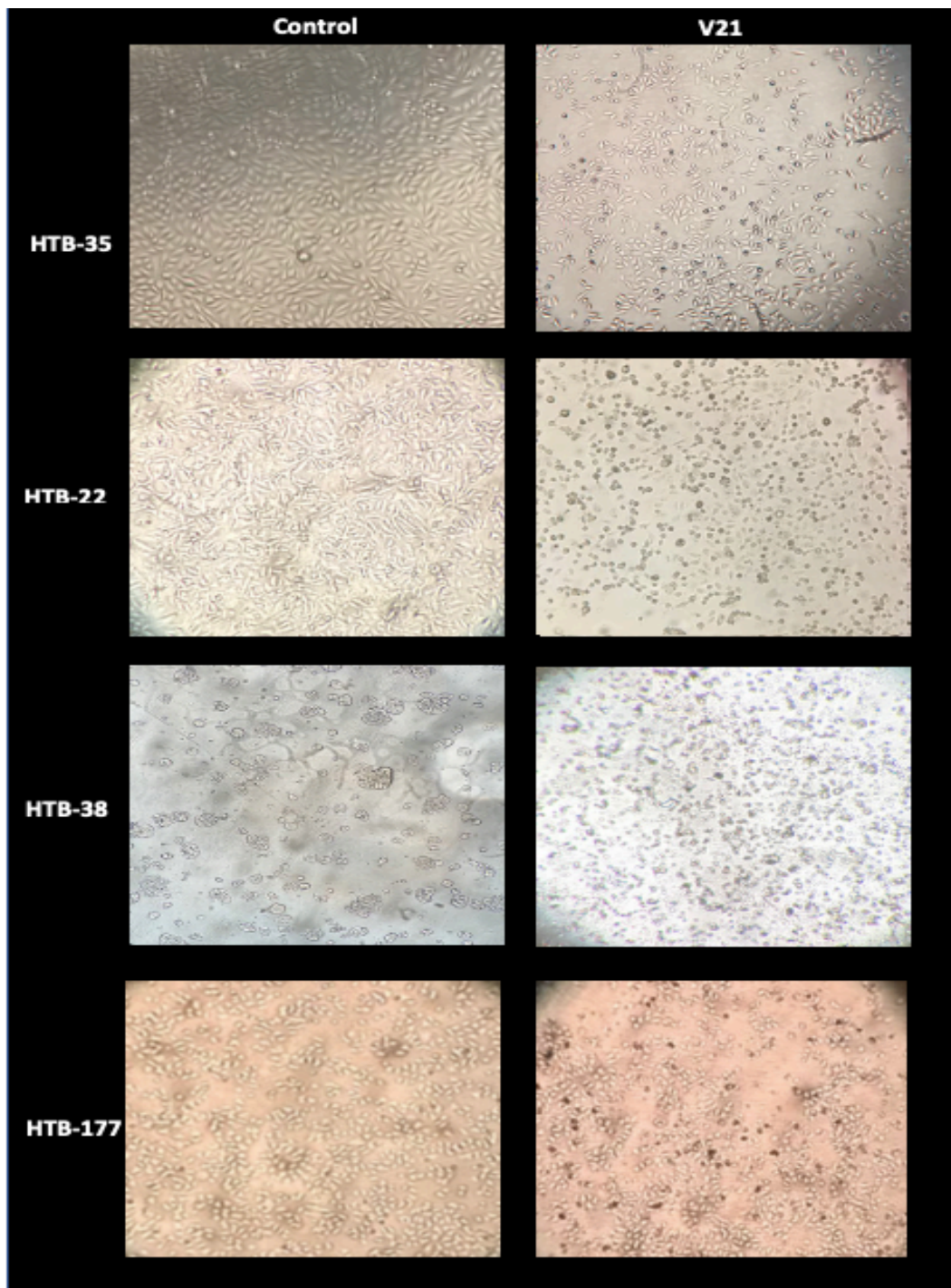


Figura 35. Citotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en las líneas celulares HTB-35, HTB-22, HTB-38, HTB-177. En la imagen se observan las células control en la izquierda y en la derecha las células expuestas con las nanopartículas V21 a la concentración de 200 µg/mL.

7.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas VOHPO₄·2H₂O se determinó sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a un valor de MIC de 400 µg/mL y las nanopartículas VOHPO₄·2H₂O V13, V17 y V21 sobre *Lomentospora prolificans* se determinó a un valor de MIC de 200 µg/mL (tabla 11).

Tabla 11. Resultados de Concentración mínima Inhibitoria (MIC) de la actividad antimicrobiana en las nanopartículas de fosfato de vanadio V13, V17 y V21.

	MIC (µg/mL)			Fármaco control
	V13	V17	V21	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Resistente a ceftazidima)	> 400	> 400	> 400	> 400 (Benzatina-Bencilpenicilina)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Resistente a ceftazidima)	400	> 400	> 400	> 400 (Benzatina-Bencilpenicilina)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Resistente a cefoxitina)	> 400	> 400	400	50 (Benzatina-Bencilpenicilina)
<i>Lomentospora prolificans</i> (Resistente a fluconazol)	200	200	200	> 400 (Fluconazol)
<i>Candida glabrata</i> (Resistente a fluconazol)	> 400	> 400	> 400	> 400 (Fluconazol)
<i>Candida krusei</i> (Resistente a fluconazol)	> 400	> 400	> 400	> 400 (Fluconazol)

7.5. Mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio en las células cancerígenas

7.5.1. Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglo)

La expresión génica diferencial se determinó exponiendo las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ V21 sobre la línea celular cancerígena HTB-22, donde la calidad del ARN ribosomal obtenido en cada muestra a través del gel de agarosa, se observaron con buena integridad las bandas correspondientes a las subunidades 28 y 18. Se llevó a cabo la síntesis del ADNc con fluoróforos y la hibridación en el microarreglo, en la figura 36 se muestra en la imagen el chip de ADN de las dos condiciones de experimentación.

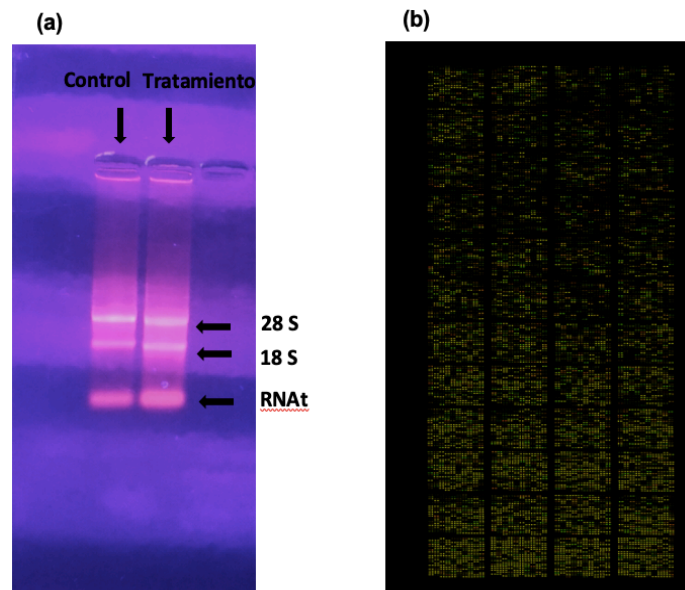


Figura 36. Extracción de ARN y microarreglo de ADN. (a) Gel de agarosa al 1% del ARN obtenidos en la extracción, (b) chip de ADN de la exposición de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21.

Se analizaron los resultados obtenidos de la cuantificación de los genes mediante el chip de ADN, tomando en cuenta el z-score ± 2 DS de los genes reprimidos o sobre expresados, para el estudio bioinformático. En la exposición con las nanopartículas de fosfato de vanadio V21, se encontraron 101 genes reprimidos y 345 genes sobre expresados (figura 37).

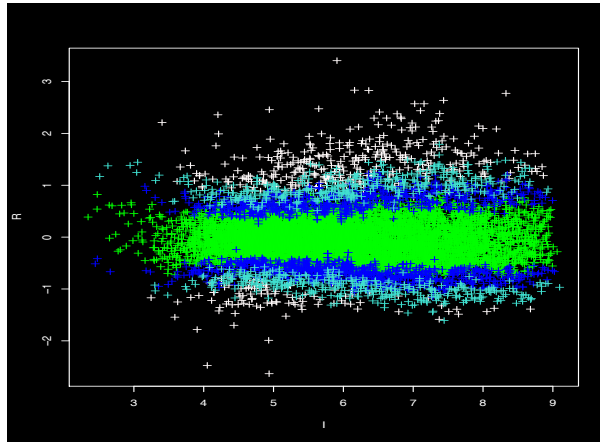


Figura 37. Todos los genes del microarreglo de ADN.

Con ayuda de la herramienta informática (DAVID) se identificaron los genes de las rutas metabólicas del cáncer involucradas en la muerte celular. Se reprimieron 26 genes que pertenecen a 13 vías biológicas involucradas en el desarrollo y propagación del cáncer como: vías de señalización Rap1, PPAR, MAPK, ErbB, unión de adherentes, receptores de citocina, factores de transcripción, vía ribosomal, ARN polimerasa, vía del lisosoma, fagocitosis, metabolismo de ácidos grasos y biosíntesis de glicoesfingolípidos (tabla 12).

Se sobre expresaron 32 genes involucrados a 10 vías biológicas: interacción de receptores, fosforilación oxidativa, vías metabólicas, fagosoma, lisosoma, apoptosis, ruta de señalización del Hippo y ribosoma (tabla 13). Los genes expresados de ALDH2 (Aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial), CYP1A1 (Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 1) y CYP1B1 (Citocromo P450 familia 1 subfamilia B miembro 1) y los genes involucrados en la fosforilación oxidativa dan alusión de una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, es por ello que se realizó la cuantificación de ROS (figura 38).

Tabla 12. Vías biológicas reprimidas en el tratamiento de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21.

Vías biológicas reprimidas	Genes
Vías cancerígenas	<ul style="list-style-type: none"> • CRK Proto-oncogén, adaptador de proteína • CBLC Proto-oncogén C • CTNNA2 Alfa cadherina 2 • RaC1 Ras Toxina botulínica C1
Ruta de señalización Rap1	<ul style="list-style-type: none"> • CRK Proto-oncogén, adaptador de proteína • ANGPT1 Angiopoyetina 1 • RaC1 Ras Toxina botulínica C1
Vía de señalización MAPK	<ul style="list-style-type: none"> • IL1R1 Receptor de interleucina 1 • CRK Proto-oncogén, adaptador de proteína
Ruta de señalización PPAR	<ul style="list-style-type: none"> • ACSL4 Acetil-CoA sintetasa 4 • FABP5 Proteína de unión a ácidos grasos 5
Ruta de señalización ErbB	<ul style="list-style-type: none"> • CRK Proto-oncogén, adaptador de proteína • CBLC Proto-oncogén C
Adhesión celular	<ul style="list-style-type: none"> • CTNNA2 Alfa cadherina 2 • RaC1 Ras Toxina botulínica C1
Fagocitosis mediada por FcγR gamma	<ul style="list-style-type: none"> • CRK Proto-oncogén, adaptador de proteína • RaC1 Ras Toxina botulínica C1
Interacción de receptores Citosina	<ul style="list-style-type: none"> • IL1R1 Receptor de interleucina 1 • IL18RAP Receptor de interleucina 18
Metabolismo y síntesis de ácidos grasos	<ul style="list-style-type: none"> • ACSL4 Acetil-CoA sintetasa 4 • ADH7 Alcohol deshidrogenasa 7 (clase IV) • ELOVL5 Ácido graso elongasa 5 • ST3GAL1 ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 1 • SLC33A1 Familia portadora de solutos 33 miembro 1
Lisosoma	<ul style="list-style-type: none"> • ABCB9 ATP unida al casset de la subfamilia B miembro 9 • NAGPA N-acetilglucosamina 1-fosfodiéster alfa-N-acetilglucosaminidasa • AP1S1 Complejo proteico 1
Factor de transcripción basal	<ul style="list-style-type: none"> • TAF4 Factor 4 de la Caja TATA asociado a la proteína de unión • GTF2A Factor IIA de la transcripción general subunidad 1 • GTF2H3 Factor IIIH de la transcripción general subunidad 3
ARN polimerasa	<ul style="list-style-type: none"> • POLR1E ARN polimerasa I subunidad E • POLR2C ARN
Ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • RPL15 Proteína ribosomal L15 • RPL3 Proteína ribosomal L3 • RPS3A Proteína ribosomal S3A

Tabla 13. Vías biológicas sobre-expresadas en el tratamiento de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21.

Vías biológicas sobre expresadas	Genes
Interacción de receptor-ligando	<ul style="list-style-type: none"> • MAS1 Receptor acoplado a proteína G, proto-oncogen • CHRM1 Factor colinérgico • C3AR1 Receptor complementario C3 • FPR1 Receptor de péptido de formilo 1 • GALR2 Receptor de galanina 2 • GRM4 Receptor metabotrópico de glutamato • CGA Hormona glicoproteica • PLG plasminógeno • TSPO Proteína translocadora
Unión estrecha	<ul style="list-style-type: none"> • CLDN5 Claudina 5 • CLDN9 Claudina 9 • PPP2CB Proteína fosfatasa 2
Vía de señalización PI3K-Akt	<ul style="list-style-type: none"> • CHRM1 Factor colinérgico • TGF Factor de crecimiento • TLR2 Receptor toll 2 • ITGA5 Integrina alfa 5
Fosforilación oxidativa	<ul style="list-style-type: none"> • ATP5O ATP sintasa, transporte de H⁺, complejo mitocondrial F1O • ATP5G1 ATP sintasa, transporte de H⁺, complejo mitocondrial FG1 • NDUFB5 Ubiquinona oxidoreductasa subunidad B5, NADH • COX7A1 Subunidad citocromo c oxidasa 7 A1
Vías metabólicas	<ul style="list-style-type: none"> • ALDH2 Aldehído deshidrogenasa 2 (mitocondrial) • CYP1A1 Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 1 • CYP1B1 Citocromo P450 familia 1 subfamilia B miembro 1
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • NFKB 1A Inhibidor alfa • AIFM1 Factor 1 de apoptosis inducido por la mitocondria
Fagosoma	<ul style="list-style-type: none"> • CORO1A Coronina 1A • ITGA5 Integrina alfa 5 • TLR2 Receptor 2 toll
Lisosoma	<ul style="list-style-type: none"> • AP1M2 Complejo proteico relacionado con el adaptador 1 • DNASE2 Deoxirribonucleasa 2
Señalización del hipocampo	<ul style="list-style-type: none"> • MOB1A Activador de quinasa MOB 1A • ID2 Inhibidor 2 de la unión del ADN
Ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • FAU Fusión ubiquitina similar a proteína ribosómica 30s

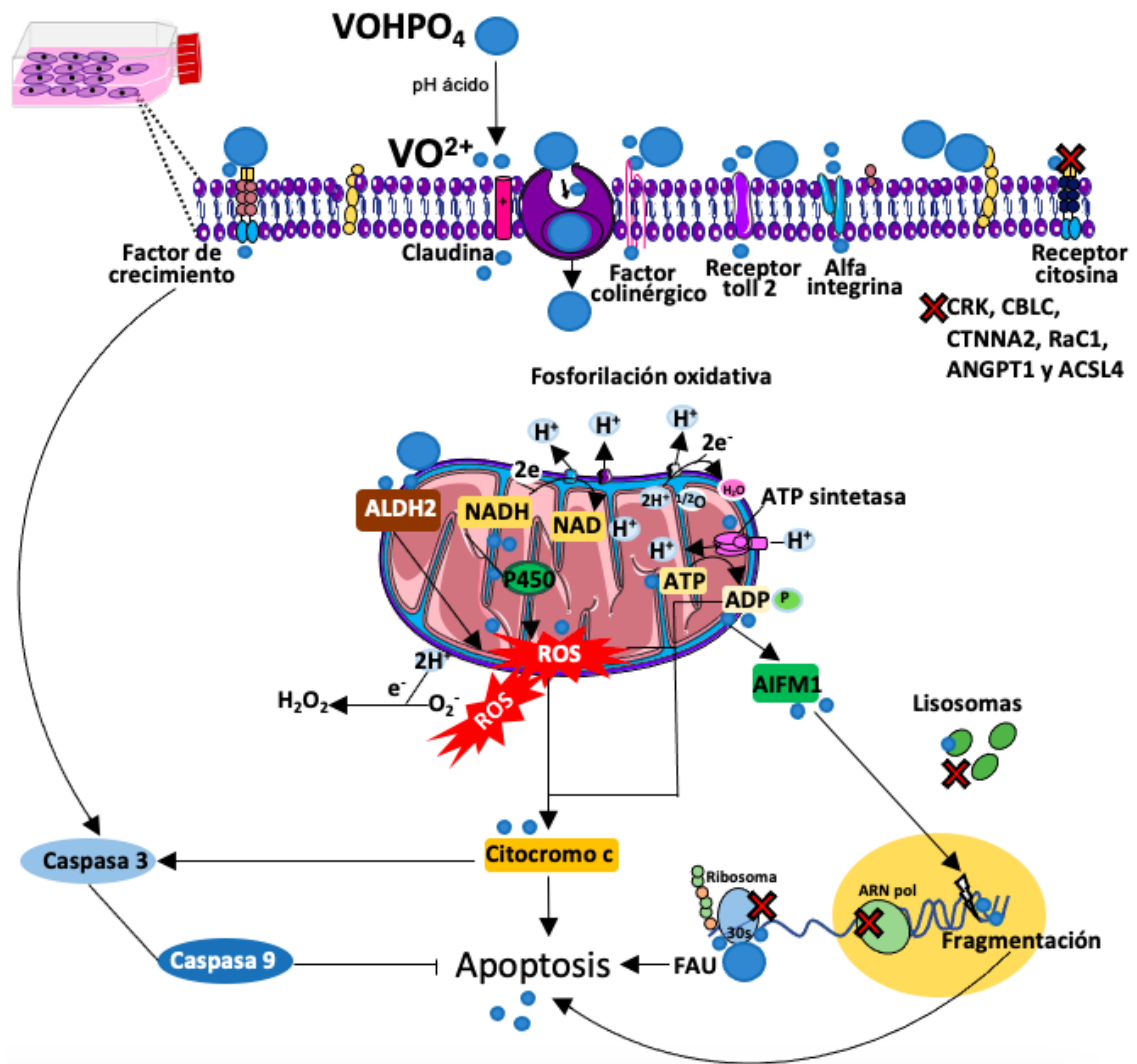


Figura 38. Rutas metabólicas de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 sobre HTB-22. Los genes reprimidos se presentan con una x, los genes sobreexpresados se muestra a lado de VO^{2+} o $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CRK (Proto-oncogén, adaptador de proteína), CBL (Proto-oncogén), CTNNA2 (Alfa cadherina 2), RaC1 (Toxina botulínica C1), ANGPT1 (Acetil-CoA 4), ACSL4 (Angiopoyetina 1), ALDH2 (Aldehído deshidrogenasa 2), H^+ (ion hidrógeno), NADH y NAD (Deshidrogenasas), ATP (Adenosín trifosfato), ADP, (Adenosín difosfato) AIFM1 (Factor 1 de apoptosis inducido por la mitocondria), ROS (Especies reactivas de oxígeno), FAU (Fusión ubiquitina), ARN pol (ARN polimerasa), O_2^- (superóxido) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno).

7.5.2. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Se determinó el porcentaje de la fluorescencia de ROS de $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ V21 en las líneas celulares CCL-81 y HTB-22. En el caso de las células CCL-81, se visualiza que conforme se aumenta la concentración de las nanopartículas de $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aumenta la producción de las ROS, y a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay un porcentaje del 100% con respecto al control (tabla 14 y figura 39).

Tabla 14. Producción de ROS (%) de las nanopartículas de fosfato de vanadio de V21 en CCL-81 y HTB-22.

	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
CCL-81	Producción ROS % + DS						
V21	5 ± 1.1	8 ± 1	12 ± 6.2	53 ± 1	72 ± 8	81 ± 12	100 ± 0.3
HTB-22							
V21	3 ± 0.7	5 ± 1	13 ± 7	55 ± 3	85 ± 14	93 ± 13	131 ± 5

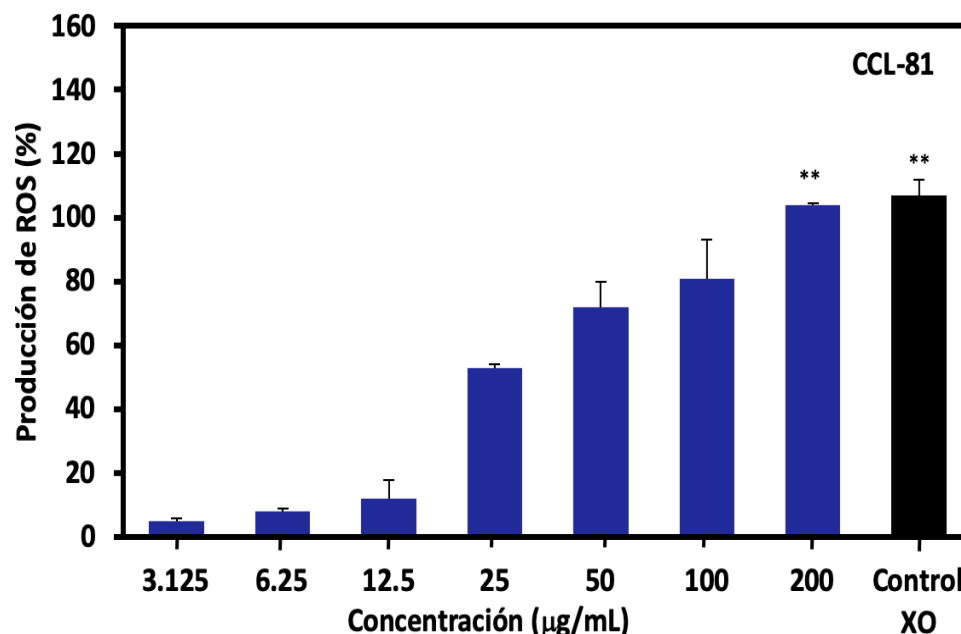


Figura 39. Cuantificación de la producción de ROS de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 en las líneas celular CCL-81. Se utilizó como control xantina oxidasa (XO), a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas hay un porcentaje de alrededor del 104%, ** $p < 0.01$

En el caso de las células HTB-22 expuestas a las nanopartículas de fosfato de vanadio, a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la producción de las ROS sobrepasa al control XO en un 31% (tabla 15 y figura 40).

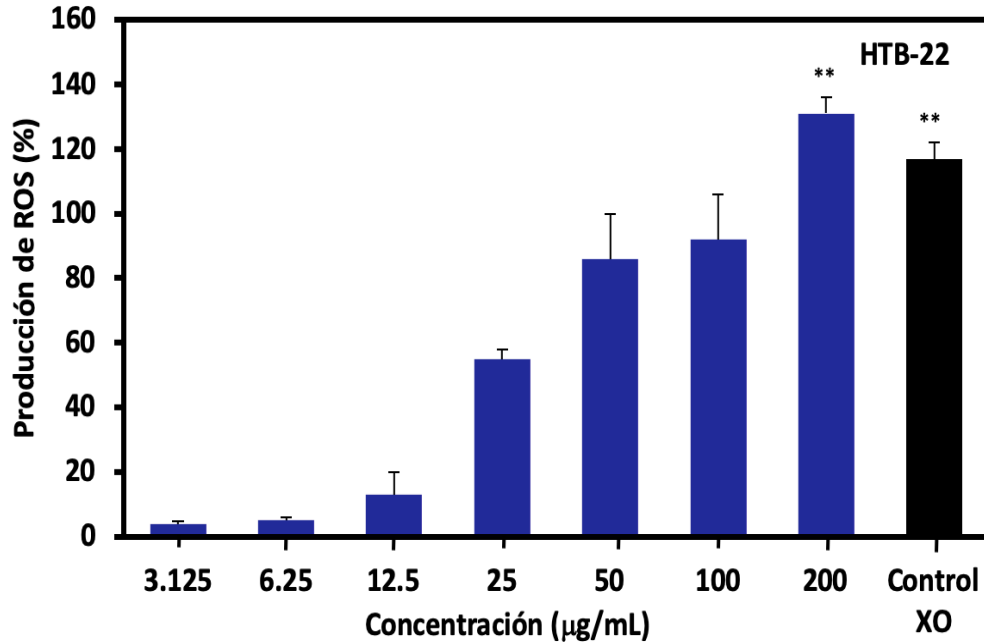


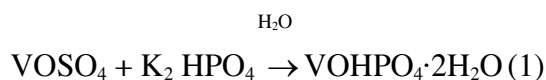
Figura 40. Cuantificación de la producción de ROS de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 en las líneas celular HTB-22. Se utilizó como control xantina oxidasa (XO), a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas hay un porcentaje de alrededor del 131%, $**p<0.01$.

8. DISCUSIÓN

8.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de fosfato de vanadio

Durante el proceso de la síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio se utilizó el método por precipitación, que permite el control sobre el tamaño y la morfología de las nanopartículas en presencia de agentes: surfactante (dodecilsulfato de sodio, SDS), precursor (sulfato de vanadio) y precipitante (fosfato dibásico de potasio). Según los reportes de Niraula *et al.*, 2014, Jones, 1967, Dasgupta *et al.*, 2002, Datta *et al.*, 2002, Saenz *et al.*, 2011 y Lucio-Porto *et al.*, 2012 el uso del SDS en la síntesis por precipitación, juega un papel importante en el crecimiento de las nanopartículas, debido a que es un compuesto tensioactivo aniónico con 12 átomos de carbono con un grupo sulfato, que confiere propiedades anfifílicas que permite la formación de micelas con tensión superficial y viscosidad, dando lugar a nanopartículas esféricas.

La síntesis de las nanopartículas de fosfato de vanadio tiene la siguiente reacción: los iones VO^{2+} de la solución precursora VOSO_4 y los aniones HPO_4^{2-} de la solución precipitante de K_2HPO_4 (ecuación 1).



En los resultados de la caracterización por MEB, las nanopartículas VPI-2h, V13, V17 y V21 tuvieron un promedio de diámetro de 75 nm, 55 nm, 70 nm y 40 nm respectivamente.

La diferencia entre la VPI-2h y la V13 fue la disminución del tiempo de reacción, obteniendo un tamaño menor de diámetro. Lo cual concuerda con Thanh *et al.*, 2014 y Polte, 2015 esto debido a que el sulfato de vanadio con el fosfato dibásico de potasio interactuó menos tiempo, durante la fase de crecimiento de las nanopartículas. En la V17

se aumentó el porcentaje de SDS para reducir el tamaño de las nanopartículas, sin embargo, el tamaño de diámetro aumentó, en el estudio de Niraula *et al.*, 2014, Thanh *et al.*, 2014 y Polte, 2015 establecen que esto se debió a que la temperatura juega un papel importante en el crecimiento de las nanopartículas.

Para las nanopartículas V21 se disminuyó el porcentaje de SDS y la temperatura con el mismo tiempo de reacción que V13 y V17, se visualizó un tamaño de diámetro más pequeño comparado con todas las nanopartículas, en la investigación de Niraula *et al.*, 2014 documentan que, al aumentar el porcentaje de surfactante, las micelas forman nanopartículas pequeñas favorecido por el tiempo de reacción y la temperatura.

En los resultados de la caracterización por DRX de las nanopartículas, el patrón de difracción de las nanopartículas VPI-2h muestran picos que corresponden a $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de la ficha JCPDS 01-084-1885, de acuerdo con los estudios de Le Bail *et al.*, 1989 y Worzala *et al.*, 1998 pertenecen a un sistema cristalino triclinico con un grupo espacial P-1 y con una densidad teórica de 2.50 gcm^{-3} . La estructura cristalina consiste en capas que alternan octaedros de VO_6 y tetraedros de PO_4 en la dirección c, no hay moléculas aisladas entre las capas.

Las nanopartículas V13, V17 y V21 mostraron picos anchos con señales continuas centrados en 2θ igual a 30° que pertenecen a $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de la ficha JCPDS 00-048-1158, estos resultados son similares a los reportados por Hutchings, 2008 y Weng, 2011 quienes obtuvieron señales continuas en el DRX, lo cual indica que el tamaño de nuestras partículas es de escala nanométrica. Esta caracterización nos confirma la composición de las nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

En la caracterización de FTIR de las nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ VPI-2h, V13, V17 y V21, se obtuvieron bandas muy similares a lo reportado por Dasgupta *et al.*, 2002 demuestran que la señal de $3401\text{-}3388 \text{ cm}^{-1}$ pertenece al OH y la señal de $1617\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ pertenece a H_2O . En los trabajos de Chen *et al.*, 2017, Lim *et al.*, 1996, Azarkamanzad *et al.*, 2017 y Boran y Datta, 2010 establecen que la señal en $1035\text{-}1084 \text{ cm}^{-1}$ pertenece a PO_4^{3-} , la señal en $420\text{-}441 \text{ cm}^{-1}$ pertenece a O-P-O. Según Mao *et al.*, 2019 la señal en $954\text{-}984 \text{ cm}^{-1}$ pertenece a $\text{V}=\text{O}$. En estos resultados no se presentaron bandas de los surfactantes, esto nos indica que fue eliminado durante el proceso de filtración de las nanopartículas.

En la caracterización por UV-Vis se realizó el perfil de disolución de las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en pH 6.4 y 7.4 para verificar la liberación del ion VO^{2+} . Según Alfarouk *et al.*, 2014 estos valores de pH representan las condiciones fisiológicas de las células y el microambiente ácido del tumor. En los trabajos de Shuang *et al.*, 2019 plantean que este tipo de nanopartículas son materia inorgánica solubles en medios ácidos. Mao *et al.*, 2019 confirman este criterio y también señalan que la absorbancia de 766 nm obtenida a pH 6.4 que pertenece a la liberación del ion VO^{2+} en las nanopartículas. Según Jian *et al.*, 2016 en los espectros de UV-Vis de las nanopartículas son señalan la presencia del ion VO_2^+ durante la disolución, este ion es un producto de la oxidación del VO^{2+} .

8.2. Actividad citotóxica

La línea celular CCL-81 fue expuesta a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ VPI-2h y al VOSO_4 , no se determinó muerte celular a pesar de ser la concentración más alta evaluada en la primera etapa; según Evangelou, 2002, Holko *et al.*, 2008 la similitud de los resultados se debe a que ambos son compuestos de iones VO^{2+} .

Por lo anterior, para el caso de las nanopartículas V13, V17 y V21 se aumentaron las concentraciones, en las líneas CCL-13 y CCL-81 expuestas a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó solo un 23% de toxicidad y en 55-X se determinó un 55%, lo cual es un tanto similar con el estudio presentado por Holko y cols., en el 2008, ellos analizaron la citotoxicidad de VOSO_4 sobre las líneas BEAS-2B (células de pulmón) y PNT-2 (epitelio de próstata), en la primera líneas células mostraron una viabilidad del 50% a la concentración a 48.9×10^6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y en el caso de las células PNT-2 no se observó toxicidad a esta concentración. En la investigación de Wozniak y Blasiak., en el 2004 determinaron la actividad de VOSO_4 sobre linfocitos, a la concentración de 815×10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtuvieron una viabilidad del 50%, se observa que en estos trabajos y en nuestros resultados se utilizaron concentraciones altas en células no cancerígenas sin causar daño irreversible.

En otro estudio de Abakumova y cols., en el 2012, trabajaron con fibroblastos NIH/3T3 expuestos a VOSO_4 , esta línea mostró una viabilidad del 50% a la concentración

de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en esta investigación al igual que la nuestra se observa que los fibroblastos 55-X y NIH/3T3 son susceptibles a VOSO_4 y al ion VO^{2+} .

8.3. Actividad anticancerígena

En los resultados de la actividad cancerígena de $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ VPI-2h, VOSO_4 y vincristina, en HTB-35, a la exposición de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se presentó una viabilidad del 61%, 63% y 76% para cada compuesto. En HTB-22 se observó una viabilidad del 56%, 56% y 78% respectivamente de cada uno.

Estos resultados de nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y VOSO_4 mostraron viabilidades similares, debido a que ambos son fuentes de iones VO^{2+} , y en distintos reportes de Evangelou, 2002, Holko *et al.*, 2008, Abakumova *et al.*, 2012, Wozniak y Blasiak, 2004 confirma que la actividad anticancerígena se debe a los iones. En otros reportes de Da Silva *et al.*, 2017, Badwaik *et al.*, 2013 y Lara *et al.*, 2010 enfatizan que las nanopartículas muestran respuestas farmacológicas rápidas, debido al tamaño nanométrico y al uso de dosis pequeñas de los compuestos, esto ayuda a atravesar barreras biológicas logrando llegar a sitios donde se requiera.

En los resultados de la actividad de las nanopartículas V13, V17 y V21 y vincristina, se observó que para HTB-35 se presentó en cada nanopartícula una IC_{50} mayor a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para vincristina fue de 200.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para el caso de HTB-22 se demostró para cada compuesto una IC_{50} de 124 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mayor a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. En HTB-38 se mostró una IC_{50} de 155 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 154 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mayor a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Para HTB-177 se visualizó en cada nanopartícula una IC_{50} de 172 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 161 $\mu\text{g}/\text{mL}$, V21 y en vincristina fue mayor a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En comparación al estudio presentado por Holko y cols., en el 2008 analizaron la actividad anticancerígena de VOSO_4 sobre las líneas A549 (carcinoma de pulmón) y DU145 (carcinoma de próstata), las cuales mostraron una IC_{50} de 24.45×10^3 mg/mL . En la investigación de Wozniak y Blasiak., en el 2004 determinaron la actividad de VOSO_4 sobre HeLa (carcinoma de cérvix), y demostraron una IC_{50} de 815×10^3 mg/mL . Estas

investigaciones en comparación a nuestros resultados reportan una IC_{50} de $VOSO_4$, muy por arriba a lo que se presenta en este estudio con las nanopartículas de $VOHPO_4 \cdot 2H_2O$.

Nuestros resultados obtenidos difieren con lo reportado por Abakumova y cols., en el 2012, trabajaron con las líneas celulares L929 (fibrosarcoma de ratón) y PC12 (feocromocitoma de ratón), las cuales expusieron a $VOSO_4$ y mostraron una IC_{50} de 5 $\mu g/mL$ y 5.5 $\mu g/mL$ respectivamente, por debajo al presente estudio de investigación de las nanopartículas.

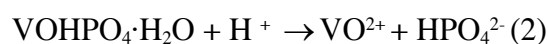
De acuerdo con los antecedentes mencionados y conforme a los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra que las nanopartículas de fosfato de vanadio tienen mayor afinidad por las células cancerosas que el control utilizado vincristina, esto es debido a que son compuestos diferentes y varían su la toxicidad (Evangelou, 2002, Holko *et al.*, 2008, Abakumova *et al.*, 2012). Además, según al reporte de Özcelik *et al.*, 2004, demuestran que las nanopartículas tienen mejor actividad anticancerígena que el fármaco control vincristina, esto es debido a que son compuestos diferentes y varían en la toxicidad que presentan.

La toxicidad de vincristina varía según el tipo de célula, según estudios de Özcelik *et al.*, 2004 y Neshati *et al.*, 2008 analizaron la citotoxicidad en células Vero, HeLa, Hep-2 y 5637, para cada línea celular fue 0.098 $\mu g/mL$, 0.049 $\mu g/mL$ y 0.098 $\mu g/mL$ y 49 $\mu g/mL$, estos resultados están por debajo a lo que se obtuvo en el presente proyecto. El mecanismo de acción de la vincristina lo reportan Himes *et al.*, 1976 y Olshefki y Ladisch, 2001, ellos describen que actúa en las células anticancerígenas interfiriendo con los microtúbulos, que forman los haces mitóticos durante la metafase interrumpiendo el ciclo celular, sin dejar a un lado que los fármacos anticancerígenos no son selectivos y se causan diferentes efectos adversos.

En otras investigaciones Torres-Martínez, 2017, Ahamed *et al.*, 2016, Lam *et al.*, 2014, Patil *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2010 y Aderibighe, 2015 reportan diferentes mecanismos de acción de la actividad anticancerígena de nanopartículas de Au y Ag, las cuales causan daño al ADN, inhabilitan el ciclo celular, dañan la mitocondria, generan ROS e inducen apoptosis. En los estudios reportados por Akhtar *et al.*, 2017, Köpf-Maier, 1994 y Jia *et al.*, 2013 describen que los mecanismos biológicos se realizan debido a que

las nanopartículas metálicas de Au y Ag, en el medio extracelular ácido liberan los iones generando el desencadenamiento de los mecanismos.

De acuerdo con los antecedentes revisados y los resultados presentados en este trabajo podemos hacer mención que las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en el medio ácido de las células cancerígenas, puede solubilizarse como se muestra en la ecuación 2, liberando el ion VO^{2+} y esto logra una selectividad hacia las células cancerosas. Por lo cual, las nanopartículas $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ podría ser una buena alternativa para el tratamiento del cáncer (Sánchez-Oseguera *et al.*, 2010).



8.4. Actividad antimicrobiana

En el presente estudio la actividad antimicrobiana de las nanopartículas V21 se presentó en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* con valores de MIC de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y las nanopartículas V13, V17 y V21 inhibieron el crecimiento de *Lomentospora prolificans* a un valor de MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comparado con Sharma y Sharma., en el 2013 analizaron la actividad antimicrobiana de VOSO_4 , ellos visualizaron esta actividad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, *Byssochlamys fulva* y *Mucor circinelloides* con un valor de MIC de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En otro estudio reportado por Fukuda y Yamase., en el 1997 determinaron la actividad antimicrobiana de VOSO_4 contra *Streptococcus pneumoniae* con un valor de MIC de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ambos trabajos de investigación presentaron un valor de MIC muy por debajo a lo que se obtuvo en este trabajo. En los estudios de Goosens *et al.*, 2014, Chagnot *et al.*, 2013, Fernandes y Sao-José, 2018 la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* es debida a la estructura de la membrana celular Gram positiva, tienen una capa de gruesa de peptidoglicano y una cápsula que envuelve toda la célula. Según Waxman, 1983 la penicilina contra *Staphylococcus aureus* tiene un valor de MIC de 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, muy por debajo a lo que se reporta en esta investigación con las nanopartículas. Además, el mecanismo de acción de penicilina es la inhibición del

peptidoglicano indispensable en la formación de la pared celular bacteriana, se une a la enzima transpeptidasa llamada proteína fijadora de penicilinas PBP, la cual es responsable de producir cadenas de péptidos (Waxman, 1983).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* según Goosens *et al.*, 2014, Chagnot *et al.*, 2013 y Fernández y Sao-José, 2018 este microorganismo tiene una membrana celular doble con un espacio periplásmico que contiene peptidoglicano, fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas, lo que confiere mayor resistencia a los fármacos, en el caso de la toxicidad de vanadio podría ser debida a una concentración alta del compuesto.

En el caso de los hongos filamentosos según Pazouki y Panda, 2000, Modrzewska y Kurnatowski, 2013 la susceptibilidad se debe a la estructura de membrana celular, la cual está compuesta por proteínas transmembrana, alrededor tiene quitina, seguido de betaglucano y monoproteínas, esto facilita la entrada de algunos compuestos tóxicos. La susceptibilidad del fluconazol para *Lomentospora prolificans* de acuerdo con Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015 y Elizondo-Zertuche *et al.*, 2017 es de un valor de MIC de 64 ug/mL. En el trabajo de Casalnuovo, 2004 se plantea el mecanismo de acción de fluconazol, el cual inhibe la síntesis del ergosterol mediante la interacción con desmetilasa 14-alfa, una enzima del citocromo p450 que se necesita para convertir el lanosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana

En diversos trabajos de Badwaik *et al.*, 2013, Jerez-Urrilagoitia *et al.*, 2006, Bryaskova *et al.*, 2011, Lipovsky *et al.*, 2011, Bryaskova *et al.*, 2011 y Pérez-Salas, 2006 reportan la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de oro, plata, zinc y plata plantean los diferentes mecanismos de acción toxicológico como muerte celular, generación de ROS y daño al ADN. Por lo tanto, existe una gran diferencia entre los fármacos y las nanopartículas por los diferentes mecanismos de acción.

En los resultados de este trabajo de investigación los valores de MIC están por arriba a lo reportado por los autores, sin embargo, cabe mencionar que los microorganismos utilizados en la actividad eran fármaco-resistentes. Esta acción se podría sugerir que las nanopartículas de fosfato de vanadio podría ser un posible agente antimicrobiano.

8.5. Análisis del patrón de expresión génica diferencial (microarreglos)

Para encontrar terapias dirigidas contra el cáncer según Hanahan y Weinberg, 2000 y 2011, se tiene que tomar en cuenta las capacidades adquiridas de las células cancerígenas durante la fase del crecimiento y la progresión del tumor. Nuestras nanopartículas de fosfato de vanadio $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ejercen el mecanismo de acción reprimiendo y sobreexpresando genes que se conectan con el circuito de la proliferación y la progresión celular.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis del mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio V21 en la línea celular HTB-22, se encontraron 13 vías biológicas reprimidas y 10 vías biológicas sobreexpresadas.

Las nanopartículas de fosfato de vanadio reprimieron genes de las vías de señalización Rap1, PPAR, MAPK, ErbB, metabolismo de ácidos grasos, biosíntesis de glicoesfingolípidos, se tiene evidencia de Dai *et al.*, 2011, Fathers *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2007, Chittezhath *et al.*, 2014, Taher *et al.*, 200 y Asilbekyan *et al.*, 2012 que estos genes están involucrados en la supervivencia y en la proliferación celular.

Se reprimieron las vías de adhesión celular y receptores de citosina, por lo cual, estas vías son importantes para la señalización intracelular (Fanjul-Fernández *et al.*, 2013, Hedl *et al.*, 2014). Las vías de señalización lisosomal, fagocitosis, factores de transcripción, ARN polimerasa y ribosomal, también se reprimieron, de acuerdo a los estudios de Tanaka, 2009, Martinelli *et al.*, 2013, Werten *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2013 y Russo *et al.*, 2013 estas vías son importantes en el transporte de péptidos y proteínas, para la reparación y proliferación neoplásica. Al verse reprimidas las vías esenciales para el desarrollo de del cáncer, las células disminuyen su población.

Distintos autores establecen que el VOSO_4 influye en algunas vías biológicas del cáncer, muy similar a lo que se reporta en el presente trabajo de investigación como MAPK, PPAR y ribosomal, por otro lado, también se presentan rutas que no son similares a los resultados de este estudio como fosforilación de proteínas AP-1, MEK-q, ERK-1, JNK-1, PI-3K y NF-kB y la sobre expresión de BcL-2 (Pandey *et al.*, 1995, Markopoulou *et al.*, 2009, Evangelou, 2002, Novothy y Kombian, 2014).

Entre los genes que se sobre expresaron en las líneas cancerígenas después de la exposición a las nanopartículas de fosfato de vanadio, están involucradas las vías de interacción de receptores: uniones estrechas, fagosoma, lisosoma, ruta de señalización del Hippo y ribosomal. En las investigaciones de Maurer *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2015, Lai *et al.*, 2005, Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2004, Moriceau *et al.*, 2009, San Martin *et al.*, 2008 y Ling *et al.*, 2007 demuestran que estas vías están involucradas en la migración y transporte de proteína e iones, a través de canales iónicos o endocitosis. Por lo cual las nanopartículas de fosfato de vanadio posiblemente se unieron a la membrana de las células cancerígenas principalmente a los receptores toll y de acuerdo a las evidencias que el pH de estas células es bajo, las nanopartículas liberan el ion VO^{2+} . En estudios de Evangelou, 2002, Irving *et al.*, 2017, Tesmar *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2010, Novothy y Kombian, 2014, Abakumova *et al.*, 2012 plantean que el ión atraviesa la membrana por medio de los canales iónicos y las nanopartículas pasan por endocitosis (Pandey *et al.*, 1995, Markopoulou *et al.*, 2009, Evangelou, 2002, Novothy y Kombian, 2014, Maurer *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2015, Uehara *et al.*, 2014, Liao *et al.*, 2014, Wahl y Grant, 2000).

En otros resultados de este estudio los genes que se sobre expresaron en las líneas cancerígenas, están involucradas las vías de fosforilación oxidativa, vías metabólicas y apoptosis. Comparado con reportado por García-Bermúdez y Cueva, 2016, Vives-Bauza *et al.*, 2010, Casemet, 2016 y Rönn *et al.*, 2008 la ruta de fosforilación oxidativa incrementa su función del transporte de electrones, incluyendo ATP sintasa, NADH y citocromo c oxidasa, juntos incrementan los niveles del estrés oxidativo en la mitocondria.

Según Mao *et al.*, 2019 el ion VO^{2+} se enlaza a la mitocondria y se une a la ATP para realizar la acción biológica.

Otra vía importante en la respuesta al estrés es sin duda NFKBIA (inhibición alfa) y AIFM1 (factor mitocondrial inductor de apoptosis), según Li *et al.*, 2004, Weerasinghe *et al.*, 2014, Lautraite *et al.*, 2002, Chag, 2002, Poter *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2007, Ye *et al.*, 2002, Murahashi *et al.*, 2003, Gallego *et al.*, 2004 y Son *et al.*, 2009 estas alteraciones y el daño mitocondrial antes mencionados reafirman que la principal causa muerte de las células cancerígenas es por apoptosis independiente de caspasas.

Los resultados obtenidos son similar con los trabajos de Zhao *et al.*, 2010, Korbecki *et al.*, 2012, Evangelou, 2002, Irving *et al.*, 2017, Tesmar *et al.*, 2017, Li *et al.*,

2010, Novothy y Kombian, 2014, Abakumova *et al.*, 2012 y Hong *et al.*, 2017 donde establecen que el VOSO_4 produce estrés oxidativo dañando la mitocondria y conduce a la apoptosis celular.

En los trabajos de Abdelhamid *et al.*, 2010 plantean que vanadio expuesto en las células HepG2 sobreexpresan el gen de CYP1A1 (Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 1) y en este trabajo también se presentó este gen, el cual induce apoptosis.

Según Dárcy, 2019, Tochigi *et al.*, 2013, Banfi *et al.*, 2004, Szurko *et al.* 2003, Wawrzynska *et al.* 2010 la apoptosis es conocida como muerte celular programada, se caracteriza principalmente por una variedad de estímulos extracelulares e intracelulares que regulan las vías de señalización, las cuales se traducen en el núcleo como la inactivación o la destrucción de proteínas y el citoesqueleto, además se suele relacionar con la pérdida de la función mitocondrial, que se refleja por una disminución en el potencial de la membrana de este orgánulo, la alta producción de ROS e induce la muerte celular. Se pueden establecer estos resultados de los genes sobreexpresados en las líneas cancerígenas expuestas a las nanopartículas de fosfato de vanadio, como base para continuar el estudio de la cuantificación de la producción de ROS.

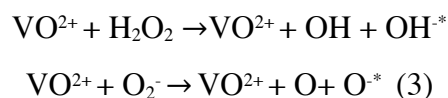
8.6. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno

En cuanto a los resultados de la cuantificación en la producción de ROS, se observó que las nanopartículas de $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en HTB-22 sobrepasa el porcentaje de la fluorescencia en un 31% con respecto al control XO. Con este resultado se confirma que las nanopartículas generan ROS en las células cancerígenas.

Comparado con la investigación de Akhtar *et al.*, 2017, Wu, 2006 las células cancerosas aumentan el estrés intrínseco generado por las ROS, debido en gran parte al aumento de la actividad metabólica y los defectos en la vía apoptótica, en comparación con las células no cancerosas. En otro estudio de Pelicano *et al.*, 2004 expresan que las cantidades excesivas de ROS afectan las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN en las células cancerosas.

Tomando en consideración los antecedentes de Ray *et al.*, 2006, Kowalski *et al.*, 2019, Capella *et al.*, 2002, Irving y Stoker, 2017, el sulfato de vanadio sobre las células MCF-7 y las células de cáncer de páncreas ingresa al interior para generar cambios de ROS como O_2^- y H_2O_2 e induciendo apoptosis. Comparado con Sakurai, 1994, Teicher, 2009, Semenza, 2007, Persi *et al.*, 2018, Reshkin *et al.*, 2014 y Alfarouk *et al.*, 2014 presentan la misma situación, en donde el ion VO^{2+} actúa en las células cancerosas, uniéndose a la membrana celular, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), causando la escisión del ADN e induciendo la muerte celular.

En otro trabajo de Capella *et al.*, 2002, Irving y Stoker, 2017, las ROS pueden reaccionar con VO^{2+} a través de la reacción Fenton, para generar radicales hidroxilos formando peroxovanadio como lo propone Evageluo, 2002 en la reacción química (3), donde las células cancerosas en el ambiente débilmente ácido en presencia del ion VO^{2+} , H_2O_2 y oxígeno, produce una producción de radicales libres:



De acuerdo con los antecedentes e investigaciones establecidas en este proyecto, en los resultados de la técnica de microarreglos de ADN y la cuantificación de la producción de ROS de las nanopartículas de fosfato de vanadio, se sugiere que la muerte celular de las células cancerígenas HTB-22 es a través de la apoptosis e inducida por el daño mitocondrial provocado por la producción de ROS.

9. CONCLUSIONES

1. Se confirmó la composición de las nanopartículas de fosfato de vanadio a través de las técnicas de DRX y FTIR.
2. Se obtuvieron nanopartículas esféricas de fosfato de vanadio con diámetros promedio de 40, 55, 70 y 75 nm.
3. Se demostró mediante UV-Vis la liberación del ion VO^{2+} durante la dispersión de las nanopartículas de fosfato de vanadio en solución ácida.
4. Las nanopartículas de fosfato de vanadio **V13**, **V17** y **V21** mostraron baja toxicidad sobre las líneas celulares CCL-13, CCL-81 y alta toxicidad en la línea celular 55-X.
5. Las nanopartículas de fosfato de vanadio **V13**, **V17** y **V21** mostraron actividad anticancerígena sobre las líneas celulares HTB-35, HTB-38, HTB-22 y HTB-177.
6. Las nanopartículas de fosfato de vanadio **V13** y **V21** demostraron actividad antibacteriana en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

7. Las nanopartículas de fosfato de vanadio **V13**, **V17** y **V21** inhibieron el crecimiento de *Lomentospora prolificans* fármaco-resistente.
8. El análisis de microarreglo de ADN de las nanopartículas de fosfato de vanadio **V21** sobre HTB-22 demostró inhibición en las vías de supervivencia y proliferación celular, mediante la generación de estrés oxidativo en la mitocondria e indujeron la apoptosis.
9. Se confirmó la sobre producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de fosfato de vanadio **V21** sobre la línea celular HTB-22.
10. Las hipótesis planteadas en este trabajo se acepta parcialmente, debido a que las actividades evaluadas no pudieron ser demostradas en todas las líneas celulares y en todos los microorganismos planteados.

10. PERSPECTIVAS

1. Comprobar los genes implicados en el mecanismo de acción de las nanopartículas de fosfato de vanadio reportados en el microarreglo, mediante la técnica de qPCR.
2. Determinar la genotoxicidad de las nanopartículas de fosfato de vanadio.
3. Evaluar la farmacocinética y la farmacodinamia de las nanopartículas de fosfato de vanadio en un modelo *in vivo*.

LITERATURA CITADA

1. Abakumova, O. Y., Podobed, O. V., Belayeva, N. F., Tochilkin, A. I. 2012. Anticancer activity of oxovanadium compounds. *Biomedical chemistry*, 6, 164-170.
2. Abdelhamid, G., Anwar-Mohamed, A., Badary, O. A., Moustafa, A. A., el-Kadi, A. O. S. 2010. Transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP1A1 by vanadium in human hepatoma HepG2 cell. *Cell biology and toxicology*, 26, 421-434.
3. Aderibighe, B. A., 2015. Polymeric prodrugs containing metal-bases anticancer drugs. *Inorganic and Organometallic polymers*, 25, 339-353.
4. Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. A. M., Alhaslaq, H. A., Alshamsan, A. 2016. Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cell (HepG2). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 665-673.
5. Alastruey-Izquierdo, A., Melhem, M., Bonfietti, L. X., Rodriguez-Tudela, J. L. 2015. Septibility test for fungi: clinical and laboratorial correlation in medical mycology. *Medical Tropical*, 19, 57-64.
6. Alfarouk, K. O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A. K., Bashir, A. H. H., Elhassan, G. O., Ibrahim, M. E., Polo Orozco, J. D., Cardone, R. A., Reshkin, J. S., Harguindey, S. 2014. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1, 777-802.
7. Almasaudi, S. B. 2016. *Acinetobacter spp.* Nosocomial pathogens: epidemiology and resistance features. *Biological Sciences*, 1, 1-11.
8. Álvarez-Fraga, L., Vazquez-Ucha, J. C., Martinez-Guitian, M. 2018. Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the feoA gene in the pathogenesis of *A. baumannii*. *Virulence*, 1, 1-204.
9. Akhtar, M. J., Ahamed, M., Alhadlaq, H. A. 2017. Therapeutic targets in the selective killing of cancer cells by nanomaterials. *Clinica chemical Acta*, 469, 53-62.
10. Arredondo-Espinoza, E. U. 2010. Evaluación del efecto anticancerígeno y citotóxico *in vitro* de la porfirina no simétrica a3b ns1, el compuesto hs01 de la planta *hibiscus sabdariffa* y la proteína química e2- IL-18. Tesis, 149.
11. Arredondo-Espinoza, E. U. 2014. Síntesis de Porfirinas y metoloporfirinas no simétricas funcionalizadas con L-glutamato y Evaluación de sus propiedades fotodinámicas y anticancerígenas. Tesis de Doctorado, 159.
12. Arredondo-Espinoza, E. U., 2016. Syntesis and photodynamic activity of unsymmetrical A₃B tetraarylporphyrinins functionalized with L-glutamate and their Zn(II) and Cu(II) metal complex derivates. *Biomedical and Pharmacotherapy*, 82, 327-336.
13. Asilbekyan, S., Jensen, M. K., Campos, H., Linkletter, C. D., Loucks, E. B., Ordovas, J. M., Deka, R., Rimm, E. B., Baylin, A. 2012. Genetic variation in fatty acid elongases is not associated with intermediate cardiovascular phenotypes or myocardial infarction. *Clinical Nutrition*, 66, 353-359.
14. Azarkamanzad, Z., Farzaneth, F., Maghami, M., Simpson, J., Azarkish, M. 2017. Syntesis, characterization and immobilization of a novel mononuclear vanadium (V) complex on modifield magnetic nanoparticles as catalyst for epoxidation of allyl alcohols. *Applied Organometallic Chemistry*, 1, 1-14.
15. Badwaik, V. D., Willis, C. B., Perder, D. S., Paripelly, R., Shah, M., Kherde, Y. A., Vangala, L., Gonzalez, M. S., Dakshinamurthy, R. 2013. Antibacterial gold nanoparticles-biomass assisted synthesis and characterization. *Biomedical nanotechnology*, 10, 1716-1723.
16. Banfi, S., Carusco, E., Caprioli, S., Mazzagatti, L., Canti, G., Ravizza, R., Garibaldi, M., Monti, E. 2004. Photodynamic Effects of porphyrin and clorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma Cells. *Bio-organic and Medical Chemistry*, 12, 4853-4860.
17. Bar-Zeev, M., Livney, Y. D., Assaraf, Y. G. 2017. Targeted nanomedicina for cancer therapeutics: towards precision medicine overcoming drug resistance. *Drug resistance updates*, 31, 15-30.
18. Bass, D. A., Parce, J. W. 1983. Flow cytometric studies of oxidante stress product formation formation by neutrophils: a grade response to membrane stimulation. *Immunology*, 130, 1910-1917.
19. Benedí, J., Gómez-Del Rio, M. A. 2006. Fármacos antineoplásicos. *Fármacia profesional*, 20, 60-64.
20. Bhatia, S. 2016. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural polymer drug Delivery Systems*, 29, 33-93.
21. Blagosklonny, M. V. 2004. Analysis of FDA Approved Anticancer Drugs Reveals the Future of Cancer Therapy. *Cell Cycle*, 3, 1035-1042.
22. Bonomo, R. A., Szabo, D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectology*, 43, 49-56.
23. Borm, P. J. A., Robbins, D., Houbold, S. 2006. The potential risks of nanomaterials. *Fiber Toxicol*, 3, 1-11.
24. Borah, P., Datta, A. 2010. *Apply Catal. A:General*, 376, 19-24.
25. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 0, 0-31.

26. Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S., Kantardjiev, T. 2011. Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). *Chemistry biology*, 4, 185-191.
27. Capaccio, G. 2013. *Cancer Treatments*. Edi. Marshall Cavendish benchmark, 64, 20-42.
28. Capella, L. S., Gefé, M. R., Silva, Edson, F. E., 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. *Biochemistry and Biophysics* 406, 65-72.
29. Carmeli, Y., Tacconelli, E., Cavaleri, M., Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., Burkert, F. 2015. Antibiotic resistant bacteria, *PLoS One*, 10, 1-11.
30. Casalnuovo, A., Di Francesco, P., Garaci, E. 2004. Fluconazole resistance in *Candida*. *Pharmacological*, 8, 69-77.
31. Casemet, M. L. 2016. Cell metabolism. *Cell Biology*, 263-281.
32. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Antibiotic Resistance threats in the United States 2013, <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> (consultado el 5 de octubre del 2017).
33. Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T., Desavaux, M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Microbiology*, 4, 1-26.
34. Chang, N. S. 2002. The non-ankyrin C terminus of I κ B physically interacts with p53 in vivo and dissociates in response to apoptotic stress, hypoxia, DNA damage, and transforming growth factor- β 1-mediated growth suppression. *Biology Chemistry*, 277, 10323-10331.
35. Chen, N., Zhou, Q., Kang, H., Ji, G., Zhu, G., Zhang, Y., Chen, S., Chen, J., Feng, X., Hou, W. 2017. Power sources, 344, 185-194.
36. Chen, S., Seiler, J., Santiago-Reichert, M., Felber, K., Grummt, I., Voit, R. 2013. Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Molecular cell*, 52, 303-313.
37. Chitvezhath, M., Dhillon, M. K., Lim, J. Y., Laoui, D., Shalova, I. N., Teo, Y. L., Chen, J., Kamaraj, R., Kamaraj, R., Raman, L., Lum, J., Thamboo, T. P., Chiong, E., Zolezzi, F., Yang, Van Ginderacheter, J. A., Poidinger, M., Wong, A. S., Biswas, S. K. 2014. Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity*, 41, 815-829.
38. Dárcy, M. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. 43, 582-592.
39. Dai, Y., Qi, Zhang, X., Li, y., Chen, M., Zu, X. 2011. Crkl and p130(Cas) complex regulates the migration and invasion of prostate cancer cells. *Cell Biochemistry Function*, 29, 625-629.
40. Da Silva, C. G., Peters, G. J., Ossendorp, F., Cruz, L. J. 2017. The potential of multi-compound nanoparticles to bypass drug resistance in cancer. *Cancer Chemotherapy pharmacology*, 10, 1-14.
41. Dasgupta, S., Agarwal, M., Datta, A., Mater, J. 2002. *Chemistry communicator*, 12, 162-164.
42. Datta, A., Agarwal, M., Dasgupta, S. 2002. *Proc. Indian Acad. Sci. Chemistry. Science*, 114, 379-390.
43. David, M. Z., Daum, R. S. 2017. Treatment of *S. aureus* Infections. *Microbiology and Immunology*, 409, 1-7.
44. Desai, N. 2012. Challenges in Development of Nanoparticles-Based Therapeutics. 14, 282-295.
45. Dickinson, B. C., Chang, C. J. 2011. Chemistry and Biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Chemistry biology*, 7, 504-511.
46. Drug y Drug. <https://www.fda.gov/forpatients/approvals/drugs/> (consultado el 15 de septiembre del 2018).
47. Douglas, A., Skoog, F. J. H., Stanley, R., Crouch. 2008. *Principios de análisis instrumentales*, 6ta edición, Learning, 34-1063.
48. Evangelou, A. M. 2002. Vanadium in cancer treatment. *Oncology-hematology*, 42, 249-265.
49. Elizondo-Zertuche, M., Montoya, A. M., Robledo-Leal, E., Garza-Veloz, I., Sánchez-Núñez, A. L., Ballesteros-Elizondo, R., González, G. M. 2017. Comparative Pathogenicity of *Lomentospora Prolificans*. *Mycopathologia*, 5, 1-7.
50. Fanjul-Fernandez, M., Quesada, V., Cabanillas, R., Cadiñanos, J., Fontanil, T., Obaya, A., Ramsay, A. J., Llorente, J. L., Astudillo, A., Cal, S., López-Otin, C. 2013. Cell-cell adhesion genes CTNNA2 and CTNNA3 are tumour suppressors frequently mutated in laryngeal carcinomas. *Nature*, 4, 2531-2535.
51. Fathers, K. E., Bell, E. S., Rajadurai, C. V., Cory, S., Zhao, H., Mourskaia, A., Zuo, D., Madore, J., Monast, A., Mes-Masson, A. M., Grosset, A. A., Goboury, L., Hallet, M., Siegel, P., Park, M. 2012. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast cancer*, 14, 74-76.
52. 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. *Pharmacology and Toxicology*, 80, 202-206.
53. Fernandes, S., Sao-Jose, C. 2018. Enzymes and Mechanisms Employed by tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial cell Barriers. *Viruses*, 10, 1, 22.
54. Fukunda, N., Yamase, T. 1997. In vitro antibacterial activity of Vanadate and Vanadyl compounds against *Streptococcus Pneumoniae*. *Biology Pharmacy*, 20, 927-930.
55. Gallego, M., Joseph, B., Hemström, T. H., Tamili, S., Montrier, L., Kroemer, G., Formstercher, P., Zhivotovsky, B., Marchetti, P. 2004. Apoptosis inducing factor determines the chemoresistance of non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 23, 6282-6291.

56. García-Bermúdez, J., Cuezva, J. M. 2016. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochimica Biophysica Acta*, 1857, 1167-1182.
57. Goc, A. 2016. Biological activity of vanadium compounds, *Biology*, 1, 314-332.
58. Goodman Gilman, A. 2002. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial MC Graw Hill. Hardman y Limbird. IX, 1397-1476.
59. Goosens, V. J., Moteferrante, C. G., Dijil, J. M. 2014. The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1843, 1698-1706.
60. Gordon, N. C., Wareham, D. W. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Antimicrobiology Agents*, 35, 219-226.
61. Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. Hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
62. Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
63. Hancock, J. T., Desikan, R., Neil, S. J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemistry*, 29, 345-350.
64. Hedl, M., Zheng, S., Abraham, C. 2014. The IL18RAP region disease polymorphism decreases IL-18RAP/IL-18R1/IL-1R1 expression and signaling through innate receptor-initiated pathways. *Immunology*, 192, 5924-5932.
65. Himes, R. H., Kersey, R. N., Heller-Berttinger, I., Samson, F. E. 1976. Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine and Desacetyl Vincristine amine on Microtubules in vitro. *Cancer Research*, 36, 3798-3802.
66. Holko, P., Ligeza, J., Kisielewska, J., Kordowiak, A. M., Klein, A. 2008. The effect of vanadyl sulphate (VOSO₄) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines. *Pathology*, 59, 3-8.
67. Hong, X. L., Liu, L. J., Lu, W. G., Wang, X. B. 2017. A vanadium (V) terpyridine complex: synthesis, characterization, cytotoxicity in vitro and induction of apoptosis in cancer cells. *Transition metal chemistry*, 42, 459-467.
68. Huang, H., Wang, H., Luo, R. C. 2007. Inhibitory effects of cordyceps extract on growth of colon cancer cells. *Zhong*, 30, 310-313.
69. Hutchings, G. J. 2008. Heterogeneous catalysts. *Material chemistry*. 19, 1222-1235.
70. Igney, F., Krammer, P. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature cancer*, 2, 219-230.
71. Irving, E., Stoker, A. W. 2017. Vanadium Compounds as PTP Inhibitors. *Molecules*, 22, 1-19.
72. Ivankovic, S., Music, S., Gotic, M., Ljubetic, N. 2006. Anticancer Activity of Oxovanadium Compounds. *Biomedical Chemistry*, 59, 305-320.
73. Jahangirian, H., Kalantari, K., Izadiyan, Z., Rafiee-Moghaddam, R., Shamelli, K., Webster, T. J. 2019. A review of small molecules and drug delivery application using gold and iron nanoparticles. *Nanomedicine*, 14, 1633-1657.
74. Jeffrey, D., Jenks, M. D., Sharon, L., Reed, M. D., Seidel, D., Koehler, P., Oliver, A., Cornely, M. D., Sanjay, R., Mehta, M. D. 2018. Rare Mold Infections Caused by Mucorales, *Lomentospora Prolificans* and *Fusarium*, San Diego: The Role of Antifungal Combination Therapy. *Microbial agent*, 3, 2-23.
75. Jerez-Urriolagoitia, M. M. 2006 "Efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre microorganismos resistentes a los antibióticos" (Tesis UANL).
76. Jermal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
77. Jia, F., Lui, X., Li, L., Mallapragada, S., Narasimhan, B., Wang, Q. 2013. Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents. *Controlled Release*, 3, 1020-1034.
78. Jiang, Z., Klyukin, K., Alexandrov, V. 2016. Structure, hydrolysis and diffusion of aqueous vanadium ions from car-parrinello molecular dynamics. *Conference Proceeding*, 123, 1-21.
79. Jung, J., Park, W. 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Microbiology Biotechnology*. 99, 2533-2548.
80. Jones, M. N. 1967. The interacción of sodium dodecyl sulfate with polythelene oxide. *Colloid and Inteface science*, 23, 36-42.
81. Katzung, B. G., Trevor, A. J. 2007. *Farmacología*. Segunda edición, Mc Graw Hill, 102-140.
82. Kerr, J. F., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Cancer*, 4, 239-257.
83. Kéki, S., Torok, J., Deak, G., Daroczi, L., Zsuga, M. 2000. Silver nanoparticles by PAMAM-assisted photochemical reduction of Ag⁺. *Colloid and Interface Science*, 229, 550-553.
84. Keskinbora, K., Jamel, M. A. 2018. *Nanotechnology Applications and Approaches in Medicine: A Review*. *J Nanoscience and Nanotechnology Research*, 2, 1-5.
85. Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Pharmacol Toxicol*, 44, 239-267.
86. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V. Malorni, W., Knight, R. A., Placentini, M., Nagata, S., Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 12, 1463-1467.
87. Köpf-Maier, P. 1994. Complexes of metals other than platinum as antitumoral agents. *Clinic Pharmacol*, 47, 1-16.

88. Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. 2012. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Biochimica*, 59, 195-200.
89. Kowalski, S., Wyrzykowski, D., Hac, S., Rychlowski, M., Radomski, M. W., Inkielewicz-Stepniak, I. New Oxidovanadium (IV) Coordination complex containing 2-Methylnitritoltriacetate Ligands Induces Cell cycles arrest and autophagy in Human Pacreatic Ductal Adenocarcinoma cells lines. *Molecular Sciences*, 20, 1-20.
90. Kumar, V., Abbas, A, Fausto, N., Aster, J. 2010. *Patologia structural y funcional*. 8 edición. Elsevier saunders, 19-24.
91. Lai, Z. C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, LL., Li, Y. 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, 120, 675-685.
92. Lam, A. T. N., Yoon, J., Ganbold, E. O., Singh, D. K., Kim, D., Cho, K. H., Son, S. J., Choo, J., Lee, S. Y., Kim, S., Joo, S. W. 2014. Adsorption and desorption of tyrosine kinase inhibitor erlotinib on gold nanoparticles. *Colloid and Interface*, 425, 96-101.
93. Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Nanobiotechnology*. 8, 1-10.
94. Lautreite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O., Chipman, J. K. 2002. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 17, 45-53.
95. Le Bail, A., Ferey, G., Amoros, P., Beltran-Porter, G., Villeneuve, J. 1989. *Solid State Chemistry*, 79, 169-176.
96. Li, H., Lu, Q., Dong, L. H., Xue, H. Zhou, H. Y., Yang, H. J. 2007. Expression of fatty acid binding protein in human breast cancer tissues. *Bioscience and medicine*, 23, 312-318.
97. Li, S. Y., Gomelsky, M., Duan, J., Zhang, Z., Gomelskys, L., Zhang, X., Epstein, P. N., Rent, J. 2004. Overexpression of Aldehyde Dehydrogenase-2 (ALDH2) Transgene Prevents Acetaldehyde-induced cell Injury in Human Umbilical Vein Endotelial Cells. *Biological Chemistry*, 279, 11244-11252.
98. Li, Y. T., Zhu, C. Y., Wu, Z. Y., Jiang, M., Yan, c. W. 2010. Syntesis, crytal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds. *Transition metal chemistry*, 35, 597-603.
99. Liao, X. H., Wang, Y., Wang, N., Yan, T. B., Xing, W. J., Zheng, L., Zhao, D. W., Li, Y. Q., Lui, L. Y., Sun, X. G., Hu, P., Zhang, T. C. 2014. Human chorionic gonadotropin decreases human breast cancer cell proliferation and promote differentiation. *IUBMB*, 66, 352-360.
100. Licciardi, M., Scialabba, C., Florica, G., Cavallaro, G., Giammona, G. 2013. Polymeric Nanocarriers for magnetic targeted drug delivery: preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *Mol. Pharmaceutics*, 10, 4397-4407.
101. Lim, S. C., Vaughey, J. T., Harrison, W. T. A., Dussack, L. L., Jacobson, A. J., Johnson, J. W., 1996. *Solid State Ionics*, 84, 219-226.
102. Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G., Anderson, R. A. 2007. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *Cell Biology*, 176, 343-453.
103. Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A., Lubart, R. 2011. Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*, 22, 957- 963.
104. Lister, J. L., Horswill, A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Infection Microbiology*, 4, 1-9.
105. Liu, Y., Hui, S., Peng, X., Dong-Hai, X., Li-Hua, L., Recker, R., Deng, H. 2006. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: A 2004 update. *Bone Mineral Research*, 21, 1511-1535.
106. Lu, P., Weaver, V. M., Werb, Z. 2018. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Cell Biology*, 19, 395-406.
107. Lucio-Porto, R., Gómez, I. 2012. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*. 42, 833-838.
108. Markopoulou, S., Kontargiris, E., Batsi, C., Tzavara, T., Trougakos, I., Boothman, D. A., Gonos, E. S., Kolettas, E. 2009. Vanadium-induced apoptosis of Hacat cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. *HHS*, 276, 3784-3799.
109. Martinelli, D., Travaglini, L., Drouin, C. A., Ceballos-Picot, I., Rizza, T., Bertini, E., Carozzo, R., Petrini, S., de Lonalay, P., El Hachem, M., Hubert, L., Montpetit, A., Torre, G., Dionisi-Vici, C. 2013. MEDNIK syndrome: a novel defect of copper metabolism treatable by zinc acetate therapy. *Brain*, 136, 872-881.
110. Mao, F., Liu, Y., Ma, L., Lui, L., Jiang, A., Zhai, X., Zhou, J. 2019. Green synthesis of ultra-small Vox nanodots for acidic-activated HSP60 inhibition and therapeutic enhancement. *Biomaterial*, 194, 94-104.
111. Maurer, A. J., Bonney, P. A., Toho, L. C., Glenn, C. A., Agarwal, S., Battiste, J. D., Fung, K. M., Sughrue, M. E. 2015. Tumor necrosis-initiated complement activation stimulates proliferation of medulloblastoma cells. *Inflammation*, 64, 185-192.
112. Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O, I., Radomski, M. W. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Pharmacology*, 5, 552-560.
113. Meo, D., Reed, T. T., Venditti, P., Victor, V. M. 2016. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longvity*, 1-44.

114. Modrzewska, B., Kurnatowski P. 2013. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. *Annals of parasitology*, 59, 57-66.
115. Moriceau, S., Kantari, C., Mocek, J., Davezac, N., Gabillet, J., Guerrero, I. C., Brouillard, F., Tondelier, D., Sermet-Gaudelus, I., Danel, C., Leoir, G., Daniel, S., Edelman, A., Witko-Sarsat, V. 2009. Coronin-1 is associated with neutrophil survival and is cleaved during apoptosis: potential implication in neutrophils from cystic fibrosis patients. *Immunology*, 182, 7254-7263.
116. Mosmann, T. T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunology Methods*, 65, 55-63.
117. Mourtada-Maarabouni, M., Kirkham, L., Farzaneh, F., Willian, G. T. 2004. Regulation of apoptosis by fau revealed by functional expression cloning and antisense expression. *Oncogene*, 23, 9419-9426.
118. Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K. J., Ikebuchi, K., Yamaguchi, M., Yamada, Y., Sato, N., Fijihara, M., Kroemer, G., Ikeda, H. 2003. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *Leukocytes Biology*, 73, 399-406.
119. Napoli, C., Lerman, L., Sica, V., Lerman, A., Tajana, G., De Nigris, F. 2003. Microarray análisis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians. *Heart*, 89, 597-604.
120. Neshati, V., Matin, M. M., Iranshahi, M., Bahrami, A. R., Behravan, J., Mollazadeh, S., Rassouli, F. B. 2008. Cytotoxicity of Vincristine on the 5637 cell line is enhanced by combination with interferon. *Interaction*, 5, 317-322.
121. Niraula, T. P., Bhattarai, A., Chatterjee, S. K. 2014. Sodium dodecylsulphate: A very useful Surfactant for Scientific Investigations. *Knowledge and Innovation*, 2, 111-113.
122. Novothy, L., Kombian, S. B. 2014. Vanadium: possible use in cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Research*, 3, 97-102.
123. Ochoa, S. A., Lopez-Montiel, F., Escalona, G. 2013. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Medigraphic*, 2, 138-150.
124. Olazarán Santibáñez, F. E. 2013. Evaluación del efecto celular y molecular de derivados de azetidina-2-onas sobre líneas celulares. Tesis de Maestría, UANL, 104.
125. Olshefski, R. S., Ladisch, S. 2001. Glucosylceramide synthase inhibitor enhances vincristine-induced cytotoxicity. *Cancer*, 93, 131-138.
126. OMS Cancer (World Health Organization) http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_es.pdf?ua=1 (consultado el 15 de septiembre del 2018).
127. OMS principales enfermedades con problema de salud pública <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/> (consultado el 5 de octubre del 2018).
128. Özcelik, B., Karaoglu, T., Abbasoglu, U. 2004. Evaluation of cytotoxicity of some agents as a screening test in antitumoral activity using Vero, HeLa and Hep-2 cell cultures. *Pharmacy*, 1, 153-163.
129. Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles?. *Microbiology*, 73, 1712-1720.
130. Pandey, S. K., Chiasson, J. L., Srivastava, A. K. 1995. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 153, 69-78.
131. Patil, Y. B., Swaminathan, S. K., Sadhukha, T., Ma, L., Panyam, J. 2010. The use of nanoparticle-mediated gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials*, 31, 358-365.
132. Pazouki, M., Panda, T. 2000. Understanding the morphology of fungus. *Bioprocess Engineering*, 22, 127-143.
133. Pehar, M., Jonas, M. C., Hare, T. M., Puglielli, L. 2012. SLC33A1/AT-1 protein regulates the induction of autophagy downstream of IRE1/XBP1 pathway. *Biology Chemistry* 287, 29921-29930.
134. Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance*, 7, 97-110.
135. Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology*, 21, 538-82.
136. Perea, S., Patterson, T. F. 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases*, 35, 1073-1080.
137. Perez-Salas, S. O. 2016. Síntesis de nanopartículas de plata utilizando un extracto acuoso de *Petroselinum crispum* y evaluación de su actividad antibacteriana frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Tesis de licenciatura).
138. Persi, E., Duran-Frigola, M., Damaghi, M., Roush, W. R., Aloy, P., Cleveland, J. L., Gillies, R. J., Ruppin, E. 2018. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nature*, 9, 1-11.
139. Pioquinto-Avila, E. 2017. Evaluación de la Actividad anticancerígena y citotóxica de moléculas con afinidad al sitio de unión de la colchicina en la beta-tubulina. Tesis de maestría, UANL, 104.
140. Polte, J. 2015. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles-a new perspective. *CrytEngi*, 17, 6809-6830.

141. Poter, D. W., Ye, J., Ma, J., Barger, M., Robinson, V. A., Ramsey, D., MaLurin, J., Khan, A., Landsittel, D., Teass, A., Castranova, V. 2002. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF-kappa B activation, inflammation, cytokine production, and damage. *Toxicology*, 14, 349-367.
142. Puente-De León, C. E. 2016. Síntesis de nanopartículas de plata utilizando un extracto acuoso de *Mentha spicata* y evaluación de su actividad antimicótica frente a *E. coli* y *S. aureus* (Tesis de licenciatura).
143. Ramírez-Cabrera, M. A. 2010. Evaluación de la cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata. UANL. (Tesis doctoral).
144. Ray, R. S., Ran, B., Swami, B., Venu, V., Chatterjee, M. Vanadium mediated apoptosis and cycle arrest in MCF7 cell line. *Chemical-Biological Interactions*, 163, 239-247.
145. Rayner, C., Munckhuof, W. J. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infection caused by *S. aureus*. *Medicine*, 35, 1-9.
146. Reshkin, S. J., Greco, M. R., Cardone, R. A. 2014. Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philosophical transactions of the royal society*, 369, 1-9.
147. Rönn, T., Poulsen, P., Hansson, O., Holmkvist, J., Almegren, P., Nilsson, P., Toumi, T., Isomaa, B., Groop, L., Vaag, A., Ling, C. 2008. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 51, 1159-1168.
148. Russo, A., Esposito, D., Castillo, M., Pietropaolo, C., Crescenzi, E., Russo, G. 2013. Human rpL3 induces G₁/S arrest or apoptosis by modulating p21 (waf1/cip1) levels in a p53-independent manner. *Cell cycle*, 12, 76-87.
149. Saenz, G., Hernandez, M. C., Martínez, L. A. 2011. Síntesis Acuosa de Nanopartículas de Plata. *LatinAm. Metal*, 3, 34-35.
150. Sakurai, H. 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *E. Health perspectives*, 3, 35-36.
151. San Martín, C. D., Garri, C., Pizarro, F., Walter, T., Theil, E. C., Núñez, M. T. 2008. Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by mu2 (AP2)-dependent endocytocytosis. *Nutrition*, 138, 659-666.
152. Sárkay, A., Papp, Z., Sajó, I., Schay, Z. 2005. Unsupported pd nanoparticles prepared by radiolysis of PdCl₂. *Solid State Ionics*, 176, 209-25.
153. Schwab, M. 2008. *Encyclopedia of cancer*. 2nd edition, New York; Springer.
154. Semenza, G. L. 2007. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis*, 26, 223-224.
155. Sharma, C., Chowdhary, A. 2017. Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. *Microbial agent*, 1, 1-47.
156. Sharma S., Sharma N. 2013. Synthesis, characterization, electrochemistry and antimicrobial activities of bis (hydroxamato) oxidovanadium (IV) complexes. *Chemical*, 4, 108-119.
157. Shioda, N., Han, F., Morioka, M., Fukunaga, K. 2008. Bis(1-oxy-2pyridinethiolato) oxovanadium (IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 155, 876-887.
158. Shuang, W., Lia, L., Xioahui, N., Peidong, X., Yoxin, L. 2019. pH activated heat shock protein inhibition and radical generation enhanced NIR luminescence imaging guided photothermal tumor ablation. *International Pharmaceutical*, 566, 40-45.
159. Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R., Doak, S. H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano*, 1, 1-15.
160. Son, Y. O., Jang, Y. S., Heo, J. S., Chung, W. T., Choi, K., Lee, J. C. 2009. Apoptosis-inducing factor plays a critical role in caspase-independent, pyknotic cell death in hydrogen peroxide-exposed cells. *Apoptosis*, 14, 796-808.
161. Srivastava, A. K. 2000. Antidiabetic and toxic effect of vanadium compounds. *Molecular Cell Biochemical*, 206, 177-182.
162. Swietach, P., Harris, A. L., Vaughan-Jones. 2010. The tumor microenvironment: new insights into regulation of tumor pH by carbonic anhydrases. *Cancer Drug*, 4, 23-41.
163. Szurko, A., Krämer-Marek, G., Widel, M., Ratuszna, A., Habdas, J., Ku's, P. 2003. Photodynamic effects of two water soluble porphyrins evaluated on human malignant melanoma cells *in vitro*. *Acta Biochim*, 50, 1165-1174.
164. Tanaka, S. 2009. Biological roles of signaling adaptor protein CRK. *Seikagaku*, 81, 361-376.
165. Teicher, B. A. 2009. Acute and chronic *in vivo* therapeutic resistance. *Biochemistry Pharmacology*, 77, 1665-1673.
166. Taher, T. E., Tijjin, E. P., Beuling, E. A., Borst, J., Spaargaren, M., Pals, S. 2002. T. c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *Immunology*, 169, 3793-3800.
167. Tesmar, A., Wyrzkowski, D., Kruszynski, R., Niska, K., Inkielewicz-Stepniak, I., Drzewdzon, J., Jacewicz, D., Chmurzynski, L. 2017. Characterization and Cytotoxic effect of aqua-(2,2', 2''-nitriлотriacetato)-oxo-vanadium salts on human osteosarcoma cells. *Biometal*, 30, 261-275.
168. Thanh, N. T. N., Maclean, N., Mahiddine, S. 2014. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews*, 114, 7610-7630.

169. Tochigi, M., Inoue, T., Suzuki-Karasaki, M., Ochiai, T., Ra, C., Suzuki-Karasaki, Y. 2013. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation, *Oncology*, 42, 765-772.
170. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics. *CA Cancer for Clinicians*, 65, 87-108.
171. Torres-Martínez, Y. 2017. Evaluación de la actividad anticancerígena de nanopartículas de plata: efecto del estabilizante y aporte al mecanismo de acción. UANL. (Tesis de Maestría).
172. Uehara, T., Kanazawa, T., Mizukami, H., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Misawa, K., Carey, T. E., Suzuki, M., Ichimura, K., Ozawa, K. 2014. Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 haed and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer science*, 105, 72-80.
173. UANL, Manual de procedimientos en Microbiología clínica, Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, 1, 1-10.
174. Velázquez-Meza, M. E. 2005. Metilcil resistant *Staphylococcus aureus*. *Public health*, 47, 381-384.
175. Videira, P. A., Correia, M., Malagolini, N., Crespo, H. J., Ligeiro, D., Calais, F. M., Trindade, H., Dall'Olio, F. 2009. ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *Cancer BMC*, 9, 357-363.
176. Vives-Bauza, C., Margrané, J., Andreu, A. L., Manfredi, G. 2010. Novel role of ATPase subunit C targeting peptides beyond mitochondrial protein import. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 131-139.
177. Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics*, 9, 138-141.
178. Wahl, M. L., Grant, D. S. 2000. Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin's activity and on intracellular pH. *General Pharmacology*, 35, 277-285.
179. Wang, Q., Liu, T. T., Fu, Y., Wang, K., Yang, X. G. 2010. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. *Biology Inorganic chemistry*, 15, 1087-1097.
180. Wangchinda, W., Chongtrakool, P., Tanboon, J., Jitmuang, A. 2018. *Lomentospora prolificans* vertebral osteomyelitis with spinal epidural abscess in an immunocompetent woman: case report and literature review. *Medical Mycology Case reports*, 21, 26-29.
181. Waxman, D. J. 1983. Penicillin-bilding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Biochemical*, 52, 825-869.
182. Wawrzynska, M., Kalas, W., Bialy, D., Ziolo, E., Arkowski, J., Mazurek, W., Strzadala, L. 2010. In Vitro Photodynamic Therapy with Chlorin e6 Leads to Apoptosis of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arch. Immunology Therapy*, 58, 65-75.
183. Weerasinghe, S. V., Jang, Y. J., Fontana, R. J., Omary, M. B. 2014. Carbamoyl phosphate synthetase-1 is a rapid turnover biomarker in mouse and human acute liver injury. *Gastrointest Liver Physiology*, 307, G355- G364.
184. Weingarten, J. A., Paterson, D. L., Yu, V. L. 2003. Pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Disease*, 5, 159-169.
185. Weinberg, R. A. 2007. *The biology of cancer*. Garland Science, 297, 1092-1095.
186. Weinberg, R. A. 2008. Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*, 29, 1092-1095.
187. Weng, W., Al Otaibi, R., Alhumaimess, M., Conte, M., Bartley, J., Dummer, N. F., Hutchings, G. J., Kiely, C. J. 2011. Controlling vanadium phosphate catalyst precursor morphology by adding alkane solvents in the reduction step of VOPO₄·2H₂O to VOHPO₄·5H₂O. *Materials Chemistry*, 21, 16136-16146.
188. Werten, S., Mitschler, A., Romier, C., Gangloff, Y. C., Thuault, S., Davidson, I., Moras, D. 2002. Crystal structure of a subcomplex of human transcription factor TFIID formed by TATA binding protein-associated factors hTAF4 (hTAF(II)135) and hTAF12 (hTAF(II)20). *Biology Chemistry*, 277, 45502-45509.
189. Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., Van Delft, M. F. Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., Huang, D. C. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315, 856-879.
190. Wishart, D. S., 2019. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiological*, 22, 1819-1875.
191. Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Experimental & Clinical cancer Research*, 30, 85-87.
192. Worzala, T., Goetze, D., Fratzky, M. 1998. *Acta Cryst*, C54, 283-285.
193. Wozniak, K., Blasiak, J. 2004. Vanadyl sulfate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa cells. *A. Toxicology*, 78, 7-15.
194. Wu, S. Y., Fan, J., Hong, D., Zhou, Q., Zheng, D., Wu, D., Li, Z., Chen, R. H., Zhao, Y., Pan, J., Qi, X., Chen, C. S., Hu, S. Y. 2015. C3aR1 gene overexpressed at initial stage of acute myeloid leukemia-M2 predicting short term survival. *Leukemia and Lymphoma*, 56, 2200-2202.
195. Wu, W. S. 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progressor. *Cancer Metastasis*, 25, 695-705.
196. Xu, Q., Lam, K. 2003. Protein and chemical microarrays-powerful tools for proteomics. *Biomedical and Biotechnology*, 5, 257-266.
197. Yap, J. C., Malhotra, H. K., Yang, g. Y. 2010. Intensity modulated radiation therapy in the treatment of esophageal cancer. *Treatment cancer*, 2, 62-69.

198. Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., Wu, H. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature Structural and Molecular Biology*, 9, 680-684.
199. Zgoda, J R., Porter, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacterial and fungi, *Pharmacology Biology*, 39, 221-225.
200. Zhao, Y., Ye, L., Liu, H., Xia, Q., Zhang, Y., Yang, X., Wang, K. 2010. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *Inorganic Biochemistry*, 104, 371-378.
201. Zhou, L., Chang, D. C. 2008. Dynamics and structure the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *Cell Science*, 121, 2186-2196.

ANEXO A

ANTIBIOGRAMAS

Tabla 15. Antibiograma de los aislados clínicos de las bacterias fármacorresistentes

Antibióticos	Micoorganismos		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Levofloxacino	S	S	S
Gentamicina	S	S	S
Imipenem	R	S	
Tobramicina	S	R	
Amikacina	S	R	
Cefepime	S	R	
Ceftazidima	R	R	
Piperacilina/Tazobactam	S	R	
Ticarcilina	R	R	
Aztreonam	R		
Ciprofloxacino	S		R
Cefotaxima	R		R
Tetraciclina			S
Cloranfenicol			S
Clindamicina			S
Azitromicina			S
Trimetoprima/Sulfametoxazol			S

S: sensible, R: resistant

Tabla 16. Antibiograma de los aislados clínicos de los hongos fármacorresistentes

Antibióticos	Micoorganismos		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>
Anfotericina B	R	S	S
Fluconazol	R	R	R
Posaconazol	S		S
Voriconazol	S		
Itraconazol	R		

S: sensible, R: resistente

ANEXO B

ETAPAS DE DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO

Todos los agentes terapéuticos pasan por una serie de pasos de evaluación antes de poder determinar su utilidad en el mercado. Solo algunas moléculas llegan al estudio final, pasando por alrededor de 10 a 15 años de análisis durante dos etapas la preclínica y la clínica.

La fase preclínica tarda de 3-4 años consisten en:

- La síntesis y caracterización de distintos compuestos, moléculas o nanopartículas.
- La actividad toxicológica y farmacológica (*in vitro* e *in vivo*) de compuestos, moléculas o nanopartículas. Los modelos experimentales del cáncer *in vitro* se realizan en diferentes líneas celulares normales y cancerígenas (HTB-35, HTB-22, HTB-38 y HTB-177) y en las células bacterianas, hongos y levaduras.

La fase clínica consiste en tres fases:

- Fase I: Participan grupos pequeños de voluntarios sanos, sin embargo, para el caso de los compuestos, moléculas o nanopartículas anticancerígenas, esta etapa no se lleva a cabo.
- Fase II: Participan pacientes diagnosticados con el padecimiento que se desea combatir, pero sin tratamiento adicional.
- Fase III: Participan un número mayor de pacientes, se hacen pruebas aleatorias y controladas con un placebo.
- La fase IV, se trata de la postcomercialización que se ocupa de la detección, valoración y prevención de los efectos adversos o cualquier otro problema relacionado con el fármaco (FOOD y DRUG, 2018).

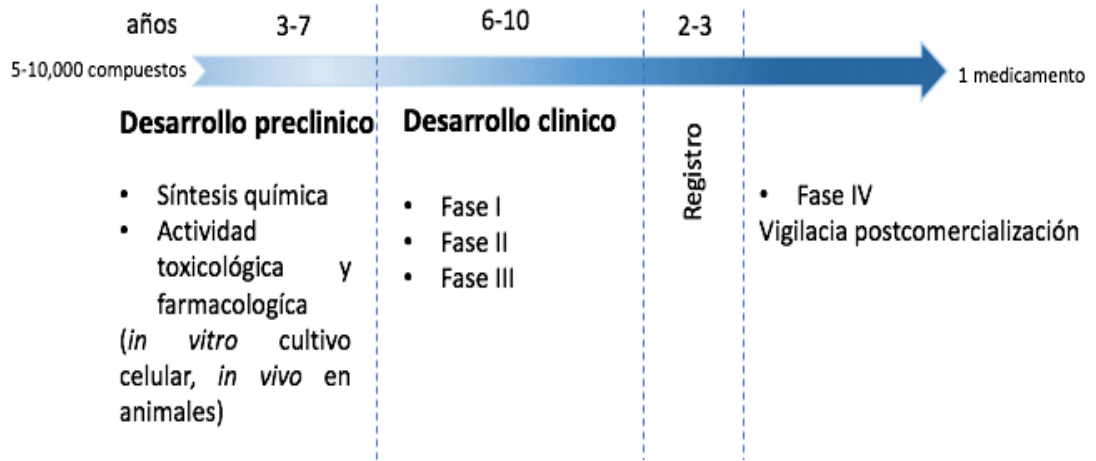


Figura 41. Etapas de desarrollo de un fármaco. (FOOD y DRUG, 2018).

ANEXO C

MATERIAL UTILIZADO EN TODAS LAS METODOLOGÍAS

Síntesis y caracterización de las nanopartículas

Se utilizó los siguientes materiales y equipos: sulfato de vanadio (VOSO_4), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 , Sigma Aldrich), dodecilsulfato de sodio (SDS, Sigma Aldrich), termómetro, bureta, probeta, placa petri, vasos precipitados, kitasato, refrigerante, pinzas, pizeta, corchos, soporte universal, matraz de tres bocas, porta objetos, frasco de 1 L, H_2O desionizada, planchas de calentamiento, ultrasonido, bomba de vacío y balanza granataria, Microscopio Electrónico de Barrido (SEB, FEI Nova NanoSEM), Espectrómetro de Infrarrojo (FTIR, Thermo Scientific model Nicolet 6700 spectrophotometer), Difracción de rayos X (Panalytical Empyrean) y Uv-Vis (NIR Cary Agilent Technologies).

Cultivo de líneas celulares, cultivo primario, actividad citotóxica

Se utilizó los siguientes materiales y equipos: frascos T-25, placas de 96 pz., pipetas estériles de 1, 5, 10 mL, puntillas de 10-100, 20- 200 y 1000 μL , pipetas automáticas de 5-10 μL , 50-100 μL , 20-200 μL y 1000 μL , cámara de Neubauer, membranas de filtración de 0.22 μm y 50 nm, pipetas pasteur, reservorio, tubos de 50 mL, tubos de 15 mL, algodón, papel de estraza, bolsas de RPBI, MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, Sigma Aldrich), medio EMEM (Medio esencial mínimo de Eagles, Caisson), tripsina/EDTA (Sigma aldrich), antibióticos (ampicilina, estreptomycin) (GIBCO), PBS (buffer salino de fosfatos), SFB (suero fetal bovino, Corning), etanol, cloro 5 %, H_2O miliQ, líneas celulares sin cáncer: CCL-13 (células de hígado), CCL-81 (células de riñón de mono verde), 55-X (células de pulmón) líneas celulares cancerígenas: HTB-35 (carcinoma escamoso de cérvix de segundo grado), HTB-22 (adenocarcinoma mamario), HTB-38 (adenocarcinoma colorrectal) y HTB-177 (carcinoma de pulmón de células grandes), lector de placas multipocillos (Elx800, BIOTEK), incubadora de CO_2 (Thermo Scientific), invertoscopio (Carl Zeiss), campana de bioseguridad nivel II (Banker), potenciómetro de pH, autoclave (All American) y centrifuga.

Cultivo de microorganismos y actividad antimicrobiana

Se utilizaron los siguientes materiales y equipos: agar nutritivo, agar Eosina y azul de metileno (EMB), agar sangre, agar y medio sabouraud dextrosa (SDA), agar y medio papa dextrosa (PDA), agar y Medio Mueller-Hinton, cajas petril, asa bacteriológica, placa multipocillos, matraz de 500mL, antibióticos de control, pipetas de 5-10 μ L, 50-100 μ L y pipeta multicanal 100-200 μ L, puntillas de 100 μ L, tubos para escala de McFarland, tubos eppendorf, ultrasonicador, incubadora de 30 y 37 °C, aislados clínicos con resistencia al tratamiento *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*.

Análisis de microarreglos

Se utilizaron los siguientes materiales y equipos: frascos T-25, pipetas automáticas de 5-10 μ L, 50-100 μ L, 20-200 μ L y 1000 μ L, cámara de Neubauer, tubos de 50 mL, tubos de 15 mL, PBS (buffer salino de fosfatos), SFB (suero fetal bovino, Corning), medio EMEM (Eagles, Caisson), tripsina al 0.25%, etanol, cloro 5 %, H₂O miliQ, HTB-22 (adenocarcinoma mamario), nanopartículas V21, incubadora de CO₂ (Thermo Scientific), invertoscopio (Carl Zeiss), campana de bioseguridad nivel II (Banker), potenciómetro de pH, autoclave (All American), microcentrifuga, vórtex, tubos de 1 mL, kit de extracción de ARN, microarreglos, Nanodrop 2000 Thermo Fisher Scientific, gel de agarosa al 1%, TAE 1X y fuente de poder.

Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Se utilizaron los siguientes materiales y equipos: Fluorómetro (Fluoroskan Ascent), diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), xantina oxidasa (XO), frascos T-25, placas de 96 pz., pipetas estériles de 1, 5, 10 mL, puntillas de 10-100, 20- 200 y 1000 μ L, pipetas automáticas de 5-10 μ L, 50-100 μ L, 20-200 μ L y 1000 μ L, cámara de Neubauer, membranas de filtración de 0.22 μ m y 50 nm, pipetas pasteur, reservorio, tubos de 50 mL, tubos de 15 mL, algodón, papel de estraza, medio MEM (Eagles, Caisson), tripsina/EDTA (Sigma aldrich), antibióticos (ampicilina, estreptomycin) (GIBCO), PBS (buffer salino de fosfatos), SFB (suero fetal bovino, Corning), etanol, cloro 5 %, H₂O miliQ, líneas

celulares sin cáncer: CCL-81 (células de riñón de mono verde), HTB-22 (adenocarcinoma mamario), incubadora de CO₂ (Thermo Scientific), invertoscopio (Carl Zeiss), campana de bioseguridad nivel II (Banker), potenciómetro de pH, autoclave (All American), centrifuga.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Adela Sánchez Oseguera



Candidato para obtener el Grado académico de
DOCTORADO EN CIENCIAS con **Orientación**
en Farmacia

Tesis:

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO Y ANTIMICROBIANO
DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE VANADIO Y APORTACIONES AL
MECANISMO DE ACCIÓN “*IN VITRO*”

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Bibliografía:

Nacida en D.F., México el 12 de agosto de 1991, Hija de Fulgencio O. Sánchez Reaño y Juana Oseguera Gómez

FORMACIÓN ACADEMICA

- | | |
|-------------|--|
| 2015 - 2017 | Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, México Nuevo León, México. |
| 2010 -2014 | Licenciatura: Químico Biólogo Parasitólogo, en la Universidad Autónoma de Guerrero, México. |

LOGROS ALCANZADOS

- Participación en el V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde, 4, 5 y 6 de septiembre del 2019 en Monterrey, N. L.
Modalidad Cartel: Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Nanopartículas de fosfato de vanadio. Autores: M. C. Adela Sánchez Oseguera, Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera, Dr. Raúl Lucio Porto, Dr. Eder U. Arredondo Espinoza, Dra. Gloria González González, Dr. José Daniel Velázquez Martínez.
- Artículo publicado: Anticancer activity of $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Nanoparticles *in vitro*
Autores: Adela Sánchez-Oseguera, Arnulfo López-Mélendez, Raúl Lucio-Porto, Omar González-Santiago, Eder Ubaldo Arredondo-Espinoza, Mónica Azucena Ramírez-Cabrera*
- Artículo en escritura: $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Nanoparticles with Antimicrobial activity
Autores: Adela Sánchez-Oseguera, Eder Ubaldo Arredondo-Espinoza, Gloria González-González, José Daniel Velázquez-Martínez, Raúl Lucio-Porto*, Mónica Azucena Ramírez-Cabrera*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Short communication

Anticancer activity of $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nanoparticles *in vitro*Adela Sánchez-Oseguera^{a,b,c}, Arnulfo López-Meléndez^{b,c}, Raúl Lucio-Porto^{b,c,*},
Eder Ubaldo Arredondo-Espinoza^a, Omar González-Santiago^a,
Mónica Azucena Ramírez-Cabrera^{a,**}^a Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos, Av. Guerrero S/n, Cd.

Tresiño, Monterrey, 64570, Nuevo León, México

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, San Nicolás de los Garza, 66455, Nuevo León, México^c Universidad Autónoma de Nuevo León, Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología, Apodaca, 66600, Nuevo León, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Anticancer activity
MCF-7
Nanoparticles
SiHa
Vanadium phosphate

ABSTRACT

In the present report the anticancer activity of $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nanoparticles with an average diameter of 75 nm and spherical morphology is evidenced. The toxicity against MCF-7 and SiHa cells is higher than for Vero cells indicating a selectivity towards tumor cells. The optimal concentration of $25 \mu\text{gml}^{-1}$ shows a viability of 85% for Vero cells, 56% for MCF-7 cells and 61% for SiHa cells. The mechanism of action is proposed and involves the dissolution of $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nanoparticles to release VO^{2+} and VO_2^+ ions. $\text{VOHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nanoparticles show a selectivity towards breast cancer cells compared to a human non cancer line indicating their potential application for cancer therapy.

1. Introduction

Novel approaches to design drugs against cancer is one of the most intense research field around the world [1]. This multifactorial disease is caused by a complex mixture of genetic and environmental factors leading to difficult prolonged treatments [2]. However, the drugs used are not selective for cancer cells, leading to toxicity in healthy cells, adverse effects [3,4] and frequently fail to produce a complete anti-cancer response due to the development of therapeutic resistance mechanisms [5,6].

For all the above-mentioned factors, new anticancer drugs with a better therapeutic index are needed to reduce the toxicity in non-carcinogenic cells and to improve efficiency of cancer therapies [7]. An alternative strategy is to develop non-conventional drugs such as, nanoparticles or inorganic compounds [8,9]. There are many reports on the literature that deals with the development of metallic nanoparticles such as Au, Ag, Ru, Bi, Cu and Sn with application in cancer therapy [10–15]. More recently, metal oxides nanoparticles have been developed as anticancer drugs. For instance, V_2O_5 , Mn_3O_4 , Fe_3O_4 , TiO_2 and ZnO were exposed to different cancer cell lines. Different mechanisms have been invoked to explain the anticancer activity of this nano-materials like mechanical damage to the cells, the inhibition of key

signaling regulators of programmed cell pathway, interruption of the mitochondrial electron transport leading to an irreversible membrane damage, among others [16–22].

Vanadium compounds have been also studied as a non-conventional drug to prevent the appearance of tumorigenesis and in the treatment of cancers, such as NH_4VO_3 and VOSO_4 , [24,25]. Previous studies of the anticancer activity of VOSO_4 solutions have been carried out in breast, cervix, colon, lung and prostate cancer cell lines [26,27]. It was pointed out that the antiproliferative effect of the vanadium salts is due to the vanadyl cation VO^{2+} that is formed in aqueous solutions by the dissolution of the inorganic salt [26,28,29]. The vanadyl cation VO^{2+} decreases cell viability in cancer cells by penetration through the cell membrane by means of passive diffusion and once in the intracellular space they cause structural changes that involve the generation of reactive oxygen species causing irreversible damage to the mitochondria, it is also reported that the ion can bind to proteins such as HSP60 or DNA to activate a cell death pathway [23,25,30–36].

It is well known that the alteration generated in cancer cells induce a great energy demand and greater oxygen consumption, which forces the cell to reprogram its metabolism in anaerobic conditions. This type of breathing causes the cells to excrete protons (H^+), giving rise to an extracellular acid microenvironment of cancer cells between pH rank

* Corresponding author. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, San Nicolás de los Garza, 66455, Nuevo León, México.

** Corresponding author. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, 66455, Nuevo León, México

E-mail addresses: raul.lucio@uanl.edu.mx (R. Lucio-Porto), monica.ramirez@uanl.edu.mx (M.A. Ramírez-Cabrera).<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102032>

Received 15 June 2020; Received in revised form 8 August 2020; Accepted 21 August 2020

Available online 29 August 2020

1773-2247/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.